

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
DOUTORADO
EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ELAINE WAITE DE SOUZA

**ESPOROTRICOSE FELINA: RESPOSTA AO TRATAMENTO,
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CUTÂNEAS E IDENTIFICAÇÃO
DE *SPOROTHRIX* SPP. NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO -
BRASIL**

Rio de Janeiro

2015

**ESPOROTRICOSE FELINA: RESPOSTA AO TRATAMENTO,
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CUTÂNEAS E IDENTIFICAÇÃO
DE *Sporothrix* spp. NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - BRASIL**

ELAINE WAITE DE SOUZA

Tese apresentada ao curso de
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto
Nacional de Infectologia para
obtenção do título de Doutora
em Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas.

Orientadores: Rodrigo Caldas
Menezes e Cintia Moraes Borba

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S729 Souza, Elaine Waite de

Esporotricose felina: resposta ao tratamento, alterações histológicas cutâneas e identificação de *Sporothrix spp.* no estado do Rio de Janeiro - Brasil / Elaine Waite de Souza. – Rio de Janeiro, 2014.
xix, 107 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2014.
Bibliografia: f. 91-100

1. Esporotricose. 2. Gatos. 3. *Sporothrix brasiliensis*. 4. Histopatologia. 5. Tratamento. 6. Itraconazol. I. Título.

CDD 636.0896969

À minha família, por todo o amor. Meu pai, minha mãe, meus irmãos, meu filho, meus sobrinhos, meus animais.
“Sem amor eu nada seria...”

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Rodrigo Caldas Menezes e Cintia Moraes Borba, cada um com suas características, me ensinaram muito mais do que ciência. Obrigada pelo convívio, ajuda, paciência e ensinamentos, que levarei para minha vida.

A todos os médicos veterinários do LAPCLIN-DERMZOO INI/FIOCRUZ, incluindo também os estagiários e bolsistas, os que já passaram por aqui ou ainda estão presentes, as meninas do setor 1, agradeço muito por toda a ajuda, seja na hora da coleta de material, no envio dos exames ao laboratório, nas dúvidas com o computador e com a discussão de casos atendidos. Aqui é um lugar que me senti acolhida, minha família veterinária, e por serem muitos não caberiam aqui, mas me sinto grata a cada um de vocês.

Às meninas que trabalham ou trabalharam na recepção do LapclinDermzoo e Emilia da limpeza, trabalho imprescindível para tudo dar certo.

À Dra. Isabella Dib pela ajuda de todas as horas. Enorme coração amigo.

Ao Dr. Sandro Pereira por ter me proporcionado o início dessa jornada.

À minha amiga Luciana Casartelli, grande responsável por eu estar aqui, grande incentivadora, irmã de coração. Obrigado pela companhia e pelo esclarecimento de tantas dúvidas.

À Luisa Miranda pela ajuda com as fotos de histopatologia, por ser incansável nas explicações sobre as células inflamatórias, pela parceria na coleta de material. Você foi fundamental para eu entender algumas coisas!

Ao Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira, pela cooperação durante a fase da genotipagem e por todos os ensinamentos. Foram-me muito úteis.

Aos bolsistas do Programa Institucional de Bolsas da Faperj: Cecília, Karol, Adriana, e Aron e à bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/FIOCRUZ): Priscila, que me foram muito úteis durante várias etapas deste trabalho.

À Marcellly M. S. Brito e Danielly C. M. de Sequeira. Ajuda inestimável no laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do IOC. Tantas dúvidas e vocês fizeram tudo ficar mais fácil. E as demais pessoas do laboratório, que estão sempre prontas a auxiliar e emprestar material.

Aos funcionários do IOC, Claudia Mello e Amarildo, sempre solícitos a qualquer coisa que se pede. Ajuda preciosa.

À Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo apoio financeiro a este projeto (Processo 100.338/2013).

À Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, do Laboratório de Epidemiologia Clínica, INI, pela dedicação à análise estatística e pela grande paciência.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação do INI, em especial à Priscila, que sempre esteve pronta a ajudar.

A todos do laboratório de Micologia do INI/FIOCRUZ, que me receberam, me ensinaram e me ajudaram em vários momentos deste projeto.

À Camila Rocha da Cunha e José Liporage Teixeira, do Serviço de Farmácia do INI, pela ajuda em conseguir o tratamento dos animais do projeto.

À Dra Ilam Lyn e Dr Steven Bolin, do DCPAH MSU State University, e a Dra Ing Borg de Lousiana State University, pela cooperação com os exames histopatológicos.

Souza, E W. **ESPOROTRICOSE FELINA: RESPOSTA AO TRATAMENTO, ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CUTÂNEAS E IDENTIFICAÇÃO DE *Sporothrix* spp. NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - BRASIL** Rio de Janeiro, 2014. 107 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia

RESUMO

A esporotricose é causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix* spp. Nos felinos domésticos, a doença se caracteriza pela presença de lesões cutâneas ulceradas e nodulares, podendo apresentar caráter disseminado. Esse estudo teve como objetivos avaliar a evolução clínica e as alterações histopatológicas das lesões cutâneas de esporotricose ao longo do tratamento antifúngico em gatos naturalmente infectados, identificar as espécies de *Sporothrix* spp. e correlacionar esses fatores com o desfecho do tratamento. Foram estudados 34 gatos com lesões cutâneas, que foram tratados com itraconazol na dose de 100 ou 50 mg/gato/dia por um período máximo de 36 semanas, até o desfecho de cura clínica ou falência. Na primeira consulta, foi realizada uma biopsia de lesão cutânea, para realização do exame histopatológico e isolamento do fungo e a sua identificação por taxonomia polifásica, utilizando análise morfológica, análise fisiológica e identificação molecular. Revisões regulares dos gatos e uma biopsia cutânea adicional na mesma localização da primeira, após um intervalo de 5 a 11 semanas, foram realizadas. Os gatos incluídos nesse estudo tinham uma idade média de 2,9 anos, sendo 70,5% machos. *S. brasiliensis* foi a única espécie identificada na população felina estudada. Vinte e seis (76,5%) gatos tiveram cura clínica e oito (23,5%) tiveram falência de tratamento. Foi encontrada associação de animais em bom estado geral apresentando lesões mais localizadas com o desfecho cura após 5 a 11 semanas de tratamento. Na primeira biopsia, foi observada dermatite piogranulomatosa, granulomas mal organizados com predomínio de macrófagos e neutrófilos e altas cargas fúngicas. Já na segunda biopsia, houve um aumento significativo na ocorrência de dermatofibrose e dermatite não-granulomatosa, assim como uma menor intensidade de células inflamatórias e redução significativa da carga fúngica. Não houve correlação entre os fatores avaliados. A evolução das alterações clínicas e histológicas observadas sugere que o itraconazol nas doses utilizadas é efetivo contra o fungo *S. brasiliensis* em gatos.

Palavras chaves: esporotricose, gatos, *Sporothrix brasiliensis*, histopatologia, tratamento, itraconazol.

Souza, E W. **FELINE SPOROTRICHOSIS: TREATMENT RESPONSE, HISTOLOGICAL SKIN CHANGES AND IDENTIFICATION OF *Sporothrix* spp. IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO - BRASIL** Rio de Janeiro, 2014. 107 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia

ABSTRACT

Sporotrichosis is caused by the dimorphic fungus *Sporothrix* spp. In domestic cats the disease is characterized by the presence of ulcerated and nodular skin lesions and may have widespread character. This study aimed to evaluate the clinical and histopathological alterations of cutaneous sporotrichosis lesions along the antifungal treatment in naturally infected cats, to identify the species of *Sporothrix* spp. and to correlate these factors with the outcome of treatment. Thirty-four cats were studied with skin lesions that were treated with itraconazole at a dose of 100 or 50 mg/cat/day for a maximum of 36 weeks, until the outcome of clinical cure or treatment failure. At the first visit, a biopsy of a skin lesion was performed, to make the histopathological examination and isolation of the fungus and their identification by polyphasic taxonomy. Cat's regular reviews were performed and an additional skin biopsy at the same location as the first was performed. Cats included in this study were mostly males with a mean of 2.9 years of age. The anatomical region with the highest number of collection was the forelimbs and head / face. *S. brasiliensis* was the species identified in the study feline population. Twenty-six (76.5%) cats had clinical cure and eight (23.5%) had treatment failure. It was found animal association in good general condition and presenting more localized lesions with the outcome healing after 5-11 weeks of treatment. The first biopsy was observed pyogranulomatous dermatitis, poorly organized granulomas with predominance of macrophages and neutrophils and high fungal load. The second biopsy was seen a significant increase in the occurrence of dermatofibrosis and non-granulomatous dermatitis, as well as a lower intensity of inflammatory cells and significantly reduced the fungal load. There was no correlation between the factors evaluated. The evolution of clinical and histological changes observed suggest that itraconazole in doses is effective against the fungus *S. brasiliensis* in cats.

Keywords: sporotrichosis, cats, *Sporothrix brasiliensis*, histopathology, treatment, itraconazole.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Assimilação diferencial de carbono para <i>Sporothrix</i> spp.	36
Tabela 2. Avaliação clínica dos 34 gatos com esporotricose durante a primeira consulta antes do início do tratamento com itraconazol e correlação dos sinais clínicos com o desfecho do tratamento.	46
Tabela 3 Avaliação clínica dos 34 gatos com esporotricose no momento da segunda biopsia (3ª consulta) e correlação dos sinais clínicos com o desfecho do tratamento.	47
Tabela 4. Alterações histopatológicas cutâneas em gatos com esporotricose no momento da primeira biopsia e sua correlação com o desfecho do tratamento.	63
Tabela 5. Alterações histopatológicas cutâneas em 34 gatos com esporotricose no momento da segunda biopsia e sua correlação com o desfecho do tratamento.	64

Tabela	Página
Tabela 6. Comparação dos números de células inflamatórias por mm ² e de estruturas leveduriformes (carga fúngica) em cortes histológicos de pele com lesão obtida nas primeira e segunda biopsias de 34 gatos com esporotricose tratados com itraconazol.	71
Tabela 7. Comparação da mediana das células inflamatórias por mm ² e da carga fúngica das primeira e segunda biopsias em cada desfecho	72
Tabela 8. Correlação da carga fúngica das lesões cutâneas na primeira e segunda biopsias com as características clínicas dos 34 gatos com esporotricose incluídos no estudo	73
Tabela 9. Correlação da carga fúngica das lesões cutânea com as alterações histopatológicas cutâneas em 34 gatos com esporotricose no momento da primeira e segunda biopsias.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Fluxograma das atividades realizadas no primeiro atendimento de gatos suspeitos de esporotricose até a sua entrada no estudo com o início do tratamento.	34
Figura 2. Colônias filamentosas positivas para <i>Sporothrix</i> spp. crescidas em meio Mycosel, à temperatura de 25°C, com 15 dias, a partir de amostras clínicas de gatos, atendidos no ambulatório do LAPCLIN-DERMZOO/INI, com suspeita de esporotricose. A) Colônia rugosa creme; B) Colônia glabra de coloração negra.	42
Figura 3. Cultura em lâmina, em BDA, de isolado de <i>Sporothrix</i> spp. proveniente de gato com esporotricose, apresentando hifas hialinas septadas com conídios hialinos e pigmentados dispostos em grupos como margarida e pigmentados sésseis . Lactofenol de Amman com azul de algodão. Aumento 1000 X.	43
Figura 4 Felino macho, 2 anos, 4 Kg, apresentando lesões esporotricóticas. A- Lesões ulceradas na face e membro posterior esquerdo observadas na primeira consulta; B- Linfangite em membro posterior esquerdo – 1ª consulta; C- Lesões em mucosa conjuntival, plano nasal e mento – 1ª consulta; D- Cura clínica após 20 semanas de tratamento com itraconazol – todas as lesões cicatrizaram.	48

Figura	Página
<p>Figura 5. Felino macho, 2 anos, 3,5 Kg, apresentando lesões esporotricóticas. 49</p> <p>A- Lesões ulceradas no dorso e região escapular direita – 1ª consulta; B- Evolução das mesmas lesões, após 4 semanas de tratamento com itraconazol; C- Momento da 2ª biopsia da lesão escapular com oito semanas de tratamento. Observa-se regressão do tamanho e cicatrização parcial da lesão; D- Cura clínica após 28 semanas de tratamento com itraconazol – todas as lesões cicatrizaram.</p>	
<p>Figura 6. Felino fêmea, 3 anos, 5,2 Kg, apresentando lesão esporotricótica. 50</p> <p>A- Lesão na cauda - 1ª consulta; B- Durante evolução clínica não houve cicatrização da lesão, mesmo após 36 semanas de tratamento com itraconazol.</p>	
<p>Figura 7. Felino macho, 2 anos, 3,4 Kg, apresentando lesões esporotricóticas. 51</p> <p>A e B- Lesão em plano nasal com aumento no volume do nariz após 8 semanas de tratamento com itraconazol; C- Cicatrização da lesão no plano nasal após 32 semanas de tratamento; D- Recidiva da lesão após 16 semanas de cura clínica.</p>	
<p>Figura 8. Colônias filamentosas de <i>Sporothrix</i> spp., frente e verso, variando de cor cinza com borda branca (A) e seu reverso marrom escuro na parte central e creme na borda (B), a colônia com centro negro e borda branca (C) e reverso marrom escuro e borda marrom mais claro e creme (D) crescidas em meio BDA, à temperatura de 30°C, por 21 dias. 52</p>	
<p>Figura 9. Colônias filamentosas de <i>Sporothrix</i> spp., em placas de Petri e em tubo, contendo meio BDA, incubadas à 30°C e a 26°C, respectivamente, por 21 dias. As colônias, em placa de Petri, apresentaram aspecto rugoso de cor cinza a negra (A), liso na borda e rugoso na parte central de cor creme (B) e arenoso de cor cinza a marrom escuro quase negra (C). Em tubo as colônias apresentaram morfologia semelhante e variou de cinza a negra (D). 53</p>	

Figura	Página
Figura 10. Colônia leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. com sulcos e dobras, de coloração creme, encontrada entre os isolados provenientes dos gatos com esporotricose, crescidas em meio BDA, à temperatura de 37°C, por 21 dias.	54
Figura 11. Características microscópicas dos isolados de <i>Sporothrix</i> spp. provenientes de gatos com esporotricose crescidos em meio ágar <i>corn meal</i> , incubadas à 30°C, no escuro, por 12 dias. (A) Observam-se hifas hialinas, septadas, ramificadas, conídios simpodiais obovoidais, hialinos, terminais dispostos em grupos na forma de pétalas de margarida (B) Conídios sésseis, globoso/subgloboso, pigmentados. Lactofenol de Amman com azul de algodão. Aumento 1000 X.	55
Figura 12 Perfis moleculares obtidos por T3B PCR <i>fingerprinting</i> de DNAs preparados de 8 isolados de <i>Sporothrix</i> spp. Linha 1: controle negativo; Linha 2: Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder); Linha 3: <i>S. brasiliensis</i> (IPEC 16490); Linha 4: <i>S. mexicana</i> (MUM 11.02); Linha 5: <i>S. schenckii</i> (IPEC 27722); Linha 6: <i>S. globosa</i> (IPEC 27135); Linha 7: Isolado 8996; Linha 8: Isolado 11345; Linha 9: Isolado 9054; Linha 10: Isolado 9680 identificado como <i>S. brasiliensis</i> ; Linha 11: Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder).	59

Figura**Página**

Figura 13. Biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi cura clínica após 20 semanas do uso de itraconazol. 1ª biopsia: (A) Dermatite piogranulomatosa, apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório acentuado e difuso composto por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. HE; (B) Diversas estruturas leveduriformes coradas em negro são observadas na derme. GMS; 2ª biopsia: (C) Úlcera recoberta por crosta e dermatite piogranulomatosa moderada e difusa, com infiltrado inflamatório mais intenso na derme superficial. HE; (D) Detalhe da foto A mostrando foco de dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório moderado constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. HE

66

Figura 14. Biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi cura clínica após 28 semanas de uso de itraconazol. 1ª biopsia: (A) Dermatite piogranulomatosa acentuada e difusa, apresentando granuloma bem organizado. HE; 2ª biopsia: (B) Dermatite não granulomatosa discreta e difusa composta por neutrófilos e linfócitos. Observa-se também acentuada dermatofibrose com 8 semanas de tratamento. HE.

67

Figura	Página
<p>Figura 15. Biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi cura clínica após 20 semanas de uso de itraconazol, porém apresentando recidiva após 16 semanas da alta. 1ª biopsia: (A) Dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma fúngico com abundantes estruturas leveduriformes no interior de macrófagos e escasso infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. HE; (B) Abundantes estruturas leveduriformes arredondadas e em forma de charuto coradas em negro são observadas. GMS; 2ª biopsia: (C) Dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório acentuado e difuso constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. HE; (D) Estruturas leveduriformes arredondadas sem brotamento coradas em cinza. GMS.</p>	68
<p>Figura 16. Biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi falência após 36 semanas de uso de itraconazol. 1ª biopsia: (A) Granuloma fúngico com abundantes estruturas leveduriformes no interior de macrófagos e escasso infiltrado inflamatório. HE; (B) Presença de estruturas fúngicas arredondadas. GMS; 2ª biopsia: (C) Dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório acentuado e difuso constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. Observa-se também dermatofibrose. HE; (D) Detalhe da foto C; (E) Presença de estruturas leveduriformes semelhantes a hifas coradas em negro. GMS; (F) Detalhe da foto E apresentando estruturas alongadas semelhantes a hifas e arredondadas com brotamento.</p>	69
<p>Figura 17. Primeira biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi cura clínica após 20 semanas de uso de itraconazol, porém apresentando recidiva após 12 semanas da alta. Raros mastócitos (seta) e eosinófilos (cabeça de seta) são observados no infiltrado inflamatório da derme, próximos a estruturas leveduriformes (EL) de <i>S. brasiliensis</i>. Giemsa.</p>	70

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
Quadro 1. Características morfológicas e fisiológicas de 22 isolados de <i>Sporothrix</i> spp. em concordância ou não com a espécie <i>S. brasiliensis</i> pela assimilação de açúcares.	57
Quadro 2. Comparação da evolução clínica dos gatos com esporotricose e a pigmentação dos conídios dos isolados fúngicos.	61

SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
BDA	Batata dextrose ágar
BHI	Brain Heart Infusion
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
DNA*	Ácido Desoxiribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FELV	Vírus da Leucemia Felina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FIV	Vírus da Imunodeficiência Fellina
GMS	<i>Grocott's methenamine silver</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IM	Intramuscular
INI	Instituto Nacional de Infectologia
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
LAPCLIN- DERMZOO	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
LTBBF	Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos
NK	<i>Natural killer</i>
PAS*	Ácido periódico de Schiff
PBS*	Solução salina tamponada com fosfato
PCR*	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SPSS*	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SC	Subcutâneo
TLR	<i>Toll-Like recptors</i>

Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
YNB	Yeast Nitrogen Base

* Abreviaturas em inglês

As unidades de medidas utilizadas no texto seguem a nomenclatura do Sistema Internacional de Unidades (SI).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Sporothrix schenckii</i>	1
1.1.1. O COMPLEXO <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i>	3
1.2. ESPOROTRICOSE	4
1.2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	4
1.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA ESPOROTRICOSE FELINA	8
1.2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	10
1.2.4. RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ESPOROTRICOSE	15
1.2.5. TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA	18
1.3. IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE <i>SPOROTHRIX</i> SPP.	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. DESENHO DO ESTUDO	28
4.2. CASUÍSTICA	28
4.2.1. AMOSTRA	28
4.2.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	28
4.2.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	28
4.2.4. CRITÉRIOS PARA INTERRUÇÃO DEFINITIVA DO TRATAMENTO	29
4.3. EXAME CLÍNICO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	29
4.3.1. PRIMEIRA CONSULTA	29
4.3.2. TERAPIA ANTIFÚNGICA	31
4.3.3. DESFECHOS	32
4.3.4. CONSULTAS DE SEGUIMENTO	32
4.4. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS	35
4.4.1. PROVAS FENOTÍPICAS	35
4.4.1.1. MORFOLOGIA	35

4.4.1.2. ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO	35
4.4.2. PROVAS GENOTÍPICAS	36
4.4.2.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	36
4.4.2.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	37
4.5. AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA	38
4.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES	38
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.8 ASPECTOS ÉTICOS	40
5. RESULTADOS	41
5.1. CASOS CLÍNICOS AVALIADOS	41
5.1.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE GÊNERO DO AGENTE CAUSAL	41
5.1.2. ANIMAIS INCLUÍDOS NO ESTUDO	43
5.1.2.1. DESFECHO DO TRATAMENTO	44
5.1.2.2. AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA	44
5.1.2.3. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS EM NÍVEL DE ESPÉCIE	52
5.1.2.3.1. MORFOLOGIA	52
5.1.2.3.2. ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO	56
5.1.2.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS EM NÍVEL DE ESPÉCIE	59
5.1.2.5. COMPARAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS GATOS COM ESPOROTRICOSE E A PIGMENTAÇÃO DOS ISOLADOS	60
5.1.2.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES	62
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÕES	88
8. PERSPECTIVAS	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES	101
ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Sporothrix schenckii*

Sporothrix schenckii, até o ano de 2007, era considerado o único agente causal da esporotricose (Marimon et al, 2007). A espécie foi isolada pela primeira vez por Benjamin Schenck, em 1898, nos Estados Unidos, a partir de material coletado de lesões de um paciente com abscessos na mão e no braço. A amostra clínica foi enviada para Erwin Smith que classificou o agente causal como sendo um fungo pertencente ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898).

Em 1900 Hektoen e Perkins, também nos Estados Unidos, isolaram o agente causal de uma lesão no dedo de uma criança e o classificaram como *Sporothrix schenckii* (Hektoen & Perkins, 1900).

Na Europa esse fungo foi descrito por Beurmann e Gougerot em 1903 com o nome de *Sporotrichum beurmanni*, porém, posteriormente, essa terminologia passou a ser sinônima de *S. schenckii* (Lavalle & Mariat, 1983).

Ao longo dos anos vários estudos descrevendo a esporotricose e seu agente etiológico, *S. schenckii*, foram publicados por diversos autores (Lurie, 1971; Mariat & Lavalle, 1972; Nicot & Mariat, 1973; Lavalle & Mariat 1983; Travassos 1985; Rippon, 1988; Schubach et al., 2004).

S. schenckii tem sido descrito como um fungo dimórfico apresentando uma fase micelial e outra leveduriforme. A fase micelial, saprófita, é obtida também em cultura a 25°C. Em sua macromorfologia a fase micelial apresenta colônias de superfície rugosa, rachada e quebradiça, podendo ser plana, úmida, glabra ou membranosa. A pigmentação varia do branco ao marrom escuro e cinza, mas frequentemente são negras, sendo que em alguns isolados demoram a escurecer. Na micromorfologia observam-se hifas hialinas, delgadas e septadas contendo conidióforos que produzem conídios (esporos de

origem assexuada). (Thibaut, 1970; Travassos, 1985; Nicot & Mariat, 1973; Neufeld, 1999; Romero-Martinez et al., 2000; Lopes-Bezerra et al., 2006; Zancopé et al., 2011).

