

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Avaliação da capacidade imunogênica de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii* inativadas em modelo murino**

**Tatiana de Ávila Antunes**

Pelotas, 2010

**Tatiana de Avila Antunes**

**Avaliação da capacidade imunogênica de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii* inativadas em modelo murino**

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

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientador: Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, 2010

## **Dados de catalogação na fonte:**

( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

A636a Antunes, Tatiana de Avila

Avaliação da capacidade imunogênica de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii* inativadas em modelo murino / Tatiana de Avila Antunes ; orientador Mário Carlos Araújo Meireles; co-orientador Luiz Filipe Damé Schuch. - Pelotas, 2010.-102f. ; il..- Tese ( Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. *Sporothrix schenckii* 2.Imunoterapia 3.Esporotricose  
4.Imunoprofilaxia I Meireles, Mário Carlos Araújo  
(orientador) II .Título.

CDD 636.08

**Banca examinadora:**

Marlete Brum Cleff- UFPel

Patrícia da Silva Nascente- UFPel

João Luiz Zani- UFPel

Eliza Simone Viegas Sallis- UFPel

Luiz Filipe Damé Schuch (Suplente)

Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me deu a vida e que iluminou meus caminhos em todos os momentos;

Ao Miguel e nossa filha Bruna e aos meus pais, irmãos e demais familiares pelo amor e apoio em todos os momentos;

Ao meu orientador e professor Mário Carlos Araújo Meireles pela orientação, dedicação, pelos conhecimentos acadêmicos e experiência, pela amizade e disposição quando solicitado;

Ao Prof. Luiz Filipe Schuch, pela orientação e amizade que me acompanharam ao longo desses quatro anos;

Ao professor Telmo Vidor e Geferson Fischer pelo apoio nos momentos necessários e formulação das vacinas;

As professoras Simone e Margarida pela ajuda na realização da análise histopatológica;

A amiga e professora Márcia de Oliveira Nobre por ter me incentivado desde o início na realização dos estudos e pelo apoio e dedicação recebida;

Às colegas e amigas Anelise Martins, Helen Silveira Coimbra; Isabel Madrid; Rosema Santin, Anelise Fonseca, Luiza Osório Angelita, Marta, Ana Paula e Antonella Mattei pela ajuda em todos os momentos, obrigada por tudo;

As amigas pelo incentivo recebido;

As minhas amigonas Renata Osório de Faria, Lorena Leonardo Souza, Marlete Brum Cleff, Patrícia Nascente e Ana Raquel Meinerz principalmente pela amizade e carinho recebido, pelo auxílio, apoio e incentivo em todos os momentos;

Aos bolsistas e estagiários Angela, Franklin, Iara e Roberto que contribuíram muito para a realização do trabalho;

A funcionária Tati do laboratório de Micologia pela paciência, amizade e ajuda em todos os momentos;

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas pelo acondicionamento dos animais experimentais;

Aos professores das disciplinas cursadas pelo conhecimento recebido durante o curso de pós-graduação;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante o curso de Doutorado;

Aos meus amigos e demais familiares pelo apoio recebido;

Em especial, obrigado a todos meus colegas e amigos que ajudaram de forma incondicional para a realização do trabalho experimental;

A todos, o meu muito obrigado!

*“A vida passa e abre caminhos que  
não são percorridos em vão”*

**Frida Khalo**

*“Não se mede o estudo pelo número  
de páginas lidas numa noite ou pela  
quantidade de livros lidos num semestre.  
Estudar não é um ato de consumir idéias,  
mas de criá-las e recriá-las”*

**Paulo Freire**

## RESUMO

ANTUNES, Tatiana de Avila. **Avaliação da capacidade imunogênica de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii* inativadas em modelo murino.** 2010. 102f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientador: Luiz Filipe Damé Schuch

Esporotricose é uma micose subcutânea de caráter zoonótico, cosmopolita de evolução subaguda ou crônica que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* afetando o homem e várias espécies de animais, principalmente o felino doméstico, sendo considerada de interesse para a Saúde Pública. Considerando as dificuldades terapêuticas no tratamento da micose nessa espécie animal, incluindo toxicidade e o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos tradicionalmente utilizados na terapia da enfermidade o estudo objetivou avaliar a capacidade imunogênica de células leveduriformes de *S. schenckii* inativadas tanto na imunoprevenção como na imunoterapia da esporotricose. Foram utilizados 160 ratos albinos wistar (*Rattus norvegicus*) com 70 dias (80 na imunoprevenção e 80 na imunoterapia) sendo divididos em quatro grupos que receberam três doses do imunógeno a cada 14 dias. Os grupos foram divididos em: G1 (controle- óleo mineral), G2 (Ag+ adjuvante incompleto de freund), G3 (Ag + adjuvante completo de freund) e G4 (Ag + adjuvante incompleto de freund + própolis). Para preparação da vacina foi utilizado um isolado de *S. schenckii* na forma leveduriforme proveniente de um caso de esporotricose cutânea de felino doméstico. O fungo foi cultivado em meio líquido (Brain-Heart broth®), incubado durante 10 dias a 37°C e mantido sob agitação constante para obtenção da forma leveduriforme. A cultura foi filtrada em dupla camada de gaze estéril, centrifugada, lavada duas vezes com solução salina tamponada (PBS), homogeneizada e padronizada em  $10^8$  células de *S. schenckii*/ml. As células foram inativadas com thimerosal a 0,02% e posteriormente emulsificadas com óleo mineral, sendo as vacinas acondicionadas em frascos estéreis fechados e mantidas a temperatura de 4°C durante todo o período experimental. Foi utilizada uma dose de 0,1 ml/animal por via intramuscular. Os ratos que receberam a vacina como imunoprevenção após as três doses foram desafiados, sendo inoculados por via subcutânea com  $2 \times 10^3$  células/ml de *S. schenckii* e avaliados durante 10 dias. Os animais tratados com imunoterápico foram inoculados com o agente e após 14 dias receberam três doses do imunógeno. Após o período experimental todos foram eutanasiados e feita necropsia para realização de análise micológica, histopatológica e contagem das Unidades Formadoras de Colônias.



Os resultados obtidos foram: na imunoprofilaxia as alterações anatomopatológicas demonstraram diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) dos grupos vacinados (G2, G3 e G4) quando comparados ao grupo controle (G1) em relação ao ponto de inoculação, não havendo diferença estatística na avaliação dos órgãos internos. Na imunoterapia a avaliação clínica no ponto de inoculação evidenciou que não houve diferença estatística entre os quatro grupos experimentais, porém ao final do experimento os grupos G1, G2, G3 e G4 apresentavam respectivamente 8,3%, 58,3%, 41,7% e 50% das lesões em processo de regressão e cicatrização. Em relação a lesões em outras áreas corpóreas somente na última semana do experimento os grupos G2 e G3 diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do grupo controle (G1). Alterações anatomopatológicas foram encontradas nos órgãos internos dos quatro grupos experimentais, porém com um maior número de lesões nos animais do grupo CONT. Tanto na imunoprofilaxia quanto na imunoterapia o retroisolamento do agente e Contagem das Unidades Formadoras de colônias demonstraram que houve crescimento do *S. schenckii* nos quatro grupos experimentais, porém com menor frequência e quantificação de UFCs no ponto de inoculação e órgãos internos dos grupos G2, G3 e G4. Na avaliação histopatológica foi verificada a presença de granulomas e piogranulomas focais e multifocais no ponto de inoculação e órgãos internos dos quatro grupos, porém os animais que receberam imunoprofilático as alterações ficaram mais restritas ao ponto de inoculação. Os resultados permitem concluir que as três formulações de vacinas (AIF, ACF e AIFP) utilizadas como imunoprofilático e imunoterápico não foram eficazes para a remissão completa das lesões de esporotricose cutânea experimental.

**Palavras-chave:** *S. schenckii*, esporotricose, imunoprofilaxia, imunoterapia

## ABSTRACT

ANTUNES, Tatiana de Avila. **Evaluation of the immunogenic capacity of yeast cells of *Sporothrix schenckii* inactivated in a murine model.** 2010. 102f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientador: Luiz Filipe Damé Schuch

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis of zoonotic character, cosmopolitan development subacute or chronic whose agent the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* affecting man and various species of animals, especially the domestic cat, being considered of interest to Public Health. Considering the difficulties in the therapeutic treatment of ringworm in this animal species, including toxicity and the development of resistance to antifungal agents traditionally used to treat disease the study aimed evaluate the immunogenic capacity of yeast cells of *S. schenckii* inactivated both in immunoprophylaxis and immunotherapy of sporotrichosis. We used 160 Wistar albin rats (*Rattus norvegicus*) at 70 days (80 in immunoprophylaxis and 80 in immunotherapy) were divided into four groups that were immunized three times every 15 days. The groups were divided as follows: G1 (control, mineral oil), G2 (Ag + incomplete freund adjuvant), G3 (Ag + Freund's complete adjuvant) and G4 (Ag + incomplete freund adjuvant + propolis). Preparation of the vaccine used was an isolate of *S. schenckii* from yeast in the form of a case of cutaneous sporotrichosis of domestic cat. The fungus was grown in medium liquid (Brain-Heart broth®), incubated for 10 days at 37°C and kept under constant agitation to obtain the yeast form. The culture was filtered through a double layer of sterile gauze, centrifuged, washed twice with buffered saline (PBS), homogenized and standardized in 10<sup>8</sup> cells of *S. schenckii* / ml. The cells were inactivated with 0.02% thimerosal and then emulsified with mineral oil, and vaccines packaged in sterilized sealed and kept at a temperature of 4°C throughout the experimental period. Was used a dose of 0.1 ml/animal intramuscularly. Rats that received the vaccine as immunoprophylaxis after the three doses were challenged, and inoculated subcutaneously with 2X10<sup>3</sup> cells / ml of *S. schenckii* in the right footpad and evaluated for 10 days. Animals treated with immunotherapy were inoculated with the agent after 14 days and received

three doses of immunogen. After the experimental period all were euthanized and necropsy to mycological examination, histopathology and counting colony forming units. The results were: immunoprophylaxis in the pathological changes showed statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) in the vaccinated groups (G2, G3 and G4) compared to the control group (G1) to the point of inoculation, with no statistical difference the evaluation of internal organs. Immunotherapy clinical evaluation at the injection showed that there was no statistical difference among the four experimental groups, but at the end of the experiment the groups G1, G2, G3 and G4 had respectively 8.3%, 58.3%, 41.7 % and 50% of injuries in the process of regression and healing. In relation to injuries in other body areas only in the last week of the experiment, the G2 and G3 differ statistically ( $P < 0.05$ ) in the control group (G1). Pathological changes were found in the internal organs of the four experimental groups, but with a greater number of lesions in group CONT. Both in immunoprophylaxis and immunotherapy the retroisolation of the agent and count of colony forming units showed that there was growth of *S. schenckii* in the four experimental groups, but with less frequency and quantification of CFU at the point of inoculation and internal organs of the groups G2, G3 and G4. In histopathologic evaluation to determine the presence of granulomas and pyogranulomas focal and multifocal in the point of inoculation and internal organs of the four groups, but the animals that received immunoprophylactic changes were more restricted to the point of inoculation. The results indicate that the three vaccine formulations (AIF ACF and AIFP) used as immunoprophylactic and immunotherapy have not been effective for the remission of the lesions of experimental cutaneous sporotrichosis.

**Keywords:** *S. schenckii*, sporotrichosis, immunoprophylaxis, immunotherapy

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Colônia filamentosa de <i>Sporothrix schenckii</i> proveniente de esporotricose disseminada felina (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....                                                                                                                                                                                                                                                   | 40 |
| Figura 2 | Forma leveduriforme do <i>Sporothrix schenckii</i> para formulação do imunoprolático e imunoterápico. (A) Fungo em BHI líquido após 10 dias de cultivo; (B) <i>S. schenckii</i> após ser filtrado em dupla camada de gaze estéril; (C) lavagem com solução salina tamponada (PBS); (D) <i>S. schenckii</i> padronizado em 10 <sup>8</sup> células/ml (Setor de Micologia, FV-UFPEl)..... | 41 |
| Figura 3 | <i>Sporothrix schenckii</i> no meio BHI líquido sob agitação constante de 100 rpm a 37 <sup>0</sup> C (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....                                                                                                                                                                                                                                                | 42 |
| Figura 4 | Procedimento para realização da curva de inativação do <i>Sporothrix schenckii</i> (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 43 |
| Figura 5 | Preparação vacina com adjuvante incompleto de Freund. (A) Emulsificador com óleo mineral; (B) <i>Sporothrix schenckii</i> inativado sendo colocado juntamente com o óleo para realização da emulsificação (Laboratório Virologia, FV-UFPEl).....                                                                                                                                         | 45 |
| Figura 6 | Preparação da vacina com adjuvante completo de Freund. (A) adjuvante completo de Freund; (B) emulsificador; (C) colocação do <i>Sporothrix schenckii</i> inativado juntamente com ACF para emulsificação; (D) realização da emulsificação (Laboratório Virologia, FV-UFPEl).....                                                                                                         | 45 |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 7  | Preparação da vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis. (A) colocação do <i>Sporothrix schenckii</i> inativado juntamente com AIF para emulsificação; (B) colocação do extrato etanólico de própolis brasileira para emulsificação (Laboratório Virologia, FV-UFPEL)..... | 46 |
| Figura 8  | Acondicionamento das vacinas em frascos estéreis (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                                                                     | 46 |
| Figura 9  | Preparo do inóculo fúngico: retirada de fragmentos da colônia de <i>Sporothrix schenckii</i> do meio de cultura com auxílio de lâmina de bisturi estéril (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                             | 47 |
| Figura 10 | Inoculação subcutânea no coxim plantar direito de rato wistar com a suspensão fúngica contendo $2 \times 10^3$ células de <i>S. schenckii</i> /ml (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                    | 48 |
| Figura 11 | Maceração do fragmento de lesão do fígado com o auxílio de gral e pistilo para realização da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                     | 50 |
| Figura 12 | Procedimento para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). (A) diluições seriadas da suspensão fúngica; (B) transferência da suspensão fúngica para placas; (C) e (D) suspensão fúngica semeada através da técnica de espalhamento com alça de Drigalski.....                 | 50 |
| Figura 13 | Aplicação de 0,1 ml do imunoterápico por via intramuscular em rato albino wistar (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                                     | 52 |
| Figura 14 | Cultivo do baço para retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                                                  | 53 |
| Figura 15 | Felino doméstico com esporotricose (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                                                                                   | 56 |
| Figura 16 | Proprietário com lesão cutânea fixa de esporotricose demonstrando envolvimento zoonótico (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                             | 56 |
| Figura 17 | <i>Sporothrix schenckii</i> após cultivo no tempo zero de inativação (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                                                 | 57 |
| Figura 18 | Cultivo após 24 horas de inativação, sem crescimento de <i>Sporothrix schenckii</i> (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....                                                                                                                                                                  | 57 |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19 | Freqüência de lesões anatomopatológicas encontradas no ponto de inoculação, fígado e baço após imunoprofilaxia nos quatro grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPeI)....                                                                                             | 59 |
| Figura 20 | Escore de alterações anatomopatológicas observadas nos quatro grupos experimentais após imunoprofilaxia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                   | 60 |
| Figura 21 | Presença de edema e úlcera no coxim plantar direito de animal pertencente ao grupo controle (G1) (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                          | 60 |
| Figura 22 | Fígado de animal do Grupo 3 (ACF) sem alterações anatomopatológicas (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                                                       | 61 |
| Figura 23 | Retroisolamento fúngico no coxim plantar direito, órgãos internos e testículo dos quatro grupos experimentais após utilização do imunoprolático (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                           | 62 |
| Figura 24 | Escore de retroisolamento fúngico observados nos quatro grupos experimentais após imunoprofilaxia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                         | 63 |
| Figura 25 | Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de <i>Sporothrix schenckii</i> nos quatro grupos experimentais após imunoprofilaxia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                          | 64 |
| Figura 26 | Unidades Formadoras de Colônias de <i>Sporothrix schenckii</i> do fígado de animal pertencente ao grupo controle (G1) após imunoprofilaxia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                | 65 |
| Figura 27 | Corte histológico pertencente a rato do G2: coxim plantar direito demonstrando presença de célula gigante tipo corpo estranho com células leveduriformes de <i>Sporothrix schenckii</i> intracitoplasmático. P.A.S, objetiva 40X (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPeI)..... | 66 |
| Figura 28 | Média dos escores da avaliação clínica semanal durante tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                       | 68 |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 29 | Lesões de esporotricose no coxim plantar direito na semana 4 do experimento com imunoterápico: (A) G1- presença de úlceras e crostas; (B) G2- presença de úlceras e crostas; (G3)- ulcera iniciando processo de regressão das lesões; (G4) presença de úlcera e exsudato (Setor de Micologia, FV-UFPeI)..... | 68 |
| Figura 30 | Rato wistar pertencente ao grupo controle (G1) apresentando ulcera, crosta e linfangite ascendente no membro posterior direito durante imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI)....                                                                                                                       | 69 |
| Figura 31 | Frequência de lesões em outras áreas corpóreas nos quatro grupos experimentais durante imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                                                      | 70 |
| Figura 32 | Rato wistar pertencente ao grupo 4 (AIFP) apresentando nódulo no membro anterior esquerdo durante imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                                           | 71 |
| Figura 33 | Frequência de alterações anatomopatológicas nos órgãos internos, linfonodo poplíteo e testículo nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                        | 72 |
| Figura 34 | Escore de alterações anatomopatológicas observadas nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                                                     | 73 |
| Figura 35 | Fígado de animal do grupo 3 (ACF) apresentando lesões puntiformes esbranquiçadas disseminadas após realização de necropsia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                               | 73 |
| Figura 36 | Retroisolamento fúngico no coxim plantar direito, órgãos internos e testículo dos quatro grupos experimentais após utilização do imunoterápico (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                           | 74 |
| Figura 37 | Escore de retroisolamento fúngico observados nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                                                           | 75 |
| Figura 38 | Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de <i>Sporothrix schenckii</i> nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI).....                                                                                                                                            | 75 |

- Figura 39 Corte histológico pertencente a rato do G3 (ACF): Hepatite piogranulomatosa focal rodeada por cápsula fibrosa. H.E, objetiva 40X(Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl)..... 77
- Figura 40 Corte histológico pertencente a rato do G3 (ACF): Periorquite piogranulomatosa multifocal à coalescente. H.E, objetiva 10X (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl)..... 77



## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1  | Formulações das vacinas utilizadas como imunoprolático e imunoterápico e seus respectivos adjuvantes.....                                                                                         | 44 |
| Tabela 2  | Contagem das Unidades Formadoras de colônias (UFCs) após cultivo das amostras inativadas com Thimerosal a 0,02% num período de 24 horas.....                                                      | 57 |
| Tabela 3  | Frequência de lesões anatomopatológicas encontradas no ponto de inoculação, em órgãos internos e testículo após imunoprolaxia nos quatro grupos experimentais e média dos escores.....            | 59 |
| Tabela 4  | Frequência de retroisolamento fúngico no ponto de inoculação, órgãos internos e testículos dos quatro grupos experimentais após imunoprolaxia e média dos escores.....                            | 62 |
| Tabela 5  | Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia de <i>Sporothrix schenckii</i> referentes ao ponto de inoculação e fígado dos animais conforme os grupos experimentais.....                      | 64 |
| Tabela 6  | Frequência semanal da avaliação clínica no ponto de inoculação durante tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais.....                                                          | 67 |
| Tabela 7  | Média dos escores da avaliação clínica semanal no ponto de inoculação durante imunoterapia nos quatro grupos experimentais.....                                                                   | 67 |
| Tabela 8  | Frequência semanal de lesões em outras áreas corpóreas durante tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais.....                                                                  | 70 |
| Tabela 9  | Frequência de lesões anatomopatológicas encontradas em órgãos internos, linfonodo poplíteo e testículo após tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais e média dos escores..... | 72 |
| Tabela 10 | Frequência de retroisolamento fúngico no ponto de inoculação, órgãos internos e testículos dos quatro grupos experimentais e média dos escores.....                                               | 74 |

## SUMÁRIO

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>RESUMO</b> .....                                                         | 7  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                       | 9  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                                               | 11 |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                               | 16 |
| <b>SUMÁRIO</b> .....                                                        | 17 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                   | 19 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                        | 24 |
| 2.1 <i>Sporothrix schenckii</i> .....                                       | 24 |
| 2.2 Esporotricose.....                                                      | 27 |
| 2.3 Resposta imune frente ao <i>Sporothrix schenckii</i> .....              | 32 |
| 2.4 Imunoprofilaxia e imunoterapia.....                                     | 34 |
| 2.5 Adjuvantes.....                                                         | 38 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                           | 40 |
| 3.1 Preparação do imunoprofilático (vacina) e imunoterápico.....            | 40 |
| 3.1.1 Isolado de <i>Sporothrix schenckii</i> .....                          | 40 |
| 3.1.2 Cultivo do <i>Sporothrix Schenckii</i> para formulação da vacina..... | 41 |
| 3.1.3 Inativação do <i>Sporothrix schenckii</i> .....                       | 41 |
| 3.1.4 Curva de inativação do <i>Sporothrix schenckii</i> .....              | 42 |
| 3.1.4 Formulações das vacinas (imunoprofilático e imunoterápico).....       | 43 |
| 3.2 Imunoprofilaxia (vacinação).....                                        | 46 |
| 3.2.1 Modelo experimental.....                                              | 46 |
| 3.2.2 Preparo do inóculo fúngico.....                                       | 47 |
| 3.2.3 Inoculação Experimental.....                                          | 48 |
| 3.2.4 Necropsias dos animais experimentais.....                             | 48 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.5 Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> .....         | 49 |
| 3.2.6 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....      | 49 |
| 3.3 Imunoterapia.....                                              | 51 |
| 3.3.1 Inoculação experimental.....                                 | 51 |
| 3.3.2 Animais experimentais.....                                   | 51 |
| 3.3.3 Acompanhamento clínico.....                                  | 52 |
| 3.3.4 Necropsias dos animais experimentais.....                    | 52 |
| 3.3.5 Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> .....         | 53 |
| 3.3.6 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....     | 53 |
| 3.4 Avaliação histopatológica.....                                 | 54 |
| 3.5 Análise estatística.....                                       | 54 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....                                          | 55 |
| 4.1 Caso clínico de esporotricose.....                             | 55 |
| 4.2 Inativação do <i>Sporothrix schenckii</i> .....                | 56 |
| 4.3 Imunoprofilaxia.....                                           | 58 |
| 4.3.1 Alterações anatomopatológicas dos animais experimentais..... | 58 |
| 4.3.2 Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> .....         | 61 |
| 4.3.3 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....     | 63 |
| 4.3.4 Avaliação histopatológica.....                               | 65 |
| 4.4 Imunoterapia.....                                              | 66 |
| 4.4.1 Avaliação clínica dos animais experimentais.....             | 66 |
| 4.4.1.1 Lesões no ponto de inoculação.....                         | 66 |
| 4.4.1.2 Lesões em outras áreas corpóreas.....                      | 69 |
| 4.4.2 Alterações anatomopatológicas dos animais experimentais..... | 71 |
| 4.4.3 Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> .....         | 73 |
| 4.4.4 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....     | 75 |
| 4.4.5 Avaliação histopatológica.....                               | 76 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....                                           | 78 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....                                           | 86 |
| <b>7 PERSPECTIVAS</b> .....                                        | 87 |
| <b>8 REFERÊNCIAS</b> .....                                         | 88 |

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea cosmopolita de evolução subaguda ou crônica que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* afetando o homem e várias espécies de animais domésticos como cães, gatos, cavalos, bovinos, camelos, cabras, suínos, ratos, camundongos, golfinhos, chimpanzés e aves (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002). Esse fungo vive em solo rico em matéria orgânica, vegetação, cascas de árvores e em locais de clima quente e úmido, principalmente em regiões de climas tropicais e subtropicais (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992).

