

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 100 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), Wistar, machos, com sete semanas de idade, os quais foram alojados na sala de experimentação do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O experimento foi previamente aprovado pela comissão de ética e experimentação animal (CEEAA).

Para reprodução da esporotricose experimental os animais foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar direito, com 0,1 ml do inóculo fúngico contendo 2×10^3 células/ml. O inóculo foi preparado a partir de isolado de *Sporothrix schenckii*, pigmentado e termotolerante, proveniente de caso clínico de esporotricose felina.

Os animais foram divididos em quatro grupos de 25, grupo controle (G1), os quais receberam 0,5ml de água destilada estéril; grupo G2 tratados com 10mg/kg de itraconazol; grupo G3 tratados com 10mg/kg de itraconazol associado a 0,5 mg de β glucana e o grupo G4 tratados com 0,5 mg β glucana. O tratamento iniciou duas semanas após a inoculação, quando os ratos já apresentavam lesões características da esporotricose.

O antifúngico e a água destilada estéril foram administrados por via oral (VO) com auxílio de sonda orogástrica uma vez ao dia, a β 1-3 glucana por via subcutânea (SC) uma vez por semana. Os animais foram submetidos ao mesmo manejo, sendo que o grupo G1 e G2 receberam solução salina via SC semanalmente, e o G4 recebeu por VO água destilada estéril diariamente.

Semanalmente foi realizada necropsia de três animais de cada grupo, sendo a primeira realizada após uma semana de tratamento. Na necropsia foi avaliada a presença de lesões anatomopatológicas, bem como realizada a colheita do coxim plantar direito de cada animal para avaliação histopatológica. Órgãos (fígado e baço), testículos e linfonodos poplíteos foram colhidos para avaliação histopatológica. O mesmo procedimento foi realizado no restante dos animais no final do período experimental.

Amostras teciduais foram colhidas e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS). Após as lâminas histológicas foram observadas ao microscópio para pesquisa do agente e de lesões características da esporotricose.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

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

A análise estatística evidenciou que os animais pertencentes aos grupos tratados (G2, G3 e G4) diferiram $p < (0,05)$ em relação ao grupo controle (G1), demonstrando menor frequência ou ausência de alterações anatomopatológicas nos grupos tratados, no entanto não houve diferença significativa entre estes três grupos (tab.1).

Tabela 1- Frequência de animais com alterações anatomopatológicas observadas durante as necropsias realizadas no decorrer do período experimental conforme cada grupo de tratamento (n=25).

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

Pulmão	4	-	-	-
--------	---	---	---	---

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

Na avaliação histopatológica do coxim plantar correspondente à primeira necropsia foi evidenciado semelhança entre os quatro grupos experimentais estudados, visto que todos os animais demonstraram a formação de granulomas multifocais a coalescentes com presença de células fúngicas leveduriformes no interior da necrose tendo no infiltrado inflamatório predomínio de macrófagos e células gigantes.

Na segunda avaliação, o G1 apresentava uma evolução mais tardia das lesões, permanecendo com granulomas iniciais multifocais a coalescentes. Os grupos tratados (G2, G3 e G4) já apresentavam granulomas tardios, que se caracterizavam essencialmente pela diminuição do centro necrótico e intensa proliferação de tecido conjuntivo, o qual aparecia freqüentemente com baixa celularidade e com deposição de feixes de colágeno densos e fibrose.

No entanto na terceira necropsia verificou-se uma agudização dos processos em todos os grupos, caracterizado pela presença granulomas multifocais iniciais, alguns com infiltrado de polimorfonucleares e presença de leveduras no interior da necrose.

No grupo controle, somente a partir da quinta avaliação foram observados granulomas tardios tendendo para uma resolução. Neste grupo as lesões apresentavam grandes focos necróticos, os quais resultaram de intensa atividade inflamatória, que se manteve até o final do experimento.

A presença do fungo *S. schenckii* foi demonstrada pela presença de estruturas arredondadas a alongadas, PAS positivas. Entre os grupos tratados não foram observadas diferenças significativas quanto ao padrão das lesões, sendo observado predominantemente nesses grupos a presença de granulomas tardios. No entanto no G3 houve maior intensidade do processo inflamatório ocasionando maior restrição do agente no interior de centro necrótico e/ou células gigantes. As lesões se caracterizavam por granulomas profundos com grandes áreas de fibrose. No final do estudo foram encontrados raríssimos ou somente restos celulares de *Sporothrix schenckii* nesse grupo experimental.