Os conídios são de dois tipos: conídios sésseis, demáceos (marrons, melanizados), de modo geral dispostos individualmente sobre curtos dentículos ao longo de hifas vegetativas e conídios simpodiais, hialinos (claros, sem pigmento) ou ligeiramente pigmentados, usualmente obovóides dispostos sobre células conidiogênicas denticuladas. Esses conídios simpodiais apresentam-se em forma de pétala de rosa e se arranjam em grupos cuja estrutura se assemelha a uma margarida, dispostos em cada lado da hifa, podendo se separar delas se tornando células independentes com potencial germinativo. A intensidade da pigmentação da colônia está diretamente ligada à produção de melanina por esse fungo (Thibaut, 1970; Nicot & Mariat, 1973; Travassos, 1985; Neufeld, 1999; Romero-Martinez et al., 2000; Lopes-Bezerra et al., 2006; Oliveira et al., 2011).

A fase leveduriforme, parasitária, é obtida em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) a 35°-37°C, com aspecto macromorfológico de colônias úmidas e de coloração creme. A microformologia demonstra células fusiformes, ovais ou em formato de charuto, medindo 2,5 a 5 µm de diâmetro. Alguns fatores influenciam na transição morfológica, mas a temperatura é um fator determinante no dimorfismo, que é reversível. Em algumas culturas a 28-30°C todos os tipos celulares – hifas, conídios e leveduras – podem ocorrer simultaneamente (Travassos, 1985; Neufeld, 1999; Romero-Martines et al., 2000; Lopes-Bezerra et al., 2006).

Os constituintes da parede celular determinam a morfologia do fungo, desempenham um papel ativo durante a infecção, sendo também essenciais ao crescimento fúngico e resistência à fagocitose. Os carboidratos deste envelope celular dos fungos dimórficos variam na composição e estrutura conforme o estágio

morfológico do fungo. As glicoproteínas são componentes importantes na parede celular do *S. schenckii* e são os mais ativos componentes antigênicos. A presença de melanina confere proteção, pois este pigmento é eliminador de radicais livres, e também é um importante fator de virulência (Romero-Martinez et al., 2000; Latgé, 2013; Previato et al., 2013; Mora-Montes et al., 2013). A parede celular das células em fase leveduriforme possui mais carboidratos do que lipídios quando comparada a parede dos conídios (fase micelial). Os principais polissacarídeos de parede são manose e ramnose, sendo encontrados também galactose, traços de glicose e outros (Lavale & Mariat, 1983; Morris-Jones et al., 2003; Lopes-Bezerra, 2011).

1.1.1. O COMPLEXO *Sporothrix schenckii*

Sporothrix spp. é um fungo dimórfico e anamórfico, e alguns estudos apontam para a possibilidade que *Ophiostoma* sp. seja sua forma sexuada (Kirk et al, 2008).

Esse gênero é composto por cerca de 60 espécies distribuídas mundialmente nas regiões tropical e subtropical, sendo comumente saprófitas. A única espécie que era considerada patogênica, *S. schenckii*, atualmente pertence a um complexo de espécies, proposto por estudos filogenéticos que indicaram uma variabilidade genética dentro da espécie (Marimom et al., 2006; de Meyer et al., 2008).

Estudos moleculares e fenotípicos permitiram a identificação de seis espécies que compõem o complexo *S. schenckii*: *S. schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix luriei* e *Sporothrix pallida* (Marimom et al., 2007; Marimom et al., 2008). Inicialmente as espécies patogênicas pertencentes ao complexo eram: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, e *S. schenckii sensu stricto* (Marimom et al., 2007). Mas já tem sido descritos casos clínicos humanos associados às espécies *S. mexicana* e *S. pallida* (Marimom et al., 2008; Dias et

al., 2011; Morrison et al., 2013; Morrison et al., 2013; Rodrigues et al, 2013; Choappa et al., 2014).

S. brasiliensis é considerada a espécie mais virulenta para modelo murino, seguida de *S. schenckii* e *S. globosa* (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). Adicionalmente, dados referentes a casos clínicos humanos tem demonstrado que a espécie *S. brasiliensis* é mais agressiva, mas que os indivíduos infectados apresentaram uma boa resposta ao tratamento, em intervalo de tempo menor, quando comparados aos casos clínicos devido a *S. schenckii* (Almeida-Paes et al., 2014).

Marimon e colaboradores (2007) propuseram inicialmente, para identificação das espécies do complexo *Sporothrix*, utilizar uma chave de identificação a qual continha testes de: análise da morfologia dos conídios, auxonograma (rafinose, ribitol e sacarose) e termotolerância.

Atualmente, classificar as espécies do complexo *Sporothrix* somente utilizando características morfológicas é um dado muito restrito, pois as estruturas morfológicas divergem sutilmente entre as espécies, além da possibilidade de modificações devido a fatores externos (Oliveira et al, 2011; Rodrigues et al, 2013). É indispensável analisar diferentes características, morfológicas, ecológicas, bioquímicas, fisiológicas, nutricionais e genéticas, em uma análise multifatorial denominada taxonomia polifásica (Cruz, 2013). Os isolados que não puderem ser classificados fenotipicamente em nível de espécie devem passar pela análise molecular (Oliveira et al., 2011).

1.2. ESPOROTRICOSE

1.2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A esporotricose, micose subcutânea causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix* spp., é considerada uma micose emergente (Barros et al., 2011; Rodrigues et al., 2013), e tornou-se um grande problema de saúde pública no estado do Rio de Janeiro (Silva et al., 2012; Pereira et al., 2014). A partir de 2013 os casos em humanos se tornaram de notificação compulsória, na tentativa de conter a expansão desta doença, por meio da Resolução SES nº 674 de 12 de julho de 2013 (Brasil, 2013). Entretanto, a esporotricose animal tornou-se de notificação compulsória somente em 2014 a partir da Portaria GM/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014, em seu artigo 2º, parágrafo IV, que inclui epizootia na lista de doenças de notificação compulsória nacional (Brasil, 2014).

Os primeiros relatos de casos de esporotricose humana ocorreram em 1898 e 1900, por Schenck e Hektoen & Perkins, respectivamente. Entretanto, Linck em 1809 e Lutz em 1889 já tinham se referido a possíveis casos de esporotricose, porém sem isolamento do agente causal (Kwon-Chung & Bennet, 1992).

No Brasil a doença é conhecida desde 1907 com a infecção natural em ratos (Lutz & Splendore, 1907), sendo feito menção de transmissão ao homem através da mordedura desses animais (Pupo *apud* Oliveira, 2013). Singer e Muncie (1952) também mencionaram a possibilidade de doença zoonótica entre felinos e o homem. Freitas e colaboradores (1956) descreveram o primeiro caso brasileiro de esporotricose felina, naturalmente adquirida, e posteriormente publicaram oito casos em gatos na cidade de São Paulo (Freitas et al., 1965).

Atualmente, reconhece-se que a esporotricose é uma micose causada por espécies do gênero *Sporothrix*, que infecta os seres humanos e várias espécies animais, desempenhando o gato um importante papel na transmissão zoonótica (Marimon et al., 2007; Pereira et al., 2014).

A transmissão do fungo ocorre através da inoculação traumática na pele ou pelo contato com plantas ou material orgânico contaminado, ou ainda através de mordidas ou arranhões de animais, causando uma infecção cutânea e subcutânea, mas que pode se manifestar de forma disseminada tanto nos homens quanto nos animais (Pereira et al., 2014; Gutierrez-Galhardo et al., 2015). A transmissão pela inalação dos conídios pode ocorrer, porém em menor frequência, causando sinais extracutâneos, como a infecção pulmonar e a forma sistêmica (Kauffman et al., 2007; Barros et al., 2011).

O papel do gato como fonte de infecção, difere do que ocorre na forma clássica de transmissão, na qual o ser humano em atividades ocupacionais ou de lazer manipula ou interfere no habitat do fungo. Nesta forma de transmissão zoonótica, é o fungo que entra no ambiente do ser humano por meio dos gatos (Barros et al., 2004).

As primeiras publicações de casos humanos de esporotricose transmitidos por gatos ocorreram na década de 1970 (Larsson et al., 1989) e os números continuaram a crescer nos anos posteriores (Dunstan et al., 1986a; Barros et al., 2001).

Durante o período de 1987 a 1998 foram atendidos 13 casos humanos de esporotricose no serviço de dermatologia do Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro. Dentre estes, dois pacientes, atendidos no ano de 1991 e 1997, relataram arranhadura por gatos (Barros et al., 2001).

O isolamento do fungo das unhas e cavidade oral de gatos saudáveis e a presença de um grande número de estruturas leveduriformes nas lesões cutâneas de felinos infectados indicaram um grande potencial zoonótico desta espécie (Schubach et al., 2001; Schubach et al., 2002; Gremião et al., 2006).

Já a primeira epidemia (Rezende, 1998) de esporotricose humana resultante de transmissão zoonótica foi identificada no Rio de Janeiro com início em 1998, na qual a maior prevalência da doença foi observada nas pessoas que cuidavam dos gatos doentes.

Entre 80 e 91% dos casos humanos de esporotricose nessa epidemia em curso na região metropolitana do Rio de Janeiro são de transmissão zoonótica através de mordidas, arranhaduras ou contato com exsudato das lesões do gato doméstico. A população mais acometida é do sexo feminino, idade entre 21 e 60 anos e da raça branca (Barros et al., 2004; Barros et al., 2008; Barros et al., 2010; Freitas, 2010; Silva et al., 2012).

A esporotricose felina é frequente no Brasil, onde o maior número de casos é proveniente da região metropolitana do Rio de Janeiro (Pereira et al., 2014, Gremião et al., 2015). Um total de 4.124 gatos foram diagnosticados com a doença no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) do Instituto Nacional de Infectologia INI/FIOCRUZ-RJ , de 1998 até 2012, podendo este número ser maior, devido a falta de notificação obrigatória da doença nesse período (Gremião et al., 2015). Há relatos de casos no Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (Rodrigues et al., 2013), sendo considerada uma infecção emergente no estado de São Paulo (Montenegro et al., 2014).

Atualmente, o tratamento desta doença nos felinos continua sendo um dos maiores entraves e permanece como o grande desafio para o controle da epidemia (Barros et al., 2010; Gremião et al., 2015). Alterações no meio ambiente, o aumento da população felina, aliado a falta de ações de saúde pública para interromper a cadeia de transmissão animal são fatores que podem estar relacionados com a epidemia no estado do Rio de Janeiro (Barros et al., 2008; Silva et al., 2012). A irregularidade no tratamento e no acompanhamento clínico, assim como o alto índice de abandono pelo proprietário do gato, ao perceber melhora nas lesões cutâneas, pode levar a recorrência da doença, prejudicando o processo de cura e representando um obstáculo no controle da cadeia de transmissão (Chaves et al., 2013; Pereira et al., 2014).

Medidas de controle para a epidemia englobam estudos epidemiológicos, promoção de ações educativas que enfatizem a posse responsável dos animais, programas que limitem a reprodução felina, diagnóstico e tratamento precoce dos gatos com esporotricose, notificação obrigatória dos casos, ações efetivas por parte das instituições governamentais de saúde pública, cremação de animais doentes que venham a óbito e desenvolvimento de vacinas antifúngicas para animais (Schubach et al., 2005; Barros et al., 2008; Barros et al., 2010; Pereira et al., 2014).

1.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA ESPOROTRICOSE FELINA

A apresentação clínica nos gatos varia desde uma infecção subclínica, passando por lesão cutânea única até lesões cutâneas múltiplas e sistêmicas fatais, acompanhada ou não de sinais extracutâneos (Dustan et al., 1986; Davies & Troy, 1996; Schubach et al., 2004). Os gatos são altamente susceptíveis a esporotricose e o envolvimento sistêmico é frequente nesta espécie, levando a formas graves e de difícil tratamento, podendo levar o animal a óbito. Difere do que ocorre em humanos e cães, nos quais a forma sistêmica é menos frequente e geralmente há uma boa resposta ao tratamento (Schubach, 2004; Pereira et al., 2009; Barros et al., 2011; Almeida Paes et al, 2014).

Não se sabe ainda porque os gatos apresentam uma maior sensibilidade a *Sporothrix* spp. comparado aos humanos e outros animais, como os cães. Estudo de Pereira e colaboradores (2009) sugere uma imunodepressão ou anergia específica a este microrganismo. Outro fator que pode influenciar na baixa resposta a terapia em gatos está relacionada à extensão e gravidade das lesões associadas à virulência do fungo (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Gremião et al., 2015).

A forma clínica mais frequente nos gatos é o aparecimento de nódulos cutâneos múltiplos, gomas e úlceras recobertas ou não por crostas, com envolvimento frequente

de mucosas (Pereira et al., 2009). As lesões ocorrem preferencialmente na cabeça, cauda e membros (Werner & Werner, 1994; Schubach, 2004). Extensas áreas de necrose podem se desenvolver e expor ossos e músculos. Os gatos também são frequentemente acometidos por sinais respiratórios, como espirros, secreção nasal e dispneia, acompanhados por linfadenomegalia. (Schubach et al., 2004; Pereira et al., 2010; Madrid et al., 2012).

O fungo *Sporothrix* spp. pode disseminar para outras áreas do corpo do animal, por auto-inoculação durante o comportamento habitual de limpeza ou por via hematogênica (Dunstan et al., 1986b; Schubach et al., 2003). As incursões de gatos em áreas com material contaminado, o ato de afiar as unhas em troncos de árvores e as arranhaduras durante brigas ou brincadeiras promovem a infecção dos felinos (Larsson et al., 1989). Há relatos de espirros iniciais precedendo o aparecimento de lesões cutâneas, mas, geralmente, estão relacionados à presença de lesão nasal, o que sugere que a via inalatória seja outra importante via de infecção para os felinos (Schubach et al., 2004). O prognóstico da doença nos felinos depende da ocorrência dos sinais respiratórios, como os espirros, secreção nasal e dispneia e da apresentação clínica da doença (Gremião et al. 2015). Lesões nasais por patógenos fúngicos são de difícil cura, devido a alguns fatores, como: a virulência dos isolados, o pouco suprimento sanguíneo na região, assim como pouco tecido cutâneo viável para cirurgias reconstrutivas e a resistência dos microrganismos aos medicamentos comumente utilizados (Malik et al., 2004).

A maioria dos gatos acometidos são machos jovens inteiros, ou seja, não castrados, com cerca de dois anos de idade, que adquiriram a infecção por meio de brigas com outros gatos. Adicionalmente a procura pelo atendimento veterinário é feita tardiamente, em média oito semanas após o início dos sinais clínicos. A maioria dos

gatos apresenta lesões em três ou mais locais não adjacentes. A esporotricose parece não estar relacionada à co-infecção pelo vírus da leucemia felina (FELV) ou da imunodeficiência felina (FIV), nem mesmo as formas mais graves, como a forma disseminada, onde *Sporothrix* spp. é isolado de diferentes vísceras, como o fígado, baço, pulmões e linfonodos (Davies & Troy, 1996; Schubach et al., 2003; Schubach et al., 2004).

Pereira e colaboradores (2010), descreveram 773 gatos com esporotricose, 41,3% dos animais tinham lesões cutâneas em três ou mais sítios anatômicos não contíguos e 41,5% apresentavam sinais respiratórios, principalmente espirros, os quais estiveram associados a um maior risco de óbito. Linfangite, linfadenite nodular ascendente e lesões em mucosa também estavam presentes (Pereira et al., 2010).

Uma das principais alterações hematológicas e bioquímicas de gatos com lesões cutâneas múltiplas de esporotricose, além da anemia e hipoalbuminemia, é a leucocitose e hipergamaglobulinemia, o que pode reforçar a hipótese que a gravidade da doença nos gatos não está associada à imunossupressão (Schubach et al., 2004).

As diferentes apresentações clínicas da esporotricose felina podem influenciar no prognóstico e conseqüentemente no desfecho do caso conforme relatado em estudos anteriores (Schubach et al, 2004; Pereira et al., 2009).

1.2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico definitivo da esporotricose felina, considerado padrão de referência, ocorre pelo isolamento do fungo em meio de cultura (Schubach et al., 2003; Zancopé-Oliveira et al., 2011). Para o cultivo micológico o material é obtido das lesões através de punção aspirativa, coleta com *swab* ou biópsia cutânea (Welsh, 2003). Em casos de suspeita da forma disseminada da doença, é recomendado a cultura do sangue,

e em casos de sinais respiratórios deve-se utilizar *swabs* nasais ou coleta de material de lavagem broncoalveolar (Leme et al., 2007; Schubach et al., 2004b; Lloret et al., 2013).

Em 89% dos casos o isolamento fúngico ocorre em oito dias, mas pode demorar até quatro semanas para o crescimento (Kaufmann et al., 2007). Os meios utilizados são ágar Sabouraud dextrose ou ágar Mycosel, e as culturas incubadas a 25°C.

Inicialmente as colônias apresentam tonalidade creme, mas após algumas semanas se tornam marrons ou pretas. O dimorfismo térmico deste fungo é demonstrado por meio da conversão da fase filamentosa para a leveduriforme pela incubação das culturas a 37°C em meio BHI e posterior visualização microscópica da morfologia do fungo, o que finaliza o diagnóstico (Morris-Jones, 2002).

A esporotricose em gatos pode ser diagnosticada preliminarmente usando-se o exame citológico, sendo o material biológico utilizado obtido pela punção aspirativa de nódulos ou abscessos, impressão em lâmina de lesões ulceradas, impressão com *swab* por rolamento e raspados de pele (Clinkenbeard, 1991; Pereira et al., 2011). A coloração das lâminas é feita com corantes tipo Romanowsky (ex: Wright, Giemsa, Panóptico rápido), sendo visualizadas estruturas leveduriformes arredondadas ou ovais, de 3 a 5µm de diâmetro, ou na forma de charuto, encontradas em macrófagos, células gigantes e neutrófilos ou no meio extracelular (Clinkenbeard, 1991; Raskin & Meyer, 2001; Pereira et al., 2011). Em um estudo que utilizou 806 gatos com esporotricose confirmada pela cultura micológica, o exame citopatológico revelou sensibilidade de 78,9% no diagnóstico da infecção pelo *Sporothrix* (Pereira et al., 2011).

O exame histopatológico pelo HE é útil para sugerir o diagnóstico, principalmente no caso de nódulos intactos e lesões recentes (Rosser & Dunstan, 2006; Greene 2012;Lloret et al., 2013), mas os achados geralmente não são específicos, devido serem semelhantes a outras infecções fúngicas, demonstrando um processo

inflamatório piogranulomatoso e variam com a fase evolutiva da doença (Donadel, 1993; Miranda et al., 2013).

O exame histopatológico detecta características que proporcionam a suspeita diagnóstica, permitindo um diagnóstico presuntivo, direcionando a pesquisa pelo agente etiológico nas amostras histológicas. Essa técnica permite a requisição de testes subsequentes apropriados reduzindo custos, o tempo para obter o diagnóstico definitivo e iniciar a terapia adequada (Miranda et al., 2010).

Portanto, para caracterização morfológica das estruturas leveduriformes no exame histopatológico, é recomendada a utilização de técnicas histoquímicas, como a impregnação pela prata de Grocott e a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (Miranda et al., 2010). Os elementos fúngicos encontrados na lâmina podem apresentar-se em forma de charuto ou arredondada, podendo ser observados corpos asteróides, os quais são prolongamentos eosinofílicos da célula fúngica, ou hifas, também conhecido como reação de Splendore-Hoeppli (Bickley et al., 1985; Quintela et al., 2011). Brotamentos únicos de base estreita são achados comuns na superfície de estruturas leveduriformes (Miranda et al., 2009). Formas atípicas podem ser encontradas nos tecidos, com brotamentos múltiplos e estruturas com dimensões maiores do que o habitual. As hifas encontradas nos tecidos podem ocorrer devido à baixa tensão de oxigênio e temperaturas baixas, o que acontece nas extremidades do organismo animal (Lopes et al., 1992).

O exame histopatológico também é útil para diferenciar de outras enfermidades, como o pioderma bacteriano, micobacteriose, nocardiose, actinomicose, histoplasmose, neoplasias, doença auto-imune e erupção por medicamentos (Welsh, 2003). Deve-se tomar a precaução de não confundir estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. com *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum* ou *Trichosporon* spp. (Dunstan et al., 1986b).

O padrão histológico observado na esporotricose dos gatos é uma reação inflamatória piogranulomatosa nodular a difusa (Dunstan et al., 1986b). Em um estudo histopatológico de amostras de pele de 90 gatos com esporotricose realizado por Schubach e colaboradores (2004), foi observado um infiltrado inflamatório dérmico exuberante consistindo de células polimorfonucleares e mononucleares, principalmente neutrófilos e macrófagos. Estruturas leveduriformes foram observadas em 62,2% das amostras, sendo que em apenas 12,2% dos casos o granuloma estava presente. Corpos asteróides não foram encontrados.

Com relação à distribuição das lesões na pele dos gatos com esporotricose, Schubach e colaboradores (2004) classificaram como L3 os gatos que tinham lesão cutânea em 3 ou mais sítios, L2 os gatos que tinham lesões em dois sítios não contíguos, L1 lesão cutânea em apenas um sítio e L0 animais sem lesões. Houve diferença significativa entre o grupo L3 comparado aos grupos L2 e L1, com relação à baixa frequência de granuloma e a abundância de organismos fúngicos na lesão de gatos L3 (Schubach et al., 2004).

Em um trabalho mais recente com 84 felinos com esporotricose o processo inflamatório encontrado no exame histopatológico foi do tipo granulomatoso supurativo com predominância de granulomas mal formados (Miranda et al., 2013). Nesse mesmo trabalho, em 41,7% dos casos de esporotricose felina o granuloma foi classificado como fúngico, ou seja, granuloma em que os macrófagos estão preenchidos com estruturas leveduriformes em toda a sua extensão, havendo raros linfócitos e plasmócitos. Gatos em bom estado geral exibiram quantidade marcante de neutrófilos. Os resultados sugeriram associação do granuloma bem formado com o controle da carga fúngica, com a boa condição geral do animal e com a apresentação clínica (Miranda et al., 2013).

A sensibilidade do exame histopatológico utilizando o corante da prata de Grocott é de 94% para a esporotricose felina (Gremião et al, 2015). Outras opções de coloração para identificação de formas leveduriformes por meio da histopatologia são o Ácido Periódico de Schiff (PAS) e a imunohistoquímica, mas até o momento não tiveram avaliadas sua sensibilidade nas biopsias de gato (Pereira et al., 2011; Miranda et al., 2013; Gremião et al., 2015).