O *Sporothrix schenckii* foi isolado primeiramente em 1898 por Schenck de uma lesão em humano (ARENAS, 1993). No Brasil, a doença é conhecida desde 1907 quando Lutz e Splendore relataram a infecção no homem e em ratos. Em meados de 1950, a esporotricose foi descrita em cães em Santa Catarina (SOUZA, 1957) e em gatos em São Paulo (FREITAS; MIGLIANO; ZANI NETO, 1956), sendo atualmente considerada uma zoonose emergente de importância para a Saúde Pública.

A esporotricose é adquirida pela inoculação traumática do *S. schenckii* na pele através do solo contaminado, plantas e pela arranhadura, mordedura ou contato direto com lesões dos felinos (MARQUES et al., 1993; WOLF; TRAY, 1997). Além do gato, o tatu (*Dasypus novencitus*), por ser um animal que mantém um contato permanente com a terra, também é apontado como fonte de infecção da esporotricose ao homem (DÍAZ, 1987).

Atualmente, vem sendo demonstrado que os felinos domésticos (*Felis cattus*) têm um importante papel epidemiológico na transmissão da esporotricose pelos hábitos, de cavar buracos e cobrir seus dejetos com terra ou de afiar as garras em troncos de árvores, podendo tornar-se portadores sadios ou enfermos. A infecção no homem e em outros animais com o fungo ocorre através da arranhadura e

mordedura ou pela contaminação através de solução de continuidade. Estudos demonstraram o isolamento de *S. schenckii* de unhas (SCHUBACH et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001; SOUZA, 2001) e cavidade bucal (SCHUBACH et al., 2001) de felinos com a micose destacando o risco de inoculações do agente através de mordidas e arranhaduras desses animais.

Outro fator que propicia a contaminação do *S. schenckii* pelos felinos domésticos é o fato das lesões destes possuírem grande quantidade de células fúngicas, potencializando assim a capacidade infectante do agente para o homem ou animais. Estes possuem uma aparente inabilidade para a resolução da esporotricose, e nessa espécie a enfermidade se apresenta de forma mais intensa em comparação com as demais. Provavelmente esse fato seja atribuído a doenças imunossupressivas ou a deficiência específica na resposta imunológica contra o *Sporothrix schenckii* (DUNSTAN et al., 1986; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; SCHUBACH et al., 2001). Estudos demonstram que o felino doméstico possa ter uma deficiência na resposta imunológica contra o *Sporothrix schenckii* devido a uma tolerância imunológica provocada por altos títulos de antígenos (CARLOS; SGARBI; PLACERES, 1999).

Dentre os animais a maior frequência de casos ocorre em felinos domésticos e nestes as lesões ocorrem principalmente nas partes distais dos membros, face ou base da cauda, caracterizadas por nódulos ulcerados e crostosos que drenam exsudato purulento castanho-avermelhado, com zonas de necrose, muitas vezes ocorrendo exposição de músculos e ossos. Quando ocorre evolução para forma sistêmica, além das lesões cutâneas, os felinos podem apresentar anorexia, hipertermia e prostração. No homem, as lesões se manifestam, principalmente, na forma cutânea fixa podendo evoluir para linfangite ascendente ocorrendo raramente a forma sistêmica, sendo esta associada a doenças imunossupressivas (LARSSON et al., 1989; LACAZ et al., 2002; KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; JUSTA P. NETO et al., 1999). Nos cães, a esporotricose apresenta-se principalmente na forma cutânea localizada ou cutânea–linfática (MIGLIANO; FREITAS; MORENO, 1963; JUNGGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998) e nos eqüinos, a enfermidade possui caráter crônico e ocorre principalmente na forma subcutânea com formação de múltiplos nódulos e úlceras drenantes e forma cutâneo-linfática com linfangite ascendente ulcerativa (JUNGGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; GREYDANUS et al., 1994; COPETTI et al., 2002).

No Brasil os principais relatos de esporotricose ocorrem no Rio de Janeiro, por ser uma região litorânea de clima quente e úmido, com mais de 1400 casos descritos em humanos e animais, sendo descrita também em São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Paraná e Minas Gerais (NOGUEIRA et al., 1995; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1999; BARROS et al., 2001; FLEURY et al., 2001; NOBRE et al., 2002; FERNANDES et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; SCHUBACH et al., 2006; GORGOZINHO et al., 2006; MEINERZ et al., 2007). Na região sul do Rio Grande do Sul foram diagnosticados nos últimos anos vários casos de esporotricose em felinos domésticos com e sem envolvimento zoonótico e um crescente aumento da micose em caninos (XAVIER et al., 2004; MADRID et al., 2007; MEINERZ et al., 2007)

A esporotricose é uma micose de caráter zoonótico, sendo considerada de interesse para a Saúde Pública devido atualmente haver um aumento na aquisição do felino doméstico como animal de companhia. Este convive diretamente com seu proprietário podendo facilitar a transmissão da doença a partir de um animal portador do *S. schenckii* (SOUZA et al., 2000; BARROS et al., 2001; XAVIER et al., 2004). Entretanto, os fármacos utilizados no tratamento da enfermidade não satisfazem completamente a necessidade médica e veterinária, devido, principalmente aos problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos antifúngicos disponíveis (DE PAUW, 2000). Em humanos, o crescente uso de fármacos imunossupressores, antibacterianos e quimioterápicos, além de aumento no número de pacientes transplantados e com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) resultaram no aumento de susceptibilidade destes adquirirem esta enfermidade e conseqüentemente estarem sujeitos a falhas terapêuticas, recidiva, assim como o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos de uso corrente.

Durante vários anos os medicamentos de eleição para esporotricose nas formas cutânea e linfocutânea foram os iodetos inorgânicos, principalmente o iodeto de potássio. Porém, o seu uso terapêutico demonstrou ser ineficaz apresentando toxicidade em felinos, que comumente apresentam sinais de iodismo (LARSSON, 1998). A ação do iodeto de potássio não é demonstrada *in vitro* contra o *S. schenckii*, sendo que a sua ação *in vivo* parece estar relacionada com o estímulo da fagocitose (POLAK, 1999; NOBRE et al., 2002). Já a anfotericina B, antibiótico poliênico, foi introduzida em 1956 e desde então tem sido preconizada para as

formas sistêmicas da micose em humanos, apresentando boa atividade, no entanto são comuns relatos de nefrotoxicidade, com isso teve seu uso restrito nos animais domésticos (HOPPE-TICHY, 1997). Outros antifúngicos utilizados para o tratamento desta micose são o cetoconazol e a terbinafina, sendo que estudos *in vitro* 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).

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

Neste contexto, vários estudos têm buscado novas alternativas terapêuticas para a esporotricose e outras micoses de interesse humano e veterinário, devido ao aumento da ocorrência dessas doenças fúngicas associadas a enfermidades imunossupressoras. Portanto, estão sendo realizadas pesquisas para o desenvolvimento de imunógenos tanto na prevenção como tratamento dessas infecções. O desenvolvimento de vacinas contra organismos eucariotas representa um desafio, pois a complexidade antigênica desses organismos dificulta a seleção de componentes imunogênicos com potencial protetor. Porém, algumas vacinas contra determinados fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton* sp, *Microsporum canis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* já foram testadas demonstrando bons resultados (GUDDING; LUND, 1995; GORDON; BOND, 1996; DIXON et al., 1998; RYBNIKAR; VRZAL; CHUMELA, 1998; CUTLER; DEEPE Jr.; KLEIN, 2007).

Em vista da importância do felino doméstico na transmissão da esporotricose para outros animais e para o homem, assim como as falhas terapêuticas e recidivas envolvendo a terapia em alguns animais da espécie felina, o presente trabalho teve como objetivo estudar e avaliar a capacidade imunogênica de células leveduriformes

de *Sporothrix schenckii* inativadas utilizando diferentes adjuvantes, tanto na prevenção (imunoprofilaxia) como no tratamento (imunoterapia) da esporotricose experimental em ratos albinos (*Rattus norvergicus*) linhagem Wistar, para que posteriormente os felinos domésticos tenham novas alternativas com menos efeitos colaterais e menor custo do que os antifúngicos de eleição.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Sporothrix schenckii*

O fungo *Sporothrix schenckii* foi isolado pela primeira vez em 1898 nos Estados Unidos, por Benjamin Schenck, em lesão de paciente humano, sendo denominado *Sporotrichia*. Em 1900, Hektoen & Perkins informaram o segundo caso de esporotricose e denominaram o fungo isolado de *S. schenckii*. Em 1903, De Beurman & Gougerot estudaram a esporotricose na França e em 1905 o fungo isolado destes casos clínicos foi denominado *Sporotrichum beurmanni*, por ser considerado diferente do *S. schenckii*, mas em 1921 as esporotricoses americana e francesa foram consideradas idênticas e em 1963 foi proposto por Carmichael a denominação do agente de *Sporothrix schenckii* (RIPPON, 1988; ARENAS, 1993; LACAZ et al, 2002).

O agente etiológico da esporotricose é um fungo geofílico, sendo considerado um sapróbio de solo rico em celulose, crescendo em plantas, cascas de árvores e musgos principalmente em locais de clima quente e úmido (FINDLAY; VISMER, 1986; DONADEL et al., 1993; SMILACK, 1993). Pertence a divisão *Ascomycota*, subclasse *Euascomycetes*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae*, gênero *Sporothrix* e espécie *schenckii* (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002). A forma teleomorfa do agente não está totalmente definida, embora a análise molecular de rRNA ribossômico forneceu que *Ophiostoma stenoceras*, relacionado aos *Ascomycetes* seja a provável forma sexual (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Por ser um fungo dimórfico, o *S. schenckii* apresenta a forma micelial no meio ambiente e *in vitro* em temperatura ao redor de 25°C formando hifas e conídios e a forma leveduriforme *in vivo* e *in vitro* a 37°C. A temperatura ideal de crescimento varia entre 25-27°C e a inibição do seu crescimento ocorre entre 39-40°C (LACAZ et

al., 2002). A forma miceliana aparece microscopicamente como pequenos conídios ovais hialinos ou dematiáceos, solitários ao longo das hifas, semelhantes a uma “margarida” nas extremidades de conidióforos curtos e não ramificados (KERN; BLEVINS, 1999). As hifas são finas, hialinas, septadas e ramificadas, com conidióforos delgados, em cujo ápice forma-se uma pequena vesícula com dentículos simpodialmente dispostos, do qual nasce o conídio. As colônias escuras produzem dois tipos de conídios: os hialinos com parede celular fina e os escuros com parede celular espessa. Os primeiros são ovais, elípticos e piriformes, medindo 2 a 6 µm de diâmetro e os de parede espessa, são esféricos a ovais com 2 a 4 µm de diâmetro (LACAZ et al., 2002). A forma leveduriforme é caracterizada por pequenas células esféricas, ovais ou alongadas, que se assemelham a “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, foi observado 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).

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

A camada externa da parede celular do *S. schenckii* contém muitos polímeros com peptídeos-ramnomananas e poucos com galactose. As frações antigênicas como a peptídeo-ramnomanana foram isoladas das células leveduriformes do *S. Schenckii* e têm capacidade de estimular a atividade mitogênica dos linfócitos, mas com baixa atividade (LLOYD; BITTON, 1971; CARLOS; SGARBI; PLACERES, 1999). A peptídeo-ramnomanana é responsável pelo processo de adesão tanto dos conídios como das leveduras ao colágeno tipo II, fibronectina e laminina. O processo de aderência do patógeno a tecidos do hospedeiro é essencial para o desenvolvimento da infecção, assim como para a disseminação do fungo (LIMA et al., 1999).

O meio de cultura utilizado para o isolamento do *S. schenckii* é geralmente ágar Sabouraud acrescido ou não de nutrientes, antibacterianos (penicilina, estreptomicina, cloranfenicol) ou de antifúngicos como a cicloheximida. Também são utilizados para cultivo outros meios como ágar fubá, infusão cérebro-coração (BHI) e ágar batata crescendo bem de três a cinco dias após o cultivo (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002). Quando cultivado em temperatura de 25°C a 35°C, apresenta-se como uma colônia inicialmente de cor branca amarelada, sedosa, membranosa, às vezes com micélio aéreo, posteriormente tornando-se pregueada e escurecida. A 37°C o *S. schenckii* cresce na forma leveduriforme e adota aspecto de colônia bacteriana cinza ou creme (ARENAS, 1993). O uso de óleo mineral estéril e água destilada estéril são indicados para manutenção dos isolados (BORBA; SILVA; OLIVEIRA, 1992; CAPRILES et al., 1993).

## 2.2 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea de evolução subaguda ou crônica, produzida pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* afetando o homem e uma grande variedade de animais como cães, gatos, cavalos, bovinos, camelos, golfinhos, cabras, mulas, suínos, ratos, chimpanzés e aves (LACAZ et al., 2002; KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992) sendo atualmente mais diagnosticada em gatos do que em cães (FARIAS et al., 1997; LARSSON, 1998; BARROS et al., 2001). 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; KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; SCHUBACH et al., 2002).

No Brasil, segundo revisão bibliográfica (FERREIRO, 1984), a esporotricose é conhecida desde 1907, quando foi relatada a infecção no homem e em animais (ratos) no estado de São Paulo por Lutz e Splendore. Em meados de 1950, a doença foi descrita em cães em Santa Catarina (SOUZA, 1957) e em gatos em São Paulo (FREITAS; MIGLIANO; ZANI NETO, 1956). No Rio Grande do Sul o primeiro caso ocorreu em dois cães (LONDERO; CASTRO; FISCHMAN, 1964). Almeida et al. (1955) alertou pela primeira vez no Brasil a possível transmissão da esporotricose felina ao homem.

A esporotricose era considerada uma doença de ocorrência rara no Brasil até o ano de 1997 (MIGLIANO; FREITAS; MORENO, 1963; FISCHMAN; ALCHORNE; PORTUGAL, 1973; LARSSON et al., 1989; MARQUES et al., 1993), sendo o maior número de casos registrados em humanos. Estudos realizados por Almeida et al. (1955) reuniram 344 casos da enfermidade em São Paulo e Freitas et al. (1965) relataram oito casos em felinos e 12 em cães.

Atualmente a doença tem sido diagnosticada na região sudeste com crescente número de casos principalmente no estado do Rio de Janeiro com mais de 1400 casos descritos em humanos e animais (COSTA et al., 2000; SHIAVO et al., 2000; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; SOUZA et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001) e São Paulo (LARSSON et al., 1989; MARQUES; CAMARGO; FAGUNDES, 1997; LARSSON, 2000) e, em menor número, em Minas Gerais (NOGUEIRA et al., 1995; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998). Na região sul, principalmente no Rio Grande do Sul, a esporotricose foi relatada primeiramente em

humanos moradores de áreas rurais e atualmente vêm ocorrendo casos envolvendo felinos domésticos em áreas urbanas e rurais (LONDERO; CASTRO; FISCHMAN, 1964; LOPES et al., 1999; SEVERO et al., 1999; MEINERZ et al., 2001; SOUZA, 2001; NOBRE et al., 2002; XAVIER et al., 2004; MEINERZ et al., 2007).

No homem, a esporotricose é uma doença que costuma ocorrer sob a forma de casos isolados ou pequenos surtos familiares ou profissionais, envolvendo pessoas expostas a vegetais ou solo rico em matéria orgânica, como agricultores, floristas, jardineiros, mineiros e caçadores além de laboratoristas. Nos últimos anos essa enfermidade tem tido importância em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em proprietários de felinos domésticos, veterinários e enfermeiros (DIAZ, 1987; CARAVALHO et al., 1991; DONADEL et al., 1993; LARSSON, 1997; MARQUES; CAMARGO; FAGUNDES, 1997; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; ROCHA et al., 2001).

Atualmente os casos zoonóticos envolvendo felinos domésticos têm aumentado, com isto os relatos de esporotricose humana descrevem principalmente os felinos domésticos como transmissores da doença. Esta micose é estabelecida através da arranhadura por carregarem o agente em suas unhas, mordedura ou contato direto da pele com escoriações e lesões ulceradas e exsudativas dos gatos afetados que possuem um grande número de organismos fúngicos (DUNSTAN et al., 1986; MARQUES et al., 1993; FARIAS et al., 1997; MARQUES; CAMARGO; FAGUNDES, 1997; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; Schubach et al., 2000; 2001; SOUZA et al., 2000; NOBRE et al., 2002; ALMEIDA et al., 2009). Deve-se destacar o papel epidemiológico desses animais, principalmente machos, não castrados e de livre acesso à rua, devido a seus hábitos de esconder-se em plantas, rebolcar no solo, cavar buracos, cobrir seus dejetos com terra, marcar territórios com as unhas em cascas de árvores e arranharem-se entre si em lutas ou brincadeiras (LARSSON et al., 1989; DONADEL et al., 1993; FARIAS et al., 1997; LARSSON, 2000).

A esporotricose é adquirida pelo hospedeiro através do implante traumático na derme por ferimentos punctiformes de felpas de madeiras, por espinhos de roseiras e outros vegetais, arranhadura ou mordedura de animais como gatos, roedores, tatus ou quando ocorre a contaminação de feridas abertas ou da pele com solução de continuidade por exudatos provenientes de animais infectados ou de materiais laboratoriais (DIAZ, 1987; LARSSON, 1989; MARQUES et al., 1993; FARIAS et al., 1997; MARQUES; CAMARGO; FAGUNDES, 1997; SCHUBACH et

al., 2000). Raramente a contaminação ocorre por inalação do agente, podendo resultar em esporotricose pulmonar ou sistêmica (FARIAS et al., 1997; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000).

Após a inoculação com *S. schenckii* o sistema imunológico é ativado e a infecção irá desenvolver-se quando o indivíduo estiver com deficiência na resposta imunológica, seja por uso contínuo de corticóides, antibióticos ou doenças imunossupressivas ou pela grande quantidade de unidades infectantes inoculadas (JUSTA P. NETO et al., 1999; SEVERO et al., 1999). Portanto, o desenvolvimento da infecção depende basicamente de três fatores: resistência do hospedeiro, quantidade do inóculo e a virulência do fungo (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

As formas clínicas da esporotricose são: cutânea fixa, disseminada e linfática raramente evoluindo para forma sistêmica, sendo que os principais sintomas clínicos e lesões são enfartamento ganglionar seguindo a cadeia linfática nódulos, úlceras e crostas. Em humanos, a enfermidade ocorre principalmente na forma cutânea-fixa podendo evoluir para linfangite ascendente. Em pacientes com SIDA, as osteoartrites e a forma disseminada da doença são freqüentemente observadas (DUNSTAN et al., 1986; LIMA et al., 1999; SEVERO et al., 1999; ROCHA et al., 2001).

A esporotricose em gatos se apresenta habitualmente na forma cutânea- fixa ou disseminadas a partir de lesões cutâneas que se espalham via hematógena ou através da linfa, podendo evoluir para forma sistêmica, embora o envolvimento ósseo seja raro (IWASAKI et al., 1988; SCHUBACH et al., 2001). As lesões se situam preferencialmente nas regiões cefálica, dos membros e da cauda, podendo, com freqüência, assemelhar-se àquelas decorrentes de criptococose. Inicialmente caracterizam-se por abscessos, celulite ou com o aspecto fistuloso, evoluindo até amplas áreas necróticas, nodulares, ulceradas e crostosas (GONZALEZ- CABO et al., 1989; BARONI et al., 1998; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; SCHIAVO et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001). Em casos graves de disseminação do agente, pode haver comprometimento orgânico generalizado acompanhado de letargia, prostração, anorexia e hipertermia (LARSSON, 1997). No Brasil, apesar de terem sido relatados casos de esporotricose em gatos com Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e/ou Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), não há uma relação entre as enfermidades, embora possam favorecer o aparecimento de quadros clínicos de maior gravidade desta doença (SCHUBACH et al 2001; SOUZA, 2001).

Nos cães, a esporotricose apresenta-se principalmente na forma cutânea localizada ou cutânea-linfática (MIGLIANO; FREITAS; MORENO, 1963; JUNGGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998; MADRID ET AL., 2007; WHITTEMORE; WEBB, 2007) e nos eqüinos, a enfermidade possui caráter crônico e ocorre principalmente na forma subcutânea com formação de múltiplos nódulos e úlceras drenantes e forma cutâneo-linfática com linfangite ascendente ulcerativa (JUNGGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; GREYDANUS et al., 1994; COPETTI et al., 2002).

As lesões papulares ou nodulares da esporotricose podem ser de natureza linear; comumente indicativas de linfangite concomitantes. Normalmente as áreas envolvidas são indolores e não pruriginosas. O comprometimento sistêmico pode afetar os ossos, sistema nervoso central e pulmões, sendo associado, principalmente com indivíduos imunocomprometidos. A forma sistêmica da doença pode resultar numa infecção pulmonar por inalação de conídios ou disseminação de lesões cutâneas ou subcutâneas (WOLF; TRAY, 1997).

No exame histopatológico os tecidos corados pelas técnicas histoquímicas de hematoxilina-eosina (H.E), que demonstra lesões histológicas, (Periodic Acid Schiff) PAS e metenamina argênica de Gomori permitem evidenciar a forma leveduriforme do *Sporothrix schenckii* (FREITAS et al., 1965; GONZALEZ-CABO et al., 1989; FARIAS et al., 1997; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998; FLEURY et al., 2001). As formas parasitárias, às vezes não são visualizadas, mesmo em casos de lesões ativas, com cultura positiva. As formas parasitárias são em geral intracelulares, pequenas, ovaladas ou alongadas em forma de “charuto” podendo apresentar exoesporulação única ou múltipla. O granuloma causado pelo *S. schenckii* pode apresentar centro supurativo, necrótico, circundado por inflamação granulomatosa epitelióide, com grande número de células gigantes, multinucleadas e halo linfoplasmocitário com tecido de granulação e fibrose. As células epitelióides, células gigantes e linfócitos constituem infiltrados celulares clássicos no interior dos granulomas e corpos asteróides podem estar presentes (GONZALEZ-CABO et al., 1989; WOLF; TRAY, 1997; SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Em felinos, o histopatológico das lesões de esporotricose pode revelar reação piogranulomatosa envolvendo a derme, o panículo e a musculatura esquelética subjacente, associadas a ulcerações superficiais cobertas por exsudato purulento. Numerosos organismos fúngicos podem ser observados pelas colorações

H.E e PAS, dentro das áreas inflamadas, sendo caracterizados de esféricos a ovais com predominância de brotamentos unipolares. A resposta inflamatória em alguns felinos poderá ser tão intensa que os organismos são visualizados intra e extracelularmente. Macrófagos, células gigantes, neutrófilos e linfócitos estão presentes nas respostas inflamatórias (DUNSTAN et al., 1986; LARSSON et al., 1989; MARQUES et al., 1993).

O tratamento da esporotricose em pacientes nos quais a imunidade está preservada resulta, normalmente em uma boa resposta, em contraste com a terapia em indivíduos imunocomprometidos, os quais são comuns as falhas terapêuticas, casos de recidiva e o desenvolvimento de resistência às drogas de uso clínico corrente (BAKER et al., 1989; BELKNAP, 1989; HELLER; FUHRER, 1991; DIAZ et al., 1992; ODDS, 1993; JOHNSON; WARNOCK, 1995; JUSTA P. NETO ET AL., 1999).

No início do século XX, por volta de 1900, o uso dos iodetos foi proposto por Beurmann como efetivo para o tratamento da esporotricose cutânea ou cutânea-linfática, sendo utilizado com êxito até hoje, principalmente iodeto de potássio, oferecendo uma forma de terapia com baixo custo no tratamento da esporotricose humana (ZEPEDA et al., 1990; CABEZAS et al., 1996; MARQUES; CAMARGO; FAGUNDES, 1997) e também para animais, embora haja o risco de iodismo em gatos (DUNSTAN et al., 1986; GONZALEZ-CABO et al., 1989; CARAVALHO et al., 1991; KELLY; CLARK, 1991; FARIAS et al., 1997; COSKUN et al., 2004 ). Os felinos devem ser observados atentamente para evidências de intoxicação, que apresenta sinais de epífora, aumento de secreção nasal, depressão, descamação aumentada da pele, pêlos secos, anorexia, emese, icterícia, tremores, insuficiência cardíaca e hipertermia (FARIAS et al., 1997; LARSSON, 2000). Ainda não está esclarecido com exatidão o mecanismo de ação dos iodetos, mas sabe-se que eles não atuam *in vitro* contra o *S. schenckii*, sendo que a sua ação *in vivo* parece estar relacionada com o estímulo da fagocitose (POLAK, 1999).

