

AValiação Histopatológica em Candidíase Experimental Utilizando Tratamento com *Origanum vulgare*

GOMES, Angelita Reis¹ ; CLEFF, Marlete Brum² ; SANTIN, R³ ; SALLIS, Elisa Simone⁴; MEIRELES, Mário Carlos Araújo⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Veterinária – UFPel
angelitagomes@gmail.com

² Profª Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária – UFPel

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária – UFRGS

⁴ Profª Adjunto – Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Veterinária – UFPel

⁵ Profº Associado – Departamento Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária - UFPel

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que os mesmos fatores de risco para desenvolver candidíase sistêmica sejam comuns a humanos e animais (HESELTINE et al., 2003; MOHRI et al., 2009). Outros fatores responsáveis pelo alastramento dos casos de candidose em animais correspondem ao estresse, má nutrição, uso inadequado de antibióticos e a resistência observada em algumas espécies da levedura (CLEFF et al., 2007; BLANCO & GARCIA, 2008).

Os antifúngicos azóis são usados como primeira escolha terapêutica no tratamento de infecções por *Candida*, entretanto as consequências do longo tempo de exposição podem determinar a resistência do agente através de vários mecanismos (MORIO et al., 2010), além de problemas relacionados ao espectro de atividade e toxicidade (NOBRE et al., 2002).

Neste contexto os óleos essenciais e extratos naturais demonstram possuir um alto valor terapêutico (ROSATO et al., 2009). Em micologia, destacam-se pesquisas sobre o potencial farmacêutico do *Origanum vulgare* L (orégano), cujo óleo essencial é rico em compostos fenólicos, tais como carvacrol, timol, alfa terpineol, gama terpineol, responsáveis pelos seus efeitos antibacterianos, antioxidantes e antifúngicos (MANOHAR et al., 2001; DE VICENZI et al., 2004).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram avaliados 48 ratos *novergicus (ratus ratus)* da linhagem Wistar, machos, com oito semanas de idade pesando em média 300g, distribuídos em quatro grupos de 12 animais conforme o tratamento recebido T1=0,5ml de emulsão de óleo a 1,5% em solução contendo 0,001% de tween 80; T2=0,5ml emulsão de óleo a 3% em solução contendo 0,001% de tween 80; T3= 0,5ml de solução de fluconazol (10mg/kg); T4= tratados com veículo (suspensão contendo 0,001% de tween 80).

Todos os animais foram inoculados com isolado de *Candida albicans* proveniente de caso clínico cutâneo em cão, estocado na micoteca do laboratório de micologia Faculdade de Veterinária da UFPel. O inóculo fúngico foi padronizado em 10⁶ cel/mL e inoculado através da veia lateral da cauda em todos os animais. Uma semana antes da inoculação, e durante o experimento, os animais receberam acetato de hidrocortisona 100 mg/Kg, a cada sete dias por via

subcutânea e adicionado 0,5mg/mL hidrocloreto de tetraciclina na água dos animais, para controle das infecções bacterianas secundárias.

O tratamento dos grupos foi iniciado 24 horas após a inoculação, sendo realizado uma vez ao dia durante 30 dias através de sonda orogástrica. Durante o período experimental os animais foram avaliados duas vezes por semana, averiguando-se alterações físicas e/ou comportamentais. Observou-se o estado geral de cada animal, piloereção, agressividade, consciência e disposição, sistema locomotor, presença/ausência de incoordenação, perda de equilíbrio e ocorrência mortes. No final de 30 dias, os animais foram sacrificados através de anestesia profunda e necropsiados, sendo realizadas análises de alterações macroscópicas e microscópicas.

Foram avaliados rim, baço, fígado e encéfalo de dez animais de cada grupo, a exceção de T4 que teve seis animais avaliados. Os fragmentos de tecido foram processados no Laboratório de Histoquímica do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel. O material foi fixado em formalina 10%, incluído em parafina e cortado em seções de 3 µm, posteriormente corado com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) para a avaliação da reação inflamatória e presença do agente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliando as lesões macroscópicas os grupos não diferiram entre si, a exceção de T3 (fluconazol), que obteve menor quantidade de lesões, entretanto observou-se que microscopicamente o grupo T2 (óleo 3%) também obteve diferenciação dos demais grupos, aproximando-se de T3 em relação à menor extensão das lesões presentes. Histologicamente as lesões apresentaram reação tecidual característica causada por fungos, do tipo piogranulomatosa, mostrando a presença de infiltrado macrófagico difuso, células epitelióides, células gigantes, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos (ACKERMANN, 2009).

No exame clínico dos animais foram observadas alterações de ordem neurológica, como incoordenação, lateralidade, andar em círculos e apatia, posteriormente averiguou-se perda das circunvoluções cerebrais no exame macroscópico. Infecção por *Candida* no SNC (sistema nervoso central) é uma das mais sérias formas de infecção da corrente sanguínea, com índice de mortalidade acima de 50%, sendo que em recente estudo realizado por Nakayama et al., (2010) o cérebro aparece como o órgão mais afetado nos casos de candidíase sistêmicas, embora em todas as necropsias outros órgãos estivessem envolvidos, sugerindo que havendo lesão no SNC provavelmente a infecção já ocorreu no restante do organismo.