Schubach e colaboradores (2004) relataram que há uma correlação inversa entre a presença de granulomas e a visualização de estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* no infiltrado inflamatório de felinos e que a ausência de fungos na amostra pode ser explicada pela biopsia em estágios iniciais da infecção ou a variação individual da intensidade da resposta imune. A baixa frequência de formação de granulomas, a ausência de corpos asteróides e a abundância de leveduras nas lesões sugerem uma alta susceptibilidade dos gatos na infecção por *Sporothrix* spp. (Schubach et al., 2004).

O envolvimento sistêmico, demonstrado pelos achados histopatológicos de infiltrado inflamatório leve a moderado de células mononucleares e estruturas fúngicas em pulmões, fígado, baço, olhos, adrenais e linfonodos, é frequente em gatos (Schubach et al., 2012).

Os micologistas tem pesquisado meios de diagnósticos que possam agilizar e baratear o diagnóstico da esporotricose felina, sendo introduzidos novos métodos que não utilizam os tradicionais procedimentos de cultivo. Recentemente foi desenvolvido e otimizado um teste ELISA para detecção de anticorpos anti *Sporothrix schenckii*, o qual demonstrou sensibilidade e especificidade acima de 90%, sendo um bom teste de triagem (Fernandes et al., 2011). Na tentativa de buscar metodologias mais rápidas e práticas, a biologia molecular, em especial a PCR, tem sido utilizada na identificação apenas de *S. schenckii* em amostras clínicas provenientes de humanos e animais em

trabalhos de pesquisa (Oliveira et al, 2011; Rodrigues et al, 2013). Essas metodologias foram desenvolvidas utilizando regiões dos genes de quitina sintase, rRNA 18S e topoisomerase II, para os quais foram desenvolvidos *primers* específicos para a detecção molecular do agente da esporotricose (Hu et al., 2003; Kanbe et al., 2005; Kano et al., 2005).

1.2.4. RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ESPOROTRICOSE

Sporothrix spp. ao ultrapassar a barreira física de um organismo, como a pele e mucosas, encontra uma série de mecanismos de defesa, como os fagócitos mono ou polimorfonucleares, desencadeando uma resposta inflamatória aonde predominará um tipo de célula à resposta agressora do patógeno (Blanco, 2008).

Um desses tipos celulares são os mastócitos, células versáteis do sistema imune que contribuem para a resposta inata e adaptativa contra patógenos, têm meia vida longa e são observados em locais de entrada dos microrganismos, como pele e mucosa, se tornando as primeiras células inflamatórias a entrar em contato com o patógeno invasor. Estudo experimental *in vitro* demonstrou que a depleção funcional de mastócitos permite a resistência ao progresso da infecção, com diminuição da carga fúngica, demonstrando redução significativa na severidade das lesões cutâneas de esporotricose (Romo-Lozano et al., 2012).

Os neutrófilos são células que aparecem em intensidade variada nas biopsias de pele, acompanhando o aparecimento de macrófagos. A intensa quantidade de neutrófilos nos casos humanos esta relacionada a pacientes com maior número de lesões e tratamentos mais prolongados (Morgado et al., 2011), enquanto nos felinos há uma relação inversa entre quantidade de neutrófilos e carga fúngica (Miranda et al., 2013).

Os macrófagos, por meio dos receptores *Toll-Like* (TLR) que são ativados pelos lipídeos da parede fúngica (Carlos et al., 2009), secretam moléculas que amplificam a resposta imune, controlam a inflamação, contribuem diretamente para o reparo de danos teciduais por remoção do tecido morto. Mais importante, eles processam os antígenos em preparação para a resposta imune específica (Tizard, 2009). Os macrófagos são células importantes na defesa do hospedeiro pela sua capacidade fagocitária e também pela síntese de proteínas regulatórias como as citocinas (Carlos et al., 2003). Essas células liberam colagenases e elastases que destroem diretamente o tecido conjuntivo. Adicionalmente, liberam IL-1 que promovem a proliferação de fibroblastos e estimula a síntese do colágeno, essencial para o reparo de qualquer dano tecidual (Tizard, 2009).

O colágeno é depositado por toda a lesão e é gradualmente remodelado por várias semanas ou meses à medida que a área retorna ao normal, e durante esse tempo, há crescimento de novos vasos sanguíneos. Se o microrganismo ofensor não puder ser destruído, o processo inflamatório pode persistir (Tizard, 2009). Os microrganismos que permanecem no meio intracelular podem resistir ao processo de fagocitose, persistindo por longos períodos, causando estimulação antigênica crônica e ativação de células T e macrófagos, resultando na formação de granulomas. Nestes casos, a histopatologia demonstra um processo inflamatório granulomatoso (Abbas et al., 2013).

Os granulomas começam a ser visualizados à medida que os macrófagos são ativados e diferenciados, dispersos no infiltrado inflamatório dérmico ou no tecido subcutâneo, podendo se estender para a musculatura esquelética, acompanhado pelo declínio do número de células fúngicas encontradas. Com a cronicidade do processo, devido à persistência do agente agressor e a quimiotaxia das células inflamatórias, o infiltrado torna-se arranjado em três zonas características, sendo a zona central composta de neutrófilos, a zona intermediária composta de histiócitos e a zona

periférica de células redondas formando o granuloma esporotricótico, que é um granuloma bem organizado (Donadel, 1993; Rosser & Dunstan, 2006; Miranda et al., 2009), frequentes na esporotricose humana e canina e pouco comuns em gatos (Miranda et al., 2009; Miranda et al., 2013).

O tipo de infiltrado inflamatório encontrado em biópsias de pele de gatos com esporotricose, demonstram na maioria dos casos, um piogranuloma mal organizado, com predomínio de células inflamatórias do tipo neutrófilos e macrófagos, sendo que o citoplasma dessas células, em muitos casos, encontram-se com abundantes estruturas fúngicas, caracterizando um granuloma fúngico, com uma mínima reação linfoplasmocitária, diferentemente do que é observado nos casos de esporotricose canina e humana (Miranda et al., 2013; Gremião et al., 2015).

As infecções fúngicas, uma vez estabelecidas só podem ser destruídas por mecanismos mediados por células T. As doenças fúngicas crônicas ou progressivas se associam comumente com defeitos no sistema de células T. Essas células funcionam nas infecções fúngicas por meio da ativação dos macrófagos, promoção do crescimento epitelial e da queratinização (Yasuda et al., 2005).

Na infecção por *S. schenckii* a resposta do tipo Th1 e Th2 estão presentes. Em geral, a imunidade mediada por células tipo Th1 é usada para a depuração da infecção fúngica, enquanto a imunidade Th2, habitualmente, atua na suscetibilidade à infecção. A produção de citocinas inibidoras tais como, IL-4 e IL-10 por células Th2 estão associadas à desativação de fagócitos e à progressão da doença. Após a oitava semana de infecção pelo *Sporothrix* spp. a resposta celular do tipo Th2 tende ao crescimento (Costa et al., 2008; Romani, 2011). A pequena resposta do tipo Th1 em esporotricose induz a infecções mais severas (Romo-Lozano et al., 2012).

1.2.5. TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA

No passado, o tratamento da esporotricose felina envolvia a administração oral de iodetos (Dunstan et al., 1986b; Werner & Werner, 1994; Davies & Troy, 1996; Welsh, 2003). Entretanto, efeitos adversos graves associados aos iodetos levaram a sua substituição por antifúngicos mais efetivos e seguros como os imidazólicos (Welsh, 2003). Todos os azólicos exercem sua ação antifúngica na membrana celular do fungo pela inibição da síntese de ergosterol (Heit & Riviere, 1995). Entretanto, o mecanismo de ação dos iodetos permanece ainda obscuro e sugere-se que sua ação terapêutica seja através da modulação da resposta inflamatória (Reis et al., 2012).

Na década de 1970, o cetoconazol, o primeiro composto imidazólico para uso oral, foi aprovado. Esse fármaco possui uma boa distribuição na pele e tecido celular subcutâneo, considerado efetivo no tratamento de infecções fúngicas superficiais. Os efeitos adversos mais comuns incluem anorexia, náusea e vômitos, sendo os felinos mais sensíveis a esses efeitos quando comparado aos cães (Heit & Riviere, 1995; Pereira et al., 2009).

Já os triazólicos, como o itraconazol, apresentam efeitos adversos bastante reduzidos (Oliveira Nobre et al., 2002). O itraconazol é considerado o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose em gatos e humanos (Sykes et al., 2001; Morris-Jones, 2002, Welsh, 2003, Pereira et al., 2009), principalmente, nas situações onde o custo não limita seu uso e por ser um fármaco efetivo e com menor associação de efeitos adversos quando comparado aos demais antifúngicos (Sykes et al., 2001; Pereira et al., 2010). O itraconazol é um antifúngico mais seguro, pois possui maior seletividade para sistemas de citocromos do fungo, além de atingir uma boa concentração na pele (Welsh, 2003). A dose oral de itraconazol recomendada para

esporotricose varia de 5 a 10 mg/kg, uma ou duas vezes ao dia (Rosser & Dunstan 2006).

Schubach e colaboradores (2004) realizaram um estudo sobre esporotricose felina na região metropolitana do Rio de Janeiro e avaliaram diferentes esquemas terapêuticos para o tratamento de 266 gatos doentes. A cura clínica foi obtida em 68 pacientes (25,5%) e a duração do tratamento variou de 16 a 80 semanas (mediana = 36 semanas). Os efeitos adversos mais observados foram: anorexia, vômito e diarreia. Entretanto, o número de abandonos e mortes por diferentes causas somou 69,7 %, explicitando o alto índice de não adesão ao tratamento e não permitindo a mensuração da eficácia de cada esquema utilizado.

Já Pereira e colaboradores (2010) verificaram uma mediana de tempo de tratamento até a cura clínica menor, de 26 semanas. Esse autores observaram cura clínica em 38,3% de gatos tratados com itraconazol em uma dose de 8,3 a 27,7 mg/kg/dia, superior a dose tradicionalmente recomendada. Outro fármaco também utilizado foi o cetoconazol, utilizado na dose de 13,5 a 27 mg/kg/dia, sendo o percentual de cura de 28,6%.

Ensaio de susceptibilidade antifúngica revelaram um amplo espectro para os triazóis, mas também indicam cepas multiresistentes dentro do complexo *Sporothrix* (Rodrigues et al., 2014).

Recentemente, foi descrito o tratamento de 48 gatos com esporotricose utilizando-se iodeto de potássio em cápsulas na dose de 2,5 mg/kg com aumento progressivo desta dosagem até 20 mg/kg a cada 24 horas. Nesse tratamento foi obtida a cura em 47,9% dos animais, sugerindo que este fármaco na formulação e doses descritas é uma alternativa no tratamento da esporotricose felina (Reis et al., 2012).

Uma opção para casos refratários ao itraconazol, ou seja, gatos que não iniciam uma melhora com dois meses de tratamento ou não alcançam a cura clínica com um tempo satisfatório com esse antifúngico, é a associação deste com a anfotericina B, na dose de 0,5 mg/kg SC (via subcutânea) ou 1 mg/kg via intralesional (Rodrigues, 2009; Gremião et al., 2009; Gremião et al., 2011). A anfotericina é o fármaco de primeira escolha para infecções micóticas disseminadas e de rápida progressão em humanos. A anfotericina B interfere na permeabilidade de membrana celular do fungo promovendo a morte celular. É pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, logo, é somente usada por via parenteral (Schubach et al., 2012).

O tratamento cirúrgico combinado à terapia antifúngica pode ser curativo sem aumento do risco para o animal desde que seja em local fisiologicamente e anatomicamente operável, como por exemplo, lesão localizada na bolsa escrotal (Gremião et al., 2006). A criocirurgia com intervalos mensais pode ser indicada em casos de lesões persistentes, como tratamento coadjuvante (Pereira et al., 2013). Honse e colaboradores (2010) relataram a cura clínica de um gato com esporotricose cutânea localizada utilizando a termoterapia local.

O tratamento da esporotricose felina ainda é um desafio, devido a poucas opções de fármacos antifúngicos testados, aos efeitos adversos e ao alto custo do tratamento (Reis et al., 2012).

A necessidade de um tratamento antifúngico regular e prolongado (Schubach et al., 2004), a dificuldade na administração de medicamentos por via oral aos gatos domésticos, a falta de condições para manter os animais confinados, além dos gastos com transporte urbano e a dificuldade para transportar os animais em veículos coletivos (Barros et al., 2004), podem explicar parcialmente o grande percentual de abandono relatados por Schubach e colaboradores (2004) e Chaves e colaboradores (2013).

Este percentual de abandono de tratamento da esporotricose felina foi de 21% em um estudo epidemiológico com 147 animais entre os anos de 1998 a 2005 no estado do Rio de Janeiro (Chaves et al, 2013). Portanto, o comprometimento do proprietário do gato com o tratamento é um fator determinante no prognóstico da doença (Lloret, 2013).

A esporotricose em humanos imunocompetentes e em cães, geralmente, apresenta prognóstico mais favorável e com boa eficácia terapêutica. No entanto, a esporotricose felina tende a uma evolução grave, de ocorrência sistêmica e com baixa resposta terapêutica (Pereira et al., 2010).

Algumas micoses subcutâneas graves são de difícil resolução podendo ocorrer progressão durante a terapia ou recorrência, além de problemas de intolerância aos antifúngicos (Gremião et al., 2006). Existem relatos de reativação de lesões cutâneas entre três e 18 meses após o final do tratamento com cura clínica (Gremião et al., 2011). Formas viáveis de *Sporothrix schenckii* podem ficar sequestradas nos tecidos por seis meses sem ocasionar sinais clínicos, além de lesões aparentemente cicatrizadas poderem ser reativadas e progredir para lesões cutâneas características, após imunossupressão com corticóide (MacDonald et al., 1980).

1.3. IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE *Sporothrix* spp.

A identificação do gênero *Sporothrix* em nível de espécie tem sido realizada por metodologias fenotípicas e genotípicas.

Estudos moleculares e fenotípicos sobre a população de *Sporothrix* spp. demonstraram a existência de linhagens genéticas diferentes, definida como um complexo, que podem ser agrupadas de acordo com sua origem geográfica (Mesa Arango et al., 2002; Marimon et al., 2006; Rodrigues et al., 2013).

Ishizaki e colaboradores (1998) encontraram relação entre o DNA mitocondrial de *Sporothrix schenckii* provenientes de humanos de diferentes áreas geográficas, dentre elas Estados Unidos, Venezuela, Argentina e Brasil, pela técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). Utilizando essa mesma técnica, Zhang e colaboradores (2006) encontraram significativas correlações entre o perfil molecular, a distribuição geográfica e a apresentação clínica de 31 isolados de *Sporothrix schenckii* provenientes de casos humanos de cinco regiões diferentes da China. Trabalho recente (YuX et al., 2013) analisou 74 amostras humanas e identificaram *S. globosa* (71/74) como a espécie prevalente no Nordeste da China, por meio de características fenotípicas e análise do sequenciamento parcial do gene da calmodulina.

Por meio da caracterização molecular de *Sporothrix* spp. de humanos e gatos envolvidos na epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro, utilizando a técnica de RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*), demonstrou-se que apesar da grande relação genética exibida entre os isolados eles puderam ser agrupados entre 5 a 10 genótipos (Reis et al., 2009). Já pela técnica de microsatélite observou-se a formação de dois grupos maiores, os quais foram subdivididos em dois grupos menores cada um. Os isolados de gatos foram idênticos aos das amostras humanas, entretanto, esses isolados foram diferentes dos isolados provenientes de outra região geográfica, os Estados Unidos (Reis et al., 2009).

Em um estudo molecular, fisiológico e filogenético realizado por um grupo espanhol com 127 isolados recebidos como *S. schenckii*, foram propostas três novas espécies no gênero *Sporothrix*: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*. Portanto, os resultados desse estudo sugeriram que *S. schenckii* não deveria ser considerada como uma única espécie, mas sim um complexo de espécies, o qual necessita de mais estudos

para a compreensão de sua distribuição geográfica, seu papel na doença e nas diferenças às respostas aos agentes antifúngicos (Marimon et al., 2006; Marimon et al., 2007). Utilizando semelhante metodologia, Oliveira e colaboradores (2011) analisaram fenotipicamente 246 isolados humanos de *Sporothrix* spp. provenientes da epidemia de esporotricose do estado do Rio de Janeiro entre 1998 e 2008 e concluíram que a espécie *S. brasiliensis* foi a mais prevalente nesta epidemia. Entretanto, nesse mesmo estudo a análise fenotípica não foi suficiente para identificar 25 isolados de *Sporothrix* em nível de espécie, o que só foi possível com o uso da análise genotípica (Oliveira et al., 2011).

Rodrigues e colaboradores (2013) fizeram estudo semelhante, por meio de análises fenotípica e genotípica de amostras provenientes de cinco estados brasileiros, de cães e gatos, e confirmaram *S. brasiliensis* como a espécie mais prevalente em gatos no Brasil e a única identificada nos animais do Rio de Janeiro. Os isolados de *S. brasiliensis* de gatos de São Paulo, Paraná e Minas Gerais compartilharam o mesmo genótipo da epidemia do Rio de Janeiro, diferente dos isolados do Rio Grande do Sul, permitindo concluir que existem no mínimo duas fontes distintas dessa espécie no Brasil (Rodrigues et al., 2013). Esses autores identificaram a espécie *S. schenckii* em apenas um isolado de gato proveniente de São Paulo.

A caracterização fenotípica é realizada conforme chave de identificação taxonômica proposta por Marimon e colaboradores (2007), sendo observada a morfologia do isolado em diferentes meios de cultura, especialmente a morfologia dos conídios pigmentados sésseis, taxa de crescimento nas temperaturas de 30, 35 e 37°C, e assimilação das fontes de carbono, sacarose, rafinose, glicose e ribitol. Compara-se então com o perfil das espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. albicans*, descritas por Marimon e colaboradores (2007), identificando-se o isolado em estudo.

Já a caracterização genotípica utiliza a técnica da PCR tendo como alvo diferentes genes, por exemplo, o gene da calmodulina, ITS1, ITS4, β -tubulina, quitina sintase, seguido do sequenciamento de seus produtos (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Liu et al., 2014). A detecção molecular de *Sporothrix* spp. seria útil para um rápido diagnóstico e em casos de cultura negativa devido a pouca quantidade de fungos nas amostras ou infecções secundárias. Nesse contexto, chama a atenção de uma metodologia rápida de identificação de espécies de *Sporothrix* pelo método T3B *fingerprint* desenvolvida por pesquisadores brasileiros (Oliveira et al., 2012).

Outra metodologia que tem sido realizada para a distinção de isolados de *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii*, *S. luriei* e *S. pallida* é a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS) com bons resultados e por ser um método simples, rápido, confiável e adequado para a rotina de identificação em laboratórios de micologia clínica e coleções de cultura (Oliveira et al., 2015).

A informação sobre o perfil fenotípico e molecular de *Sporothrix* spp. utilizando-se a taxonomia polifásica, associada com a epidemia de esporotricose pode ser útil para compreender um pouco mais sobre a infecção, epidemiologia e a refratariedade desse fungo aos tratamentos (Reis et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Uma epidemia de esporotricose há dezesseis anos acomete a região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, tendo sido diagnosticados mais de 4.000 casos humanos e 4.124 casos felinos no INI/FIOCRUZ/RJ entre 1998 e dezembro de 2012 (Pereira et al., 2014; Gremião et al., 2015). Os felinos estão envolvidos na transmissão para os humanos em mais de 80% dos casos nesta epidemia. Apesar da esporotricose humana ser uma doença de notificação compulsória no Rio de Janeiro desde o ano de 2013, ela continua sendo negligenciada, prevalecendo em regiões de pobreza e contribuindo para e entraves no desenvolvimento (Barros et al., 2010; Silva et al., 2012; Pereira et al., 2014).

A dificuldade de tratamento dos gatos explicitada pelos baixos índices de cura, inclusive com o itraconazol, considerado o fármaco de eleição, é um dos entraves para as tentativas de controle dessa epidemia (Barros et al., 2010; Pereira et al., 2010).

Até o momento, sabe-se que o gato é mais susceptível a infecção por *Sporothrix* spp. do que o ser humano e outros animais, como os caninos, sendo a doença de curso longo, frequentemente com acometimento sistêmico, levando a formas graves de difícil tratamento e evolução a óbito (Schubach et al., 2004). A ocorrência de sinais respiratórios está associada à falha terapêutica e óbito nesses animais. Entretanto, as causas da grande susceptibilidade à esporotricose nos felinos ainda são pouco conhecidas (Pereira et al., 2010). Acredita-se que os gatos que tenham uma resposta imunológica eficaz contra o fungo desenvolvam uma resposta inflamatória com formação de granulomas bem organizados, como observado com frequência nos casos de esporotricose humana e canina (Schubach et al., 2004; Miranda et al., 2009; Miranda et al., 2010; Quintela et al., 2011). Conseqüentemente, esses gatos provavelmente responderiam melhor ao tratamento e teriam melhor prognóstico como ocorre no

homem e no cão (Schubach et al., 2004; Schubach et al., 2006; Barros et al., 2011; Almeida-Paes et al., 2014).

Além da imunidade, outro fator que pode influenciar nesse baixo índice de cura clínica em gatos estaria relacionado a uma possível maior virulência do agente (Schubach et al., 2003). O frequente acometimento ósseo, de mucosas e de cartilagem na região nasal de felinos dessa epidemia (Gremião et al., 2015), diferente do relatado em outros países (Malik et al., 2004), reforçam essa hipótese de uma maior virulência do fungo. Essa hipótese é reforçada pela ocorrência em gatos da epidemia do Rio de Janeiro da espécie *S. brasiliensis* (Rodrigues et al., 2013), a qual é considerada a de maior patogenicidade (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). Entretanto não há estudos correlacionando a identificação fenotípica e molecular de espécies do complexo *Sporothrix* em gatos dessa epidemia com as alterações histopatológicas e sinais clínicos encontrados nesses animais.

Portanto, nos gatos com esporotricose provenientes da região epidêmica do Rio de Janeiro, incluídos no estudo, a avaliação da evolução clínica, de alterações histopatológicas das lesões ao longo do período de tratamento com o fármaco de eleição, assim como a identificação fenotípica e molecular de *Sporothrix* spp. obtidas desses animais associando-as com o desfecho, tempo de tratamento e de cicatrização das lesões, poderá contribuir para identificação de fatores preditivos de prognóstico da doença, que ainda são pouco conhecidos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a evolução clínica e descrever as alterações histológicas cutâneas durante o período de tratamento em gatos com esporotricose, identificar em nível de espécie os isolados fúngicos desses animais, e correlacionar esses fatores com o desfecho do tratamento, tempo de tratamento e de cicatrização das lesões.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Reportar a evolução clínica dos gatos com esporotricose durante o tratamento antifúngico com itraconazol;
- ▶ Identificar os isolados fúngicos por meio de métodos taxonômicos morfológico, fisiológico e quando necessário molecular;
- ▶ Descrever o tipo da inflamação presente nas lesões cutâneas e quantificar as células inflamatórias envolvidas durante o tratamento antifúngico;
- ▶ Caracterizar a morfologia e quantificar as estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. encontradas nas lesões cutâneas durante o tratamento antifúngico;
- ▶ Associar a evolução dos sinais clínicos, a evolução das alterações histopatológicas das lesões cutâneas e a(s) espécie(s) de *Sporothrix* com o desfecho do tratamento, tempo de tratamento e de cicatrização das lesões cutâneas nos gatos com esporotricose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte prospectivo.