Atualmente outros fármacos vêm sendo utilizados para o tratamento da enfermidade como os derivados azólicos, especialmente o itraconazol, que representa uma segura e efetiva terapia para esporotricose nas formas cutânea e linfocutânea (FARIAS et al., 1997; COSTA et al., 2000; KAUFFMAN; HAIJJEH; CHAPMAN, 2000; BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001; SCHUBACH et al., 2001). 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; SCHUBACH et al., 2004; WHITTEMORE; WEBB, 2007).

Também tem sido registrada a eficácia da terbinafina, droga antifúngica do grupo das alilaminas, no tratamento da esporotricose cutânea (HULL; VISMER, 1992; PAPPAS et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001).

### **2.3 Resposta imune frente ao *Sporothrix schenckii***

Na resposta imune frente aos agentes fúngicos os fagócitos são atraídos quimiotaticamente para o local da infecção e se ligam ao fungo através de numerosos receptores. Se a membrana for ativada pelo agente infeccioso ligado a ela, este será englobado pelo fagossoma com auxílio de pseudópodos que o envolverão. Dentro da célula, lisossomas se fundirão ao fagossoma formando um fagolisossoma destruindo o agente em uma seqüência de mecanismos como pelo sistema da mieloperoxidase, cuja enzima penetra no fagossoma atuando nos peróxidos na presença de halídios, preferencialmente o iodeto, gerando então, outros oxidantes tóxicos como hipó-halitos (HIO, HClO) (MALE; ROIT, 1994; ROOK, 1994).

A regulação da função dos fagócitos na resposta imune a infecções fúngicas está ligada às citocinas como fator de estimulação de fagócitos e granulócitos (G-CSF), fator de estimulação macrófago-granulócito (GM-CSF), fator de estimulação de macrófagos (M-CSF), interferon (IFN $\gamma$ ), interleucina (IL) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). O GM-CSF e o G-CSF atuam aumentando a atividade fagocítica e oxidativa dos polimorfos nucleares contra as estruturas fúngicas; O M-CSF modula a função dos fagócitos como a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumenta a produção de IL-1, IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . O IFN $\gamma$  aumenta a função de polimorfos nucleares e monócitos contra o fungo, a IL-1 tem funções múltiplas, induzindo a relação das citocinas e o TNF- $\alpha$  aumenta a produção de outras citocinas e aumenta a função dos polimorfos nucleares (ROILIDES, et al., 1998).

O receptor de antígeno da célula T reconhece os peptídeos alojados na fenda de ligação das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, determinando uma especificidade imunológica. A interação entre as células T e B é um processo duplo, já que as células B apresentam o antígeno para T e recebem sinais destas para divisão e diferenciação, e as células T secretam citocinas que possuem efeito sobre as células B, como a interleucina-2, indutora de proliferação nas células B e T, interleucina-4, que atua na fase inicial da ativação da proliferação da célula B. A interleucina-6 que é o sinal mais potente para a diferenciação da célula B e as células T também produzem os fatores de necrose tumoral alfa e beta, que aparentemente são importantes para o crescimento das células B (BARNESTON; GAWKRODGE, 1994; ROOK, 1994).

Vencendo a fase inicial de desafio com o sistema imune do hospedeiro o *S. schenckii* desenvolve um quadro de hipersensibilidade tipo IV ou tardia, mediada por células, caracterizada pelo desenvolvimento de reações granulomatosas que ocorrem após um período de algumas semanas. As citocinas (interferon, fator de necrose tumoral e interleucinas) produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup> atraem os macrófagos, e assim os granulomas se desenvolvem por autoamplificação, com diferenciação dos macrófagos em células epitelióides, que secretam citocinas com formação de mais células epitelióides que se fundem para formar células gigantes (BARNESTON; GAWKRODGER, 1994).

Tachibana, Matsuyama e Mitsuyama (1999) demonstraram que a imunidade adquirida contra *S. schenckii* é principalmente realizada pelos macrófagos ativados por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) produzido por Linfócito T CD4<sup>+</sup>. 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- $\gamma$  e lipopolissacarídeo com concomitante produção de óxido nítrico (NO). Nesse mesmo estudo foi observado que e os animais experimentais que não possuíam o gene para IFN- $\gamma$  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 realizados demonstram 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- $\alpha$ ) pelos macrófagos ativados, prejudicando assim a amplificação da resposta imune (CARLOS et al., 1992; 1994; CARLOS; SGARBI; PLACERES, 1999, MAIA et al., 2006).

Existe controvérsia em relação à importância da imunidade humoral na proteção contra patógenos fúngicos, mas recentes estudos indicaram que ambas as respostas imunológicas, mediada por anticorpos e por células, contribuem na proteção contra *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* e *Cryptococcus neoformans* (CASADEVALL et al., 1998; NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005).

Nascimento e Almeida (2005) evidenciaram recentemente em ratos inoculados experimentalmente 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.

Na esporotricose humana o título de anticorpos contribui para diagnóstico e para monitorar respostas ao tratamento (ROBERTS; HOWARD, 1971; WELSH; DOLAN, 1973; CASSERONE et al., 1983; DONADEL et al., 1993). Os títulos de anticorpos variam entre esporotricose sistêmica, articular, pulmonar e cutânea, sendo maiores na forma pulmonar e articular, devendo-se levar em conta que no caso da doença sistêmica os títulos podem ter variações diretamente ligadas à capacidade imunológica do paciente (ROBERTS; HOWARD, 1971; CASSERONE et al., 1983; FISHER; COOK, 2001).

## **2.4 Imunoprevenção e imunoterapia**

As respostas imunes adaptativas são, normalmente, dirigidas contra uma resposta imune e é conhecida como imunização. Qualquer substância que desencadeie uma resposta imune é considerada imunogênica (JANEWAAY et al., 2002).

A vacinação foi comprovada ser o método mais eficiente no controle de doenças infecciosas. Contudo, não é sempre um procedimento inócuo, e seu uso deve ser acompanhado de uma avaliação cuidadosa dos riscos e benefícios do procedimento (TIZARD, 2002).

As primeiras vacinações foram realizadas por Jenner e Pasteur nos séculos XVIII e XIX, porém, eram totalmente empíricas e se confundiram com o surgimento da própria imunologia como ciência (BAZIN, 2003). Com isso, as descobertas relacionadas ao funcionamento do sistema imunológico foram fundamentais para o desenvolvimento de vacinas, havendo desde então uma grande evolução no seu desenvolvimento (SCHATZMAYR, 2003).

As vacinas são classificadas em vacinas vivas compostas de patógenos vivos atenuados, de organismos inteiros inativados ou de toxinas bacterianas inativadas. Atualmente surgiram também as vacinas de subunidades, vacinas recombinantes e vacinas de DNA (TIZARD, 2002).

Nas vacinas inativadas os principais inativantes utilizados são o álcool, acetona e agentes alquilantes que incluem o óxido de etileno, etileinoimina, acetiletilenoimina,  $\beta$ -propiolactona, todos eles utilizados em medicina veterinária (TIZARD, 2002). Foram realizados estudos utilizando o Thimerosal a 0,02% como inativante, causando completa inativação do *Pythium insidiosum* e *Fusarium verticillioides* (SANTURIO et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006).

Este recente progresso no desenvolvimento de vacinas tem permitido a sua utilização não apenas de modo profilático, mas também no tratamento do câncer, desordens imunológicas e infecções crônicas (BLOM; HILGERS, 2004). Contudo, apesar do grande avanço tecnológico, muitas vacinas são pouco imunogênicas ou não conferem uma resposta imune capaz de prevenir a enfermidade, necessitando da associação com substâncias adjuvantes (SINGH; O'HAGAN, 2002).

O desenvolvimento de vacinas contra organismos eucariotas representa um desafio, pois a complexidade antigênica desses organismos dificulta a seleção de componentes imunogênicos com potencial protetor. Nos últimos 15 anos, devido ao aumento mundial da ocorrência das doenças fúngicas associadas a enfermidades imunossupressoras, vem sendo cada vez mais estudado o desenvolvimento de imunógenos para a prevenção e tratamento dessas infecções (CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007; HAMAD, 2008).

Atualmente a utilização de imunoprolático e imunoterápico contra fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*; *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton sp*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* estão sendo estudados e já demonstraram bons resultados (NAES; SANDVIK, 1981; DIXON et al., 1998; RYBNIKAR; VRZAL; CHUMELA, 1998; ABUODEH et al., 1999; CARDENAS et al., 1999; DEEPE; GOBBONS, 2002; WUTHRICH et al., 2002; DINIZ et al., 2004; VERMOUNT et al., 2004; WÜTHRISH; WARNER; KLEIN, et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2007; STEVENS, 2007). Um conjugado LAM- CRM (alga marrom *Laminaria digitata* com toxóide diftérico CRM197) demonstrou capacidade imunogênica e bons resultados na imunoprevenção de candidíase vaginal e sistêmica e aspergilose (*Aspergillus fumigatus*) em camundongos. Wüthrich, Warner e Klein (2005) produziram uma vacina de células T de memória contra *Blastomyces dermatitidis* para abordar o papel da interleucina 12 e demonstraram que células T CD8 foram menos dependentes da IL-12. Estudo realizado por Deepe & Gobbons (2002) demonstrou que a vacinação com *Heat Shock Protein 60* (Hsp60) de *Histoplasma capsulatum* induziu uma boa resposta imunológica em camundongos.

Vermount et al. (2004) estudaram a produção de uma vacina de subunidade através de um recombinante purificado (Keratinolytic Melanoproteases- r-MEP3) sendo testada experimentalmente em cobaias infectados com *Microsporum canis*. Tanto a resposta imunitária humoral como celular foram avaliadas. A vacina produziu uma forte resposta imunitária, mas uma resposta linfoproliferativa transitória, com isso esse protocolo não impediu a invasão e o desenvolvimento de lesões causadas pelo fungo. Os autores concluíram que os anticorpos produzidos pelo r-MEP3 não foram suficientes para produzir uma imunidade duradoura, sendo necessários mais estudos nessa área.

Uma vacina intranasal contra *Candida albicans* (HT-CA com LT R192G) foi produzida e aplicada experimentalmente em camundongos ocorrendo uma diminuição da levedura após o desafio por via endovenosa nos animais, apresentando uma boa imunidade humoral. Com isso esta nova abordagem oferece novas possibilidades para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a candidíase para utilização em seres humanos (CARDENAS et al, 1999).

Duas cepas endogâmicas de camundongos (BALB / c e C57BL / 6) foram vacinadas com uma proteína recombinante de *Coccidioides immitis*, agente etiológico da coccidioidomicose, ricos em monophosphoryl lipídico (rPRA) com adjuvante oleoso e vacina de DNA. Quatro semanas após a vacinação, os camundongos foram infectados intraperitonealmente com artroconídios do fungo. Em duas semanas, grupos de ratos que receberam soro fisiológico ou plasmídeos sem PRA apresentaram significativa perda de peso, e as UFCs nos pulmões variaram de 5,9 a 6,4  $\log_{10}$ . Em contrapartida, os grupos de camundongos imunizados com vacina de DNA ou rPRA tiveram diminuição significativa das UFCs nos pulmões variando de 3,0 a 4,5  $\log_{10}$ . *In vitro* marcadores imunológicos de proliferação de linfócitos e interferon gama foram estimuladas com rPRA correlacionados com protecção. Além disso, as concentrações plasmáticas de imunoglobulina G (IgG), IgG1 e IgG2, contra rPRA apresentaram aumentadas nos camundongos vacinados. O autores concluíram que rPRA é uma vacina promissora para a prevenção da coccidioidomicose (ABUODEH et al., 1999).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente da paracoccidioidomicose, uma doença fúngica, crônica sistêmica prevalente na América Latina. Vários estudos vêm sendo realizados na produção de vacinas contra essa enfermidade (NASCIMENTO et al., 2007; SOARES et al., 2008; BRAGA et al., 2009).

Nascimento et al. (2007) realizaram um estudo para avaliar a defesa imunológica através da imunização de camundongos BALB/c com leveduras atenuadas de *P. brasiliensis*. A imunização promoveu uma protecção duradoura contra levedura altamente infecciosa de *P. brasiliensis* e houve uma diminuição de 99,5% na contagem das UFCs após 90 dias do desafio. Ao mesmo tempo, os níveis de IgG2 e IFN-gama foram altas, enquanto uma baixa produção de IL-10 e IL-5 foi verificada, sugerindo que um padrão Th1 foi dominante. Este trabalho demonstrou o potencial das células leveduriformes atenuadas para o desenvolvimento de vacinas contra infecções por fungos.

Com relação à Pitiose, que é uma doença granulomatosa causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* e acomete eqüinos, caninos, bovinos, felinos e humanos, já vem sendo estudada a vários anos a produção e utilização de imunoterápico para espécie eqüina (MILLER, 1983; MONTERO, 1999; SANTURIO et al., 2003).

Leal et al. (2002) estudaram a resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes de vacinas demonstrando que o adjuvante de Freud apresentou melhores resultados seguido do óleo mineral e hidróxido de alumínio. Santurio et al. 2003 utilizaram três tipos de imunoterápicos para tratamento de pitiose experimental em coelhos demonstrando bons resultados.

Atualmente foi realizado um estudo com *S. schenckii* relacionado com a imunidade passiva. Neste presente estudo, uma IgG1 MAB foi produzida contra uma glicoproteína 70 kDa do *S. schenckii* a fim de compreender o efeito da imunização passiva em camundongos infectados com o fungo. Os resultados mostraram uma redução significativa no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em órgãos dos animais quando o MAB foi injetado antes e durante a infecção pelo *S. schenckii*. Resultados similares foram observados quando ratos deficientes de células T foram utilizados. Além disso, em um segundo tratamento, o MAB foi injetado após a infecção estabelecida, e uma vez mais, foi observada uma redução significativa na UFC associada com um aumento de produção de interferon gama. Os autores concluíram que pela primeira vez foi estabelecido efeito protetor de um anticorpo específico contra *S. schenckii* (NASCIMENTO et al., 2008).

## 2.5 Adjuvantes

A maioria das proteínas são pouco ou nada imunogênicas quando administradas sozinhas. As respostas imunes adaptativas fortes contra antígenos protéicos quase sempre requerem que o antígeno seja injetado em uma mistura conhecida como adjuvante, aumentando assim a imunogenicidade de outras substâncias (JANEWAY et al., 2002; TIZARD, 2002).

Os adjuvantes podem aumentar a imunogenicidade de duas formas distintas, primeiramente convertendo os antígenos protéicos solúveis em material particulado, que é mais facilmente ingerido pelas Células Apresentadoras de Antígenos (CAA), como macrófagos (JANEWAY et al., 2002). O antígeno pode ser absorvido por partículas do adjuvante, particulado por emulsificação em óleos minerais ou incorporados em partículas coloidais de Complexos imuno-estimuladores (ISCOMs). Isso aumenta um pouco a imunogenicidade, mas esses adjuvantes são relativamente fracos, a menos que associados a bactérias ou componentes bacterianos. Esses componentes bacterianos são a segunda maneira

como os adjuvantes podem aumentar a imunogenicidade, sinalizando para que os macrófagos ou células dendríticas se tornem CAA efetivas, induzindo produção de citocinas inflamatórias e respostas inflamatórias locais potentes (ROOK, 1994; JANEWAY et al., 2002).

Os principais adjuvantes conhecidos são o Adjuvante incompleto de Freund, cuja composição é emulsão de óleo em água, causando a liberação lenta do antígeno e ingestão macrofágica. O Adjuvante completo de Freund também é composto por emulsão de óleo em água, porém com micobactérias mortas que age aumentando a ingestão macrofágica e indução de co-estimuladores de macrófagos (JANEWAY et al., 2002; TIZARD, 2002). Outros adjuvantes muito utilizados são o Adjuvante de Freund com muramildipeptídeo, hidróxido de alumínio e óleos de parafinas (JANEWAY et al., 2002).

Recentemente, lipossomos, interferon, complexos imuno-estimulantes (ISCOMS) e citocinas têm sido utilizados ou investigados como potenciais adjuvantes (RESENDE et al., 2004).

Estudos foram realizados utilizando o extrato etanólico da própolis verde brasileira, cujos principais mecanismos adjuvantes seriam ativação de macrófagos, aumento da capacidade fagocítica e estimulação de citocinas como fator de necrose tumoral alfa e interferon gama, para avaliar a sua ação imunomoduladora quando associada a vacinas inativadas contra o contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) ou herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em camundongos e bovinos (FISCHER, 2007; FISCHER et al., 2007).

Atualmente, com a utilização de adjuvantes, a resposta imunológica pode ser modulada seletivamente para o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) Classe I ou MHC classe II e resposta tipo T helper -1 (Th1), que é muito importante para formação de resposta protetora contra patógenos intracelulares, como vírus, parasitas e bactérias, ou Th2, que se direciona para antígenos e microorganismos extracelulares (RESENDE et al., 2004).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação do imunoprolático (vacina) e imunoterápico

##### 3.1.1 Isolado de *Sporothrix schenckii*

Para preparação do imunoprolático e imunoterápico foi utilizado isolado de *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme termotolerante e pigmentado, proveniente de esporotricose cutânea disseminada de felino doméstico (*Felis catus*). O fungo foi armazenado na Micoteca do Setor de Micologia do Laboratório de Doenças Infecciosas – Faculdade de Veterinária/UFPeI/RS, sendo mantido na sua fase micelial a partir de subculturas em tubos contendo meio Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol com cicloheximida (Mycosel®) e preservados sob refrigeração em temperatura média de 4°C, realizando subcultivos em intervalos de seis meses como o recomendado por Kohler et al. (2004) (Fig.1).



Figura 1- Colônia filamentosa de *Sporothrix schenckii* proveniente de esporotricose disseminada felina (Setor de Micologia, FV-UFPeI).

### 3.1.2 Cultivo do *Sporothrix Schenckii* para formulação da vacina

O *S. schenckii* foi cultivado em meio líquido BHI (Brain-Heart broth®) incubado durante dez dias a 37°C e mantido sob agitação (100 ciclos/minuto) para obtenção da forma leveduriforme do *S. schenckii*. A cultura foi filtrada em camada dupla de gaze estéril, centrifugada (1500 rpm/ 15 minutos), lavada duas vezes com solução salina tamponada (PBS), homogeneizada e padronizada em  $10^8$  células de *S. schenckii*/ml (Fig. 2).

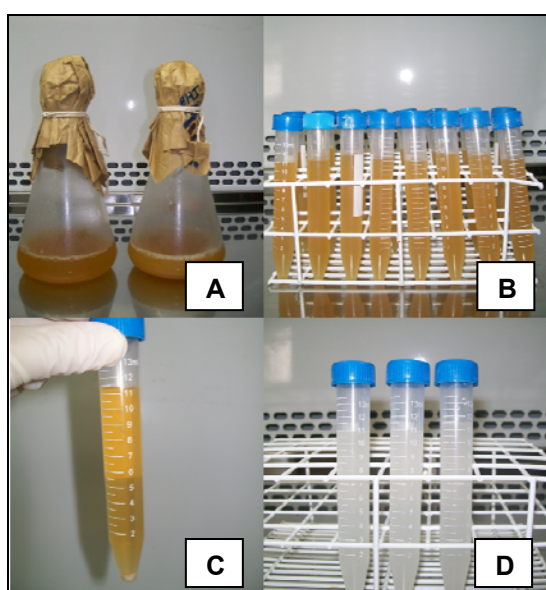


Figura 2- Forma leveduriforme do *Sporothrix schenckii* para formulação do imunoprolático e imunoterápico. (A) Fungo em BHI líquido após 10 dias de cultivo; (B) *S. schenckii* após ser filtrado em dupla camada de gaze estéril; (C) lavagem com solução salina tamponada (PBS); (D) *S. schenckii* padronizado em  $10^8$  células/ml (Setor de Micologia, FV-UFPEI)

### 3.1.3 Inativação do *Sporothrix schenckii*

As células leveduriformes do *Sporothrix schenckii* foram inativadas com Thimerosal a 0,02%. Foi realizada uma curva de inativação para ver o menor tempo que  $10^8$  células de *S. schenckii*/ml, em pH constante (7.0-7.2) seria inativada sem prejudicar a estrutura do antígeno.

### 3.1.4 Curva de inativação do *Sporothrix schenckii*

Foi colocado *Sporothrix schenckii* na turbidez de acordo com tubo 4 da escala de Mcfarland em 150 ml de meio líquido BHI (Brain-Heart broth<sup>®</sup>) incubado durante 10 dias a 37°C e mantido sob agitação (100 ciclos/minuto) para obtenção da forma leveduriforme do *S. schenckii* (Fig. 3).

Após foi retirado 50 ml da cultura, lavado três vezes com PBS e filtrado em dupla camada de gaze, centrifugado e retirado o sobrenadante, sendo ressuspensionado em PBS e posteriormente colocado thimerosal a 0,02%. O material foi semeado em Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>) e incubado durante 10 dias. O fungo foi ressuspensionado em PBS e padronizado em 10<sup>8</sup> céls *S. schenckii*/ml.

A curva de inativação foi realizada durante 24 horas sendo feitas quatro leituras a cada duas horas e meia e 24 horas após a primeira (A, B, C, D e E). Foram realizadas diluições até 10<sup>-7</sup>, e a inativação do *Sporothrix schenckii* foi feita com thimerosal a 0,02% (Fig. 4).

As amostras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>) até diluição 10<sup>-7</sup> e incubadas a 37°C durante 10 dias.



Figura 3- *Sporothrix schenckii* no meio BHI líquido sob agitação constante de 100 rpm a 37°C (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

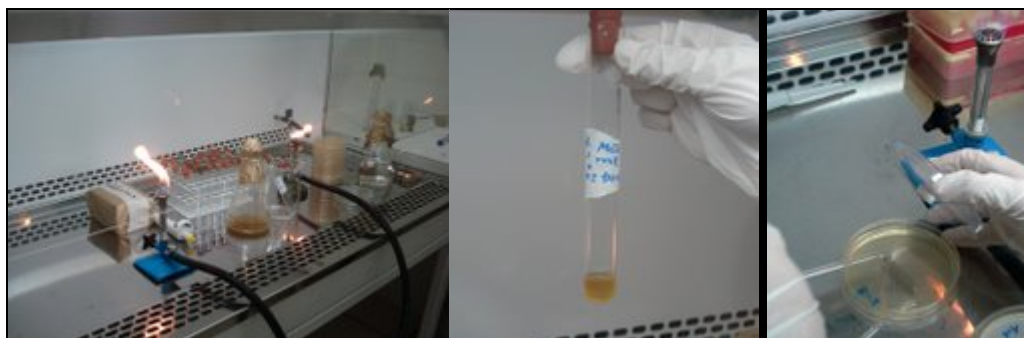


Figura 4- Procedimento para realização da curva de inativação do *Sporothrix schenckii* (Setor de Micologia, FV-UFPel)

#### 3.1.4 Formulações das vacinas (imunoprolático e imunoterápico)

As formulações das vacinas foram feitas utilizando o antígeno fúngico *Sporothrix schenckii* inativado e suspenso em solução salina tamponada (PBS) estéril juntamente com adjuvante oleoso.

A emulsificação foi realizada no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas utilizando um emulsificador confeccionado no Laboratório de Virologia. Primeiramente foi colocado o adjuvante oleoso (50%) e posteriormente o antígeno (50%) (Tab.1) (Fig. 5; 6). Na formulação 4 juntamente com o Adjuvante incompleto de Freund foi adicionado 5 mg/dose de extrato etanólico de própolis brasileira (Fig. 7).

As vacinas foram acondicionadas em frascos estéreis fechados e mantidas a temperatura de 4°C durante todo o período experimental (Fig. 8).

Foram administradas três doses das vacinas em intervalos de 14 dias por via intramuscular na dose de 0,1 ml.