Quanto à avaliação histopatológica dos demais órgãos, somente no grupo controle e no final do período experimental foram evidenciadas lesões no fígado, baço e pulmão. No entanto os quatro grupos apresentaram a formação de granulomas no linfonodo poplíteo. Esses resultados se assemelham aos encontrados na literatura (POLANIA et al.; 1990), onde ao inocular o *S.schenckii* via subcutânea observou disseminação fúngica após uma semana da inoculação, com a visualização do microrganismo nos órgãos afetados.

As células PMN geralmente eram escassas e com freqüência diferente de animais apresentando essas células entre os grupos. Foi observado que o grupo G4 apresentou maior freqüência 36% (9/25) dos animais experimentais, G3 32% (8/25), G1 com 24% (6/25) e G2 com 12% (3/25) dos animais com PMN no infiltrado inflamatório no ponto de inoculação. Esse recrutamento e ativação de PMN pela glucana, demonstrado pelo aumento da migração leucocitária para o local afetado já foi verificado por outros autores e é atribuído a síntese de fatores estimulantes de colônia para monócitos/granulócitos (GM-CSF) influenciando no aumento da produção e liberação destas células pela medula óssea (PELIZON et al., 2005).

O exato mecanismo de ação da glucana na indução celular ainda não está completamente estabelecido. No entanto autores demonstraram que as β glucanas

são reconhecidas pelo sistema imune através de receptores específicos encontrados na superfície de células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK e fibroblastos, facilitando com isso a interação e ativação dessas células de defesa. (ARAUJO-FILHO et al., 2006; AZEVEDO et al., 2005; MEIRA et al., 1996).

Em relação ao agente da paracoccidiodomicose testes *in vitro* realizados com a glucana comprovaram a ação estimulatória sobre fagócitos (PELIZON et al., 2005). Porém, em relação ao *Sporothrix schenckii*, ainda não foi avaliada a eficácia da glucana no tratamento da esporotricose, sendo o presente estudo pioneiro nesse sentido.

Neste estudo o grupo tratado com o antifúngico associado à glucana (G3) ao final do período experimental apresentou menor frequência de animais com lesões no ponto de inoculação, assim como maior número de animais em processo de cicatrização e cicatrizados. Tendo em vista que a resposta do organismo frente ao agente fúngico é mediada principalmente por macrófagos e neutrófilos, a β glucana provavelmente contribuiu para regressão e cicatrização das lesões através da estimulação da resposta celular.

4. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o imunoestimulante β - Glucana interferiu no desenvolvimento do fungo *S. schenckii*. A associação glucana e Itraconazol teve uma maior eficácia no tratamento de esporotricose cutânea experimental, demonstrado pela melhor resolução das lesões e menor disseminação para órgãos internos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, C. M. P. S.; LEDA, Y A.; OLIVEIRA, T. K. M.; BARBOSA, A.;BRANCO, D.A.C. Efeito da glucana em um caso de cromoblastomicose refratário a antifúngico. **An. Bras. Dermatol.** v.80 supl.2, 2005.
- ARAUJO-FILHO, I.; RÊGO, A.C.M.; PINHEIRO, L.A.M.; AZEVEDO, I.M.; MEDEIROS, V.B.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, A.C. Prevention of bacterial translocation using β -(1-3)-D-glucan in small bowel ischemia and reperfusion in rats *Acta Cirúrgica Brasileira* Vol 21 (Supl4)p.18-22, 2006.
- MEIRA, D.A.; PEREIRA, P.C.M.; MARCONDES-MACHADO, J.; MENDES, R.P.; BARRAVIERA, B.; PELLEGRINO, J.R.J.; REZKALLAH-IWASSO, M.T.; PERAÇOLI, M.T.S.; CASTILHO, L.M.; THOMZAINI, I.; SILVA, C.L.; FOSS, N.T.; CURRI, P.R. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidiodomycosis. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 496-503, 1996.
- PELIZON, A. C.; KANENO, R.; SOARES, A. M. V. C.; MEIRA, D.A.; SARTORI, A. Immunomodulatory Activities Associated with β -Glucan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiological Research**. v. 54, p. 557-564, 2005.
- POLANIA, L.A.G. ; ALZATE, A. ; SARAIVA, N. Comportamiento experimental del *Sporothrix schenckii* y la *Leishmania mexicana* em el Hamster. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n. 5, p.319-324, 1990.
- SAKURAI, T. L. Different role of serum components and cytokines on alveolar macrophage activation by soluble fungal (1-3)- β -D-glucan. **Eur J Pharmacol.**,v. 63, p. 255-334, 1997.
- 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, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.L.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; REIS, R.S.; PEREZ, M.A.;

WANKE, B. Feline sporotrichosis epidemic in the metropolitan area of Rio de Janeiro – clinical presentation and treatment of 347 cats (1998-2001). Journal of the American Veterinary Medical Association. 2004.

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