4.2. CASUÍSTICA

4.2.1. AMOSTRA

A população do estudo foi constituída de uma amostra de conveniência de uma coorte de 183 gatos atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil de agosto de 2011 a outubro de 2013.

4.2.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Gatos com lesões cutâneas e diagnóstico definitivo de esporotricose por isolamento de *Sporothrix* spp. em meio de cultura;
- Peso acima de 2kg;
- Idade superior a 12 meses e inferior a 12 anos;
- Gatos que não tenham sido tratados com fármacos antifúngicos ou corticosteróides;

4.2.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Gestantes ou lactantes;
- Uso de terapia concomitante não permitida (corticoides);
- Não atingir o número mínimo de duas biopsias com intervalo pré determinado;

- Não atingir o desfecho do tratamento (óbito ou eutanásia);
- Abandono de tratamento;
- Necessidade de mudança da terapia antifúngica inicial.

4.2.4. CRITÉRIOS PARA INTERRUPÇÃO DEFINITIVA DO TRATAMENTO

O paciente apresentar, durante o estudo, algumas das condições explicitadas nos critérios de exclusão; eutanásia solicitada pelo proprietário; ocorrência de graves efeitos adversos clínicos e laboratoriais (superior ao grau 3 da tabela Anexo I); óbito; não atingir o desfecho de cura ou falência.

4.3. EXAME CLÍNICO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.3.1. PRIMEIRA CONSULTA

Os animais foram atendidos no LAPCLIN-DERMZOO/INI. Após a realização do histórico e anamnese, o animal foi sedado com cloridrato de quetamina 10% (10 –15 mg/kg) associada ao maleato de acepromazina 1% (0,1 mg/kg) aplicados por via intramuscular. No exame clínico inicial foi aferido o peso do animal e foram realizados inspeção geral (mucosas, estado geral, palpação de linfonodos, temperatura retal), verificação do grau de hidratação e exame dermatológico. Foi adotado o mesmo critério de classificação de distribuição das lesões utilizado por Schubach e colaboradores (2004): L1 (presença de lesões em um local), L2 (presença de lesões em 2 locais não contíguos) e L3 (presença de lesões em 3 ou mais locais não contíguos). O diâmetro das lesões cutâneas foi medido. Também foram avaliados a presença ou não de lesões em mucosas, presença de sinais extracutâneos respiratórios e não respiratórios e o estado

geral dos gatos. O estado geral foi classificado, segundo Pereira e colaboradores (2007) em:

- estado clínico bom: indica condição corporal ideal, normorexia, defecação e micção normais, normotermia, e animal alerta;
- estado clínico regular: indica magreza, hiporexia, alterações nas funções digestivas e urinárias, desidratação leve, temperatura corporal normal ou alterada, estado de alerta pode estar afetado;
- estado clínico ruim: significa magreza ou caquexia, hipo ou anorexia, distúrbios gastrintestinais ou urinários, desidratação severa, temperatura corporal alterada, estado de alerta alterado.

Todas as informações foram detalhadas em prontuário, e realizada a documentação fotográfica com armazenamento das imagens obtidas. As lesões foram classificadas conforme seus aspectos macroscópicos em: úlcera, nódulo, goma, escoriação e cicatriz.

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa e submetidas à análise bioquímica (uréia, creatinina, ALT e fosfatase alcalina) e hematológica.

Para realização de biopsia, uma lesão cutânea foi selecionada usando o critério de maior extensão no caso de múltiplas lesões. Quando houve presença de uma lesão cutânea na região nasal, a mesma teve prioridade de coleta, pois é geralmente de cicatrização mais difícil (Gremião et al., 2011) e, portanto, permitiria biopsias subsequentes. Inicialmente foi feita coleta do exsudato com um *swab* estéril da lesão cutânea selecionada para cultura fúngica. A seguir, foram feitas duas biopsias do bordo da mesma lesão cutânea com *punch* de 3 ou 4 mm, após sua antissepsia com álcool 70% e anestesia local utilizando lidocaína a 2%. Um dos fragmentos obtidos foi fixado em formol tamponado a 10% para análise histopatológica e o outro fragmento foi

conservado em frasco contendo solução salina estéril 0,9% e antibióticos para cultura micológica.

No Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz (LTBBF/IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, foram realizados a cultura e o isolamento do fungo para identificação fenotípica e posterior extração de DNA. O material coletado da biopsia e a secreção coletada através do *swab* foram cultivados em placas contendo o meio ágar Mycosel, à temperatura de 25°C, e observados durante 30 dias. Os isolados suspeitos de *Sporothrix* spp. foram subcultivados em meio ágar batata dextrose (BDA) à 25°C para identificação morfológica, e o dimorfismo verificado pelo crescimento de estruturas leveduriformes em meio BHI à 37°C.

4.3.2. TERAPIA ANTIFÚNGICA

O animal incluído no estudo foi tratado com itraconazol (cápsulas) por via oral, na dose de 50 ou 100 mg/gato/dia, dependendo do peso e estado geral do animal. Animais com menos de 3Kg de peso ou classificados em estado geral ruim ou com algum sinal adverso, recebiam a menor dose, de 50mg. Os animais foram tratados até a cura clínica ou por um período máximo de 36 semanas, que é o maior tempo mediano de tratamento reportado para alcançar a cura clínica (Schubach et al., 2004). Os gatos foram acompanhados clinicamente durante 24 semanas após a cura clínica. O período de acompanhamento desses animais foi escolhido com o objetivo de verificar a possibilidade de ocorrência de reativação da doença, após a cura clínica (MacDonald et al., 1980, Gremião et al., 2011). Foram marcadas duas revisões dentro deste período, a cada 12 semanas, para avaliação clínica no ambulatório do LAPCLIN-DERMZOO, INI, FIOCRUZ.

4.3.3 DESFECHOS

Cura clínica: gatos com remissão completa dos sinais clínicos cutâneos e extracutâneos, incluindo os sinais respiratórios, da esporotricose, até o tempo de suspensão do tratamento pela alta clínica, que era mantido até dois meses depois da remissão dos sinais. Também era considerado curado o animal que tinha recidiva da doença, ou seja, lesões que reaparecem nos mesmos locais acometidos anteriormente, embora o animal não tenha acesso a rua.

Falência terapêutica: animais que não foram curados clinicamente até o tempo máximo estipulado de tratamento com itraconazol, de 36 semanas, ou que apresentaram piora ou estagnação das lesões cutâneas de esporotricose em duas consultas consecutivas, mesmo sendo ajustada a dose da medicação.

4.3.4. CONSULTAS DE SEGUIMENTO

As revisões foram mensais para acompanhamento da resposta clínica à terapêutica e detecção de efeitos adversos clínicos e laboratoriais. Primeiramente, o peso do animal foi aferido para então dar continuidade ao exame clínico, realizado conforme descrito na primeira consulta. Uma nova biopsia da mesma lesão cutânea submetida à primeira biopsia foi realizada entre a 5^a e 11^a semana após o início do tratamento para observação das alterações histológicas cutâneas, antes da completa cicatrização. O tempo para realização da segunda biopsia foi escolhido baseando-se no tempo mínimo reportado para cura clínica da esporotricose felina, que é de oito semanas (Pereira et al., 2010), e considerando uma margem de três semanas devido à dificuldade de agendamento das consultas de revisão com os proprietários. Essa segunda biopsia de pele foi enviada e processada para exame histopatológico, sendo

realizada também a cultura micológica da mesma forma que a primeira biopsia. Adicionalmente, uma nova amostra de sangue foi coletada para exame bioquímico e hematológico em cada tempo de realização das biopsias, visando detectar graus de toxicidade laboratorial.

A Figura 1 apresenta o fluxograma das atividades a partir da primeira consulta do gato suspeito de esporotricose no ambulatório da LAPCLIN-DERMZOO, INI até a sua entrada efetivamente no estudo.

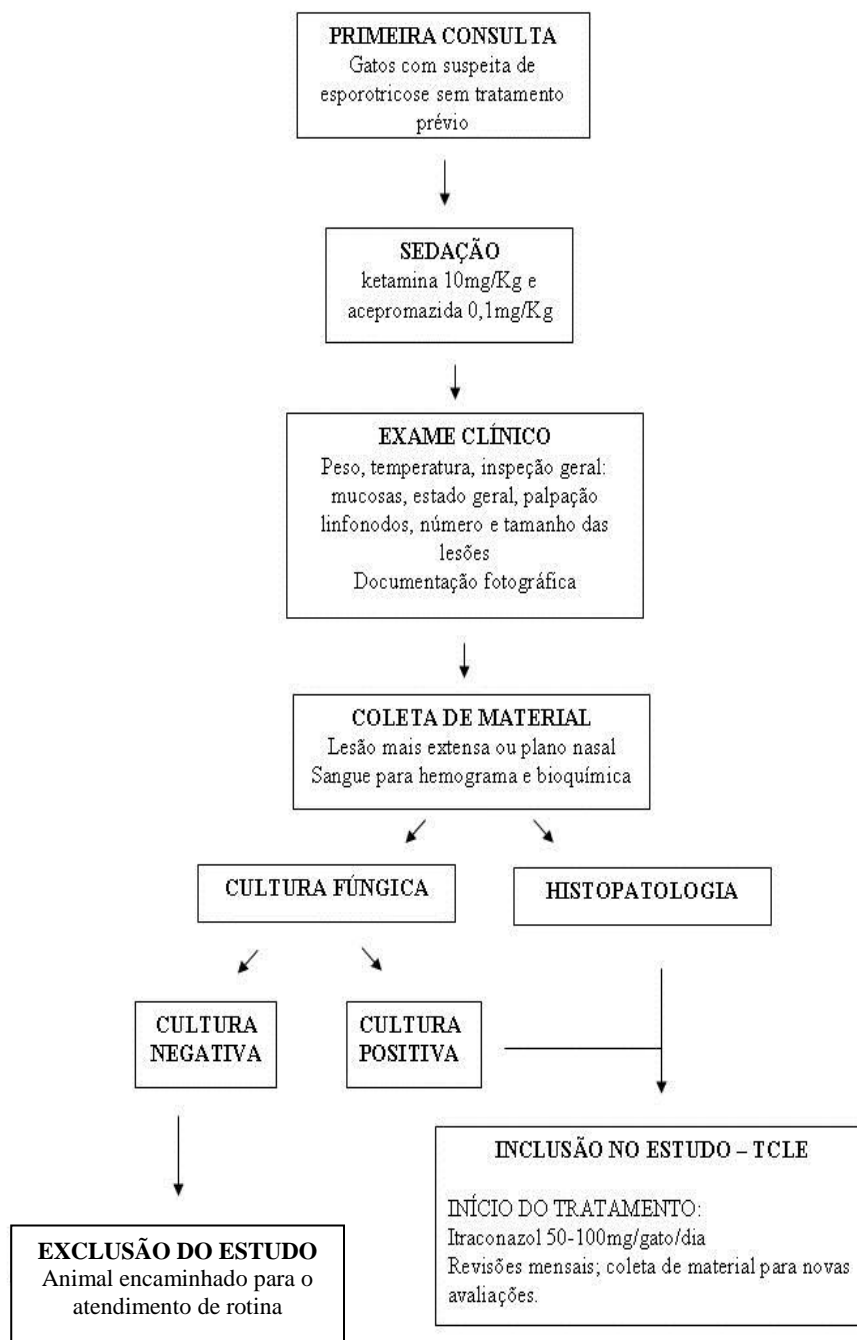


Figura 1. Fluxograma das atividades realizadas no primeiro atendimento de gatos suspeitos de esporotricose até a sua entrada no estudo com o início do tratamento.

4.4. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.4.1. PROVAS FENOTÍPICAS

4.4.1.1. MORFOLOGIA

As culturas fúngicas, na fase filamentosa, foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA), incubadas à 30°C e à 37°C, no escuro, por 21 dias para o estudo das características morfológicas (cor, aspecto e mensuração do diâmetro da colônia). Culturas em lâmina (Riddell, 1950) foram realizadas em meio ágar *corn meal*, incubadas à 30°C, no escuro, por 12 dias para o estudo das características microscópicas.

4.4.1.2. ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO

Experimentos de assimilação de carbono foram realizados utilizando o meio *yeast nitrogen base* (YNB) adicionados de fontes de carbono a serem testados: glicose, sacarose, rafinose e ribitol (Marimon et al., 2007). Os testes foram realizados, em triplicata, em microplacas de poliestireno com 96 poços, com fundo em U, contendo o meio e o respectivo açúcar a ser analisado, inoculadas com o isolado e incubadas à temperatura de 25°C por até 10 dias. Foi utilizado como controle negativo o meio YNB sem fonte de carbono inoculado com os isolados. O meio YNB acrescido de glicose foi utilizado como controle positivo (Oliveira et al., 2011). Adicionalmente, um isolado de *Rhodotorula mucilaginosa* (INCQS 40157) foi utilizado como cepa controle de assimilação de todos os carboidratos utilizados.

A leitura foi realizada como descrita por Marimon e colaboradores (2007, 2008) segundo a chave de características de diferenciação das espécies do complexo (Tabela 1).

Tabela 1. Assimilação diferencial de carbono para *Sporothrix* spp.

Espécies	Assimilação		
	Sacarose	Rafinose	Ribitol
<i>S. schenckii</i>	+	+	+
<i>S. brasiliensis</i>	-	-	- ¹
<i>S. albicans</i>	+	-	- ²
<i>S. globosa</i>	+	-	+ ³
<i>S. mexicana</i>	+	+	+
<i>S. luriei</i>	-	-	*

¹ a maioria não assimila ribitol, porém, cerca de, 19% assimilam; ²50% assimilam;

³ 9% não assimilam; * ausência de dados

Fonte: Adaptado de Marimon e colaboradores (2007, 2008).

4.4.2. PROVAS GENOTÍPICAS

Os isolados não identificados em nível de espécie dentro do complexo *Sporothrix* spp. pelas metodologias de identificação fenotípica descritas acima, foram submetidos à extração de DNA para a realização de experimentos moleculares no Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia do INI, FIOCRUZ.

4.4.2.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Isolados de *Sporothrix* spp. foram semeados em meio BDA, à temperatura ambiente, por 10 dias. A colônia foi raspada com um estilete de platina para a retirada

do micélio e cerca de 500 µg foram colocados em tubo de polipropileno estéril. Em seguida, a massa fúngica foi congelada em banho de nitrogênio líquido e macerada. Foram acrescidos 100 µL de tampão TES (50 mM de EDTA, 20% de sacarose, 1M de Tris base, pH 8,0) e nova maceração foi realizada. Em seguida, 500 µL de TES foram acrescidos e a solução submetida ao vortex por 30 segundos. As células maceradas foram colocadas em banho de água na temperatura de 90 a 100°C por 5 minutos e submetidas ao vortex, novamente, por 1 minuto. O material foi esfriado, à temperatura ambiente, centrifugado a 1.800 x g por 10 minutos e o sobrenadante recuperado. Nova centrifugação a 1.800 x g, por 3 minutos, foi realizada e logo em seguida, recuperado o sobrenadante. Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi acrescido e o material submetido ao vortex por 30 segundos e centrifugado a 1.800 x g por 10 minutos, por 3 vezes. Adicionou-se 1/10 do volume total de acetato de sódio 3M e em seguida 2,5x de etanol PA a 100%. A solução foi homogeneizada suavemente por inversão do tubo, 50 a 60 vezes, e nova centrifugação a 1.500 x g por 30 minutos foi realizada. O *pellet* foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 1.500 x g por 10 minutos. O *pellet* foi seco em microcentrífuga a vácuo. Em seguida, 50 µL de água destilada milli Q adicionada e o DNA armazenado *overnight* a 4°C (Oliveira, 2013).

Os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro Nanovue™(GE Healthcare UK). A pureza foi estimada pela razão entre os valores de densidade ótica obtidos a 230, 260 e 280 nm.

4.4.2.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foi realizada a técnica da PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B segundo Oliveira e colaboradores (2012). A reação foi preparada utilizando-se 2 mM de MgCl₂; 0,2 µM de dNTP mix; 1 U de Taq DNA polymerase; tampão KCl 10x; 10 µM

de primer T3B e 25 ng de DNA. A temperatura de hibridização (ou anelamento) utilizada foi de 52°C por 30 segundos em termociclador Biorad, seguindo o programa de amplificação de 32 ciclos: 95°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos.

O fragmento amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, a 60V, em tampão TBE (Tris base, 4,84 g; Borato, 1,14 ml; EDTA 0,5 M, 2 ml, pH 8,0; água destilada, 1000 ml). Os géis foram corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/ml em tampão TBE e fotografados sob luz ultravioleta usando-se filme polaróide. Como marcador de peso molecular foi utilizado 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

4.5. AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA

Para determinar a evolução clínica, o resultado da avaliação clínica realizada no momento da coleta da segunda biopsia cutânea foi comparado ao da avaliação clínica realizada no primeiro atendimento. As variáveis utilizadas nessa comparação foram o estado geral; a distribuição das lesões; presença de sinais respiratórios; e presença de lesão em mucosa.

4.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

As amostras teciduais coletadas por biopsia e fixadas em formol tamponado a 10% foram enviadas para o Serviço de Anatomia Patológica do INI e processadas de acordo com as técnicas usuais para inclusão em parafina, cortadas em micrótomo em seções de 5µm e coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e impregnação pela prata de Grocott (Behmer et al., 1976). A análise

microscópica das amostras foi realizada por dois observadores distintos e de forma cega em relação à evolução clínica, espécie do isolado e desfecho do tratamento.

O infiltrado inflamatório cutâneo foi classificado em piogranulomatoso ou não granulomatoso. O classificado como piogranulomatoso era constituído por células ativadas do sistema fagocítico mononuclear formando agregados compactos ou cordões intersticiais abundantes, com presença de neutrófilos (Miranda et al., 2009; Ackermann, 1997). Já o granuloma mal organizado, constituído por macrófagos cheios de estruturas leveduriformes em toda sua extensão e raros linfócitos e plasmócitos foi classificado como granuloma fúngico, o qual está inserido no conceito de piogranuloma (Miranda, 2013b). A distribuição do infiltrado granulomatoso foi classificada em difusa, focal ou multifocal. O infiltrado que não apresentou característica do tipo granulomatoso foi classificado como não granulomatoso.

O tipo de célula inflamatória detectado no infiltrado foi descrito e quantificado. A quantificação das células foi feita em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina examinando cinco campos microscópicos de 400x na área mais celular da lesão, com auxílio de um retículo óptico de contagem quadriculado de 1 mm² e também de um contador de células manual. A contagem das células foi realizada dentro da área do retículo óptico quadriculado em cada um dos cinco campos de 400x. Posteriormente foi calculado o número médio de células nos cinco campos delimitados pelo retículo. A quantificação das estruturas fúngicas leveduriformes foi feita em cortes histológicos impregnados pela prata de Grocott (GMS), usando a mesma metodologia da contagem dos tipos de células inflamatórias.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram descritas as frequências das variáveis qualitativas (sexo, distribuição das lesões, estado geral do animal, presença de sinais extracutâneos respiratórios, presença de lesão nas mucosas, tipos de granulomas, tipo/quantidade de células inflamatórias, forma/número de estruturas leveduriformes, possíveis espécies do gênero *Sporothrix*) e medianas das variáveis quantitativas (idade, peso, período de resposta clínica ao itraconazol, tempo de cicatrização das lesões).

A associação entre as variáveis qualitativas foi analisada pelo teste qui-quadrado de Pearson e/ ou Fisher, no caso de tabelas 2x2. A diferença das variáveis quantitativas de acordo com o desfecho (falência/cura) foi analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, pois a normalidade das variáveis quantitativas foi rejeitada pelo teste de Kolmogorov-Smirov, ao nível de 5%. A comparação dos resultados histopatológicos das 1ª e 2ª biópsias foi realizada pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. A correlação de Spearman foi empregada na avaliação da relação entre as variáveis quantitativas.

O teste pareado de Mac Nemar foi realizado para comparar as variáveis qualitativas: estado geral, distribuição das lesões, sinais respiratórios e lesões em mucosas no momento da primeira biopsia e segunda biopsia para verificar se houve diferença nesses dois momentos.

Na análise exploratória utilizamos o software Statistical Package for Social Sciences – SPSS versão 16.

4.8. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FIOCRUZ, pela licença LW 25/11.

Os proprietários que concordaram em participar deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APENDICE A).

5. RESULTADOS

5.1. CASOS CLÍNICOS AVALIADOS

Foram avaliados clinicamente 183 gatos que chegaram ao ambulatório do LAPCLIN-DERMZOO/INI, Fiocruz, com suspeita de esporotricose. Amostras das lesões cutâneas de todos esses gatos foram coletadas para realização de cultura micológica e exame histopatológico para diagnóstico da esporotricose, conforme descrito na metodologia.

5.1.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE GÊNERO DO AGENTE CAUSAL

Das 183 amostras coletadas dos gatos atendidos no ambulatório obtivemos 158 culturas positivas de *Sporothrix* spp.. A identificação foi baseada na morfologia macro e microscópica do fungo, *Sporothrix* spp., descrita segundo Nicot & Mariat (1973).

As amostras positivas para *Sporothrix* spp. apresentaram colônias com a superfície rugosa, glabra e membranosa de coloração variando do creme ao marrom escuro quase negro (Figura 2).



Figura 2. Colônias filamentosas positivas para *Sporothrix* spp. crescidas em meio Mycosel, à temperatura de 25°C, com 15 dias, a partir de amostras clínicas de gatos, atendidos no ambulatório do LAPCLIN-DERMZOO/INI, com suspeita de esporotricose. A) Colônia rugosa creme; B) Colônia glabra de coloração negra.

À microscopia foram observadas hifas hialinas, ramificadas, delgadas e septadas contendo conidióforos com conídios hialinos e pigmentados organizados em grupos como uma margarida e também dispostos ao longo das hifas. (Figura 3). Todas as colônias que apresentaram as características descritas acima apresentaram dimorfismo positivo, com a presença de células leveduriformes, quando crescidas em meio BHI à 37°C (dados não apresentados).