Tabela 1- formulações das vacinas utilizadas como imunoprolático e imunoterápico e seus respectivos adjuvantes

| Vacinas             | Formulações                                                                                                                                                    | Adjuvantes                                   |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1- Controle<br>CONT | 50% PBS estéril e 50% adjuvante oleoso (90% óleo mineral Marcol 52 e 10% do emulsificante Montanidi 888)                                                       | Adjuvante Incompleto de Freund               |
| 2<br>AIF            | 50% antígeno e 50% adjuvante oleoso (90% óleo mineral Marcol 52 e 10% do emulsificante Montanidi 888).                                                         | Adjuvante Incompleto de Freund               |
| 3<br>ACF            | 50% antígeno e 50% adjuvante oleoso (90% óleo mineral Marcol 52 e 10% do emulsificante Montanidi 888) mais <i>Mycobacterium tuberculosis</i> morto e dessecado | Adjuvante Completo de Freund <sup>©1</sup>   |
| 4<br>AIFP           | 50% antígeno e 50% adjuvante oleoso (90% óleo mineral Marcol 52 e 10% do emulsificante Montanidi 888) mais própolis                                            | Adjuvante Incompleto de Freund mais própolis |

CONT- controle; AIF- adjuvante incompleto freund; ACF- adjuvante completo Freund; AIFP- adjuvante incompleto de Freund mais própolis

<sup>1</sup> Sigma Life Science- USA

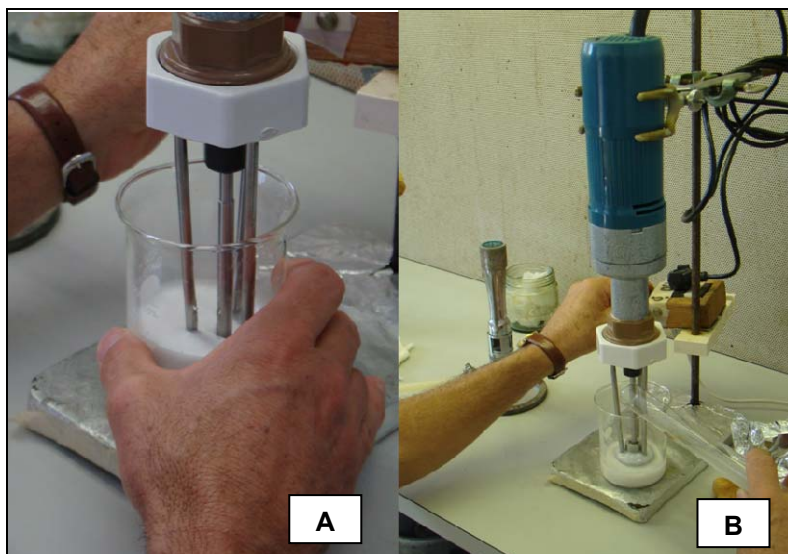


Figura 5- Preparação vacina com adjuvante incompleto de Freund. (A) Emulsificador com óleo mineral; (B) *Sporothrix schenckii* inativado sendo colocado juntamente com o óleo para realização da emulsificação (Laboratório Virologia, FV-UFPel)

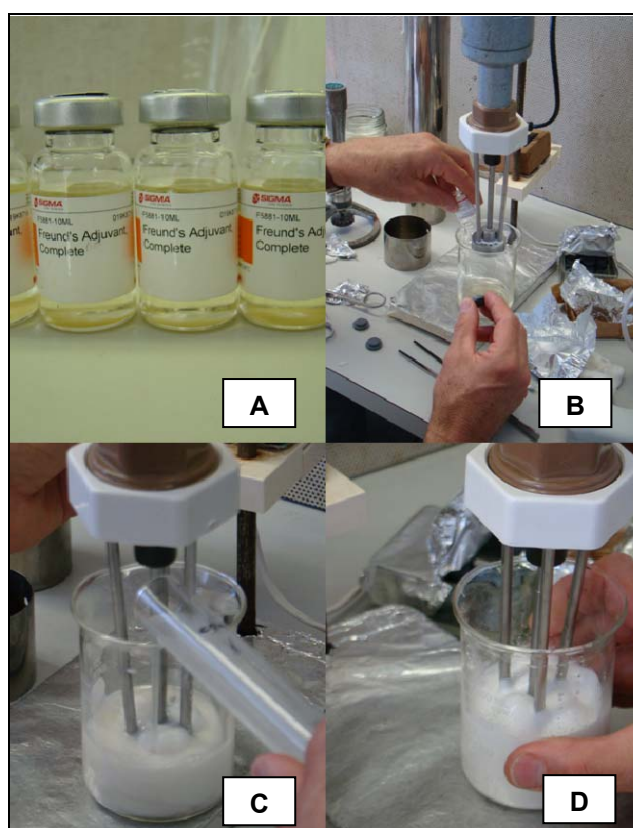


Figura 6- Preparação da vacina com adjuvante completo de Freund. (A) adjuvante completo de Freund; (B) emulsificador; (C) colocação do *Sporothrix schenckii* inativado juntamente com ACF para emulsificação; (D) realização da emulsificação (Laboratório Virologia, FV-UFPel)



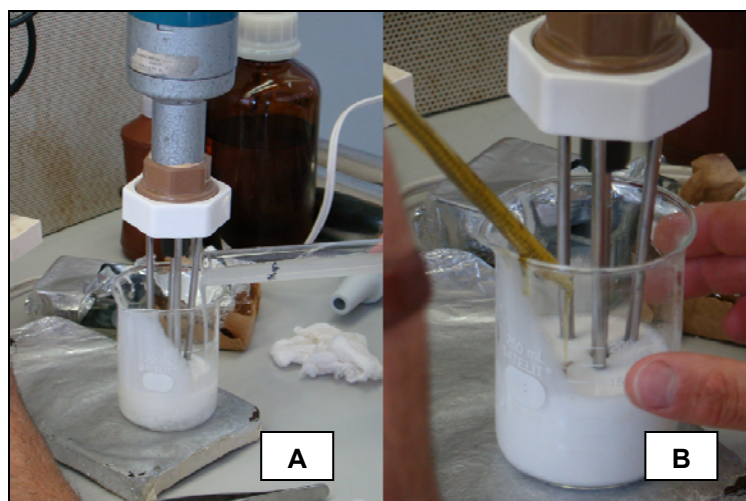


Figura 7- Preparação da vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis. (A) colocação do *Sporothrix schenckii* inativado juntamente com AIF para emulsificação; (B) colocação do extrato etanólico de própolis brasileira para emulsificação (Laboratório Virologia, FV-UFPEl)



Figura 8- Acondicionamento das vacinas em frascos estéreis (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

## 3.2 Imunoprevenção (vacinação)

### 3.2.1 Modelo experimental

Para realização do estudo foram utilizados 80 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar/Cepa UFPEl, machos, com idade de 70 dias e peso variando de 285 a 420 gramas. Os animais foram acomodados em caixas, mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro de 12

horas, recebendo dieta e água *ad libitum* durante nove semanas, na sala de experimentação do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

Este estudo já foi previamente aprovado pela comissão de ética e experimentação animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas-UFPel.

Os animais experimentais foram divididos em quatro grupos de 20 animais, sendo eles: grupo 1 controle (G1CONT) que recebeu três doses da formulação 1, grupo 2 (G2AIF) que recebeu por via intramuscular três doses da vacina obtida pela formulação 2. Os ratos dos grupos 3 (G3ACF) e 4 (G4AIFP) receberam respectivamente as vacinas obtidas pelas formulações 3 e 4.

### 3.2.2 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 (Mycose®) 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), filtradas em camada dupla de gaze estéril, centrifugadas (1500 rpm/ 15 minutos) e lavadas duas vezes com PBS, homogeneizada e padronizadas em  $2 \times 10^3$  células de *S. schenckii*/ml (Fig. 9).



Figura 9- Preparo do inóculo fúngico: retirada de fragmentos da colônia de *Sporothrix schenckii* do meio de cultura com auxílio de lâmina de bisturi estéril (Setor de Micologia, FV-UFPel)



### 3.2.3 Inoculação Experimental

Após o período de vacinação todos os animais foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar direito utilizando seringa graduada em 1 ml com 0,2 ml de suspensão do inóculo contendo  $2 \times 10^3$  células de *S. schenckii* /ml. Os animais foram previamente anestesiados com anestesia profunda de acordo com o comitê de ética de bem estar animal (Fig.10).



Figura 10- Inoculação subcutânea no coxim plantar direito de rato wistar com a suspensão fúngica contendo  $2 \times 10^3$  células de *S. schenckii*/ml (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

### 3.2.4 Necropsias dos animais experimentais

Após a administração da segunda dose da vacina imunoprolática foi realizada eutanásia e necropsia de dois animais de cada grupo para comprovação que a vacina estava realmente inativada, sendo colhidas amostras do fígado, baço e testículos para cultivo fúngico. Dez dias após a inoculação experimental o restante dos animais foram necropsiados. Os animais foram eutanasiados com administração de Thiopental intraperitoneal conforme resolução do CFMV nº 714/2002.

Na necropsia foi avaliada a presença de lesões anatomopatológicas e coletado amostra do coxim plantar direito de cada animal para avaliação histopatológica e retroisolamento do agente. Órgãos internos (fígado e baço) e testículos foram colhidos para retroisolamento do *S. schenckii* e avaliação histopatológica. Em cinco animais de cada grupo foram colhidas amostras do coxim

plantar direito e fígado para realização da contagem das Unidades formadoras de colônias.

### **3.2.5 Retroisolamento do *Sporothrix schenckii***

A técnica para o retroisolamento do agente foi realizada a partir de fragmentos teciduais coletados durante as necropsias provenientes do coxim plantar direito, fígado, baço, testículo e demais órgãos caso fosse observado à presença de lesões características da micose. As amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>) mantidos a 25<sup>o</sup>C durante dez dias para caracterização macro e micromorfológica do *S. schenckii*.

As colônias caracterizam-se por coloração inicialmente branca amarelada membranosa e posteriormente tornando-se pregueadas e escuras variando de cinza claro a cinza escuro; foram submetidas a exame direto coradas com Lactofenol azul de algodão, para observação da micromorfologia do *S. schenckii* com a presença de hifas finas, septadas, com conídios piriformes distribuídos ao longo destas, ou na extremidade, dispendo-se em forma de “margaridas”.

Para caracterização do dimorfismo do agente, foram realizados repiques em placas contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>) e incubadas a 37<sup>o</sup>C durante quatro dias sendo posteriormente realizado esfregaço em lâmina de microscopia, fixada e corada pelo método de Gram, sendo visualizadas ao microscópio óptico células leveduriformes com ou sem brotamento, ovaladas ou arredondadas.

### **3.2.6 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)**

Para a realização da contagem das UFCs, fragmentos do coxim plantar direito e fígado foram coletados. Posteriormente foram desinfetados com álcool 70%, macerados em gral com auxílio de pistilo (Fig. 11). Posteriormente 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 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) pela técnica de espalhamento sobre placa (em duplicata) em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>), incubados a 25<sup>o</sup>C durante seis dias. Após o

período de incubação foi realizada a contagem das UFCs das quatro diluições (Fig. 12).



Figura 11- Maceração do fragmento de lesão do fígado com o auxílio de gral e pistilo para realização da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) (Setor de Micologia, FV-UFPel)

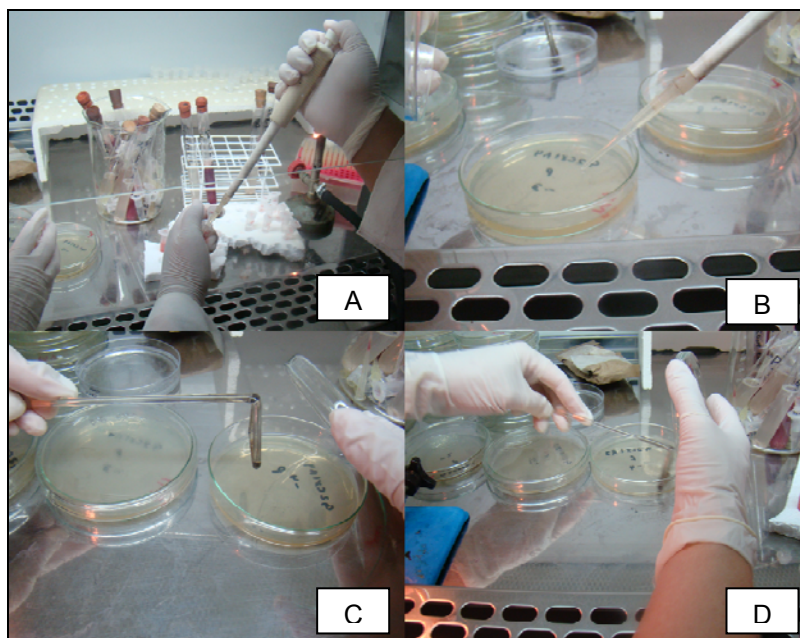


Figura 12- Procedimento para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). (A) diluições seriadas da suspensão fúngica; (B) transferência da suspensão fúngica para placas; (C) e (D) suspensão fúngica semeada através da técnica de espalhamento com alça de Drigalski

### **3.3 Imunoterapia**

#### **3.3.1 Inoculação experimental**

Os animais foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar direito utilizando seringa graduada em 1 ml com 0,2 ml de suspensão do inoculo previamente preparados conforme descrito no item 3.2.2.

O tratamento dos animais experimentais com o imunoterápico foi iniciado duas semanas após a inoculação, quando todos já apresentavam lesões características de esporotricose cutânea, com a presença de lesões gomosas e exsudato purulento castanho-avermelhado no ponto de inoculação.

#### **3.3.2 Animais experimentais**

No presente estudo foram utilizados 80 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar cepa/UFPel, machos, com idade de 70 dias divididos em quatro grupos de 20 animais, sendo submetidos às mesmas condições previamente descritas no item 3.2.1.

Os animais experimentais do grupo 1 controle (G1CONT) foram tratados com três doses da formulação 1, o grupo 2 (G2AIF) recebeu por via intramuscular três doses da vacina (imunoterápico) obtida pela formulação 2. Os ratos dos grupos 3 (G3ACF) e 4 (G4AIFP) receberam respectivamente o tratamento dos imunoterápicos obtidos pelas formulações 3 e 4 (Fig. 13).

As formulações, intervalos de aplicação, dose e vias de administração foram previamente descritos no item 3.1.4.



Figura 13- Aplicação de 0,1 ml do imunoterápico por via intramuscular em rato albino wistar (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

### **3.3.3 Acompanhamento clínico**

Os animais experimentais foram observados diariamente durante o tratamento com imunoterápico, sendo realizada semanalmente a avaliação clínica da enfermidade, na qual foi observada a presença de eritema e nódulos (escore 1), presença de úlceras, exsudato e formação de crostas (escore 2), linfangite ascendente (escore 3) e regressão e cicatrização das lesões (escore 4) no coxim plantar direito. Foi verificada também a presença de múltiplas lesões de esporotricose em outras áreas corpóreas, assim como durante todo o experimento foi observado o estado geral de cada animal. Foram feitas planilhas da avaliação clínica para realização da análise estatística.

### **3.3.4 Necropsias dos animais experimentais**

Durante o experimento foram realizadas necropsias nas semanas três, seis e nove em respectivamente, quatro, quatro e 12 animais de cada grupo, sendo colhidas amostras da pata inoculada, de órgãos internos (fígado e baço), testículos e de outros locais e órgãos quando existiam lesões compatíveis com esporotricose disseminada ou sistêmica. O material foi encaminhado para análise micológica e histopatológica.

Todos os animais foram eutanasiados através de elevadas doses de Thiopental intraperitoneal conforme resolução do CFMV n° 714/2002.

### 3.3.5 Retroisolamento do *Sporothrix schenckii*

Após a realização das necropsias, os materiais obtidos (coxim plantar direito, fígado, baço e testículos) foram cultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>) mantidos a 25<sup>o</sup>C e 37<sup>o</sup>C durante 10 dias para caracterização macro e micromorfológica do *S. schenckii* e confirmação do dimorfismo (Fig. 14).

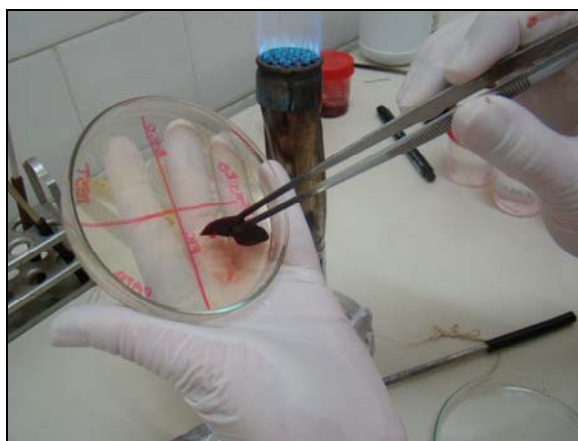


Figura 14- Cultivo do baço para retroisolamento do *Sporothrix schenckii* (Setor de Micologia, FV-UFPel)

### 3.3.6 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Nas três necropsias realizadas foram escolhidos aleatoriamente dois, dois e três animais, respectivamente, de cada grupo experimental. Fragmentos do coxim da pata inoculada e fígado foram colhidos, desinfetados com álcool 70°C e macerados em gral com auxílio de pistilo, lavados com água destilada estéril (10 ml) e filtrados em dupla camada de gaze estéril. O filtrado (0,1 ml) foi cultivado em diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) pela técnica de espalhamento sobre placa (em duplicata) em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, incubados a 25<sup>o</sup>C durante seis dias quando foi realizada a contagem das UFCs das quatro diluições. Nas duas primeiras necropsias além do fígado foram colhidas amostras do baço e testículo para realização da contagem das UFCs.

### 3.4 Avaliação histopatológica

Para a avaliação histopatológica foram escolhidos aleatoriamente quatro animais de cada grupo experimental e colhidas amostras do coxim plantar direito, testículo e órgãos internos como fígado e baço.

Os materiais colhidos após a realização da imunoprofilaxia e imunoterapia foram acondicionados em formol a 10%, sendo posteriormente incluso em parafina e processado, utilizando-se coloração de Hematoxilina-eosina (HE) e Ácido Periódico-Schiff (PAS). Após foram observados ao microscópio ótico para pesquisa do agente e de lesões características de esporotricose.

### 3.5 Análise estatística

Na imunoprofilaxia e imunoterapia, a análise das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foi realizada através de fórmula logarítmica  $\log_{10} (n+1)$  e os valores de log foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo método de Tukey. No caso da imunoterapia, a análise considerou os diferentes órgãos analisados e ponto de inoculação como blocos e a análise foi realizada como blocos casualizados. Os dados de frequência de isolamento fúngico e de alterações anatomopatológicas foram analisados pelo qui-quadrado. Para a análise adicional das alterações macroscópicas, foi construído um escore que é a soma dos índices (0 – ausência de lesão; 1 – presença de lesão) nos órgãos analisados e o ponto de inoculação (edema e úlcera) por unidade experimental (animal) na imunoprofilaxia. Assim, o escore variou de 0 (ausência de lesão nos pontos de análise) a 5 ou 4 (lesão em todos os locais analisados) e feita análise de variância e comparação entre médias Kruskal-wallis para dados não paramétricos ou ordinais. Escore semelhante foi construído com os dados de frequência de retroisolamento, atribuindo 1 ou 0 para presença/ausência de retroisolamento, nos órgãos analisados.

Para a avaliação clínica no experimento de imunoterapia, construiu-se um escore de presença de sinais clínicos no ponto de inoculação (0- sem lesão; 1- edema e eritema; 2- nódulo, úlcera ou crosta; 3- linfangite ascendente; 4- regressão e cicatrização) e efetuou-se a análise segundo Kruskal-wallis para dados não paramétricos ou ordinais, assim como para lesões em outras áreas corpóreas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caso clínico de esporotricose

Foi atendido numa clínica veterinária particular na cidade de Pelotas-RS um felino doméstico, macho, não castrado, 2 anos de idade pesando 3,5 kg, apresentando comprometimento do estado geral e sinais respiratórios. O animal vivia em um sítio no distrito de Monte Bonito, com livre acesso a rua. As lesões apresentavam-se na face, pavilhão auricular, região periocular esquerda, plano nasal e membro anterior esquerdo e eram nodulares, exsudativas e com presença de crostas. O diagnóstico presuntivo foi de esporotricose (Fig. 15).

As amostras das lesões foram colhidas com *Swabs* estéreis e encaminhadas ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD/UFPel) para realização de análises micológicas e histopatológicas.

As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel<sup>®</sup>) e incubadas a 25<sup>0</sup> C e a 37<sup>0</sup>C durante 10 dias para confirmação do dimorfismo. Após o período de incubação foi realizada a avaliação macroscópica e microscópica do agente confirmando o *Sporothrix schenckii*.

Na avaliação histopatológica também foi confirmado presença de células leveduriformes compatíveis com *Sporothrix schenckii*.

Foi prescrito o protocolo terapêutico com itraconazol (10mg/kg, PO, SID). O paciente foi hospitalizado, tendo a medicação administrada por 60 dias. Após a melhora clínica das lesões o proprietário decidiu concluir o tratamento no domicílio. O proprietário foi orientado a continuar com a medicação por quatro semanas adicionais após o desaparecimento total das lesões. Houve contaminação de dois familiares e de outro gato macho de três anos (Fig. 16). O felino doméstico acabou evoluindo para o óbito.



A cepa de *Sporothrix schenckii* foi acondicionada na micoteca do Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária- UFPel- setor Micologia.



Figura 15- Felino doméstico com esporotricose (Setor de Micologia, FV-UFPel)



Figura 16- Proprietário com lesão cutânea fixa de esporotricose, demonstrando envolvimento zoonótico (Setor de Micologia, FV-UFPel)

#### **4.2 Inativação do *Sporothrix Schenckii***

A curva de inativação demonstrou que após cinco horas não houve mais crescimento do *Sporothrix schenckii*, sendo que o thimerosal a 0,02% inativou totalmente o fungo neste período (Tabela 2) (Fig. 17; 18).

Tabela 2: Contagem das Unidades Formadoras de colônias (UFCs) após cultivo das amostras inativadas com Thimerosal a 0,02% num período de 24 horas

| Tempo | 0           | -1     | -2     | -3     | -4     | -5     | -6     | -7     |
|-------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       | (UFCs)      | (UFCs) | (UFCs) | (UFCs) | (UFCs) | (UFCs) | (UFCs) | (UFCs) |
| 0 h   | incontáveis | 1991   | 1014   | 331    | 45     | 14     | 7      | 1      |
| (A)   |             |        |        |        |        |        |        |        |
| 2,5 h | incontáveis | 114    | 34     | 3      | 1      | S/C    | S/C    | S/C    |
| (B)   |             |        |        |        |        |        |        |        |
| 5 h   | S/C         | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    |
| (C)   |             |        |        |        |        |        |        |        |
| 7,5h  | S/C         | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    |
| (D)   |             |        |        |        |        |        |        |        |
| 24h   | S/C         | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    | S/C    |
| (E)   |             |        |        |        |        |        |        |        |

S/C: sem crescimento fúngico



Figura 17- *Sporothrix schenckii* após cultivo no tempo zero de inativação (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

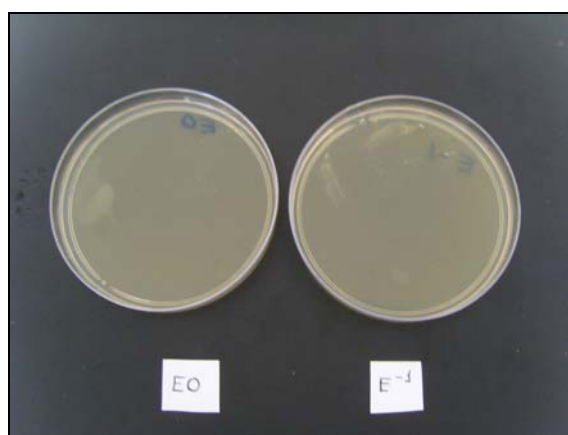


Figura 18- Cultivo após 24 horas de inativação, sem crescimento de *Sporothrix schenckii* (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

### 4.3 Imunoprofilaxia

#### 4.3.1 Alterações anatomopatológicas dos animais experimentais

Na semana três do experimento foi realizada necropsia em dois animais de cada grupo experimental para comprovação da inativação completa do *Sporothrix schenckii*. Não foram observadas alterações anatomopatológicas nos animais experimentais.