No exame microscópico do SNC de T1 foram encontradas áreas multifocais com infiltrado de células inflamatórias constituídos de linfócitos, células epitelióides e gigantes, com discreta quantidade de hifas no interior das células gigantes, observadas na substância branca e cinzenta, além de tumefação das células endoteliais. Já em T2, em dois animais verificaram-se áreas multifocais linfohistioplasmocitária e em um animal lesão granulomatosa, porém neste grupo não havia presença de hifas fúngicas e quando comparado a T1 a reação inflamatória era menor. Em T4 as lesões no SNC ocorreram em extensas áreas com presença de hifas fúngicas rodeadas por células inflamatórias, com

destruição de substância branca e cinzenta, presença de manguito perivascular de histiócitos e linfócitos e tumefação das células endoteliais.

As lesões encontradas no SNC em T1, T2, T4 foram compatíveis em diferentes graus com o descrito pela literatura, onde usualmente observam-se focos de necrose rodeada por leucócitos polimorfonucleares, ou granuloma não caseoso com células gigantes que podem conter leveduras ou hifas no seu interior (SANCHÉZ-PORTOCARRERO et al., 2000). Conforme descrito na Tabela 1 verifica-se que os grupos variaram conforme o tratamento aplicado, sendo que T1(óleo 1,5%) e T2 (óleo 3%) não diferiram entre si no número de animais apresentando lesões, entretanto obtiveram uma redução na incidência de candidíase do SNC de 70% em relação a T4 (controle), sendo que T3 (fluconazol) obteve os melhores resultados não apresentando nenhum animal com candidíase no SNC. Os grupos utilizando óleo essencial de orégano, tanto na concentração de 1,5% e 3% mostraram-se efetivos, mostrando grau de lesão menor quando comparados a T4, onde todos os indivíduos apresentaram extensas lesões.

Tabela 1 Dados percentuais de presença ou ausência de lesões e avaliação dos percentuais do SNC (Sistema nervoso Central) e rins nos grupos avaliados

| ANIMAIS | T1* | T2* | T3* | T4** |
|-----------|-----|-----|-----|------|
| Com lesão | 70% | 60% | 60% | 80% |
| Sem lesão | 30% | 40% | 40% | 20% |

| ÓRGÃOS | PERCENTUAL RELATIVO AOS ANIMAIS QUE APRESENTARAM LESÕES | | | |
|--------|---|-----|-----|------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 |
| SNC | 30% | 30% | 0% | 100% |
| Rim | 70% | 60% | 60% | 100% |

T1: Tratados com óleo a 1,5%, T2: Tratados com óleo a 3%, T3: Tratados com fluconazol (10mg/kg), T4: Tratados com veículo. * Animais necropsiados n=10 ** Animais necropsiados n=6

Foi evidenciado em estudo que *Candida* tem tropismo pelos rins, tendo sido demonstrado 90% de envolvimento renal em pacientes que foram à necrópsia após candidíase generalizada (SOUTO E DIAS, 2003), aparecendo este órgão como o segundo mais envolvido em casos de candidíase sistêmica (NAKAYAMA et al., 2010). No presente experimento observaram-se áreas multifocais com infiltrado de células mononucleares de linfócitos, plasmócitos e histiócitos. Porém não houve presença de hifas fúngicas em T3 (fluconazol) e poucas ocorreram em T2 (óleo 3%) quando comparada a T1(óleo 1,5%), em T4 (controle) havia presença de miríades de hifas fúngicas, rodeadas por células inflamatórias polimorfonucleares, neutrófilos, extensa destruição do parênquima e cultura pura de hifas na pelve renal, com fibrose em grau moderado e dilatação dos túbulos renais, denotando o grau de acentuada destruição sofrida pelo órgão.

De acordo com a Tabela 1, observou-se que T2 (óleo 3%) obteve a mesma porcentagem de animais afetados que T3 (fluconazol), evidenciando a capacidade antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* descrita por outros autores (CHAMI et al., 2004; ROSATO., 2009) que se assemelhou ao antifúngico padrão utilizado. Também é possível avaliar que em relação ao grupo T4 houve uma redução de 30% no número total de animais que apresentaram lesões.

4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, conforme os resultados obtidos que o óleo essencial do *O. vulgare* apresenta-se como um promissor agente antifúngico, demonstrando bons resultados no tratamento da candidíase experimental sistêmica.

AGRADECIMENTOS: CNPq FAPERGS e CAPES

5 REFERÊNCIAS

ACKERMANN, R. Mark. Inflamação crônica e cicatrização de feridas. In: McGAVIN, M. Donald; ZACHARY, F. James (4^a) **Bases da Patologia em Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 4, p. 1531 – 174.

BLANCO, J. L.; GRACIA, M.E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p.47-70, 2008.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **The Brazilian Journal Infection Disease**, v. 8, n.3, p. 217-226, 2004.

CLEFF, M.B.; SILVA, G.M.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.M.; MARTINS, A.A.; FONSECA, A.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO J.R.B. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**, v.14 n. 2, p. 164-168, 2007.

DE VICENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VICENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801–804, 2004.

MANOHAR, V.; INGRAN, C.; GRAY, J.; NADEEN, A.; ECHARD, B.W.; DEBASIS, B.; PREUSS, H. G. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.228, p. 111–117, 2001.

NAKAYAMA, H.; SHIBUYA, K.; KIUMURA, M.; UEDA, M.; IWABUCHI, S. Histopathological study of Candidal infection in the central nervous system. **Japanese Journal Medical Mycology**, vol. 51; p. 31-54; 2010.

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

ROSATO, A.; VITALI, C.; PIARULLI, M.; MAZZOTTA, M.; ARGENTIERI, M. P.; MALLAMACI, R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species **Phytomedicine**, v.16, p. 972–975, 2009.

SOUTO, C.A.V., DIAS, B.S. Infecção do Trato Urinário por Fungos. **Internacional Brazilian Journal Urology**,v.29,s.3, p. 21-27, 2003.