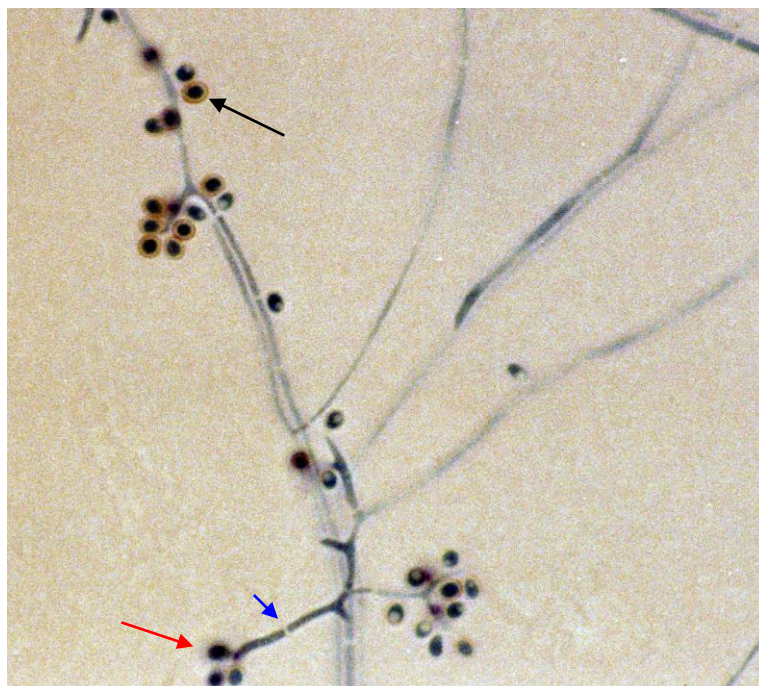


Figura 3. Cultura em lâmina, em BDA, de isolado de *Sporothrix* spp. proveniente de gato com esporotricose, apresentando hifas hialinas septadas (→) com conídios hialinos dispostos em grupos como margarida (→) e pigmentados sésseis (→). Lactofenol de Amman com azul de algodão. Aumento 1000 X.

5.1.2. ANIMAIS INCLUÍDOS NO ESTUDO

Inicialmente, foram incluídos no estudo, os 158 gatos com esporotricose confirmada pela cultura micológica. Desses, 30 (18,9%) vieram a óbito, 55 (34,81%) foram retirados devido a não ter atingido o número de duas biopsias e 39 (24,6%) abandonaram o tratamento. Sendo assim, 34 animais com esporotricose confirmada, com duas biopsias em intervalo preconizado e desfecho, como descrito na metodologia, permaneceram no estudo. Nenhum animal deste grupo foi retirado do estudo por efeito

adverso laboratorial ou clínico conforme tabelas anexas (anexo 1 e 2). Desse total 24 eram machos e 10 fêmeas, sem raça definida, com idade variando de 1,3 a dez anos, com mediana de 2 anos (desvio padrão 1,79). O peso variou entre 2,75 Kg a 5,25 Kg, com mediana de 3,57 Kg (desvio padrão 0,66).

5.1.2.1. DESFECHO DO TRATAMENTO

Dos 34 gatos com esporotricose incluídos no estudo e tratados com o itraconazol, 26 (76,5%) tiveram cura clínica e oito (23,5%) evoluíram para falência.

A mediana do tempo de tratamento até a cura clínica foi de 26 semanas nos 26 gatos que tiveram alta. Desses, cinco gatos tiveram recidiva durante o período de acompanhamento (6 meses após a cura clínica), cujos sítios anatômicos acometidos nas recidivas foram face, membro anterior (2 casos), nariz e dorso. O menor tempo de tratamento foi de 12 semanas, em um animal classificado como L3 e em estado ruim, que obteve uma ótima resposta ao fármaco. Já o maior tempo de tratamento com cura clínica atingiu o tempo máximo permitido, que foi de 36 semanas, em três animais L2. Animais que se curaram até 16 semanas eram L3 e seu estado variava de bom a ruim.

5.1.2.2. AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA

Os resultados da avaliação clínica quanto às variáveis nos 34 gatos incluídos no estudo e a associação dessas com o desfecho do tratamento encontram-se na Tabela 2.

Dentre os animais avaliados a região anatômica com maior número de coletas de amostras de lesão de pele para cultura microbiológica e exame histopatológico foi o membro anterior (13 casos), seguido da face/cabeça (dez casos), dorso (cinco casos), nariz incluindo plano e ponte nasal (quatro casos), flanco (um caso) e cauda (um caso).

O tamanho da lesão cutânea da primeira coleta variou de 0,5 a 10 cm, sendo que a mediana foi de 3 cm. Houve cicatrização da lesão escolhida para a biópsia em 32 gatos tratados. Nesses gatos, a mediana do tempo de cicatrização da lesão foi de 16 semanas e variou de quatro a 32 semanas. Em dois gatos a lesão não cicatrizou em 36 semanas e estes animais foram classificados no grupo falência de tratamento. Nos outros seis casos de falência a lesão escolhida para biópsia cicatrizou, porém houve piora ou estagnação de outras lesões cutâneas de esporotricose em duas consultas consecutivas.

Os resultados da evolução clínica durante a terceira consulta quanto às variáveis nos 34 gatos e a associação dessas com o desfecho do tratamento encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2. Avaliação clínica dos 34 gatos com esporotricose durante a primeira consulta antes do início do tratamento com itraconazol e correlação dos sinais clínicos com o desfecho do tratamento.

Características clínicas	Classificação	1ª consulta (1ª biopsia)	Desfecho		<i>p</i> *
			C	F	
Estado geral	Bom	20	17	3	0,228
	Regular/ruim	14	9	5	
Lesões-distribuição	L1/L2	11	10	1	0,227
	L3	23	16	7	
Sinais respiratórios	Sim	22	16	6	0,681
	Não	12	10	2	
Lesões mucosa nasal	Sim	22	16	6	0,681
	Não	12	10	2	

L1: lesões em um local na pele; L2: lesões em 2 locais não contíguos; L3: lesões em 3 ou mais locais não contíguos. Desfecho: C= cura clínica, F= falência.

* = associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela 3. Avaliação clínica dos 34 gatos com esporotricose no momento da segunda biopsia (3ª consulta) e correlação dos sinais clínicos com o desfecho do tratamento.

Características clínicas	Classificação	3ª consulta (2ª biopsia)	Desfecho		p*
			C	F	
Estado geral	Bom	24*	21	3	0,031
	Regular/ruim	10	5	5	
Lesões-distribuição	L1/L2	20*	18	2	0,042
	L3	14	8	6	
Sinais respiratórios	Sim	22	16	6	0,681
	Não	12	10	2	
Lesões mucosa nasal	Sim	22	16	6	0,681
	Não	12	10	2	

L1: lesões em um local na pele; L2: lesões em 2 locais não contíguos; L3: lesões em 3 ou mais locais não contíguos. Desfecho: C= cura clínica, F= falência.

* = associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Comparando os mesmos animais em dois momentos diferentes, no tempo da coleta de primeira biopsia, quando os animais estavam sem tratamento, e 5 a 11 semanas após, no tempo da segunda biopsia, encontramos uma evolução significativa do estado geral regular/ruim para o estado geral bom ($p=0,0289$) e assim como observou-se significância em gatos com distribuição de lesões L3 que evoluíram para L2/L1 ($p=0,022$).

As figuras 4, 5, 6 e 7 apresentam as lesões dos gatos com esporotricose na consulta clínica inicial no LAPCLIN-DERMZOO/INI e sua evolução durante o seu acompanhamento clínico.



Figura 4. Felino macho, 2 anos, 4 Kg, apresentando lesões esporotricóticas. A- Lesões ulceradas na face e membro posterior esquerdo observadas na primeira consulta; B- Linfangite em membro posterior esquerdo – 1ª consulta; C- Lesões em mucosa conjuntival, plano nasal e mento – 1ª consulta; D- Cura clínica após 20 semanas de tratamento com itraconazol – todas as lesões cicatrizaram.



Figura 5. Felino macho, 2 anos, 3,5 Kg, apresentando lesões esporotricóticas. A- Lesões ulceradas no dorso e região escapular direita – 1ª consulta; B- Evolução das mesmas lesões, após 4 semanas de tratamento com itraconazol; C- Momento da 2ª biopsia da lesão escapular com oito semanas de tratamento. Observa-se regressão do tamanho e cicatrização parcial da lesão; D- Cura clínica após 28 semanas de tratamento com itraconazol – todas as lesões cicatrizaram.

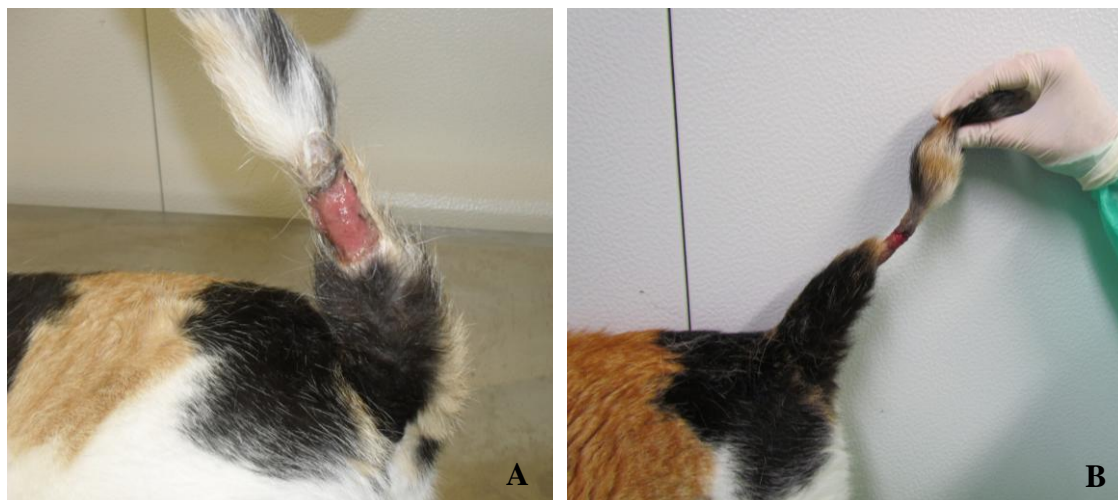


Figura 6. Felino fêmea, 3 anos, 5,2 Kg, apresentando lesão esporotricótica. A- Lesão na cauda - 1ª consulta; B- Durante evolução clínica não houve cicatrização da lesão, mesmo após 36 semanas de tratamento com itraconazol.

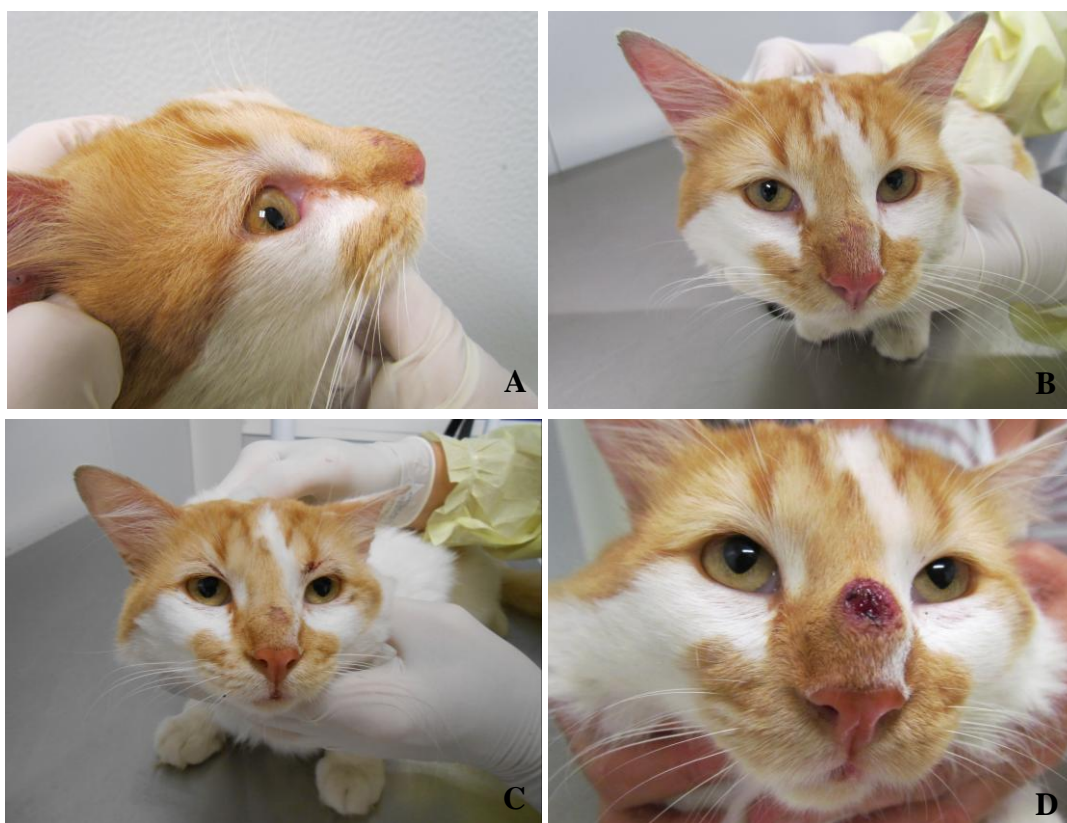


Figura 7. Felino macho, 2 anos, 3,4 Kg, apresentando lesões esporotricóticas. A e B- Lesão em plano nasal com aumento no volume do nariz após 8 semanas de tratamento com itraconazol; C- Cicatrização da lesão no plano nasal após 32 semanas de tratamento; D- Recidiva da lesão após 16 semanas de cura clínica.

5.1.2.3. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS EM NÍVEL DE ESPÉCIE

5.1.2.3.1. MORFOLOGIA

A análise macroscópica decorrente do crescimento em BDA demonstrou que após 21 dias de incubação a 30°C as colônias variaram em cor. O reverso, predominantemente, se apresentou na cor marrom escura (Figura 8).

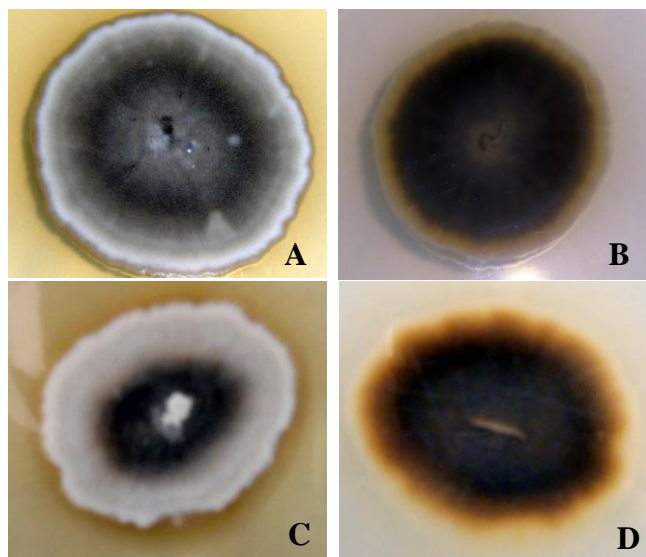


Figura 8. Colônias filamentosas de *Sporothrix* spp. frente e verso, variando de cor cinza com borda branca (A) e seu reverso marrom escuro na parte central e creme na borda (B), a colônia com centro negro e borda branca (C) e reverso marrom escuro e borda marrom mais claro e creme (D) crescidas em meio BDA, à temperatura de 30°C, por 21 dias.

O aspecto das colônias foi considerado pleomórfico, tanto em tubo como em placas de Petri contendo o meio BDA, predominando uma colônia rugosa, porém colônias lisas, arenosas e aveludadas foram observadas (Figura 9). O diâmetro das colônias, em placa de Petri, variou de 13,44 mm a 40,2 mm (Quadro 1), com média de $22,6 \pm 11,6$ mm.

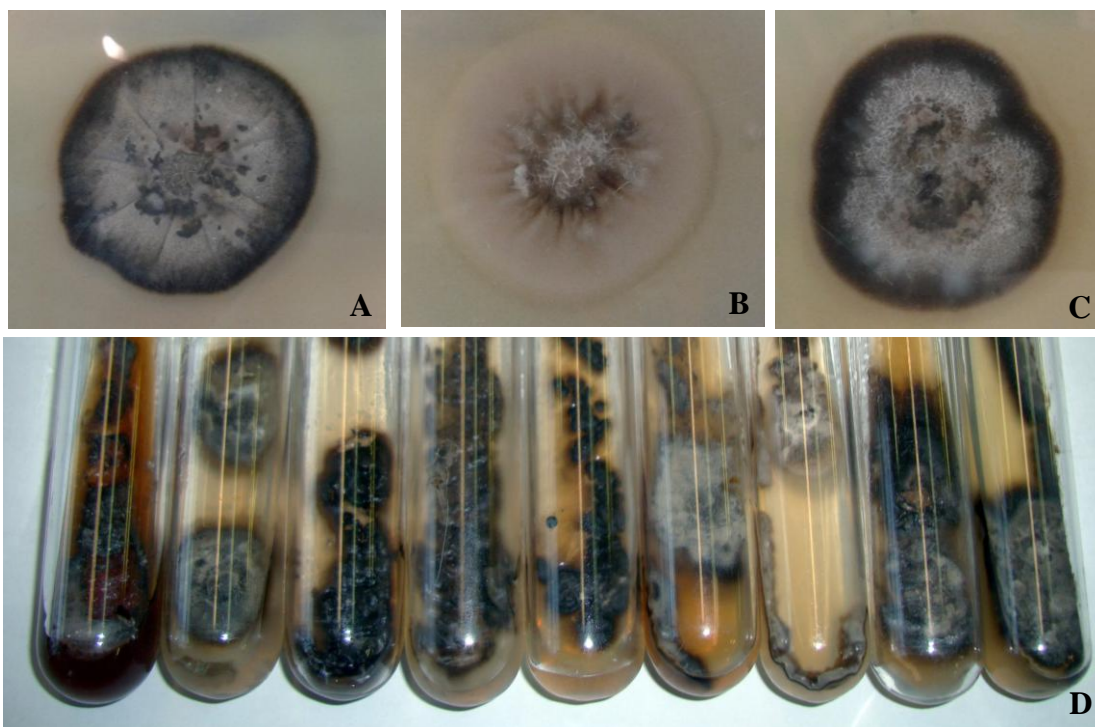


Figura 9. Colônias filamentosas de *Sporothrix* spp., em placas de Petri e em tubo, contendo meio BDA, incubadas à 30°C e a 26°C, respectivamente, por 21 dias. As colônias, em placa de Petri, apresentaram aspecto rugoso de cor cinza a negra (A), liso na borda e rugoso na parte central de cor creme (B) e arenoso de cor cinza a marrom escuro quase negra (C). Em tubo as colônias apresentaram morfologia semelhante e variou de cinza a negra (D).

Já as colônias crescidas a 37°C, testes de termotolerância, demonstraram maior homogeneidade em sua morfologia e cor, predominando o aspecto colonial com sulcos e dobras e coloração branca a creme. O diâmetro das mesmas variou de 2,33 mm a 11,67 mm (Quadro 1), com média de $8,07 \pm 1,73$ mm (Figura 10).



Figura 10. Colônia leveduriforme de *Sporothrix* spp. com sulcos e dobras, de coloração creme, encontrada entre os isolados provenientes dos gatos com esporotricose, crescidas em meio BDA, à temperatura de 37°C, por 21 dias.

As características microscópicas foram comparadas entre os isolados. Eles apresentaram aglomerados de conídios terminais ou intercalares em conidióforos, podendo ser conídios simpodiais ou sésseis, hialinos ou pigmentados, de formato obovoidal ou globoso/subgloboso nas colônias crescidas a 30 °C (Figura 11).

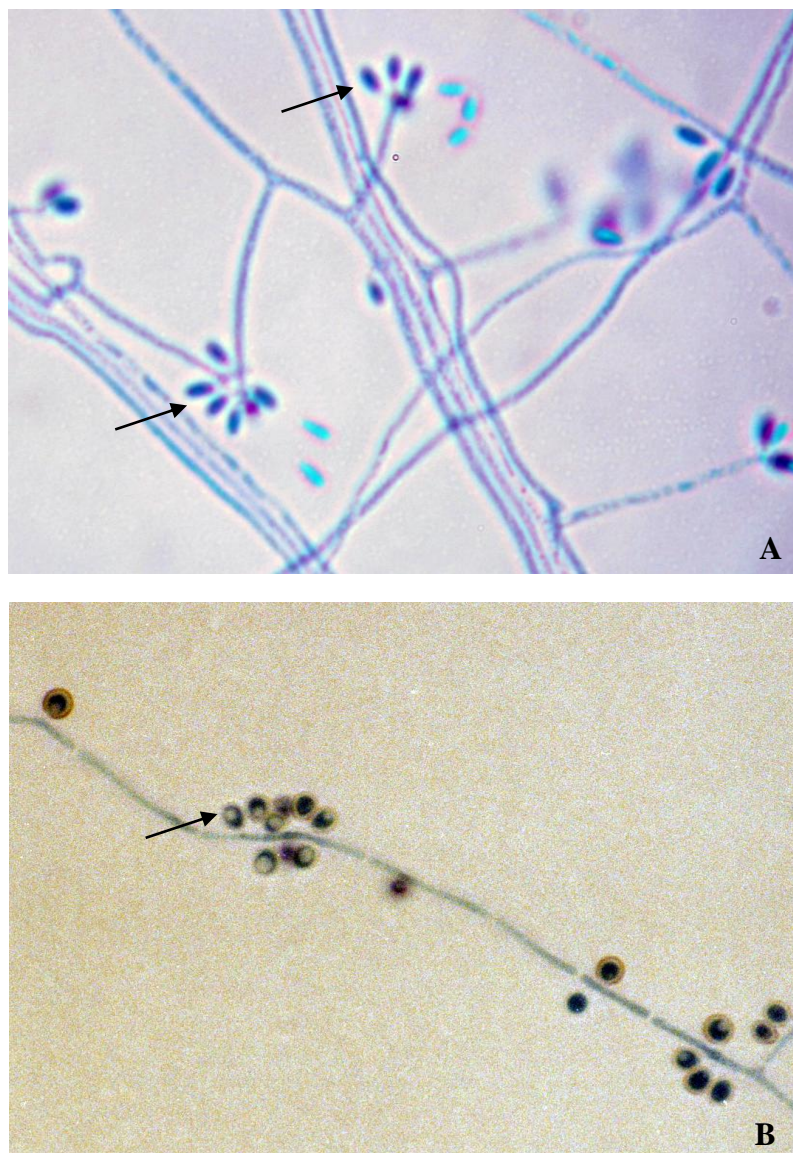


Figura 11. Características microscópicas dos isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos com esporotricose crescidos em meio ágar *corn meal*, incubadas à 30°C, no escuro, por 12 dias. (A) Observam-se hifas hialinas, septadas, ramificadas, conídios simpodiais obovoidais, hialinos, terminais dispostos em grupos na forma de pétalas de margarida (—→); (B) Conídios sésseis, globoso/subgloboso, pigmentados (—→). Lactofenol de Amman com azul de algodão. Aumento 1000 X.