Após o término do experimento o restante dos animais foram eutanasiados e necropsiados, sendo feita a análise macroscópica dos órgãos internos, testículo e ponto de inoculação de todos os animais a fim de avaliar a evolução da doença e o comprometimento sistêmico em cada grupo experimental. Foram coletados fígado, baço, testículos e coxim plantar direito sendo encaminhados para o retroisolamento do agente e análise histopatológica.

As principais alterações anatomopatológicas observadas foram edema e úlcera no coxim plantar direito com presença de exsudato e lesões puntiformes esbranquiçadas, localizada e/ou disseminada, no baço e fígado (Tab. 3) (Fig. 19).

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 úlceras do coxim plantar direito. No entanto não houve diferença significativa entre estes três grupos. Em relação à presença de edema no coxim plantar direito e lesões macroscópicas no baço, fígado e testículos, não houve diferença estatisticamente significativas entre os quatro grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Fig. 21; 22).

O escore das alterações anatomopatológicas observado na análise estatística evidenciou que o grupo controle (G1) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do G3 (AIFP), porém não houve diferença estatística significativa do G1 (CONT) em relação aos demais grupos ( $P > 0,05$ ) (Fig. 20).

Tabela 3- Frequência de lesões anatomopatológicas encontradas no ponto de inoculação, em órgãos internos e testículo após imunoprofilaxia nos quatro grupos experimentais e média dos escores

| % lesões anatomopatológicas |                  |      |      |        |           |                    |
|-----------------------------|------------------|------|------|--------|-----------|--------------------|
| Grupos                      | UCPD             | ECPD | Baço | Fígado | Testículo | Escore             |
| G1 (CONT)                   | 50 <sup>b</sup>  | 94,4 | 11,1 | 0      | 0         | 1,5 <sup>a</sup>   |
| G2 (AIF)                    | 0 <sup>a</sup>   | 72,2 | 5,6  | 5,6    | 0         | 0,83 <sup>ab</sup> |
| G3 (ACF)                    | 5,6 <sup>a</sup> | 61,1 | 0    | 0      | 0         | 0,66 <sup>b</sup>  |
| G4 (AIFP)                   | 0 <sup>a</sup>   | 88,8 | 16,6 | 5,6    | 0         | 1,11 <sup>ab</sup> |

G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3 (ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4 (AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis; UCPD: úlcera coxim plantar direito; ECPD: edema coxim plantar direito. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as colunas ( $p>0,05$ ), escore analisado pelo método de Kruskal Wallis e os demais por qui-quadrado.

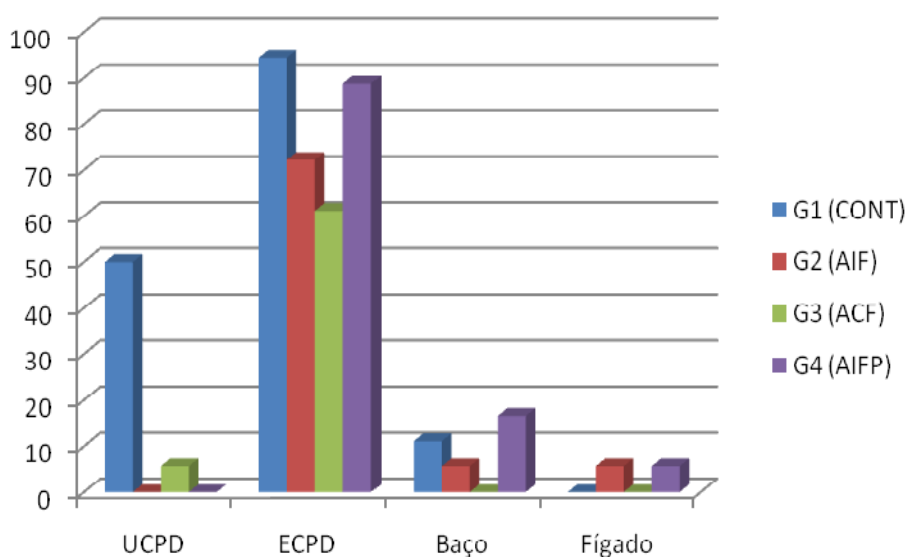


Figura 19- Frequência de lesões anatomopatológicas encontradas no ponto de inoculação, fígado e baço após imunoprofilaxia nos quatro grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPEI)

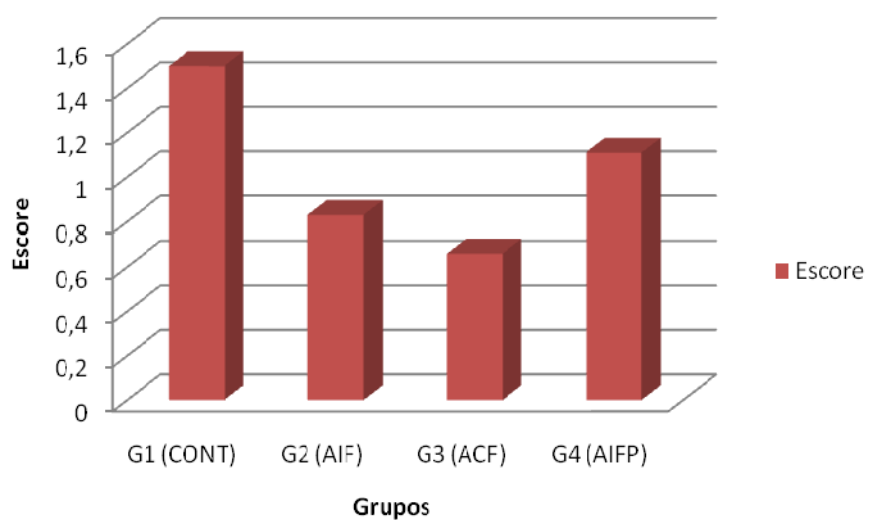


Figura 20- Escore de alterações anatomopatológicas observadas nos quatro grupos experimentais após imunoprevenção (Setor de Micologia, FV-UFPeI)



Figura 21- Presença de edema e úlcera no coxim plantar direito de animal pertencente ao grupo controle (G1) (Setor de Micologia, FV-UFPeI)



Figura 22- Fígado de animal do Grupo 3 (ACF) sem alterações anatomopatológicas (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

#### 4.3.2 Retroisolamento do *Sporothrix schenckii*

Ao final do experimento o retroisolamento do *S. schenckii* no ponto de inoculação foi obtido em 94, 4% dos animais pertencentes ao grupo controle (G1), enquanto nos grupos G2 (AIF), G3 (ACF) e G4 (AIFP) o agente foi retroisolado em 44,4%, 38,9% e 38,9% respectivamente, sendo que o G1 diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais grupos experimentais (Tab. 4).

O *S. schenckii* foi retroisolado do fígado, baço e testículos dos animais pertencentes aos grupos G1, G2 e G3, porém não houve crescimento do fungo desses órgãos nos animais do grupo G4 (Tab. 4) (Fig. 23).

Em relação ao escore do retroisolamento fúngico observado na análise estatística, o grupo controle (G1) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do G3 (ACF) e G4 (AIFP), porém não houve diferença estatística significativa do G1 (CONT) ( $P > 0,05$ ) em relação ao G2 (AIF) (Fig. 24).

Tabela 4- Frequência de retroisolamento fúngico no ponto de inoculação, órgãos internos e testículos dos quatro grupos experimentais após imunoprofilaxia e média dos escores

| % retroisolamento fúngico |                   |                   |                   |                    |                     |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Grupos                    | CPD (%)           | Fígado (%)        | Baço (%)          | Testículo (%)      | Escore              |
| G1 (CONT)                 | 94,4 <sup>b</sup> | 27,8 <sup>b</sup> | 22,2 <sup>a</sup> | 38,9 <sup>b</sup>  | 0,45 <sup>b</sup>   |
| G2 (AIF)                  | 44,4 <sup>a</sup> | 5,6 <sup>a</sup>  | 22,2 <sup>a</sup> | 16,7 <sup>ab</sup> | 0,22 <sup>a,b</sup> |
| G3 (ACF)                  | 38,9 <sup>a</sup> | 5,6 <sup>a</sup>  | 22,2 <sup>a</sup> | 11,1 <sup>a</sup>  | 0,19 <sup>a</sup>   |
| G4 (AIFP)                 | 38,9 <sup>a</sup> | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>    | 0 <sup>a</sup>     | 0,09 <sup>a</sup>   |

CPD: Coxim plantar direito; G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3(ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4(AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as colunas ( $p>0,05$ ), escore analisado pelo método de Kruskal Wallis e os demais por qui-quadrado.

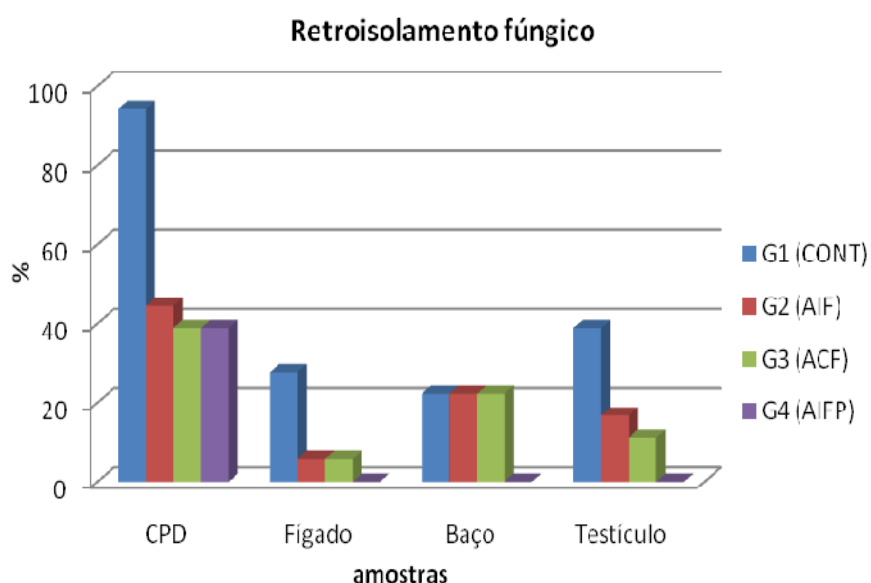


Figura 23- retroisolamento fúngico no coxim plantar direito, órgãos internos e testículo dos quatro grupos experimentais após utilização do imunoprofilático (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

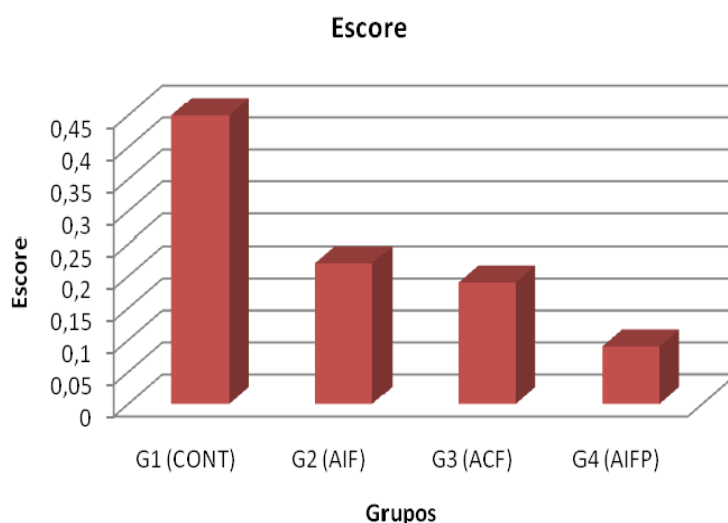


Figura 24- Escore de retroisolamento fúngico observados nos quatro grupos experimentais após imunoprofilaxia (Setor de Micologia, FV-UFPEI)

#### 4.3.3 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Na quantificação fúngica do ponto de inoculação foi observado que dentre os grupos experimentais os animais pertencentes ao G4 que receberam imunoprofilático com adjuvante incompleto de Freund mais própolis apresentaram menor quantidade de UFCs em relação aos demais grupos, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Tab. 5) (Fig. 25).

Em relação à contagem das Unidades Formadoras de Colônias do fígado, foram observadas nos grupos G1, G2 e G3 a presença de 3,02 UFC/ml, 0,39 UFC/ml e 0,53 UFC/ml respectivamente, sendo que no G4 não houve crescimento de unidade formadora de colônia do *S. schenckii*. O grupo controle (G1) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais grupos, não havendo diferença estatística significativa entre G2, G3 e G4 (Tab. 5) (Fig. 25; 26).



Tabela 5- Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia de *Sporothrix schenckii* referentes ao ponto de inoculação e fígado dos animais conforme os grupos experimentais

| Grupos    | Coxim plantar direito (UFC/ml) | Fígado (UFC/ml)   |
|-----------|--------------------------------|-------------------|
| G1 (CONT) | 6,07 <sup>a</sup>              | 3,02 <sup>a</sup> |
| G2 (AIF)  | 5,66 <sup>a</sup>              | 0,39 <sup>b</sup> |
| G3 (ACF)  | 5,00 <sup>a</sup>              | 0,53 <sup>b</sup> |
| G4 (AIFP) | 4,91 <sup>a</sup>              | 0,00 <sup>b</sup> |

G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3(ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4(AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis; UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônias/ml. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as colunas ( $p>0,05$ ).

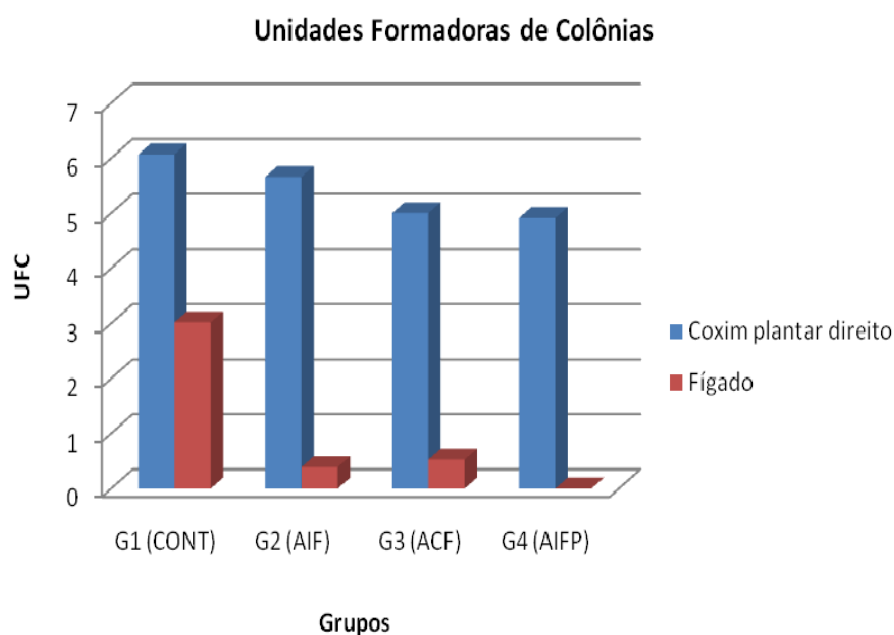


Figura 25- Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de *Sporothrix schenckii* nos quatro grupos experimentais após imunoprofilaxia (Setor de Micologia, FV-UFPEl)



Figura 26- Unidades Formadoras de Colônias de *Sporothrix schenckii* do fígado de animal pertencente ao grupo controle (G1) após imunoprevenção (Setor de Micologia, FV-UFPE)

#### 4.3.4 Avaliação Histopatológica

No grupo G1 (CONT) todos os animais apresentaram lesões no local de inoculação (coxim) caracterizada por uma dermatite piogranulomatosa focalmente extensa que por vezes variou na intensidade da lesão de moderada à acentuada. Um dos animais além das lesões no ponto de inoculação apresentou granulomas multifocais no fígado.

Não foram observadas alterações histológicas nos órgãos examinados de um animal do grupo G2 (AIF). Dois animais apresentaram lesões apenas no coxim plantar direito caracterizada por uma dermatite piogranulomatosa multifocal à coalescente que variou de moderada à acentuada (Fig 27). Em um rato foi observado lesão no local de inoculação e fígado, no coxim havia uma dermatite piogranulomatosa focalmente extensa acentuada e no fígado granulomas multifocais.

No grupo G3 (ACF) similar ao grupo G2 um animal não apresentou lesões histológicas. Os demais animais apresentaram lesões apenas no local de inoculação caracterizada por uma dermatite piogranulomatosa multifocal que variou de moderada à acentuada.

No grupo G4 (AIFP) as lesões restringiram-se a pele; dois animais apresentaram dermatite granulomatosa multifocal que variou de discreta à moderada e dois animais apresentaram dermatite piogranulomatosa multifocal acentuada.

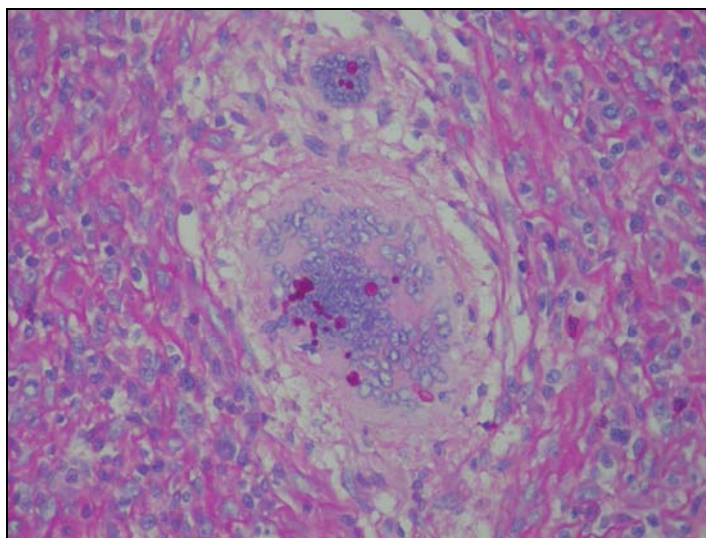


Figura 27- Corte histológico pertencente a rato do G2: coxim plantar direito demonstrando presença de célula gigante tipo corpo estranho com células leveduriformes de *Sporothrix schenckii* intracitoplasmático. P.A.S, objetiva 40X (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl)

#### 4.4 Imunoterapia

##### 4.4.1 Avaliação clínica dos animais experimentais

###### 4.4.1.1 Lesões no ponto de inoculação

Dez dias após a inoculação experimental a avaliação clínica revelou que todos os animais dos quatro grupos experimentais apresentavam lesões características da esporotricose com eritema e nódulos no coxim plantar direito.

Na semana dois a presença de úlcera, exsudato e crostas foram observadas em 80%, 75%, 50% e 75% nos grupos G1 (CONT), G2 (AIF), G3 (ACF) e G4 (AIFP) respectivamente. Nas semanas três e quatro a maioria dos animais dos quatro grupos experimentais evoluiu as lesões para linfangite ascendente com presença de úlceras e crostas (Tab.6) (Fig.29; 30).

Na semana cinco alguns animais dos grupos G2, G3 e G4 já apresentavam regressão das lesões, chegando à última semana do experimento com 58,3%, 41,7% e 50% das lesões regredidas e em processo de cicatrização (Tab. 6).

Em relação à média dos escores das avaliações clínicas durante as seis semanas do experimento não houve diferença estatística nos quatro grupos experimentais ( $P > 0,05$ ), conforme descrito na tabela 7 e figura 28.

Tabela 6- Frequência semanal da avaliação clínica no ponto de inoculação durante tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais

| GRUPOS     |     |      |      |     |           |      |      |      |           |      |      |      |            |      |      |     |
|------------|-----|------|------|-----|-----------|------|------|------|-----------|------|------|------|------------|------|------|-----|
| G1 (CONT)% |     |      |      |     | G2 (AIF)% |      |      |      | G3 (ACF)% |      |      |      | G4 (AIFP)% |      |      |     |
| SEM        | EN  | UEC  | LA   | RC  | EN        | UEC  | LA   | RC   | EN        | UEC  | LA   | RC   | EN         | UEC  | LA   | RC  |
| 1          | 100 | -    | -    | -   | 100       | -    | -    | -    | 100       | -    | -    | -    | 100        | -    | -    | -   |
| 2          | 10  | 80   | 10   | -   | 25        | 75   | -    | -    | 50        | 50   | -    | -    | 25         | 75   | -    | -   |
| 3          | -   | 12,5 | 87,5 | -   | -         | 45,5 | 54,5 | -    | 6,3       | 6,3  | 87,4 | -    | -          | 12,5 | 87,5 | -   |
| 4          | -   | 6,3  | 93,7 | -   | -         | 45,5 | 54,5 | -    | -         | 12,5 | 81,3 | 6,2  | -          | -    | 100  | -   |
| 5          | -   | -    | 100  | -   | -         | -    | 87,5 | 12,5 | -         | -    | 93,7 | 6,3  | -          | -    | 93,7 | 6,3 |
| 6          | -   | -    | 91,7 | 8,3 | -         | -    | 41,7 | 58,3 | -         | -    | 58,3 | 41,7 | -          | -    | 50   | 50  |

SEM: semana; G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3(ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4(AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis; EN: eritema e nódulo; UEC: ulcera, exsudato e crostas; LA: linfangite ascendente; RC: regressão e cicatrização

Tabela 7: Média dos escores da avaliação clínica semanal no ponto de inoculação durante imunoterapia nos quatro grupos experimentais

| Grupos   | Sem 1 | Sem 2 | Sem3 | Sem4 | Sem5 | Sem6 |
|----------|-------|-------|------|------|------|------|
| 1 (CONT) | 1     | 2     | 2,88 | 3,19 | 3,0  | 3,08 |
| 2 (AIF)  | 1     | 1,75  | 2,69 | 2,69 | 3,12 | 3,58 |
| 3 (ACF)  | 1     | 1,5   | 2,75 | 2,94 | 3,06 | 3,42 |
| 4 (AIFP) | 1     | 1,75  | 2,88 | 3    | 3,06 | 3,50 |

Sem:semana; G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3(ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4(AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos na análise pelo método de Kruskal-Wallis.

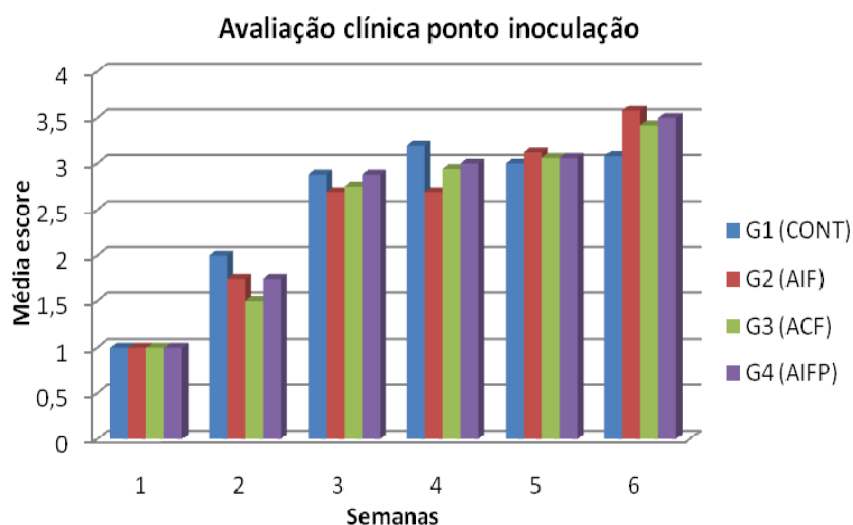


Figura 28- Média dos escores da avaliação clínica semanal durante tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

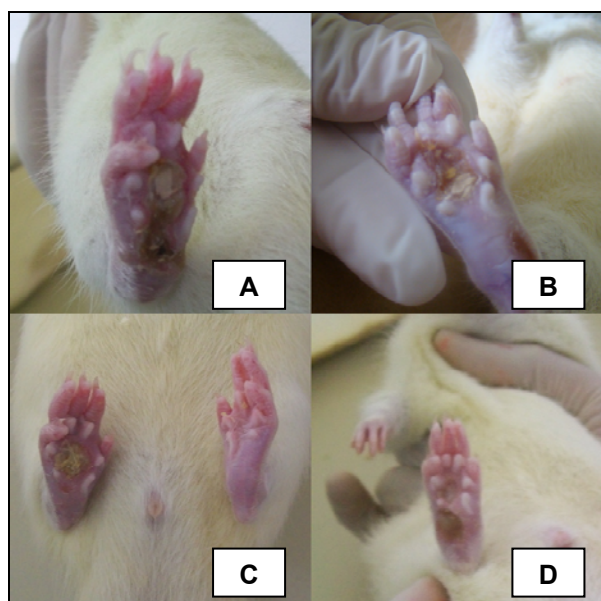


Figura 29- Lesões de esporotricose no coxim plantar direito na semana 4 do experimento com imunoterápico: (A) G1- presença de úlceras e crostas; (B) G2- presença de úlceras e crostas; (G3)- ulcera iniciando processo de regressão das lesões; (G4) presença de úlcera e exsudato (Setor de Micologia, FV-UFPeI)



Figura 30- Rato wistar pertencente ao grupo controle (G1) apresentando ulcera, crosta e linfangite ascendente no membro posterior direito durante imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPEI)

#### 4.4.1.2 Lesões em outras áreas corpóreas

Em relação às lesões de esporotricose em outras áreas corpóreas nas duas primeiras semanas experimento nenhum animal apresentou alterações. Na semana três 18,75% dos ratos do grupo 1 (CONT) apresentavam nódulos e úlceras em outros locais corpóreos como cauda, membro posterior esquerdo, membros anteriores e face.