5.1.2.3.2. ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO

Dos 34 isolados obtidos, 22 foram analisados com relação à assimilação de carbonos, uma vez que 12 isolados foram perdidos durante a fenotipagem por contaminação bacteriana ou por ácaros, tendo desses gatos apenas amostra de biopsia de pele fixada em formalina tamponada a 10% e emblocada em parafina, que será avaliada posteriormente. Dentre esses 22, 19 assimilaram as fontes de carbono em concordância com o perfil da espécie *S. brasiliensis*, ou seja, assimilação negativa para sacarose e rafinose. Um isolado apresentou resultado positivo para ribitol. Não foi possível identificar a espécie para três isolados (8996, 9054, 11345).

O quadro 1 apresenta um resumo das características fenotípicas dos 22 isolados estudados. Nele estão inseridas todas as características como: quantidade de conídios hialinos e pigmentados, assim como a sua forma (obovoidal e globoso/subgloboso); tamanho da colônia a 30° e 37°C; assimilação das fontes de carbono utilizadas, requeridas para a identificação da espécie.

Isolado	Pigmentação e forma do conídio				Diâmetro da colônia (mm)		Assimilação dos açúcares			
	Demáceo	Hialino	Obovoidal	Globoso/ Subgloboso	30°C	37°C	Glic	Rib	Raf	Sac
8996	+	+++	+++	+	32,99	6,69	+	+	+	+
9054	+++	+++	+++	+++	35,27	6,65	+	-	-	+
9106	+++	++	+++	++	31,07	7,44	+	-	-	-
9539	+++	+++	+++	+++	18,13	5,77	+	-	-	-
9579	+++	++	+++	+++	25,76	8,13	+	-	-	-
9680	+++	++	+	+++	40,2	9,07	+	-	-	-
9715	+++	+	+++	+	36,30	8,58	+	-	-	-
10269	+++	++	+++	++	31,5	10,59	+	-	-	-
10668	++	++	+	++	13,44	7,72	+	-	-	-
10711	+	+++	+++	+	36,37	8,05	+	-	-	-
10712	+++	++	+	+++	35,52	9,63	+	-	-	-

Quadro 1. Características morfológicas e fisiológicas de 22 isolados de *Sporothrix* spp.

e identificação em nível de espécie

Quadro 1. Continuação

Isolado	Pigmentação e forma do conídio				Diâmetro da colônia (mm)		Assimilação dos a		
	Demáceo	Hialino	Obovoidal	Globoso/ Subgloboso	30°C	37°C	Glic	Rib	R
10769	+	+++	+++	+	34,91	2,33	+	-	
10802	+	+++	+++	+	37,29	6,8	+	-	
10860	+	+++	+++	+++	25,01	11,67	+	-	
10955	+++	++	++	+++	27,32	6,06	+	-	
11345	+++	+++	+++	+++	23,30	7,26	+	-	
10954	+++	+++	+++	++	29,47	7,07	+	-	
12251	+	+++	+++	++	30,71	8,85	+	-	
12263	++	+++	+++	+++	38,06	8,42	+	-	
12330	+++	++	++	+++	18,97	4,45	+	-	
12379	+++	++	+++	+++	33,49	6,68	+	-	
12464	+++	++	+++	+++	28,10	8,57	+	-	

Glic = glicose; Rib = ribitol; Ra = rafinose; Sac = sacarose; +++ = grande quantidade; ++ = quantidade média; + = pouca quantidade

5.1.2.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS EM NÍVEL DE ESPÉCIE

Os três isolados (8996; 9054; 11345) de *Sporothrix* spp. que não foram identificados em nível de espécie e um isolado (9680) já identificado como *S. brasiliensis* pelas metodologias fenotípicas foram submetidos a técnica de DNA *fingerprinting*. Os resultados são mostrados na Figura 12. Observa-se que todos os 3 isolados apresentaram perfil molecular compatível com a espécie *S. brasiliensis*.

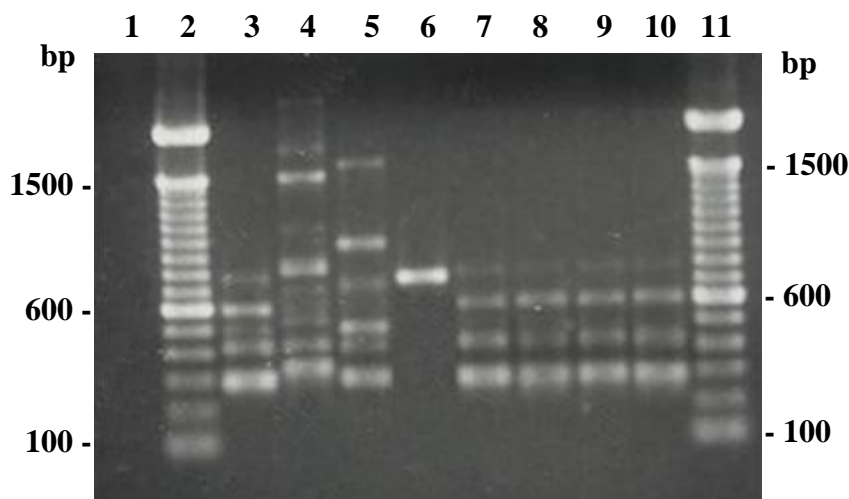


Figura 12. Perfis moleculares obtidos por T3B PCR *fingerprinting* de DNAs preparados de 8 isolados de *Sporothrix* spp. Linha 1: controle negativo; Linha 2: Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder); Linha 3: *S. brasiliensis* (IPEC 16490); Linha 4: *S. mexicana* (MUM 11.02); Linha 5: *S. schenckii* (IPEC 27722); Linha 6: *S. globosa* (IPEC 27135); Linha 7: Isolado 8996; Linha 8: Isolado 11345; Linha 9: Isolado 9054; Linha 10: Isolado 9680 identificado como *S. brasiliensis*; Linha 11: Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder).

5.1.2.5. COMPARAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS GATOS COM ESPOROTRICOSE E A PIGMENTAÇÃO DOS ISOLADOS

Na tentativa de correlacionar a evolução clínica dos gatos com a melanização dos conídios comparou-se as características dos isolados (quantidade de conídios melanizados e hialinos) com a evolução do estado geral, distribuição das lesões e desfecho nos gatos com esporotricose (Quadro 2).

Não foi encontrada correlação positiva entre melanização e maior virulência, visto que dos sete gatos cujo isolado fúngico apresentava maior quantidade de conídios melanizados, quatro (isolados: 9680; 10955; 12379; 12464) apresentaram estado geral regular, com distribuição de lesões que variaram de L2 a L3 e evoluíram para cura clínica. Os outros três gatos (isolados: 9106; 9579; 10712) com isolado fúngico apresentando predomínio de conídios melanizados evoluíram para falência, com estado geral bom e distribuição de lesões que variou de 1 a 3. Por outro lado, sete gatos cujo isolado fúngico apresentava maior quantidade de conídios hialinos, três (isolados: 10711; 10860; 12263) apresentaram estado geral regular, com distribuição de lesões L3 e evoluíram para falência e mais quatro gatos (isolados: 8996; 10769; 10802; 12251) apresentaram estado geral bom, com distribuição de lesões L3 e evoluíram para cura clínica.

Quadro 2. Comparação da evolução clínica dos gatos com esporotricose e a pigmentação dos conídios dos isolados fúngicos

Isolado	Pigmentação dos conídios		Evolução clínica dos gatos		
	Demáceo (séssil)	Hialino (simpodial)	Evolução do estado geral 1ª B/2ª B	Distribuição das lesões 1ª B/2ª B	Desfecho
8996	+	+++	BOM/BOM	3/1	C
9054	+++	+++	BOM/REG	2/3	C
9106	+++	++	BOM/BOM	1/1	F
9539	+++	+++	RUIM/REG	3/3	C
9579	+++	++	BOM/BOM	3/2	F
9680	+++	++	REG/REG	2/3	C
9715	+++	+	BOM/REG	2/1	C
10269	+++	++	BOM/BOM	3/3	C
10668	++	++	REG/REG	3/3	F
10711	+	+++	REG/REG	3/3	F
10712	+++	++	BOM/BOM	3/3	F
10769	+	+++	BOM/BOM	3/3	C
10802	+	+++	BOM/BOM	3/1	C
10860	+	+++	REG/REG	3/3	F
10955	+++	++	REG/REG	3/3	C
11345	+++	+++	BOM/BOM	2/2	C
10954	+++	+++	REG/BOM	3/2	C
12251	+	+++	RUIM/BOM	3/1	C
12263	++	+++	RUIM/RUIM	3/3	F
12330	+++	++	BOM/BOM	3/1	C
12379	+++	++	REG/BOM	3/1	C
12464	+++	++	RUIM/REG	3/3	C

B= biopsia; + = pouca quantidade; ++ = quantidade média; +++= muita quantidade C=cura F=falência

5.1.2.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

Os resultados da avaliação histopatológica das primeira e segunda biopsias das lesões dos 34 casos de esporotricose felina e sua correlação com o desfecho do tratamento encontram-se na Tabela 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Alterações histopatológicas cutâneas em gatos com esporotricose no momento da primeira biopsia e sua correlação com o desfecho do tratamento.

Alterações histológicas	Classificação	1ª biopsia N/%	Desfecho		p
			C	F	
Tipo de infiltrado	Pio/granulomatoso	34(100)	26	8	-
	Não granulomatoso	0	-	-	
Organização granuloma	Bem organizado	3(8,8)	3	0	1,0
	Mal organizado	31(91,2)	23	8	
Granuloma fúngico	Sim	13(38,2)	8	5	0,211
	Não	21(61,8)	18	3	
Dermatofibrose	Sim	1	1	0	1,0
	Não	33	25	8	
Levedura predominante	Arredondada	18(52,9)	13	5	0,692
	Charuto	14(41,2)	11	3	
	Negativo	2			
Brotamento da levedura	Sim	28(82,4)	21	7	1,0
	Não	4(11,8)	3	1	
	Negativo	2			

Desfecho: C= cura clínica, F= falência ; negativo= ausência de fungos

Tabela 5. Alterações histopatológicas cutâneas em 34 gatos com esporotricose no momento da segunda biopsia e sua correlação com o desfecho do tratamento.

Alterações histológicas	Classificação	2ª biopsia N/%	Desfecho		p
			C	F	
Tipo de infiltrado	Pio/granulomatoso	24(70,6)	16	8	0,72
	Não granulomatoso	10(29,9)	10	0	
Organização granuloma	Bem organizado	2(5,9)	2	0	0,536
	Mal organizado	22(64,7)	14	8	
Granuloma fúngico	Sim	0	-	-	-
	Não	34(100)	16	8	
Dermatofibrose	sim	20	15	5	1,0
	Não	14	11	3	
Levedura predominante	Arredondada	14(41,2)	10	4	-
	Charuto	2(5,9)	1	1	
	Negativo	18			
Brotamento da levedura	Sim	4(11,8)	3	1	1,0
	Não	12(35,3)	8	4	
	Negativo	18			

Desfecho: C= cura clínica, F= falência ; negativo= ausência de fungo

Não houve correlação entre os achados histopatológicos com o desfecho, tanto na primeira quanto na segunda biopsia. Porém, ao correlacionar estes achados em dois tempos diferentes, no mesmo animal, houve uma evolução significativa ($p=0,012$) do infiltrado do tipo piogranulomatoso para infiltrado não granulomatoso da primeira para segunda biopsia nos gatos examinados. Adicionalmente, houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da frequência de casos com dermatofibrose na segunda biopsia em comparação com a primeira.

A distribuição do infiltrado inflamatório na primeira biopsia foi difusa em 30 casos e focal em quatro casos. Já na segunda biopsia foram 26 casos de distribuição difusa, um caso de distribuição focal e 6 casos de distribuição multifocal.

Na análise do tipo de levedura, houve uma evolução significativa ($p < 0,001$) de casos com predomínio de estruturas leveduriformes em forma de charuto para casos com estrutura leveduriforme arredondada da primeira para segunda biopsia. Adicionalmente, houve redução significativa ($p=0,02$) na ocorrência de casos com estrutura leveduriforme apresentando brotamento da primeira para segunda biopsia. Estruturas fúngicas semelhantes a hifas e pseudohifas foram observadas na primeira análise em 2 casos e na segunda biopsia em 1 caso, sendo o desfecho destes animais a cura clínica em dois casos e a falência em um caso, sem significância estatística.

As Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam exemplos de alterações histológicas observadas nos gatos com esporotricose avaliados com evolução para cura clínica, cura com recidiva e falência.

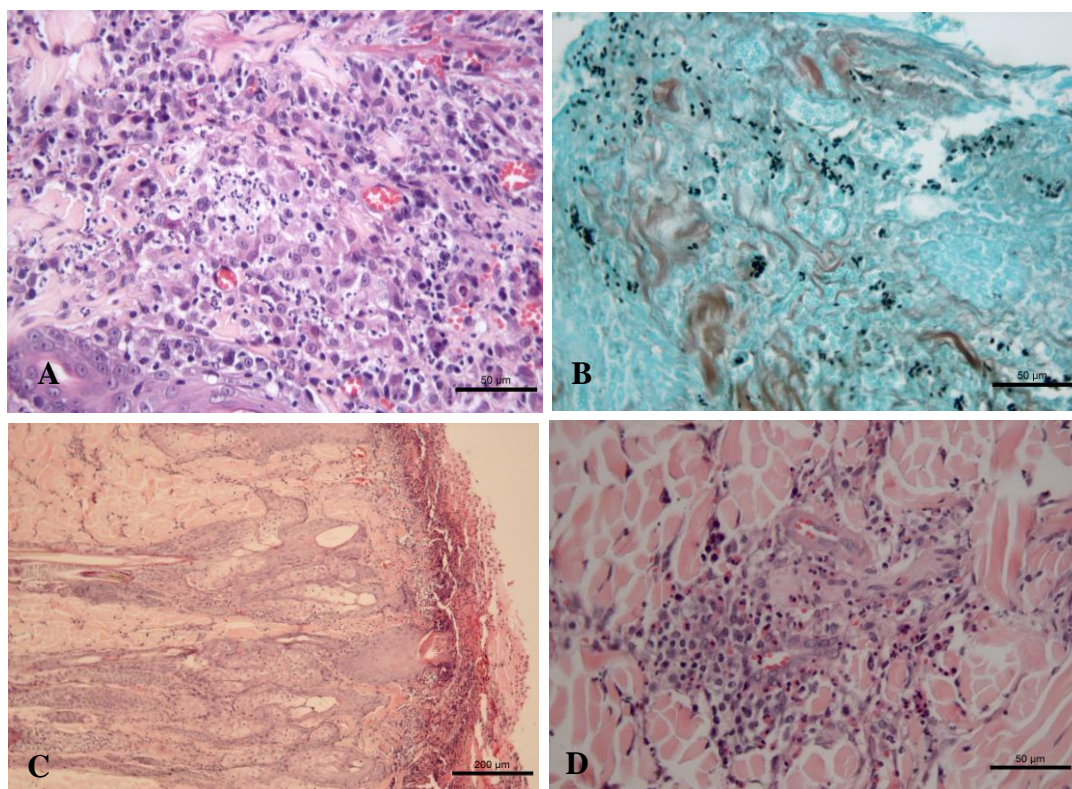


Figura 13. Biopsia de pele de gato com esporotricose (isolado 10269), cujo desfecho foi cura clínica após 20 semanas do uso de itraconazol. 1ª biopsia: (A) Dermatite piogranulomatosa, apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório acentuado e difuso composto por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. HE; (B) Diversas estruturas leveduriformes coradas em negro são observadas na derme. GMS; 2ª biopsia: (C) Úlcera recoberta por crosta e dermatite piogranulomatosa moderada e difusa, com infiltrado inflamatório mais intenso na derme superficial. HE; (D) Detalhe da foto C mostrando foco de dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório moderado constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. HE

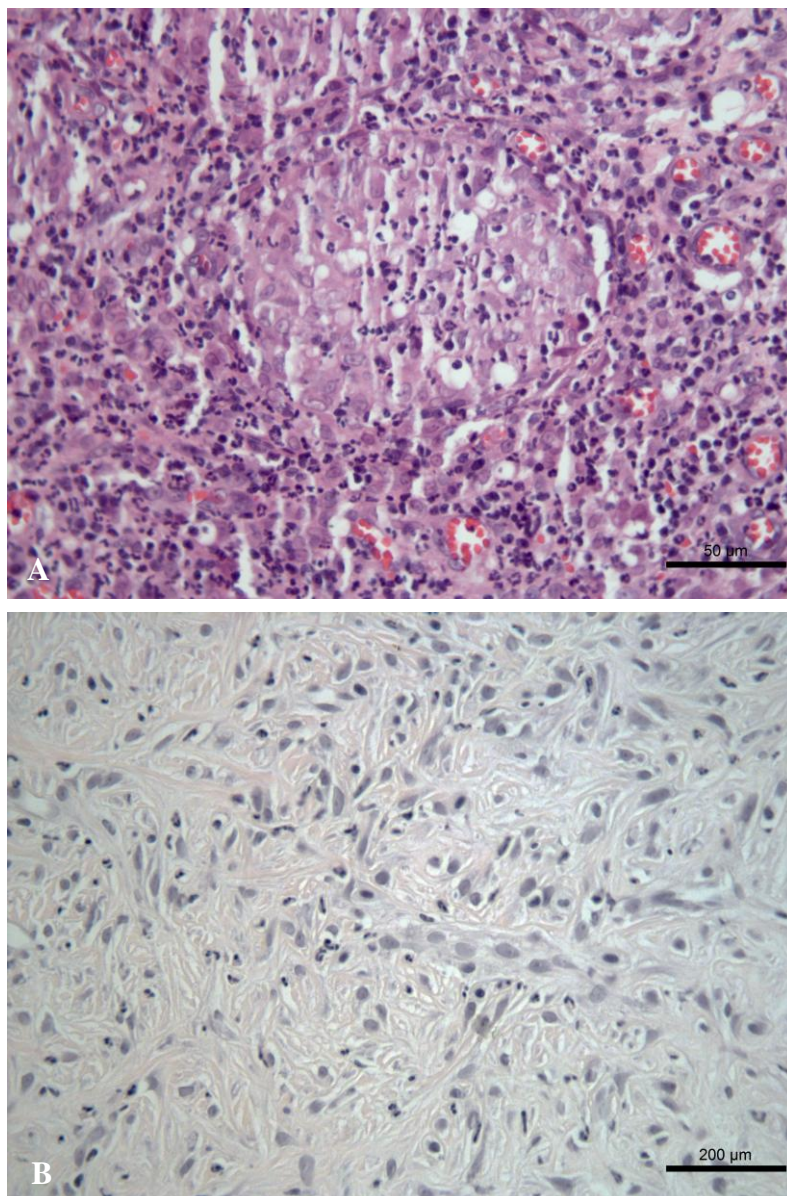


Figura 14. Biopsia de pele de gato com esporotricose (isolado 11345), cujo desfecho foi cura clínica após 28 semanas de uso de itraconazol. 1ª biopsia: (A) Dermatite piogranulomatosa acentuada e difusa, apresentando granuloma bem organizado. HE; 2ª biopsia: (B) Dermatite não granulomatosa discreta e difusa composta por neutrófilos e linfócitos. Observa-se também acentuada dermatofibrose com 8 semanas de tratamento. HE.

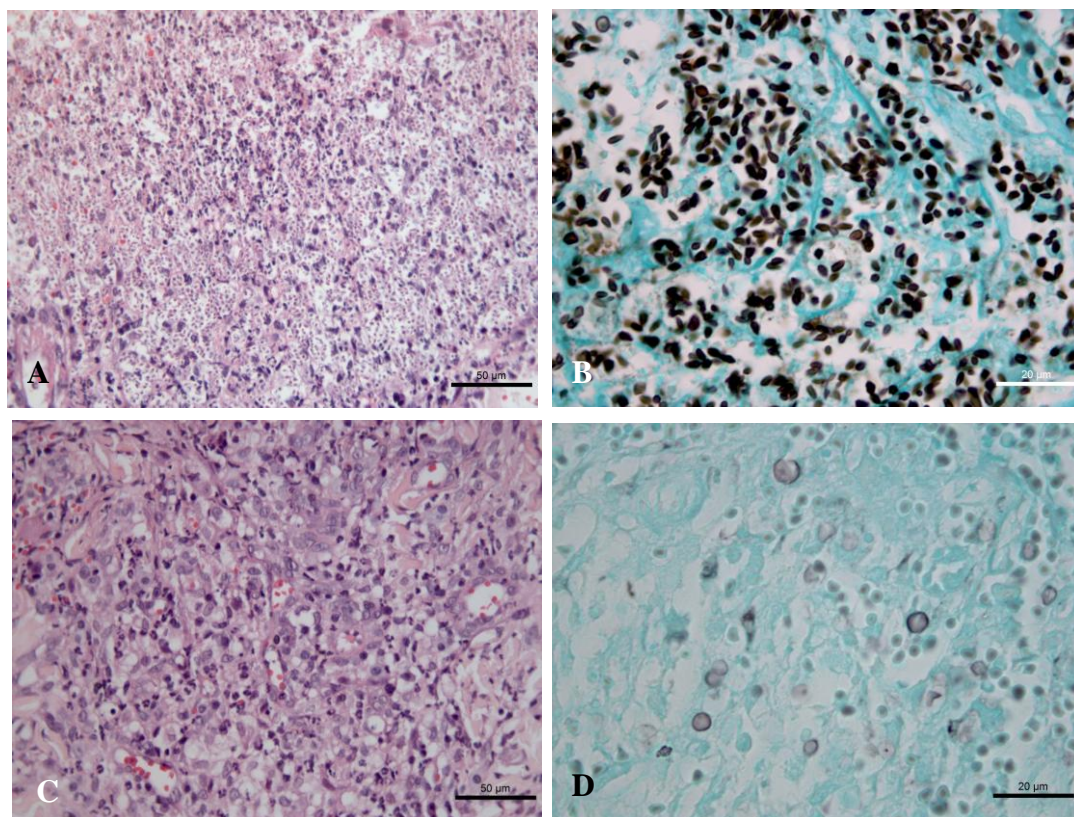


Figura 15. Biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi cura clínica após 20 semanas de uso de itraconazol, porém apresentando recidiva após 16 semanas da alta (isolado 10955). 1ª biopsia: (A) Dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma fúngico com abundantes estruturas leveduriformes no interior de macrófagos e escasso infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. HE; (B) Abundantes estruturas leveduriformes arredondadas e em forma de charuto coradas em negro são observadas. GMS; 2ª biopsia: (C) Dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório acentuado e difuso constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. HE; (D) Estruturas leveduriformes arredondadas sem brotamento coradas em cinza. GMS.