Nas semanas quatro e cinco vários animais dos quatro grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4) tinham lesões em outras áreas, entretanto, não houve diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) entre eles nas cinco primeiras semanas do experimento.

Na última semana o G3 (ACF) foi o grupo que demonstrou menor frequência de animais com lesões em outras áreas corpóreas (16,7%), diferindo estatisticamente dos grupos G1 (CONT) e G4 (AIFP) ( $P < 0,05$ ). Os grupos G1, G2 (AIF) e G4 apresentaram 81,81%, 41,7% e 83,3% dos animais com esporotricose em outros locais (Tab. 8) (Fig.31; 32).

Tabela 8- Frequência semanal de lesões em outras áreas corpóreas durante tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais

| Semanas | Grupos (%)         |                    |                   |                   |
|---------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|         | G1 (CONT)          | G2 (AIF)           | G3 (ACF)          | G4 (AIFP)         |
| 1       | 0                  | 0                  | 0                 | 0                 |
| 2       | 0                  | 0                  | 0                 | 0                 |
| 3       | 18,75              | 0                  | 0                 | 0                 |
| 4       | 18,75              | 6,25               | 6,25              | 18,75             |
| 5       | 68,75              | 37,5               | 50                | 50                |
| 6       | 81,81 <sup>b</sup> | 41,7 <sup>ab</sup> | 16,7 <sup>a</sup> | 83,3 <sup>b</sup> |

G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3 (ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4 (AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as linhas ( $p > 0,05$ ) ao teste do qui-quadrado.

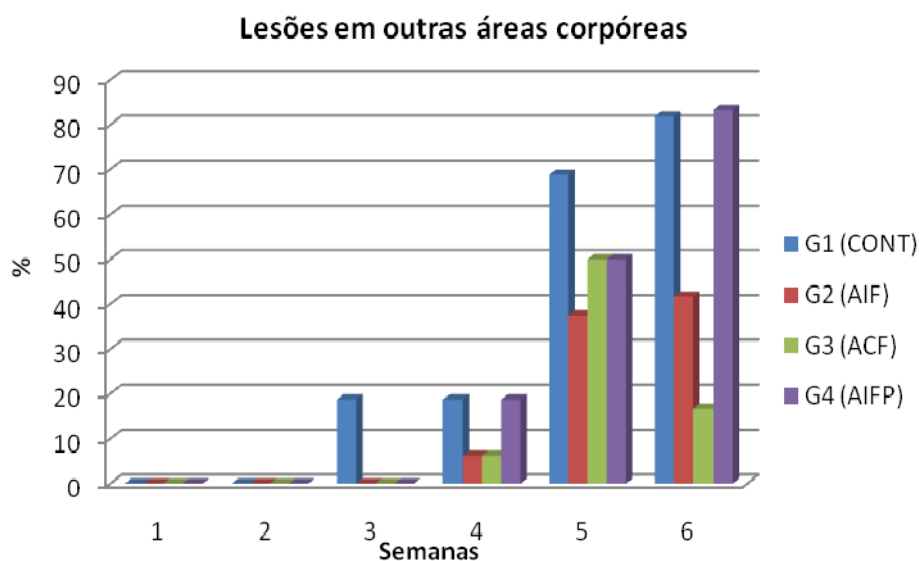


Figura 31- Frequência de lesões em outras áreas corpóreas nos quatro grupos experimentais durante imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPEI)

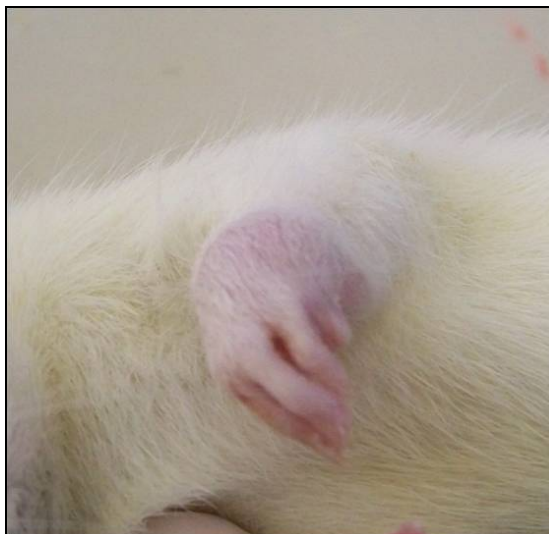


Figura 32- Rato wistar pertencente ao grupo 4 (AIFP) apresentando nódulo no membro anterior esquerdo durante imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPEI)

#### **4.4.2 Alterações anatomopatológicas dos animais experimentais**

Após a realização das necropsias os animais experimentais apresentaram lesões principalmente no baço, fígado, linfonodos e testículos, sendo que 91,7% dos animais do grupo G1 (CONT) demonstravam lesões esbranquiçadas, puntiformes localizadas ou disseminadas no baço, diferindo estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do grupo G2 (Tab. 9) (Fig.33).

No fígado as lesões foram observadas em 58,3%, 41,7%, 50% e 33,3% dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente (Fig.35).

Foram observadas lesões macroscópicas nos linfonodos poplíteos em 58,3% dos animais do grupo 1 (CONT), diferindo estatisticamente dos demais grupos experimentais ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao escore realizado na análise estatística o grupo G1 (CONT) diferiu somente do grupo 4 ( $P < 0,05$ ) (Tab. 9) (Fig.34).



Tabela 9- Frequência de lesões anatomopatológicas encontradas em órgãos internos, linfonodo poplíteo e testículo após tratamento com imunoterápico nos quatro grupos experimentais e média dos escores

| % lesões anatomopatológicas |                   |        |                   |           |                    |
|-----------------------------|-------------------|--------|-------------------|-----------|--------------------|
| Grupos                      | Baço              | Fígado | Linfonodo         | Testículo | Escore             |
| G1 (CONT)                   | 91,7 <sup>b</sup> | 58,3   | 58,3 <sup>b</sup> | 6,7       | 2,25 <sup>a</sup>  |
| G2 (AIF)                    | 41,7 <sup>a</sup> | 41,7   | 8,3 <sup>a</sup>  | 0         | 0,91 <sup>ab</sup> |
| G3 (ACF)                    | 83,3 <sup>b</sup> | 50     | 0,3 <sup>a</sup>  | 25        | 1,66 <sup>ab</sup> |
| G4 (AIFP)                   | 83,3 <sup>b</sup> | 33,3   | 0 <sup>a</sup>    | 8,3       | 1,25 <sup>b</sup>  |

G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3(ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4(AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as colunas ( $p>0,05$ ), escore analisado pelo método de Kruskal Wallis e os demais por qui-quadrado.

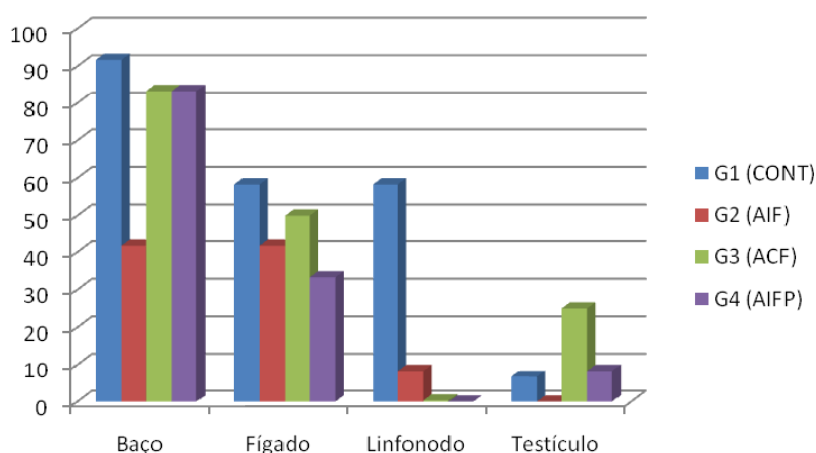


Figura 33- Frequência de alterações anatomopatológicas nos órgãos internos, linfonodo poplíteo e testículo nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPel)

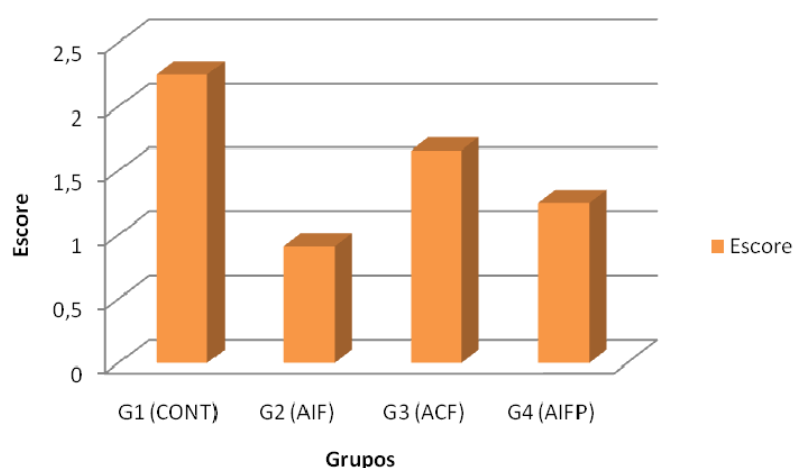


Figura 34- Escore de alterações anatomopatológicas observadas nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI)



Figura 35- Fígado de animal do grupo 3 (ACF) apresentando lesões puntiformes esbranquiçadas disseminadas após realização de necropsia

#### 4.4.3 Retroisolamento do *Sporothrix schenckii*

O retroisolamento do *S. schenckii* no ponto de inoculação foi obtido em 100% dos animais pertencentes ao grupo controle (G1), enquanto nos grupos G2 (AIF), G3 (ACF) e G4 (AIFP) o agente foi retroisolado em 85%, 60% e 95% respectivamente, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Tab. 10).

O *S. schenckii* foi retroisolado do fígado, baço e testículos dos animais pertencentes aos grupos G1, G2, G3 e G4, sendo que no grupo G1 (CONT) o agente foi retroisolado do fígado e baço em 75% e 85% dos animais respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais grupos ( $P < 0,05$ ) (Fig. 36).

Em relação ao escore do retroisolamento fúngico observado na análise estatística, o grupo controle (G1) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do G2 (ACF) e G4 (AIFP), porém não houve diferença estatística significativa do G1 (CONT) ( $P > 0,05$ ) em relação ao G3 (AIFP) (Fig. 37).

Tabela 10- Frequência de retroisolamento fúngico no ponto de inoculação, órgãos internos e testículos dos quatro grupos experimentais e média dos escores

| % retroisolamento fúngico |                  |                 |                 |                 |                     |
|---------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| Grupos                    | CPD (%)          | Fígado (%)      | Baço (%)        | Testículo(%)    | Escore              |
| G1 (CONT)                 | 100 <sup>a</sup> | 75 <sup>b</sup> | 85 <sup>b</sup> | 80 <sup>a</sup> | 3,4 <sup>b</sup>    |
| G2 (AIF)                  | 85 <sup>a</sup>  | 25 <sup>a</sup> | 35 <sup>a</sup> | 55 <sup>a</sup> | 2 <sup>a</sup>      |
| G3 (ACF)                  | 60 <sup>a</sup>  | 40 <sup>a</sup> | 55 <sup>a</sup> | 60 <sup>a</sup> | 2,55 <sup>a,b</sup> |
| G4 (AIFP)                 | 95 <sup>a</sup>  | 35 <sup>a</sup> | 35 <sup>a</sup> | 50 <sup>a</sup> | 2,15 <sup>a</sup>   |

CPD: Coxim plantar direito; G1 (CONT): controle; G2 (AIF): vacina com adjuvante incompleto de Freund; G3(ACF): vacina com adjuvante completo de Freund; G4(AIFP): vacina com adjuvante incompleto de Freund mais própolis.

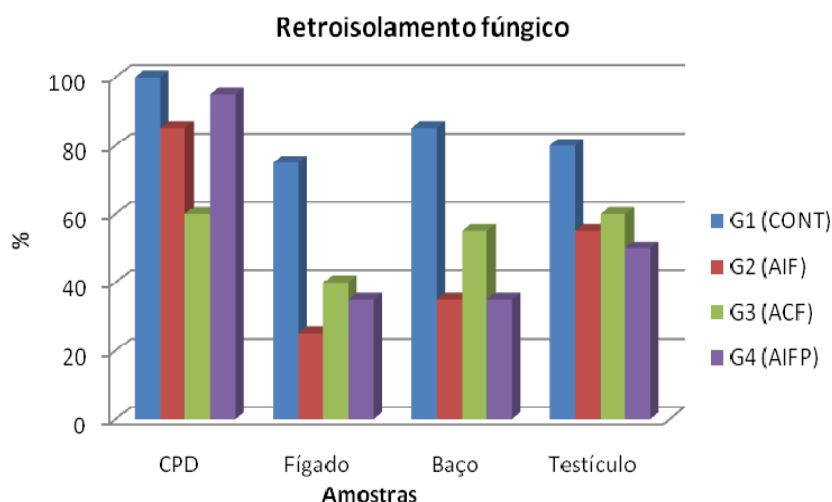


Figura 36- retroisolamento fúngico no coxim plantar direito, órgãos internos e testículo dos quatro grupos experimentais após utilização do imunoterápico (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

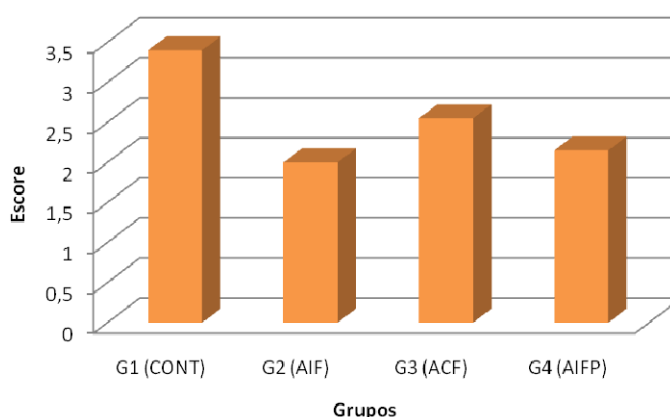


Figura 37- Escore de retroisolamento fúngico observados nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

#### 4.4.4 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Em relação à quantificação do *Sporothrix schenckii* foi observado que no ponto de inoculação, fígado, baço e testículo, dentre os grupos experimentais, os animais pertencentes ao grupo 2 (AIF) que receberam a formulação do imunoterápico com adjuvante incompleto de Freund apresentaram menor Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). A análise estatística evidenciou que os grupos tratados (G2, G3 e G4) diferiram estatisticamente  $p < (0,05)$  em relação ao grupo controle (G1) (Fig. 38).

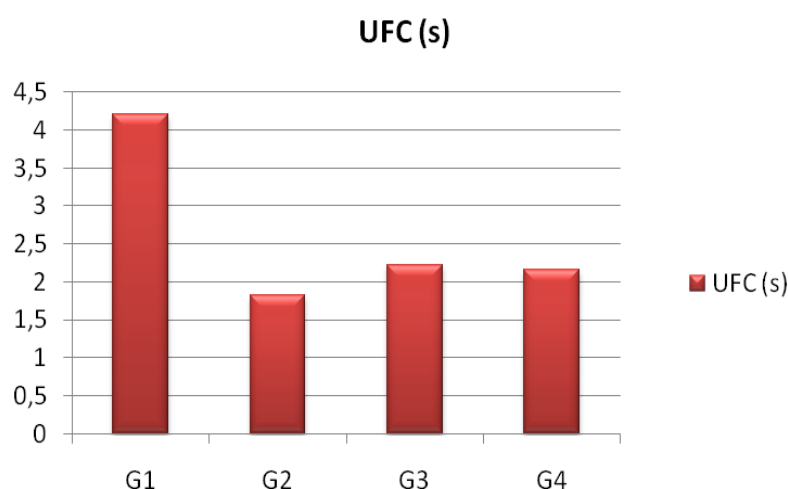


Figura 38- Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de *Sporothrix schenckii* nos quatro grupos experimentais após imunoterapia (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

#### 4.4.5 Avaliação histopatológica

No grupo G1 (CONT) todos os animais apresentaram lesões no sítio de inoculação; em um animal a lesão caracterizou-se por dermatite piogranulomatosa multifocal à coalescente moderada os demais animais diferiram na distribuição da lesão, que foi focalmente extensiva com ulceração moderado a acentuado. Nos demais órgãos examinados em um rato não foram observados lesões. Dois animais apresentaram granulomas multifocais no fígado e baço; em um rato foi observado periorquite granulomatosa multifocal.

Todos os animais do grupo G2 (AIF) apresentaram lesões no coxim caracterizadas por uma dermatite piogranulomatosa focalmente extensa com ulceração que por vezes variou na intensidade da lesão de moderado a acentuado. Um dos animais as lesões ficaram restritas a pele nos demais animais havia granulomas multifocais no fígado e baço.

Os animais do grupo G3 (ACF) apresentaram uma dermatite piogranulomatosa multifocal à coalescente acentuada com ulceração, apenas num animal a lesão era moderada. Ao exame dos demais órgãos um animal não apresentou alterações. Em dois animais havia piogranulomas e granulomas multifocais no fígado e baço (Fig. 39). Outro animal apresentou periorquite piogranulomatosa multifocal à coalescente acentuada (Fig. 40).

No grupo G4 (AIFP) todos os animais apresentaram lesões na pele, dois animais demonstraram dermatite piogranulomatosa multifocal à coalescente acentuada com ulceração. Esta lesão foi menos intensa em outro animal, no qual foi observada uma dermatite granulomatosa moderada. As lesões ficaram restritas ao coxim num dos animais. Em outro foi observado granulomas multifocais no fígado e baço. Em um animal havia periorquite piogranulomatosa multifocal à coalescente acentuada e granulomas multifocais no baço.

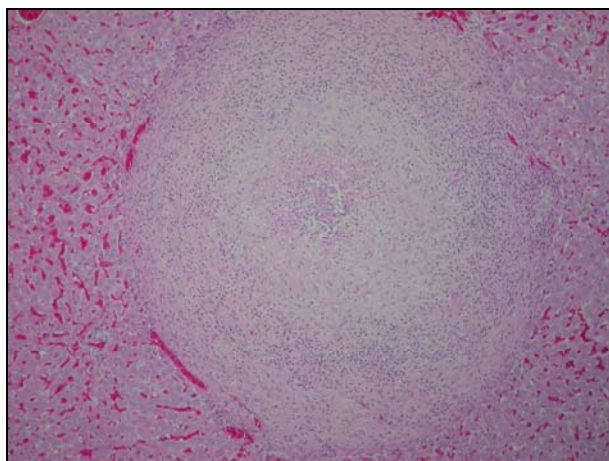


Figura 39- Corte histológico pertencente a rato G3 (ACF): Hepatite piogranulomatosa focal rodeada por cápsula fibrosa. H.E, objetiva 40X (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPeI)

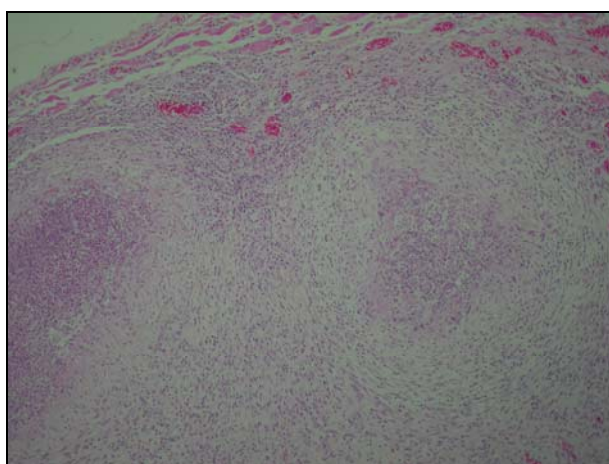


Figura 40- Corte histológico pertencente a rato do G3 (ACF): Periorquite piogranulomatosa multifocal à coalescente. H.E, objetiva 10X (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPeI)

## 5 DISCUSSÃO

Para a formulação da vacina e inoculação experimental foi utilizada uma cepa de *Sporothrix schenckii* proveniente de um caso de esporotricose disseminada em um felino doméstico que apresentava lesões na face, pavilhão auricular, região periocular esquerda, plano nasal e membro anterior esquerdo e eram nodulares, exsudativas e com presença de crostas. Segundo a literatura, a esporotricose em felinos se apresenta habitualmente na forma cutânea- fixa ou disseminadas a partir de lesões cutâneas que se espalham via hematógena ou através da linfa, podendo evoluir para forma sistêmica, embora o envolvimento ósseo seja raro (IWASAKI et al., 1988; SCHUBACH et al., 2001). As lesões se situam preferencialmente nas regiões cefálica, dos membros e da cauda, podendo, com frequência, assemelhar-se àquelas decorrentes de criptococose. Inicialmente caracterizam-se por abscessos, celulite ou com o aspecto fistuloso, evoluindo até amplas áreas necróticas, nodulares, ulceradas e crostosas (GONZALEZ- CABO et al., 1989; BARONI et al., 1998; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; SCHIAVO et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001).

Em relação à esporotricose experimental, vários estudos prévios foram realizados, os quais utilizaram as formas de inoculações intraperitoneal, intratesticular ou subcutânea em animais experimentais como camundongo, rato ou hamster para demonstração da patogenicidade do microrganismo, assim como a resposta imune do hospedeiro e o retroisolamento do agente (MUJICA et al., 1992; YOSHIIKE et al., 1993; NAKAMURA et al., 1996; FARIAS et al., 1997; TACHIBANA; MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1999; FLEURY et al., 2001). No presente estudo o modelo experimental e o sítio de inoculação utilizado são considerados preferenciais para a reprodução da esporotricose cutânea. Diversos autores demonstraram a suscetibilidade de ratos ao *Sporothrix schenckii*, assim como evidenciaram que o coxim plantar reproduz lesões semelhantes às decorrentes da forma espontânea da

esporotricose (DIXON; DUCAN; HURD, 1992; MUJICA et al., 1992; YOSHIIKE et al., 1993; NOBRE et al., 2003; KONG et al., 2006).

Levando em consideração que não há diferença significativa entre a utilização da fase micelial e leveduriforme para o desenvolvimento da esporotricose cutânea experimental (NOBRE et al., 2003) o inóculo utilizado neste estudo foi desenvolvido a partir da fase filamentosa do microrganismo.