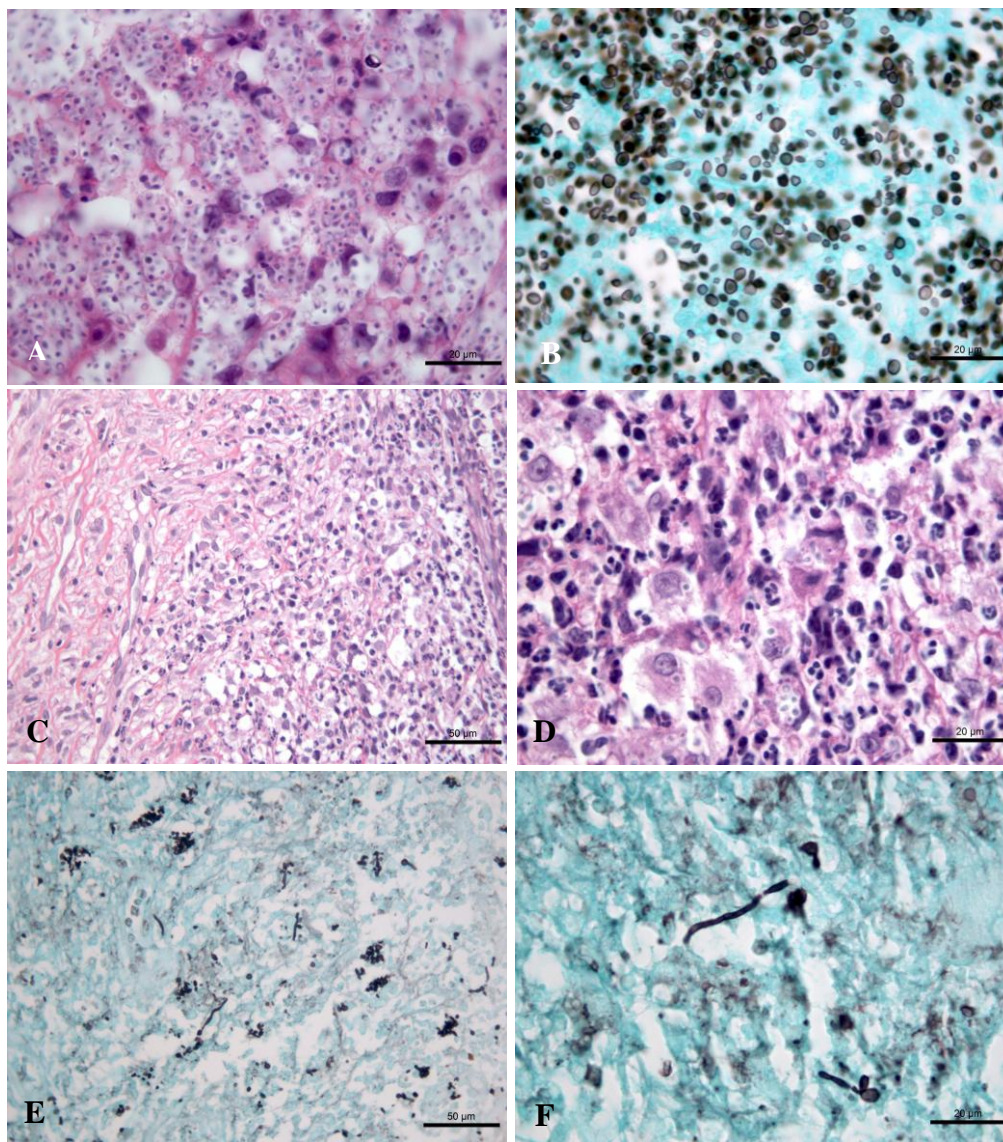


Figura 16. Biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi falência após 36 semanas de uso de itraconazol (isolado 12263). 1ª biopsia: (A) Granuloma fúngico com abundantes estruturas leveduriformes no interior de macrófagos e escasso infiltrado inflamatório. HE; (B) Presença de estruturas fúngicas arredondadas. GMS; 2ª biopsia: (C) Dermatite piogranulomatosa apresentando granuloma mal organizado e infiltrado inflamatório acentuado e difuso constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. Observa-se também dermatofibrose. HE; (D) Detalhe da foto C; (E) Presença de estruturas semelhantes a hifas coradas em negro. GMS; (F) Detalhe da foto E apresentando estruturas alongadas semelhantes a hifas e arredondadas com brotamento.

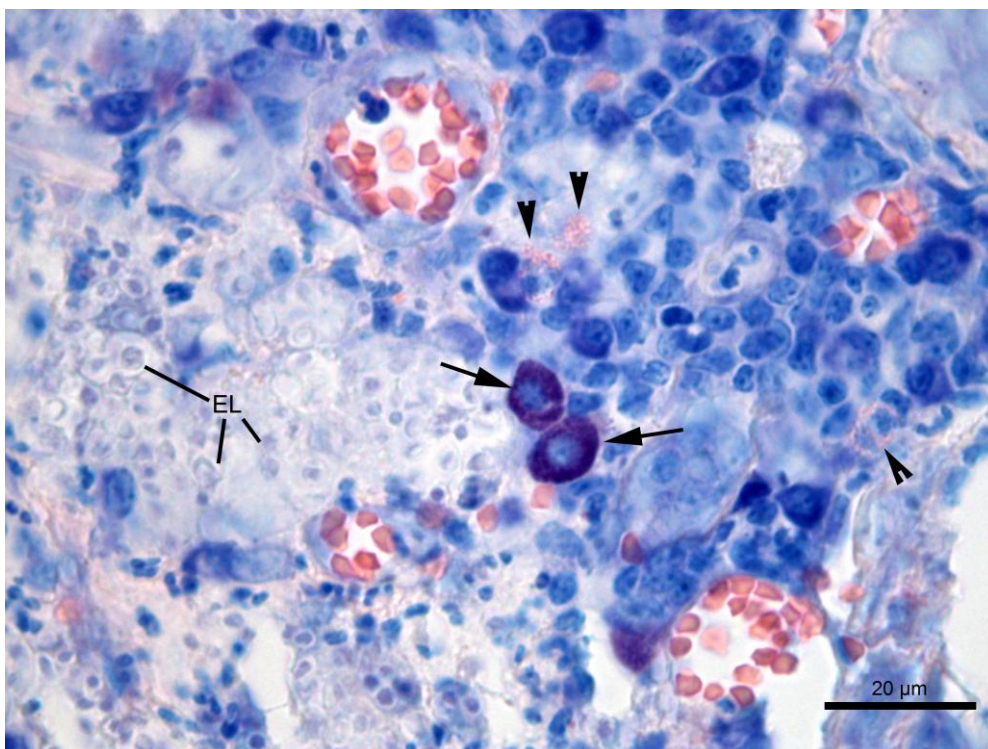


Figura 17. Primeira biopsia de pele de gato com esporotricose, cujo desfecho foi cura clínica após 20 semanas de uso de itraconazol (isolado 10769), porém apresentando recidiva após 8 semanas da alta. Raros mastócitos (seta) e eosinófilos (cabeça de seta) são observados no infiltrado inflamatório da derme, próximos a estruturas leveduriformes (EL) de *S. brasiliensis*. Giemsa.

A mediana do número de células inflamatórias e de estruturas leveduriformes foram comparadas entre a primeira e segunda biopsias (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação dos números de células inflamatórias por mm² e de estruturas leveduriformes (carga fúngica) em cortes histológicos de pele com lesão obtida nas primeira e segunda biopsias de 34 gatos com esporotricose tratados com itraconazol.

Células	1 ^a biopsia (n = 34)		2 ^a biopsia (n = 34)		p*
	Mediana	Varição	Mediana	Varição	
Neutrófilos	103,3	16,6-287,2	86,0	0-266,0	0,145
Macrófagos	95,8	30,0-178,6	55,7	0-166,2	0,001*
Linfócitos	18,6	5,0-62,2	16,5	0-434,4	0,478
Plasmócitos	14,3	1,2-62,2	10,8	0-99,4	0,215
Mastócitos	7,2	0-21,6	4,2	0-27,2	0,274
EL	364,9	0-2808,0	0	0-200,6	< 0,001*

EL = elementos leveduriformes; * valor de $p < 0,05$ = associações estatisticamente significativas.

Foram encontradas células gigantes em um caso na primeira biopsia e em três casos na segunda biopsia e a mediana do número dessas células nos dois tempos foi zero. Os eosinófilos apareceram em oito casos na primeira biopsia e em dois casos na segunda biopsia, e a mediana do número dessas células foi zero nas duas biopsias.

Realizamos também a análise da mediana de cada tipo de célula inflamatória frente à carga fúngica da primeira e segunda biopsias com cada desfecho (Tabela 7), observando que não houve diferença significativa em relação as medianas das células inflamatórias tanto na primeira biopsia quanto na segunda biopsia com relação ao desfecho de cura e falência.

Tabela 7. Comparação da mediana das células inflamatórias por mm² e da carga fúngica das primeira e segunda biopsias em cada desfecho.

Célula/Fungo	1ª biopsia (n = 34)		p*	2ª biopsia (n = 34)		p*
	F	C		F	C	
Neutrófilos	90,9	119,6	0,372	115,5	74,4	0,208
Macrófagos	74,1	95,8	0,239	74,3	52,2	0,161
Linfócitos	18,2	21,2	0,745	23,8	16,0	0,383
Plasmócitos	12,6	16,0	0,428	12,1	11,0	0,655
Mastócitos	7,7	7,2	0,935	2,7	5,0	0,760
Carga fúngica	969,6	303,4	0,620	0,9	0,0	0,468

F = falência; C = cura clínica. * valor de $p < 0,05$ = associações estatisticamente significativas.

No teste de correlação entre a carga fúngica com as medianas das células inflamatórias da primeira biopsia, obtivemos uma correlação negativa da carga fúngica com as células do tipo neutrófilo ($p < 0,001$; $R = -0,596$), macrófago ($p = 0,002$; $R = -0,522$) e linfócito ($p = 0,025$; $R = -0,384$) significando que em cargas fúngicas maiores havia menor número destes três tipos celulares. Na segunda biopsia esta correlação se inverteu, sendo que maiores cargas fúngicas estiveram relacionadas a maior número de neutrófilos ($p = 0,016$) e macrófagos ($p = 0,003$).

A carga fúngica das lesões cutâneas na primeira e segunda biopsias, assim como a avaliação da sua correlação com as características clínicas e alterações histológicas nos 34 gatos incluídos no estudo encontram-se nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8. Correlação da carga fúngica das lesões cutâneas na primeira e segunda biopsias com as características clínicas dos 34 gatos com esporotricose incluídos no estudo.

Características clínicas	Classificação	Mediana da carga fúngica			
		1ª biopsia	<i>p</i> *	2ª biopsia	<i>p</i> *
Estado geral	Bom	286,5		0	
			0,529		0,92
	Regular/Ruim	364,9		0,700	
Lesões-distribuição	L1/L2	10,0		0	
			0,71		0,010*
	L3	389,4		1,4	
Sinais respiratórios	Sim	364,9		0,600	
			0,719		0,198
	Não	283,4		0,0	
Lesões mucosas	Sim	364,9		0,600	
			0,719		0,198
	Não	283,4		0,0	

L1: lesões em um local na pele; L2: lesões em 2 locais não contíguos; L3: lesões em 3 ou mais locais não contíguos. * valor de $p < 0,05$ = associações estatisticamente significativas

Tabela 9. Correlação da carga fúngica das lesões cutânea com as alterações histopatológicas cutâneas em 34 gatos com esporotricose no momento da primeira e segunda biopsias.

Alterações histológicas	Classificação	Mediana da carga fúngica			
		1ª biopsia	<i>p</i>	2ª biopsia	<i>p</i>
Tipo de infiltrado	Piogramulomatoso	361,0		1,2	
	Não granulomatoso	0	0,139	0	0,010*
Organização granuloma	Bem organizado	0	0,008*	0,800	0,520
	Mal organizado	389,4		1,2	
Granuloma fúngico	Sim	1098,8	<0,001*	-	-
	Não	6,8		1,2	
Levedura predominante	Arredondada	8,4	<0,001*	2,8	0,039*
	Charuto	857,6		110,0	
Brotamento da levedura	Sim	549,6	0,017*	39,7	0,015*
	Não	2,9		2,2	

* valor de $p < 0,05$ = associações estatisticamente significativas

Não houve significância entre duração de tratamento e evolução clínica e achados histopatológicos, mas observamos que a mediana de cura clínica foi menor nos gatos L1/L2, sem acometimento de mucosa e que apresentavam granuloma típico (mediana= 25 semanas). O tempo de tratamento também foi menor nos casos de granulomas bem organizados, com leveduras do tipo arredondada e sem brotamento (mediana= 24 semanas).

O tempo de tratamento, o tempo de cicatrização das lesões e o tamanho das lesões não estiveram correlacionados com a mediana das células inflamatórias, mas o tempo de tratamento esteve associado ao tempo de cicatrização da lesão ($p = 0,002$).

6. DISCUSSÃO

O grupo do LAPCLIN-DERMZOO/INI vem estudando a epidemia de esporotricose em felinos no Rio de Janeiro, desde 1998 e até dezembro de 2012 diagnosticou 4.124 gatos com essa micose (Gremião et al., 2015). Neste contexto se insere essa pesquisa, onde 183 gatos com suspeita dessa infecção foram avaliados. Destes, 158 gatos foram incluídos, porém 124 foram excluídos do estudo conforme critérios de exclusão. É fato, que o acompanhamento de animais por parte dos veterinários ao longo do tratamento de esporotricose é um desafio e um esforço a longo prazo (Pereira et al., 2010; Gremião et al., 2015). As dificuldades para o acompanhamento dos animais vão desde o não retorno do paciente às consultas subsequentes até o não tratamento adequado por parte do proprietário. Muitos autores já relataram essa mesma dificuldade (Schubach et al., 2004; Barros et al., 2004; Chaves et al., 2013) não sendo um problema pontual, mas sim de modo geral o que reduz em muito o número de felinos com o acompanhamento adequado necessário.

Por outro lado, neste estudo, 34 gatos (19%) foram incluídos e acompanhados até o desfecho, ou seja, alta ou falência, e nos casos de alta ainda foram acompanhados por mais 24 semanas no intuito de detectar casos recidivantes. A maioria dos gatos inseridos neste estudo foram machos, com idade média de 2,9 anos, e de vida semi-livre. Esses resultados estão de acordo com outros estudos, nos quais demonstraram que machos jovens são os mais acometidos exatamente por estarem no início de seu período reprodutivo, tendo acesso livre às ruas, predispondo-os a brigas com outros machos (Schubach et al., 2004; Pereira et al., 2014).

No acompanhamento desses animais foram observadas, na primeira consulta, predomínio de lesões em mais de um sítio anatômico, principalmente nos membros anteriores, região cefálica, dorso e região nasal. Esse perfil clínico foi semelhante ao

descrito por outros autores, principalmente, nos gatos que tem sido estudados durante a epidemia do Rio de Janeiro (Schubach et al., 2004; Pereira et al., 2014) e gatos da região do sul do Brasil (Rodrigues et al., 2013).

Gatos com esporotricose podem ter uma apresentação clínica variável, desde lesão única a lesões múltiplas, com ou sem sinais extracutâneos (Schubach et al., 2004). No presente estudo também foi observada esta variação clínica, com um predomínio de lesões múltiplas, embora a maioria dos gatos estivesse em bom estado geral, o que também foi observado por Pereira e colaboradores (2010). Sinais respiratórios como espirros e dispnéia pelo acometimento da mucosa nasal, se destacaram em gatos do grupo L3 nessa coorte. Adicionalmente, na maioria dos gatos nos quais o desfecho foi a falência do tratamento havia o acometimento da mucosa nasal. Esses resultados sugerem que lesões na mucosa nasal causadas por *S. brasiliensis* são de cura mais difícil do que as localizadas em outros sítios anatômicos, corroborando outros autores (Gremião et al., 2009; Pereira et al., 2010; Gremião et al., 2015). Gremião e colaboradores (2015) relatam que a severidade da reação inflamatória, as altas cargas fúngicas e extensão das lesões para mucosa, cartilagem e osso do nariz de gatos associadas à infecção por *Sporothrix* spp. podem ser a causa da dificuldade de cicatrização das lesões nesse sítio anatômico. No entanto, nota-se que o tratamento regular com o itraconazol na dose pré estabelecida utilizada pode ter uma boa efetividade contra o *S. brasiliensis* em gatos, mesmo em lesões de difícil cicatrização, pois de um total de 22 gatos com lesões em mucosa nesse estudo, 16 apresentaram cura clínica.

O percentual de cura clínica nos gatos com esporotricose tratados com o itraconazol no presente estudo foi elevado. A efetividade do itraconazol tem sido demonstrada por diversos autores (Schubach et al., 2004; Pereira et al., 2010) e por esse

motivo, atualmente, é o tratamento mais utilizado na esporotricose felina (Pereira et al., 2014; Gremião et al., 2015). Em nosso estudo obtivemos uma mediana de tempo de tratamento para alcançar a cura clínica menor do que Schubach e colaboradores (2004), que foi de 36 semanas usando diferentes esquemas terapêuticos, e similar à relatada por Pereira e colaboradores (2010), em gatos tratados com itraconazol.

No momento da primeira consulta não foi encontrada associação entre o estado geral do animal, distribuição das lesões e o desfecho do tratamento. No entanto, no momento da terceira consulta foi encontrada uma associação positiva entre o bom estado clínico geral dos animais e o menor número de lesões com o desfecho de alta. Pereira e colaboradores (2010) também não encontraram associação entre a distribuição das lesões observadas em gatos antes do tratamento com itraconazol com o desfecho desse tratamento. Entretanto, estudos sobre a evolução clínica e sua associação com o desfecho do tratamento na esporotricose felina ainda não haviam sido relatados. Nossos resultados demonstram que o estado geral bom ($p=0,031$) e lesões do tipo L1/L2 ($p=0,042$) em gatos com esporotricose após 5 a 11 semanas de tratamento com itraconazol indicam uma boa resposta ao fármaco e são fatores preditivos para o desfecho de alta. É muito provável, que diversos fatores estejam relacionados com a resposta ao tratamento da esporotricose felina com o itraconazol, tais como o estado imunológico do animal, carga fúngica e a virulência do agente causal, os quais precisam ser avaliados em estudos futuros.

Avaliando a gravidade de formas clínicas na esporotricose, cinco gatos, nesse estudo, atingiram a cura clínica, porém tiveram recidiva da doença (isolados 9102; 9142; 10769; 10954; 10955). *Sporothrix* spp. é capaz de permanecer em uma lesão aparentemente cicatrizada e reativá-la meses depois (Mac Donald, 1980). Na opinião de Pereira e colaboradores (2014), as recidivas ocorrem, provavelmente, devido a

irregularidade no acompanhamento ao tratamento clínico e ao abandono pelo proprietário do gato, ao perceber melhora nas lesões cutâneas. A mesma opinião é compartilhada por Chaves e colaboradores (2013), que relatam ser a melhora clínica o principal fator de abandono e não os efeitos adversos dos fármacos. Em nosso estudo foi possível observar a reativação de lesões cicatrizadas após 3 a 6 meses de cura clínica, apesar do tratamento regular com acompanhamento veterinário e cooperação do proprietário. Esses resultados levantam as hipóteses de uma não eliminação total desse fungo nas lesões, uma vez que o itraconazol é primariamente fungistático, sendo fungicida em altas doses (Catalán & Montejo, 2006; Greene, 2012), além da capacidade desse fungo de vencer as barreiras imunológicas do hospedeiro, mesmo em uma carga fúngica reduzida após tratamento.

Em relação à identificação dos isolados provenientes dos gatos avaliados nesse estudo a maioria apresentou as características descritas por Marimon e colaboradores (2007) compatíveis com a espécie *S. brasiliensis*. A identificação das espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix*, segundo a chave taxonômica proposta pelos mesmos autores, utiliza diversas provas fenotípicas, incluindo análises morfológicas e bioquímicas.

Dúvidas na identificação, utilizando a chave taxonômica existem, devido a diferenças morfológicas sutis entre as espécies desse complexo, assim como a possibilidade de perda da capacidade de produção de alguma estrutura morfológica e de alteração devido a fatores externos ou repetidas passagens *in vitro* (Criseo et al., 2008a; Criseo et al., 2008b). Além disso, podem ocorrer divergências nos resultados dos testes de assimilação de carboidratos (Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). Nesse estudo observamos que alguns isolados assimilaram a sacarose, o que não estaria de acordo com a descrição do perfil de assimilação para a espécie *S. brasiliensis* na chave

de características fenotípicas proposta por Marimon e colaboradores (2007). Resultados semelhantes foram obtidos na avaliação de Oliveira e colaboradores (2011), sendo necessária a identificação molecular utilizando a técnica da PCR e o sequenciamento. Sendo assim, uma análise multifatorial, como a taxonomia polifásica, é indispensável para a identificação do complexo (Cruz, 2013).

Os dados obtidos nesse estudo com relação à identificação dos isolados utilizando parâmetros morfológicos e fisiológicos demonstraram que a mesma deve ser realizada com cautela, pois é dependente de prática, porém é funcional permitindo definir, na maioria dos casos, a espécie. Por outro lado, a ferramenta molecular resolveu as questões inconclusivas nesse estudo, uma vez que utilizamos a PCR *fingerprinting* do T3B, conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2012). Porém, nem todos os laboratórios, atualmente, têm condições de utilizar ferramentas moleculares e fisiológicas, para a identificação de fungos, excetuando-se os de pesquisa, e, portanto ainda utilizam a clássica identificação morfológica, sendo liberada a identificação dos isolados apenas como *S. schenckii*. Em nosso estudo aplicamos como ferramenta molecular de identificação das espécies do complexo *Sporothrix* spp., não o sequenciamento parcial de genes constitutivos, mas uma PCR *fingerprinting* de baixo custo e fácil execução (Oliveira et al., 2012).

Identificamos a espécie, *S. brasiliensis*, como o agente causal da esporotricose nos gatos incluídos nesse estudo, e nos chamou a atenção os perfis de virulência dentre os isolados, visto que os animais apresentaram diferentes padrões de manifestações clínicas evoluindo para desfechos diversos. O que nos faz supor, mesmo sendo a espécie, *S. brasiliensis*, a descrita como a mais virulenta do complexo (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009), que exista diferenças intrínsecas nessa espécie com relação aos graus de virulência. Os resultados do presente estudo corroboram com os de Rodrigues

e colaboradores (2013), que também somente encontraram a espécie *S. brasiliensis* em gatos do estado do Rio de Janeiro, provenientes da mesma região endêmica do presente estudo.

Os fatores de virulência atribuídos ao *Sporothrix* spp. são a melanização dos isolados (Romero-Martinez et al., 2000, Madrid et al., 2010; Almeida-Paes et al., 2012), termotolerância (Kwon-Chung, 1979; Travassos, 1985), composição da parede celular (Fernandes et al., 1999), capacidade de aderir e ser internalizado por células endoteliais durante a infecção *in vitro* (Figueiredo et al., 2004), além da expressão da proteína gp70 (Castro et al., 2013).