A esporotricose é geralmente adquirida pela inoculação da forma filamentosa do *Sporothrix schenckii* encontrada no ambiente. As lesões da enfermidade são decorrentes da transformação do microrganismo para forma leveduriforme, que ocorre em aproximadamente 13 dias, e posterior multiplicação no tecido do hospedeiro (CORREA et al., 1991). Neste estudo as lesões no ponto de inoculação como nódulos e úlceras foram observadas dez dias após a inoculação dos animais experimentais coincidindo com o período de transformação do fungo da forma filamentosa para fase leveduriforme. Esses achados foram semelhantes aos descritos na literatura onde estudos *in vivo* utilizando animais experimentais resultaram na presença de nódulos e úlceras no ponto de inoculação entre o sétimo e décimo quarto dia de infecção (POLANIA; ALZATE; SARAVIA, 1990; MUJICA et al., 1992; YOSHIIKE et al., 1993; NOBRE et al., 2003; KONG et al., 2006).

Neste experimento, os ratos que utilizaram imunoprolático e imunoterápico foram inoculados com  $2 \times 10^3$  células de *S. schenckii*/ml para a reprodução da enfermidade. Vários estudos foram realizados utilizando esse padrão de inóculo para inoculação dos animais experimentais, demonstrando ser eficaz para produzir lesões características de esporotricose como nódulos, úlceras, exsudato, crostas e linfangite ascendente (NOBRE et al., 2003; ANTUNES, 2004; MADRID, 2007).

Para a imunoprolaxia dos animais, assim como para o tratamento da esporotricose experimental foram utilizadas formulações de vacinas preparadas a partir do agente *Sporothrix schenckii* inativado com a utilização de adjuvante oleoso. Diversos autores têm estudado a importância da utilização de vacinas tanto na prevenção como no tratamento de doenças fúngicas com um aumento cada vez maior pelo interesse nessa área de conhecimento, com a produção de vacinas recombinantes, atenuadas, inativadas, vacinas de subunidades, entre outras (NAES; SANDVIK, 1981; DIXON et al., 1998; RYBNIKAR; VRZAL; CHUMELA, 1998; ABUODEH et al., 1999; CARDENAS et al., 1999; DEEPE; GOBBONS, 2002; WUTHRICH et al., 2002; SANTURIO et al., 2003; DINIZ et al., 2004; VERMOUNT et



al., 2004; WÜTHRISH; WARNER; KLEIN, et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2007; STEVENS, 2007; BRAGA et al., 2009).

No presente estudo o inativante utilizado foi o thimerosal a 0,02% demonstrando bons resultados, concordando com outros autores que também o utilizaram para a inativação completa do *Pythium insidiosum* e *Fusarium verticillioides* (SANTURIO et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006).

Os animais que receberam o imunoprolático foram desafiados e necropsiados 10 dias após, quando a maioria dos ratos dos quatro grupos experimentais já apresentava lesões características de esporotricose no ponto de inoculação como a presença de nódulos e úlceras, sendo que nas alterações anatomopatológicas 50% dos animais do grupo 1 (CONT) demonstravam úlceras diferindo estatisticamente dos demais grupos (G2, G3 e G4). Neste estudo foi evidenciado presença de pontos brancos puntiformes localizados ou disseminados no fígado e baço. Estes resultados foram similares aos descritos na literatura em experimentos que também utilizaram animais experimentais para inoculação do *S. schenckii* (MUJICA et al., 1992.; YOSHIIKE et al., 1993; NAKAMURA et al., 1996).

Quanto ao retroisolamento do *Sporothrix schenckii* e a quantificação das Unidades Formadoras de Colônias o presente estudo evidenciou que os animais que receberam as diferentes formulações de vacinas (G2, G3 e G4) apresentaram uma redução no crescimento fúngico quando comparado ao grupo controle (G1) tanto no coxim plantar direito quanto nos órgãos internos, demonstrando que houve alguma resposta imunológica contra o *S. schenckii*. Em outros estudos realizados, os autores descreveram que a imunidade contra o *Sporothrix schenckii* é principalmente a mediada por células (BARNESTON; GAWKRODGE, 1994; ROOK, 1994; ROILIDES, et al., 1998, TACHIBANA, MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1999). Tachibana, Matsuyama e Mitsuyama (1999) demonstraram que a imunidade adquirida contra *S. schenckii* é principalmente realizada pelos macrófagos ativados por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) produzido por LT CD4<sup>+</sup>. Porém estudos recentes demonstram que as respostas imunológicas tanto mediadas por anticorpos e por células, contribuem na proteção contra fungos como *S. schenckii* (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005).

Nascimento e Almeida (2005) evidenciaram recentemente em ratos inoculados experimentalmente 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.

O retroisolamento do *S. schenckii* de órgãos internos e sítio de inoculação já foram evidenciados em estudos *in vivo* demonstrando a ocorrência da disseminação do agente uma semana após a inoculação subcutânea (POLANIA et al, 1990; ANTUNES, 2004; MADRID, 2007). Outros estudos realizados demonstraram uma diminuição na quantificação das Unidades Formadoras de Colônias após a utilização de vacinas para fungos (ABUODEH et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2005).

A avaliação histopatológica dos animais que receberam imunoprolático demonstrou que no grupo G1 (CONT) todos os animais apresentaram lesões no local de inoculação (coxim) caracterizada por uma dermatite piogranulomatosa focalmente extensa que por vezes variou na intensidade da lesão de moderada à acentuada. Um dos animais além das lesões no ponto de inoculação apresentou granulomas multifocais no fígado. No grupo G2 dois animais apresentaram lesões apenas no coxim plantar direito caracterizada por uma dermatite piogranulomatosa multifocal à coalescente que variou de moderada à acentuada. Um animal observou-se lesão no local de inoculação e fígado, no coxim havia uma dermatite piogranulomatosa focalmente extensiva acentuada e no fígado granulomas multifocais. Os ratos do grupo G3 apresentaram lesões apenas no local de inoculação caracterizada por uma dermatite piogranulomatosa multifocal que variou de moderada à acentuada. No grupo G4 (AIFP) as lesões restringiram-se à pele; dois animais apresentaram dermatite granulomatosa multifocal que variou de discreta à moderada e dois animais apresentaram dermatite piogranulomatosa multifocal acentuada.

As lesões histopatológicas demonstradas no presente estudo foram semelhantes às descritas na literatura por outros autores (DUNSTAN et al., 1986; FINDLAY; VISMER, 1986; LARSSON et al., 1989; DIXON; DUNCAN; HURD, 1992; YOSHIIKE et al., 1993; NAKAMURA et al., 1996; FARIAS et al., 1997; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; SCHUBACH et al., 2001).

Os animais que receberam o imunoterápico demonstraram durante o período experimental que, a partir da semana um após inoculação com  $2 \times 10^3$  células de *S. schenckii*/ml, o quadro clínico e as lesões nos quatro grupos experimentais (CONT, AIF, ACF e AIFP) foram similares aos descritos na literatura

em experimentos que também utilizaram animais experimentais como ratos, camundongos e hamsters para inoculação do *S. schenckii* (POLANIA et al., 1990; DIXON et al., 1992; MUJICA et al., 1992.; YOSHIIKE et al., 1993; NAKAMURA et al., 1996) destacando neste estudo a presença de nódulos nos grupos G1 (CONT), G2 (AIF), G3 (ACF) e G4 (AIFP) que evoluíram para úlceras, exsudatos, necrose e crostas, sendo que em alguns animais ocorreu envolvimento linfático e disseminação do agente com aparecimento de lesões em outras áreas corpóreas. A infecção por *S. schenckii* em animais experimentais é produzida com facilidade, sendo os ratos especialmente suscetíveis a este microrganismo (MUJICA et al., 1992).

Em um estudo experimental em hamsters, Polania et al. (1990) demonstraram que nódulos e eritema foram observados nove dias após receberem o inóculo com posterior aparecimento de úlceras e necrose no sítio de inoculação em todos os animais, mas alguns apresentaram lesões disseminadas principalmente nas patas mesmo sendo utilizado  $2,5 \times 10^3$  células de *S. schenckii*/ ml, que seria para promover uma infecção localizada.

Este estudo demonstrou que as lesões de esporotricose observadas nos animais experimentais também foram semelhantes às descritas na literatura em humanos e animais que iniciam com presença de nódulos que ulceram e drenam exsudato castanho-avermelhado com formação de crostas e lesões necróticas podendo ser localizada ou com envolvimento de vasos linfáticos e em felinos pode ocorrer disseminação do agente e esporotricose sistêmica (DUNSTAN et al., 1986; DÍAZ, 1987; GONZÁLEZ-CABO et al., 1989; LARSSON et al., 1989; NAKAMURA et al., 1996; FARIAS et al., 1997; BARONI et al., 1998; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; NOBRE et al., 2002).

No grupo CONT a evolução clínica da enfermidade foi conforme a relatada em outros trabalhos inclusive com regressão das lesões no ponto de inoculação em alguns animais ao final do experimento (POLANIA et al., 1990; DIXON; DUNCAN; HURD, 1992; MUJICA et al., 1992.; YOSHIIKE et al., 1993; NAKAMURA et al., 1996). Esta considerável diminuição das lesões em alguns ratos pode ser explicada pelo fato destes, no decorrer do período experimental, terem adquirido imunidade contra o *S. schenckii*, com isso ocorreu uma redução das lesões provocadas pelo agente. Este fato foi relatado por Mujica et al. (1992) que observaram que ratas inoculadas com *S. schenckii* apresentaram uma boa resposta tanto na imunidade

humoral como na mediada por células, ocasionando uma regressão da enfermidade aos 30 dias de infecção. Isto também pôde ser observado em felinos, pois de acordo com revisão bibliográfica realizada por Farias et al. (1997), em um estudo realizado por McDonald et al. (1980), 25% dos gatos inoculados com o *S. schenckii* apresentaram resolução espontânea da doença, indicando que atualmente a esporotricose é uma doença mais freqüente e deve ser considerada em todos os casos de lesões granulomatosas e ulceradas.

No tratamento da esporotricose cutânea experimental com diferentes formulações dos imunoterápicos, os animais dos grupos G2 (AIF), G3 (ACF) e G4 (AIFP) apresentaram regressão e cicatrização das lesões no sítio de inoculação, sendo que no grupo 2 (AIF) 58,3% dos animais apresentavam lesões regredidas e em processo de cicatrização, entretanto em relação as lesões em outras áreas corpóreas o grupo G3 (ACF) chegou ao final do experimento com somente 16,7% dos animais com múltiplas lesões de esporotricose. Os resultados obtidos no presente estudo embora apresentem uma pequena melhora clínica nos animais tratados com imunoterápico, discordam da literatura quando comparados aos tratamentos convencionais que tem como antifúngico de eleição o itraconazol (RESTREPO et al., 1986; KAUFFMAN; HAJJEH; CHAPMAN, 2000; SCHUBACH et al., 2000; ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003; SCHUBACH et al., 2004).

Dentre os tratamentos alopáticos, o iodeto de potássio continua sendo um dos tratamentos efetivos para a esporotricose em humanos e animais, mas tem se mostrado ineficaz em felinos, podendo desenvolver iodismo (LARSSON, 2000).

Na avaliação clínica os grupos que apresentaram melhor resultado foram os Grupos G2 e G3, os quais foram tratados com imunoterápicos com Adjuvante incompleto de Freund e Adjuvante Completo de Freund, respectivamente. Estes são adjuvantes oleosos que atuam liberando o antígeno lentamente e aumentando a ingestão macrofágica, sendo que o Completo de Freund possui micobactérias mortas potencializando a resposta imunológica (JANEWAY et al., 2002; TIZARD, 2002). Os animais do G4 (AIFP) foram tratados com imunoterápico composto por Adjuvante Incompleto de Freund mais própolis que possui uma ação imunomoduladora. Porém, os resultados deste estudo não concordaram com o descrito na literatura por Fischer (2007) que estudou a capacidade adjuvante de um extrato etanólico de própolis verde em camundongos imunizados contra o

herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) e observaram aumento significativo das respostas imunes humoral e celular.

As alterações anatomopatológicas de órgãos internos demonstraram diferenças estatísticas significativas dos grupos tratados em relação ao grupo controle, evidenciando um menor número de animais apresentando lesões macroscópicas compatíveis com esporotricose. As alterações macroscópicas encontradas no presente estudo já foram descritas por outros autores que utilizaram animais experimentais para produzirem esporotricose cutânea e sistêmica (MUJICA et al., 1992; NOBRE et al., 2003; ANTUNES, 2004; MADRID, 2007; MARTINS, 2008).

No presente estudo o fungo *Sporothrix schenckii* foi retroisolado dos coxins plantares dos animais dos grupos G1 (CONT), G2 (AIF), G3 (ACF) e G4 (AIFP) não apresentando diferença estatística entre eles. O fungo foi retroisolado de órgãos internos dos quatro grupos experimentais, porém com menor frequência de retroisolamento dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle (G1). As colônias isoladas a 25<sup>0</sup>C foram caracterizadas por coloração inicialmente branca amarelada membranosa e posteriormente tornando-se preguiada e escura variando de cinza claro a cinza escuro com a presença de hifas finas, septadas, com conídios piriformes distribuídos ao longo destas, ou na extremidade, dispendo-se em forma de “margaridas”. O cultivo a 37<sup>0</sup>C demonstrou células leveduriformes ovaladas ou arredondadas. A macromorfologia e micromorfologia do *Sporothrix schenckii* neste estudo foram semelhantes ao descrito na literatura por diversos autores (DIAZ, 1987; LARSSON et al., 1989; POLANIA et al., 1990; CARAVALHO et al., 1991; MUJICA et al., 1992; YOSHIIKE et al., 1993; NAKAMURA et al., 1996; FARIAS et al., 1997; SCHUBACH et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Em relação à quantificação do *Sporothrix schenckii* foi observado que no ponto de inoculação, fígado, baço e testículo, dentre os grupos experimentais, os grupos tratados (G2, G3 e G4) diferiram estatisticamente do grupo controle (G1), evidenciando uma redução no número de células fúngicas nos animais tratados. O presente estudo demonstra que os ratos pertencentes aos grupos tratados estão respondendo imunologicamente ao imunoterápico. Estudos prévios com tratamentos antifúngicos demonstraram uma redução nas UFC (s) após o período experimental, porém ainda apresentando crescimento de células de *Sporothrix schenckii* (ANTUNES, 2004; MARTINS, 2008).

De acordo com Farias et al. (1997) mesmo sendo realizada terapia medicamentosa os organismos fúngicos podem permanecer no local da lesão por até seis meses.

Neste estudo, o período de tratamento dos animais com imunoterápico foi de seis semanas e ao final do experimento estes ainda apresentavam lesões no sítio de inoculação (coxim plantar direito) e em outras áreas corpóreas. Segundo a literatura, o tratamento da esporotricose com agentes antifúngicos deve ser realizado por um período mínimo de três meses para redução completa das lesões, porém, não foi o evidenciado no presente estudo (RESTREPO et al., 1986; KAUFFMAN; HAJJEH; CHAPMAN, 2000; SCHUBACH et al., 2000; ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003; ANTUNES, 2004; SCHUBACH et al., 2004;).

As alterações histopatológicas observadas no presente estudo foram semelhantes às descritas em outros trabalhos que descrevem a presença de granulomas com centros necróticos, infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos e presença de cápsula de tecido fibroso circundando a lesão (MIYAJI; NISHIMURA, 1982; DIXON; DUNCAN; HURD, 1992; ANTUNES, 2004). As lesões granulomatosas características da esporotricose ocorrem devido à resposta imune ser mediada por linfócitos T CD4 e macrófagos, que caracterizam a hipersensibilidade tardia com formação de granulomas (MIYAJI; NISHIMURA, 1982; TACHIBANA; MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1999; KAJIWARA et al., 2004).

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos permitem concluir que as três formulações de vacinas (AIF, ACF e AIFP) utilizadas como imunoprolático e imunoterápico não foram eficazes para a remissão completa das lesões de esporotricose cutânea experimental, entretanto houve uma diminuição nas lesões do ponto de inoculação, em órgãos internos e uma diminuição na frequência do retroisolamento do agente e quantificação das Unidades Formadoras de Colônias quando comparadas ao grupo controle.

## 7 PERSPECTIVAS

Em vista desses resultados, surge a necessidade de aprofundar os estudos para elucidar o exato mecanismo de ação das vacinas sobre o sistema imune dos animais com esporotricose. Pesquisas devem ser realizadas para purificação do fungo *Sporothrix schenckii* e suas proteínas, avaliação de diferentes doses, intervalos e duração de administração dos imunoprolifáticos e imunoterápicos quanto à estimulação da resposta imune frente a esta micose. Devem ser estudados outros adjuvantes vacinais, assim como futuramente a produção de outros tipos de vacinas contra a esporotricose. O avanço destes estudos possibilitará o alcance de uma alternativa preventiva da doença e terapêutica para os casos graves de esporotricose, bem como casos refratários ao tratamento antifúngico.



## 8 REFERÊNCIAS

- ABUODEH, R.O; SHUBITZ, L.F; SIEGEL, E; SNYDER, S; PENG, T; KORSBORN, K.I; BRUMMER, E; STEVENS, D.A; GALGIANI, J.N. Resistance to *Coccidioides immitis* in Mice after Immunization with Recombinant Protein or a DNA Vaccine of a Proline-Rich Antigen. **Infection and immunity**, p. 2935–2940, 1999.
- ALMEIDA, F.; SAMPAIO, S.A.P.; LACAZ, C.S.; FERNANDES, J.C. Dados estatísticos sobre a esporotricose: análise de 344 casos. **An. Bras. de Dermat. e Sifilogr**, v.30, 1955.
- ALMEIDA, H.L; LETTINI, C.B.E; BARBOSA, J.L; DIAS, M.C.F. Case report: Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v.51, n. 4, p. 234-238, 2009.
- ANTUNES, T.A. **Efeito do Itraconazol e da Terbinafina no tratamento da esporotricose cutânea experimental**. 2004. 60f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ARENAS, R. **Micologia Médica Ilustrada**. México – DF. 1993. Cap. 13: Esporotricosis.: p. 145-151.
- ARNOLD, W.N.; MANN, L.C.; SAKAI, K.H.; GARRISON, R.G.; COLEMAN, P.D. Acid phosphatases of *Sporothrix schenckii*. **Journal of General Microbiology**, v.132; p.3421-3432, 1986.
- BAKER, J. H.; GOODPASTURE, H. C.; KUHNS, H. R.; RINALDI, M. G. Fungemia caused by amphotericin B-resistant isolate *Sporothrix schenckii*. Successful treatment with itraconazole. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 113, n. 11, p. 1279-1281, 1989.
- BARNES, R. & GAWKRODGER, D. Hipersensibilidade-tipo IV. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J; MALE, D. **Imunologia**. 3º ed. Editora Manole Ltda. São Paulo, p. 22.1-22.12, 1994.
- BARONI, F.A.; CAMPOS, S.G.; DIREITO, G.M. Esporotricose em gato (Descrição de um caso). **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.20, n.1, p.25-27, 1998.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH,T.M.P.; GALHARDO,M.C.G.; SCHUBACH,A.O.; MONTURO,P.C.F.; REIS,R.S.; PLIVEIRA, R.M.Z.; LOZÉIA,M.S.; CUZZI-MAYA,T.; BLANCO, T.M.; MARZOCHI, K.B.F.; WANKE, B.; VALLE, A.C.F. Sporotrichosis: an Emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.956, n.6, p. 777-779, 2001.

BAZIN, H. A brief history of the prevention of infectious diseases by immunizations. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, p.293-308, 2003.

BELKNAP, B. S. Sporotrichosis. **Dermatol. Clin.**, v. 27, n. 2, p. 193-202, 1989.

BLOM, A.G., HILGERS, L.A. The sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvants: effect of the chemical composition. **Vaccine**, v.23, p.743-754, 2004.

BORBA, C.M.; SILVA, A.M.M.; OLIVEIRA, P.C. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. **Mycoses**, v.35, p. 185-188, 1992.

BRAGA, C.J.M; RITTNER, G.M.G; HENAO, J.M; TEIXEIRA, A.F; MASSIS, L.M; SBROGIO-ALMEIDA, M.E; TABORDA, L.R. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43 derived sequence and Salmonella enteric F.C flagellin. **Infection and Immunity**, v.77, n. 4, p. 1700-1707, 2009.

BUSTAMANTE, B; CAMPOS, P. E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Rev.Anti-Infect. Ther**, v. 2, p. 85-94, 2004.

CABEZAS, C.; BUSTAMANTE, B.; HOLGADO, W.;BEGUE, R.E. Treatment of cutaneous Sporotrichosis with one daily dose of potassium iodide. **Pediatr. Infect. Dis. J**, v. 15, n.4, p. 352-354, 1996.

CAPRILES, C.C.; ESSAYAG, M.S.; LANDER, A.; CAMACHO, R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). **Mycopathologia**, v.122, n.3, p.129-133, 1993.

CARAVALHO Jr, J.; CALDWELL, J.B.;RADFORD, B.L.; FELDMAN, A.R. Feline-transmitted Sporotrichosis in the Southwestern United States. **West. J. Med.**, v.154, n.4, p. 462-465, 1991.

CARDENAS-FREYTAG, L; CHENG, E; MAYEUX, P; DOMER, J; CLEMENTS, J. Effectiveness of a Vaccine Composed of Heat-Killed *Candida albicans* and a Novel Mucosal Adjuvant, LT(R192G), against Systemic Candidiasis. **Infection and immunity**, v.67, n.2, p.826-833, 1999.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. **Mycopathologia**, v.117, p.139- 144, 1992.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.144, n.1, p.9-14, 1999.

CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.127, p.189-194, 1994.

CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J.E.; MAGLIANI, W.; MURPHY, J.W.; POLONELLI, L.; ROMANI, L. Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute. **Medical Mycology**, v.36, n.1, p.95-105, 1998.

CASERONE, S.; COMTI-DIAZ, I.A.; ZANETTA, E.; PEREIRA, M.E.P. Serologia de la esporotricosis cutânea. **Sabouraudia**, v.21, p.317-321, 1983.

CONTI-DIAZ, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v.108, p.113-116, 1989.

COPETTI, M.V.; SANTURIO, J.M.; ARGENTA, J.S.; LEAL, A.B.M.; GONÇALVES, L.M.; ALVES, S.H. Esporotricose eqüina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.2, p. 135-138, 2002.

CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; PALAZZO, S. Morphogenesis of *Sporothrix schenckii* "in vivo" and "in vitro" through the method of viability by fluorescence. **Applied Fluorescence Technology**, v.3, p.1-8, 1991.

COSKUN, B.; SARAL, Y.; AKPOLAT, N.; ATASEVEN, A.; ÇIÇEK, D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. **Mycopathologia**, v.158, p. 53-56, 2004.

COSTA, D.M.; MOREIRA, N.S.; TOLEDO-PIZA, E.; RIBEIRO, L.A.F. Esporotricose felina: relato de quatro casos no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veerinária**, v.7, suplemento1, p.131, 2000.

CUTLER, J.E.; DEEPE Jr.; KLEIN, B.S. Advances in combating fungal diseases: vaccine on the threshold. 2007. [www. Nature.com/reviews/micro](http://www.Nature.com/reviews/micro).

DE PAUW, B. E. New antifungal agents and preparation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 147-150, 2000.

DEEPE JR, G; GIBBONS, R. Cellular and Molecular Regulation of Vaccination with Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum* **The Journal of Immunology**, v. 70, N.7, p. 3759–3767, 2002.

DÍAZ, I.C. Esporotricosis. **Rev. Méd. Uruguay**, v.3, p.135-147, 1987.

DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MONTERO-GEI, F.; CASTRO, L. G. M.; SAMPAIO, S. A. P.; BORELLI, D.; RESTREPO, A. A Pan-American 5-years study of fluconazole therapy for deep mycosis in the immunocompetent host. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, supp. 1, p. 68-72, 1992.

DINIZ SN, REIS BS, GOES TS, ZOUAIN CS, LEITE MF, GOES AM. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**. p. 485-92, 2004.

DIXON, D. M.; DUNCAN, R.; HURD, N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. From the largest U.S. Epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 951-954, 1992.

DIXON, D.M.; CASADEVALL, A.; KLEIN, B.; MONDOZA, L.; TRAVASSOS, L.R.; DEEPE, Jr.G.S. Development of immunotherapies and their use in the prevention of fungal infections. **Med. Mycol.**, v.36, p. 57-67, 1998.

DONADEL, K.W.; REINOSO, Y.D.; OLIVEIRA, J.C.; AZULAY, R.D. Esporotricose: revisão. **An. Bras. Dermatol.**, v.68, n.1, p.45-52, 1993.

DUNSTAN, R.W.; LANGHAM, R.F.; REIMANN, K.A.; WAKENELL. Feline sporotrichosis: A report of five cases with transmission to humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.15, n.1, 1986.

FARIAS, M.R.; COSTA, P.R.S.; FRANCO, S.R.V.S.; FERREIRA, H. Esporotricose felina e canina. **Cães & gatos**, v.66, p. 30-38, 1997.

FERNANDES, CGN; MOURA, ST; DANTAS, AFM; BLATT, MCS. Esporotricose felina – Aspectos clínico-epidemiológicos: Relato de casos (Cuiabá, Mato Grosso, Brasil). **MEDVEP**, v.2, n.5, p.39-43, 2004.

FERNANDES, K.S.S.; COELHO, A.L.J.; LOPES-BEZERRA, L.M.; FIDALGO, C.B. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology**, v.101, p.563-569, 2000.

FERREIRO, L. Bibliografia sobre micoses, micotoxicoses e micologia experimental em animais no Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**; Porto Alegre, v.12, n.1, p.139-160, 1984.

FIGUEIREDO, J.F.; FERREIRA, F.A. Esporotricose canina. **Veterinária Notícias**, v.4, n.1, p.115-120, 1998.

FINDLAY, G.H.; VISMER, H.F. Studies in sporotrichosis: Fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. **Mycopathologia**, v.96, p.115-122, 1986.

FISCHER, F.; COOK, N.B. Fungos subcutâneos. **Micologia: fundamentos e diagnóstico**. Rio de Janeiro, Revinter, cap 6, p.153-192, 2001.

FISCHER, G; CLEFF, M.B; DUNNER, L.A; PAULINO, N; PAULINO, A.S; VILELA, C.O; CAMPOS, F.S; STORCH,T; VARGAS, G.A; HÜBNER, S. O; VIDOR, T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, V.116, P.79-84, 2007.

FISCHER,G. **Avaliação da capacidade imunomoduladora de extratos de própolis verde em animais vacinados com herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) ou herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).**2007. 76f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

FISCHMAN,O.; ALCHORNE, M.M.A.; PORTUGAL,M.A.S.C. Human sporotrichosis following rat bite. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n.2, p. 99-102, 1973.

FLEURY, R.N.; TABORDA, P.R.; GRUPTA, A.K.; FUJITA, M.S.; ROSA, P.S.; WECKWERTH, A.C.; NEGRÃO, M.S.; BASTAZINI, I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v.40, n.5, p.318-322, 2001.

FREITAS, D.C.; MORENO,G.; SALIBA, A.M.; BOTTINO,J.A.; MÓS, E.N. Esporotricose em cães e gatos. **Rev.. Fac. Med. São Paulo**, v. 7, n.2, p.381-387, 1965.

FREITAS,D.C.; MIGLIANO,M.F.; ZANI NETO,L. Esporotricose: observação de caso espontâneo em gato doméstico (*Felis catus*). **Revista Medicina Veterinária**, v. 5, p.601-604, 1956.

GONZÁLEZ-CABO, .J.F.; DE LAS HERA GUILLAMON, M.; CEQUIEL, M.V.L.; CIERCOLES, J.A.G. Feline sporotrichosis: A case report. **Mycopathologia**, v.108, p.149-154, 1989.

GORDON, P.J.; BOND, R. Efficacy of a live attenuated *Trichophyton verrucosum* vaccine for control of bovine dermatophytosis. **Veterinary Record**, v.139, p. 395-396, 1996.

GORGOSINHO, KB; SOUZA, HJM; NEVES, A; FUSCO, MA; BELCHIOR, C. Um caso atípico de esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.2, p.167-170, 2006.

GREYDANUS-VAN DER PUTTEN, S. W.; KLEIN, W.R.; BLANKENSTEIN,B.; DE HOOG,G.S.; KOOEMAN,J. Sporotrichosis in a horse. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 119, n. 17, p. 500-502, 1994.

GUDDING, R.; LUND, A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. **Can Vet J**, v. 36, p. 302-306, 1995.

HAMAD, M. Antifungal Immunotherapy and Immunomodulation: A Double- Litter Approach to deal with invasive fungal infections. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, p. 533-543, 2008.

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

HOPPE-TICHY T. - Systemische Pilzerkrankungen: **Klinik und antimykotische Therapie. Pharm.**, n.142, p.2161-2168. 1997.

HULL,P.R.; VISMER,H.F. Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafine. **Br. J. Dermatol**, v. 126, p. 51-55, 1992.

IWASAKI,M.; HAGIWARA,M.K.; GANDRA, C.R.P.; CORREA,B.; ARAÚJO,N.S. Skeletal sporotrichosis in a dog. **Comp. Anim. Pract.**, v. 5, n.2, p.27-31, 1988.

JANEWAY, C.A; SHLOMCHIK,M; TRAVES,P; WALPORT,M. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença**. Ed: Artmed, São Paulo, 5<sup>o</sup> ed., p. 639-643.

JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W. Azole drug resistance in yeasts. **J. Antimicrob Chemother.**, v. 36, p. 751 - 755, 1995.

JUNGERMAN, P.F; SCHWARTZMAN, R.M. Sporotrichosis. In: **Veterinary Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1972, p. 31-39.

JUSTA P. NETO, R.; MACHADO, A.R.; CASTRO, G.; QUAGLIO, A.S.; MARTINEZ, R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida- relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, p.57-61, 1999.

KAJIWARA, H.; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p.5073-5079, 2004.

KAUFFMAN, C. A.; HAIJJEH, R.; CHAPMAN, S. H. Pratices guidelines for management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Disease Society of America. **Clin Infect Dis.**, v. 30, n. 4, p. 684-687, 2000.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, n.2, p.231-236, 1999.

KAUFFMAN, C.A.; HAJJEH ,R.; CHAPMAN, S.W. Practice Guidelines for the Management of Patients with Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p. 684-687, 2000.

KELLY, S.E.; CLARK, W.T. Feline Sporotrichosis: A Case Report with Zoonotic Involvement. **Aust. Vet. Practit.**, v.21, n.3, p.139-142, 1991.

KERN, M.; BLEVINS, K. Organismos que causam micoses subcutâneas. In: **Micologia médica**. São Paulo, Premier, 1999, cap. 6, p.171-200.

KNOW- CHUNG, K. J.; BENNETT, J.E. **Medical Micology**. Lea & Fibeger, Philadelphia, 1992, 866p.

KONG, X.; XIAO T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.12, p.1077–1081, 2006.

LACAZ, CS; PORTO, E; MARTINS, JEC; HEINS-VACCARI, EM; MELO, NT. **Tratado de Micologia Médica**, Ed: Savier, São Paulo, 9ª ed., 2002, p.479-497.

LARSSON, C. E., Dermatozoonosis. In: CONGRESSO DE LA ASOCIACIÓN MUNDIAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DE PEQUEÑOS ANIMALES, 23, 1998, Buenos Aires. **Anais...** 1998, Buenos Aires, Argentina, p.25-28.

LARSSON, C.E. Criptococose e esporotricose em carnívoros domésticos: aspectos clínicos e tratamento. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 13, Gramado-RS, 1997. **Anais**

LARSSON, C.E.; Esporotricose. In: Simpósio Brasileiro sobre Micoses Animais, 1, Porto Alegre- RS, 4 a 5 de maio de 2000. **Anais**

LARSSON, C.E.; GONÇALVES, M.A.; ARAÚJO, V.C.; DAGLI, M.L.Z.; CORREA, B.; FAVA NET, C.,. Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonóticos, **Rev. Inst. Méd. Trop.**, São Paulo, v.31, n.5 , p.351-358, 1989.

LEAL, A.T.; SANTURIO, J.M.; LEAL, A.B.; PINTO, A.M.; GRIEBELER,J.; FLORES, E.F.; FERREIRO, L.; CATTO. Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. **Ciência Rural**, v.32,n. 6, 2002.

LIMA, O.C.; FIGUEIREDO, C.C.; PEREIRA, B.A.S.; COELHO, M.G.P.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L.M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. Brazilian **Journal of Medical and Biological** , v.32, n.5, p. 651-657, 1999.

LLOYD, K.O.; BITTON, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from yeast form of *Sporothrix schenckii*. Strutural and immunochemical studies. **J. immunol.** v.7, p.663-671, 1971.

LONDERO,A.T.; CASTRO,R.M.; FISCHMAN. Two cases of Sporotrichosis in Dogs in Brazil. **Sabouraudia**, v.18, p. 273-274, 1964.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; BRUM, L.M.; WESPHALEN, J.B.; ALTERMANN, M.J.; PRATES, F.B. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v.32, n.1, p.43-51, 1999.

LOPES-BEZERRA, L; SCHUBACH, A; ROSANE, COSTA, O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 293-308, 2006.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses). **Revista de Medicina**, v.10, n.21.p.443-450, 1907.

MADRID, I. M. ; XAVIER, MELISSA ORZECOWSKI ; MATTEI, ANTONELLA ; CARAPETO, L. P. ; **ANTUNES, T. A.** ; SANTOS JR, RONALDO ; NOBRE, MARCIA OLIVEIRA ; MEIRELES, MÁRIO CARLOS ARAÚJO . Esporotricose óssea e cutânea em canino. **Brazilian Journal of veterinary research and animal science**, v. 44, p. -, 2007.

MADRID, Isabel Martins. **Estudo de casos espontâneos de esporotricose canina e felina, e avaliação da melanina em células de *Sporothrix schenckii* em modelo murino**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.161, p.11-19, 2006.

MALE, D.; ROIT, I. Introdução ao sistema imune. In: *ROITT, I; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunologia.*, cap 1, 3º ed, Manole Ltda, São Paulo, p. 1-12, 1994.

MARQUES, A.; DHONT, J.; SORGELOOS,P.; BOSSIER, P. Immunostimulatory nature of b-glucans and baker's yeast in. **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, p.682-692, 2006.

MARQUES, S.A.; CAMARGO, R.M.P.; FAGUNDES, L.K. Sporotrichosis: survey and clinical aspects from Botucatu School of Medicine, state of São Paulo, Brazil. **An. Bras. Dermat.**, v.72, n.4, p. 343-347, 1997.

MARQUES, S.A.; FRANCO,S.R.V.S.; CAMARGO, R.M.P.; DIAS,L.D.F.; HADDAD JUNIOR,V.; FABRIS,V.E. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.4, p. 327-330, 1993.

MARTINS, Anelise Afonso. **Avaliação do uso do imunomodulador  $\beta$  (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.

MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE,P. S.; FARIA, R. O . ; ANTUNES, T.A.; CLEFF, M.B.; POMBO, C.D.; NOBRE, M.O.; SCHUCH, L.F.;MEIRELES, M.C.A. Esporotricose com linfangite ascendente envolvendo Felino doméstico. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu-PR, 21 a 25 de outubro de 2001. **Anais**, 299p.



MEINERZ,A.R.; NASCENTE,P.S.; SCHUCH, L.F.; FARIA, R.O.; SANTIN,R.; CLEFF,M.B.; MADRID, I.M.;MARTINS,A.M.; NOBRE,M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Esporotricose felina – relato de casos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 575-57, 2007.

MEIRELLES,P.G; BAZON,L; ONO, M.A; SILVA, A.P; HIVOOKO,E.Y; ONO, E.Y.S. Produção e caracterização de exoantígenos de *Fusarium verticillioides*. **Ciências Agrárias**, v. 27,n.1, p. 71-80, 2006.

MIGLIANO, M.F.; FREITAS,D.C.; MORENO,G. Esporotricose em cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v.1, p.225-233, 1963.

MILLER, R.I.; WOLD,D.; LINDSAY, W.; BEADLE, R.; McCLURE, J.J.; McCLURE, R.J.; McCOY, D. Complications associated with immunotherapy of equine phycomycosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 182, n.11, p. 1227-1229, 1983.

MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Defensive role of granuloma against *Sporothrix schenckii* infection. **Mycophatologia**, v.80, p.117-124, 1982.

MONTEIRO, A.B. (1999). Immunotherapy of equine pythiosis: testing the efficacy of a biological and evaluation of the leukocytic response to the treatment in horses naturally infected with *Pythium insidiosum*. **Dissertação (Mestrado em Veterinária)**. Programa de pós-Graduação em Medicina Veterinária- Universidade Federal de Santa Maria. 55p.

MORISHITA, N.; YAMAZAKI, K.; NINOMIYA, J.; HAMAGUCHI, T.; SEI, Y.; TAKIUCHI, I. A case of lymphocutaneous sporotrichosis. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 42, n. 3, p.149-54, 2001.

MUJICA,M.T.; AGOTEGARAY,M.; CANOBA,A.; DELASOIE, P.; HAUSWIRTH,S.; KOCIZKI,G.; TARTABINI,M.; ALVAREZ,D. Esporotricosis experimental en ratas. **Revista Argentina de Micologia**, v.15, n.2, p.7-12, 1992.

NAES, B.; SANDVIK, O. Early vaccination of calves against ringworm caused by *Tricophyton verrucosum*. **Veterinary Record**, v. 109, p. 199-200, 1981.

NAKAMURA,Y.; SATO,H.; WATANABE,S.; TAKAHASHI,H.; KOIDE,K.; HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. **Mycoses**, v. 39,p. 125-128, 1996.

NASCIMENTO MARTINS E. M; REIS, B.S; FERNANDES, V.C; COSTA, M.M; GOES, A.M; DE ANDRADE, A.S. Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* induces a long lasting protection in BALB/c mice. **Vaccine**. v. 46, p.7893-9, 2007.

NASCIMENTO RC, ESPÍNDOLA NM, CASTRO RA, TEIXEIRA PA, LOUREIRO Y PENHA CV, LOPES-BEZERRA LM, ALMEIDA SR. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70 K-DA putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine Sporotrichosis. **Eur. J. Immunol.**, v.38, n.11, p.3080-3089, 2008.

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

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p. 175-184, 2002.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; CAETANO, D.T.; FAÉ, F.; CORDEIRO, J. M.C.; MEIRELES, R.M.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brazil) e revisão de literatura brasileira. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 9, n.1, p.36-41, 2002.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32(2), p.119-123, 2004.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; OLIVEIRA, I.A.; LUCIA JR, T.; FERNANDES, C.G.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Development of experimental sporotrichosis in a murine model with yeast and mycelial forms of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31(3), p.165-170, 2003.

NOGUEIRA, R.H.G.; GUEDES, R.M.C.; CASSALI, G.D.; GUELE, V.A.; MOREIRA, Y.K. Relato de esporotricose felina (*Sporothrix schenckii*) com transmissão para o homem: aspectos clínicos, microbiológicos e anátomo-patológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.47, n.1, p. 43-5, 1995.

ODDS, F. C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **J. Antimicrob Chemother.**, v. 31, p. 463-471, 1993.

PAPAS, P.; BUSTAMANTE, A.; RESTREPO, N.; FOSS, R.; DIETZE, V.; MOELLER, J. F.; BIRMINGHAM, A. L. Terbinafine for the treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: Preliminary results of a randomized double-blind trial. In: ISHAM, 14, Buenos Aires, 2000. **Resumos...**2000, Buenos Aires-Argentina, p. 162.

PELIZON, A. C.; KANENO, R.; SOARES, A. M. V. C.; MEIRA, D. A.; SARTORI, A. Immunomodulatory Activities Associated with  $\beta$ -Glucan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiol. Res.** 54: 557-564, 2005.

POLAK, A. The past, present and future of antimycotic combination therapy. **Mycoses**, v. 42, p. 335-370, 1999.

POLANIA, L.A.G.; ALZATE, A.; SARAVIA, N. Comportamiento experimental del *Sporothrix schenckii* y la Leishmania mexicana en el hamster. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n.5, p.319-324, 1990.

RESENDE, F.C.B; PASSOLD, J; FERREIRA, S. I.A.C; ZANETTI, C.R; HERMÊNIO, C.A. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos e animais. **Rev. Bras. Alerg. Imonopatol**, v.27,n.3, p. 116-124, 2004.

RESTREPO, A.; ROBLEDO,J.; GOMEZ,I.; TABANE, A.M.; GUTIERREZ,R. Itraconazole therapy in liynphangitic and cutaneous sporotrichosis. **Arch. Dermat.**, v. 122, p. 413-417, 1986.

RIPPON, J. Sporotrichosis. In: RIPPON.,J. the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. **Medical Mycology**. Philadelphia: Saunders. 1988. p. 325-352.

ROBERTS, G.D.; HOWARD, W.L. The serologic diagnosis of extracutaneous sporotrichosis. **Am., J. Clin. Pathol.**, v.56, n.5, p.597-600, 1971.

ROCHA, M.M.; DASSIN, T.; LIRA, R.; LIMA, E.L.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, n.3, p.133-136, 2001.

ROCHETTE, F; ENGELEN, M; VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in annimal health-pratical aplications. **J. Vet. Pharmacol. Therap**, v. 26, p. 31-53, 2003.

ROEDER, A., KIRSCHNING, C. J., RUPOC, R. A., SCHALLER, M., WEINDL, G. AND KORTING, H. C.. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. **Med. Mycol.** 2004, 42:485.

ROILIDES, E.; DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J.; REX, J.H. The role of immunoreconstitution in the management of refractory opportunistic fungal infections. **Medical Mycology**, v.36, supplement 1, p. 12-25, 1998.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**; v.68, n.6, p.3696-3703, 2000.

ROOK, G. Imunidade a virus, bactérias e fungus. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J; MALE, D. **Imunologia**. 3º ed. Editora Manole Ltda. São Paulo, p. 15.1-15.22, 1994. RYBNIKAR, A.; VRZAL, V.; CHUMELA. Protective efficacy of vaccines against bovine dermatophytosis after doublé and single vaccination. **Mycoses**, v.41, p.83-86, 1998.

SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M.; FESTUGATTO, LUBECK, E.S.V.; COPETTI, M.V.; ALVES, S.H.; FERREIRO, L. Three types of immunotherapics against pythiosis insidiosos developed and evaluated. **Vaccine**, v.21, p. 2535-2540, 2003.

SCHATZMAYR, H.G. Novas perspectivas em vacinas virais. **História. Ciências, Saúde**, v.10 (suplemento 2), p.655-669, 2003.

SCHIAVO, P.A; CAMPOS, S.G.; RAMADINHA, R.H.R.; FLAUSINO, G. Resposta terapêutica em um caso de esporotricose em gato. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, suplemento 1, p.132, 2000.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A. O.; Esporotricose em cães e gatos-revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v. 29, n.5, p.21-24, 2000.

SCHUBACH, T.M.; VALLE, A.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M..C.; MONTEIRO, P.C.F.; REIS, R.S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v.39, n.1, p.147-149, 2000.

SCHUBACH, T.M.P; OKAMOTO, T; PELON, I.V; MONTEIRO, D.F; MELO, M; REIS, R.S; FIALHO, M.P.C; BLANCO, T.C.M; CUZZY, M.T; SCHUBACH, A. Clínica e terapêutica da esporotricose em gatos naturalmente infectados. **Ciência Animal**, v. 11, suplemento 1, 193p, 2001.

SCHUBACH, TM; SCHUBACH, A; OKAMOTO, T; BARROS, M; FIGUEIREDO, FB; CUZZI, T; FIALHO-MONTEIRO, PC; PEREZ, RS.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, n.10, p.1623-1629, 2004.

SCHUBACH, TMP; SCHUBACH, A; OKAMOTO, T; BARROS, MBL; FIGUEIREDO, FF; CUZZI-MAYA, T; PEREIRA, SA; SANTOS, IB; PAES, RA; PAES-LEME, LR; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Micology**, v.44, p.87-92, 2006.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBASCH, A.O.; REIS, R.S.; CRUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.C.M.; MONTEIRO, D.F.; BARROS, M.B.L.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; MONTEIRO, P.C.F.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cat with e without sporotrichosis in Rio de Janeiro Brazil. **Mycopathologia**, v.153, n.2, p.83-86, 2001.

SEVERO, L. C.; FESTERGATO, M.; BERNARDI, C.; LONDERO, A.T. Widespread cutaneous lesions Due to *Sporothrix schenckii* in a patient under a long term steroids therapy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n.1, p. 59-62, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287p.

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Advances in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology**, v.17, p.1075-1081, 1999.

SMILACK, J. D. Zoonotic transmission of sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, n.6, p. 1075-1076, 1993.

SOARES, R.B.A; GOMEZ, F.J; SOARES, C.M.A; DEEPE Jr, G.S. Vaccination with heat Shock Protein 60 induces a protective Response against Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infections. **Infection and Immunity**, v.76, n.9, p. 4214-4221, 2008.

SOUZA J. J. Esporotricose em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 7, Recife, 1957. **Anais...**, Recife, p.367-371.

SOUZA, M.D.M.; PERES, M.R.; BERNARDES, M.A.A.G.; GUIMARÃES, L.O.F.; GAZÊTA, G.S.; GITTI, C.B.; ABOUD-DUTRA, A.E. Esporotricose felina e a importância zoonótica – relato de caso no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7 – suplemento 1, p.131, 2000.

SOUZA, L. L. 2001. *Sporothrix schenckii*: estudo epidemiológico em população de gatos. 32p. Pelotas, RS. **Dissertação (Mestrado em Veterinária)**-Programa de Pós-Graduação em Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas.

STEVENS, B.A. Vaccinate against Aspergilosis. A call to arms of the immune system. *Clinical Infectious Diseases*, 38, p. 1131-1136, 2004.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, M.I.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Medical Mycology*, v.39, p.295-298, 2001.

TARCHA, E; BASRUR, V; CHIUNG-YU, H; GARDNER, M.J; COLE, G.T. Multivalent Recombinant Protein Vaccine against Coccidioidomycosis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 10, p. 5802–5813, 2006.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. Ed. Roca, São Paulo, 6<sup>o</sup> ed., p. 261-281.

VERMOUNT, S.M.; BROUTA, F.B.; DESCAMPS, F.F.; LONON, B.J.; MIGNON, B.K. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. **Immunology and Medical Microbiology**, 40, p. 75-80, 2004.

WELSH, R.D.; DOLAN, C.T. *Sporothrix* whole yeast agglutination test: low-titer reaction of sera of subjects not know to have sporotrichosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.59, n.1, p.82-85, 1973.

WHITTEMORE, J.C; WEBB, C.B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in dog. **Can Vet J**, v. 48, p. 411-414, 2007.

WOLF, A. M.; TRAY, G. C. Moléstias Micóticas Profundas. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4. ed., v.1, São Paulo: Manole, 1997, p. 632-664.

WUTHRICH M.; FILUTOWICZ, H.I.; WARNER, T.; KLEIN, B. Requisite elements in vaccine immunity to *Blastomyces dermatitidis*: Plasticity uncovers vaccine potential in Immune deficient hosts. *The journal of Immunology*, p. 6969-6976, 2002.

WÜTHRICH,M.; WARNER, T; KLEIN, B. Requisite Elements in vaccine immunity to *Blastomyces dermatitidis*: Plasticity uncovers vaccine potential in immune deficient hosts. **The journal of Immunology**, v. 175, p. 5288-5297, 2005.

XAVIER, MO; NOBRE, MO; SAMPAIO JR, DP; ANTUNES, TA; NASCENTE, PS.; SÓRIA, FBA.; MEIRELES, MCA. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1961-1963, 2004.

YOSHIIKE,T.; LEI, P.; KOMATSUZAKI,H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. **Mycophatologia**, v. 123, n.2, p. 69-73, 1993.

ZEPEDA, R.R.; DAMION,M.E.R.; RICO,B.M.G.; MENDOZA,G. Estudio de la actividad fagocitica de los leucocitos de gerbiles con esporotricosis experimental tratados con ioduro de potassio. **Med. Cutan. Ibero Lat. Am**, v.18, n.4, p. 278-281, 1990.