Observamos que os isolados por nós identificados apresentavam quantidades diferentes de conídios sésseis melanizados, o que nos levou a tentar correlacionar a evolução clínica dos gatos com a pigmentação/número dos conídios para poder inferir aos isolados graus diferentes de virulência. Não encontramos uma correlação direta entre a melanização e a virulência. Entretanto, ainda existe certa confusão no que diz respeito ao que é virulência. Isso por que o termo “virulência” tem sido usado, frequentemente, para determinar propriedades do microorganismo, mesmo que estas sejam expressas somente em hospedeiros susceptíveis (Casadevall & Pirofski, 2001).

Os isolados de fenótipo *Sporothrix* spp. (8996; 9054; 11345) estiveram relacionados a um estado geral bom e ao desfecho de cura nos gatos avaliados nesse estudo, nos levando a pensar serem isolados menos virulentos, o que poderia estar relacionado a outra espécie do complexo, mesmo apresentando variação na quantidade de conídios pigmentados. Porém, o resultado da análise genotípica mostrou compatibilidade com a espécie *S. brasiliensis* nos três casos. Os isolados identificados em nível de espécie pela metodologia do T3B PCR *fingerprinting* como *S. brasiliensis*, apresentaram perfil de bandas idêntico a cepa tipo de *S. brasiliensis* IPEC 16490

(CBS120339) demonstrando ausência de variação intraespecífica entre os isolados estudados.

A classificação de um microorganismo em patogênico ou não patogênico relacionado à sua virulência é difícil de aplicar, uma vez que fatores do hospedeiro são determinantes no resultado da interação com o parasito. Assim, virulência é um fenômeno complexo, dinâmico e mutável que inclui fatores do hospedeiro e do microrganismo (Casadevall & Pirofski, 2001). O dano ao hospedeiro pode resultar do processo imune, microbiológico ou ambos, e alterações na homeostasia provocam a doença (Casadevall & Pirofski, 1999; 2001). Assim sendo, semelhante ao que foi relatado por Brito e colaboradores (2007), concluímos que a capacidade dos isolados de *S. brasiliensis*, estudados por nós, em produzir distintos quadros clínicos é o resultado das diferentes interações entre as células do hospedeiro e do fungo.

As principais alterações histológicas observadas na coorte de gatos aqui estudados foram granuloma do tipo piogranulomatoso, mal organizado, granuloma típico com leveduras brotantes tanto arredondada como em charuto, na primeira biópsia. Já na segunda biópsia esse quadro apresentou pequenas mudanças, em relação ao granuloma e as células fúngicas encontradas. Autores têm descrito que as principais lesões de esporotricose são do tipo granulomatosa (Dustan et al, 1986b; Miranda et al, 2013), o que estão de acordo com os achados de nosso estudo.

A presença de granulomas mal formados está associada à maior número de lesões cutâneas (Miranda, 2013). Em nosso estudo o infiltrado piogranulomatoso e os granulomas mal organizados e do tipo fúngico foram associados a maior carga fúngica e a maior número de lesões na primeira biópsia confirmando os achados de Miranda e colaboradores (2013). Granulomas bem organizados são vistos com maior frequência em esporotricose humana e canina (Miranda et al., 2009; Quintela et al., 2012). Nossos

achados demonstram pequeno número deste granuloma tanto na primeira quanto na segunda biopsia. Uma baixa frequência de granulomas bem organizados nas esporotricose felina foi também relatado por Miranda e colaboradores (2013) e Gremião e colaboradores (2015), que observaram esse granuloma em 10,7% e 5,9% dos gatos não tratados, respectivamente. Este tipo de granuloma, quando encontrado no presente estudo, esteve associado à baixa carga fúngica, corroborando com os achados de Miranda e colaboradores (2013) em gatos com esporotricose da mesma região endêmica. Nossos resultados corroboram com os de Miranda e colaboradores (2013), sugerindo que gatos, os quais conseguem desenvolver uma boa resposta imunológica, com formações de granulomas bem organizados, respondem melhor ao tratamento, com diminuição da carga fúngica.

Os granulomas do tipo fúngico foram um achado frequente encontrado por Miranda e colaboradores (2013) na esporotricose felina, tendo sido observado em 41,7% dos casos. No presente estudo, obtivemos uma frequência semelhante deste tipo de granuloma na primeira biopsia (38,2%), mas não observamos associação com desfecho do tratamento. Houve desfecho para cura clínica na maioria dos gatos com granuloma fúngico, embora um alto percentual (38%) tenha evoluído para falência. Esse percentual foi bem superior ao percentual de falência (14%) observado em gatos sem granuloma fúngico. Miranda e colaboradores (2013) observaram uma frequência significativamente maior desses granulomas em gatos com L3 e em má condição corporal. Os resultados do presente estudo corroboram com os dados de Miranda e colaboradores (2013) os quais sugerem que o granuloma fúngico seja indicativo de uma má resposta imunológica do gato à infecção e de uma chance menor de cura clínica com o tratamento. Porém, estudos com maior número de gatos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

As células inflamatórias presentes em maior número nos tecidos analisados dos gatos estudados foram os neutrófilos e macrófagos, havendo uma diminuição significativa de macrófagos da primeira para a segunda biopsia ($p=0,001$). Com relação aos neutrófilos, linfócitos e plasmócitos houve também uma redução, embora não significativa, da primeira para segunda biopsia. Durante o tratamento, houve redução no número dessas células, com exceção dos casos de falência. Além disso, os resultados do presente estudo demonstraram uma diminuição significativa da carga fúngica entre a primeira e segunda biopsia ($p<0,001$). Essa redução demonstra uma ação eficaz do itraconazol no período de 5 a 11 semanas após o início do tratamento, sugerindo resposta clínica satisfatória ao itraconazol. Essa redução na carga fúngica foi a provável causa da evolução da reação inflamatória piogranulomatosa para não granulomatosa da primeira para segunda biopsia. Na primeira biopsia, um maior número de neutrófilos ($p<0,001$), macrófagos ($p=0,002$) e linfócitos ($p=0,025$) esteve associado significativamente a uma menor carga fúngica, sugerindo uma ação eficaz dessas células na eliminação do fungo. Essa hipótese é reforçada pela diminuição das mesmas células inflamatórias, sobretudo de macrófagos, na segunda biopsia, acompanhando a redução na carga fúngica. Nos casos de falência o número de macrófagos, plasmócitos e linfócitos permaneceu semelhante da primeira para segunda biopsia, possivelmente por que estruturas fúngicas ainda estavam presentes apesar da grande redução de carga fúngica, diferentemente dos casos de cura, nos quais a mediana de carga fúngica foi zero.

Na esporotricose humana, a intensidade de neutrófilos está correlacionada a maior número de lesões e tratamentos mais prolongados (Morgado et al, 2011). Entretanto, nossos dados são compatíveis com os de Miranda e colaboradores (2013), onde foi encontrado em gatos com esporotricose sem tratamento antifúngico,

correlação negativa entre essas células e a carga fúngica. Esses resultados demonstram que, nos casos com intensidade marcante de neutrófilos, a carga fúngica esteve menor, o que pode ser justificado pela fagocitose e destruição dos fungos por estas células. Os resultados de Peng-Cheng e colaboradores (1993) reforçam essa hipótese, uma vez que esse autores demonstraram em camundongos infectados experimentalmente com *S. schenckii*, que os neutrófilos são células muito importantes na fagocitose e destruição desse fungo e conseqüentemente no processo de cicatrização. Mas em nosso estudo, na segunda biopsia, esta correlação se inverteu e cargas fúngicas maiores estiveram relacionadas com maior número de neutrófilos e também de macrófagos. Embora não tenha sido significativa a correlação de neutrófilos com o desfecho do tratamento, podemos notar um aumento dessas células no caso de falência, o que nos faz supor que nesse caso essas células não estariam sendo capazes de destruir o fungo. Diferentemente dos camundongos imunocompetentes, em camundongos atímicos e, portanto deficiente em linfócitos-T, o número de neutrófilos é persistente durante a infecção por *S. schenckii*, porém essas células são incapazes de fagocitar e destruir o fungo (Peng-Cheng et al., 1993). Portanto, uma resposta imune celular deficiente nos gatos nos quais ocorreu falência do tratamento, poderia explicar a persistência de neutrófilos e macrófagos incapazes de eliminar o fungo e, portanto, contribuindo para falência do tratamento.

Os mastócitos são células abundantes na pele normal de humanos e de animais domésticos como cães e gatos, sendo uma das primeiras células a entrar em contato com o patógeno invasor, além de em cães e gatos serem importantes no processo de cicatrização (Noli & Miolo, 2001). Romo-Lozano e colaboradores (2012) em estudo *in vivo* com camundongos infectados experimentalmente por *S. schenckii*, concluíram que os mastócitos são ativados por esse fungo, além de sugerirem que os mastócitos

facilitam a disseminação do *S. schenckii* e aumentam a gravidade das manifestações clínicas da esporotricose, possivelmente por causarem imunossupressão ou por incitar o progresso da doença. Observamos em nosso estudo que o número de mastócitos esteve abaixo do relatado por Foster (2008) para pele de gatos saudáveis, que é uma média de 12,5 por campo microscópico em aumento de 400x. Entretanto, não obtivemos correlação dessas células com as características clínicas, desfecho do tratamento, tempo de tratamento e de cicatrização das lesões em nossa análise. Apesar desse resultado, o baixo número de mastócitos encontrado e a sua redução na segunda biópsia, acompanhando a redução da carga fúngica, demonstram uma possível relação com a infecção, que precisa ser melhor investigada em trabalhos futuros.

Com relação a outras células inflamatórias, como células gigantes e eosinófilos, nosso estudo corrobora com o de Miranda (2013), demonstrando que essas células não são comuns na esporotricose felina por estarem presentes em poucos gatos e em intensidade baixa. Estes dados reportam diferenças para os casos humanos, nos quais consideram frequente o aparecimento dessas células (Quintella et al., 2012).

O predomínio da forma fúngica em charuto e de estruturas com brotamento nos casos de maior carga fúngica, tanto na primeira quanto na segunda biópsias, sugere que a forma de charuto esteja associada com a intensa multiplicação do fungo. Por outro lado, estruturas arredondadas e sem brotamento predominaram nos casos com baixa carga fúngica, nos levando a supor que houve uma diminuição da capacidade de multiplicação do fungo.

A diminuição significativa dos casos com predomínio de estruturas leveduriformes em forma de charuto ($p < 0,001$) e com brotamento ($p = 0,02$) da primeira para segunda biópsia sugerem uma ação efetiva do itraconazol, inibindo o crescimento fúngico.

Nos casos estudados foram encontradas estruturas leveduriformes semelhantes a hifas ou pseudo hifas em pequeno número, não conseguindo correlacionar com o desfecho do tratamento, provavelmente porque estas estruturas aparecem dependendo das condições que o organismo oferece, independente da virulência do agente. Gremião e colaboradores (2015) também encontraram hifas no tecido dos gatos avaliados, entretanto, um percentual maior dessas estruturas fúngicas foram observadas no grupo de gatos refratários ao tratamento (62,5%) comparando com o grupo sem tratamento (11,8%), mais uma vez demonstrando o importante papel do hospedeiro na evolução da doença.

O aumento significativo do número de casos de dermatofibrose na segunda biopsia esta relacionado ao processo de cicatrização da lesão, sendo encontrado esta condição em apenas um caso na primeira biopsia. Gremião e colaboradores (2015) também relataram dermatofibrose em gatos tratados e não tratados. Não podemos confirmar se o gato que apresentava processo cicatricial sem tratamento estava em processo de cura espontânea ou se o proprietário omitiu informação de tratamento prévio.

7. CONCLUSÕES

1. O bom estado geral dos gatos e lesões mais localizadas no período de 5 a 11 semanas após o início do tratamento com itraconazol sugere fatores preditivos de cura clínica.
2. A aplicação da chave de identificação apenas, não permite identificar em nível de espécie todos os isolados de *Sporothrix* spp. sendo necessário a utilização da taxonomia polifásica.
3. *Sporothrix brasiliensis* foi a espécie identificada em gatos com esporotricose no Rio de Janeiro.
4. As lesões cutâneas de esporotricose felina caracterizaram-se, principalmente, por processo piogranulomatoso, mal organizado com predomínio de macrófagos e neutrófilos em animais com e sem tratamento.
5. Granulomas bem organizados estiveram associados à menor carga fúngica e indicam uma resposta imunológica eficiente.
6. Animais que apresentaram granulomas bem organizados, do tipo típico, tiveram uma melhor resposta ao tratamento.
7. A diminuição significativa da carga fúngica, das leveduras em forma de charuto e em brotamento nas lesões cutâneas com 5 a 11 semanas de tratamento com itraconazol, indica que este fármaco é efetivo nas doses utilizadas.

8. Na avaliação da primeira biópsia, isto é, nos gatos com esporotricose sem tratamento, um maior número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos foi associado a uma menor carga fúngica.

9. Na avaliação da segunda biópsia, nos gatos com esporotricose tratados por 5 a 11 semanas, um aumento no número de neutrófilos nos casos de falência e a associação de neutrófilos e macrófagos com uma maior carga fúngica, sugerem uma incapacidade dessas células em destruir o fungo.

10. O aumento significativo na ocorrência de dermatofibrose e da reação do tipo não granulomatosa com 5 a 11 semanas de tratamento indicou a evolução das lesões cutâneas para processo cicatricial e a eficiente resposta ao itraconazol.

11. Diante das diferentes manifestações clínicas, alterações histológicas e resposta ao tratamento sugere-se a existência de isolados com perfis de virulência distintos. A melanização dos conídios, provavelmente, não esteve relacionada à maior virulência do *S. brasiliensis* em gatos no presente estudo.

12. Não houve correlação entre as alterações histológicas encontradas na primeira e segunda biópsias com desfecho do tratamento, tempo de cicatrização das lesões e tempo de tratamento.

8. PERSPECTIVAS

1. Identificação de *Sporothrix* spp. por meio de técnica molecular, extraindo DNA fúngico a partir de amostras de tecido emblocadas em parafina;
2. Identificação fenotípica dos isolados de gatos que foram submetidos a apenas uma biopsia;
3. Contagem das células inflamatórias e carga fúngica dos gatos que tiveram a lesão de coleta cicatrizada antes do período pré-determinado para a 2ª biopsia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Lightman AH, Pober, J.R. *Imunologia Básica* 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.50p.

Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanchez J et al. *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases: an algorithmic method based on pattern analysis*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997.

Almeida-Paes R, Frases S, Araújo GS *et al*. Biosynthesis and Functions of a Melanoid Pigment Produced by Species of the *Sporothrix* Complex in the Presence of L-Tyrosine Applied and Environmental. *Microbiol*. 2012; 78(24): 8623–8630.

Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS *et al*. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8:1-8.

Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo F *et al*. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15(7): 651-655.

Barros MB, Schubach TM, Gutierrez Galhardo MC, *et al*. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001; 96(6): 777-779.

Barros MB, Schubach AO, Valle AC, *et al*. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(4): 529-535.

Barros MBL, Schubach AO, Schubach TMP *et al*. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*. 2008; 136(9): 1192-1196.

Barros MBL, Schubach TP, Coll JO *et al*. Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica*. 2010; 27(6): 455-60.

Barros MBL, Almeida-Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(4): 633-654.

Bickley LK, Berman IJ, Hood AF. Fixed cutaneous sporotrichosis:unusual histopathology following intralesional corticosteroid administration. *J Am Acad Dermatol*. 1985; 12(6): 1007-1012.

Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas-Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART; 1976.

Blanco JL, Garcia ME. Immune Response to Fungal Infections. VETIMM. 2008; 7787: 1-24.

Brasil. Secretaria de Estado de Saúde. Relação de doenças e agravos de notificação compulsória no âmbito do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. [Acesso em 08 jan. 2015]. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4364979/4115670/ResolucaoSESN674DE12.07.2013.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014. [Acesso em 25 jan. 2015]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.html

Brito MMS, Conceição-Silva F, Morgado FN *et al.* Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. Med Mycol. 2007; 45: 721-729.

Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect Immun. 1999; 67(8): 3703-3713.

Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. J Infect Dis. 2001; 1(184): 337-344.

Castro RA, Kubitschek-Barreira PH, Teixeira PAC *et al.* Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolate. PLOS One. 2013; 8: 1-17

Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Praceres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . Scand J Immunol 2003; 57: 214-220.

Carlos IZ, Sassá MF, da Graça Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. Mycopathol. 2009; 168(1): 1-10.

Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 39-49.

Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC *et al.* **Global epidemiology of sporotrichosis.** Med Mycol. 2015; 53(1): 3-14.

Chaves AR, Campos MP, Barros MBL *et al.* Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. Zoonoses and Public Health. 2013; 60: 149-153.

Clinkenbeard KD. Diagnostic Cytology: Sporotrichosis. The Compendium. 1991; 13(2): 207-211.

Costa IC, Felipe I, Gaziri LCJ. Immune Response to *Candida Albicans*. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina. 2008; 29(1): 27-40.

Criseo G, Zungriand D, Romeo O. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. J Clin Microbiol. 2008a; 46: 3870–3871.

Criseo G, Malara G, Romeo O, Puglisi Guerra A. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. Mycopathologia. 2008b; 166: 159–162.

Cruz LCH, Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. Vet. e Zootec. 2013; 20 (Edição Comemorativa): 08-28.

Cruz Choappa RM, Vieille Oyarzo PI, Carvajal Silva LC. Isolation of *Sporothrix pallida* complex in clinical and environmental samples from Chile. Rev Argent Microbiol. 2014; 46 (4): 311-314.

Davies C & Troy GC. Deep mycotic infections in cats. J Am Anim Hosp Assoc. 1996; 32(5): 380-391.

Dias NM, Oliveira MM, Portela MA *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. Emerg Infect Dis. 2011; 17(10): 1975-1976.

Donadel KW, Reinoso YD, Oliveira JC, Azulay RD. Esporotricose: revisão. An Bras Dermatol. 1993; 68(1): 45-52.

Dunstan RW, Langham RF, Reimann KA, Wakenell PS. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. J Am Acad Dermatol. 1986a; 15(1): 37-45.

Dunstan RW, Reimann KA, Langham RF. Feline sporotrichosis. J Am Vet Med Assoc 1986b; 189(8): 880-883.

Fernandes KSS, Mathews HI, Bezerra LML. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. J. Med Microbiol. 1999; 48: 195-203.

Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, *et al.* Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. Vet Microbiol. 2011; 147: 445-449.

Figueiredo CC, Lima OC, Carvalho L, *et al.* The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Micro Pathol.* 2004; 36: 177-188.

Foster AP. A study of the number and distribution of cutaneous mast cells in cats with disease not affecting the skin. *Vet Dermatol.* 2008; 5(1): 17-20.

Freitas D, Migliano M e Zani Neto. Esporotricose - Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F catus*). *Rev Méd Vet de São Paulo.* 1956; 5: 601-604.

Freitas D, Moreno G, Saliba A *et al.* Esporotricose em cães e gatos. *Rev Fac Med Vet Univ São Paulo.* 1965; 7: 381-387.

Freitas DF, Valle AC, Almeida- Paes R *et al.* Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Inf Dis.* 2010; 50: 453.

Greene CE. Antifungal chemotherapy. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 3 rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 542-50.

Gremião IDF, Pereira AS, Nascimento Junior A *et al.* Procedimento operacional padrão para o manejo de gatos com suspeita de esporotricose. *Clin vet.* 2006; (65): 69-70.

Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA *et al.* Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *J Fel Med Surg.* 2009; 11: 720-723.

Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA *et al.* Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J.* 2011; 89(9): 346-351.

Gremião ID, Menezes RC Schubach TM. *Feline Sporotrichosis: Epidemiological and Clinical Aspects.* *Med Mycol.* 2015; 53(1): 15-21.

Heit MC & Riviere J. Antifungal and antiviral drugs. *Vet Pharmacol and Therapeutics.* 7th edn. Ed R. Adams. Iowa State University Press. 1995. p 855-885.

Hektoen L & Perkins CF. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*, a new pathogenic fungus. *J Experiment Med.* 1900; 5: 77-89.

Honse CO, Rodrigues AM, Gremião ID, Pereira SA, Schubach TM. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. *Vet Rec.* 2010; 166 (7): 208-9.

Hu S, Chung WH, Hung SI *et al.* Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a Nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003; 44: 1414-1418.

Ishizaki H, Kawasaki M. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathol.*1998; 142(3): 115-118.

Kanbe T, Natsume L, Goto I *et al.* Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. *J Dermatol Sci.* 2005; 38: 99-106.

Kano R, Watanabe K, Murakami M *et al.* Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. *Vet Rec.* 2005; 156 (15): 484-485.

Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Guidelines for the management of sporotrichosis. *CID.* 2007; 45.

Kwon-Chung KJ. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *J Infect Dis.* 1979; 139(4): 424-431.

Kwon-Chung KJ & Bennett JE. Sporotrichosis In: *Medical Mycology.* Philadelphia: Lea & Febiger. 1992; p 707-729.

Latgé JP. The fungal wall is a living organelle. Abstract book – First International Meeting on *Sporothrix* and sporotrichosis. Rio de Janeiro; 2013. p.19

Larsson CE, Gonçalves MA, Araújo VC, *et al.* Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1989; 31(5) :351-358.

Lavalle P & Mariat F. Sporotrichosis. *Bulletin de L'Institut Pasteur.* 1983; 81(4): 295-322.

Leme LR, Schubach TM, Santos IB *et al.* Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. *Mycoses* 2007; 50(3): 210-214.

Liu TT, Zhang K, Zhou X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2014; 15(1): 100-108.

Lloret A, Hartmann K, Maria Grazia Pennisi MG. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J of Fel Med and Surg.* 2013; 15: 619-623.

Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Acad Bras Cienc.* 2006; 78(2): 293-308.

Lopes-Bezerra, LM. *Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans front. *Microbiol.* 2011; 2: 243.

Lopes JO, Alves SH, Benevenga JP *et al.* Filamentous forms of *Sporothrix schenckii* in material from human lesions. *J Med Vet Mycol.*1992; 30: 403-406.

- Lurie HI. Sporotrichosis. In: The pathogenic anatomy of mycoses. Berlin: Springer; 1971, p.614-675.
- Lutz A & Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. Rev Med S Paulo 1907; 21: 433-450.
- Mariat F & Lavalley P. La sporotrichose. Encyclopédie Médico-chirurgicale.1972; 10: 1-6.
- Mac Donald E.; Ewert A.; Reitmeyer J.C. Reappearance of *Sporothrix schenckii* lesions after administration of Solu-Medrol R to infected cats. Sabouraudia.1980; 18(4): 295-300.
- Malik R, Vogelnest L, O'Brien CR *et al.* Infections and some others conditions affecting the skin and subcutis of the naso ocular region of cats – Clinical experience (1987-2003). J Fel Med Surg.2004; 6(6): 383-390.
- Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS *et al.* Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. Microbes and Infection. 2010; 12: 162-165.
- Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG *et al.* Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. Mycopathologia. 2012; 173 (4): 265-273.
- Marimon R, Gene J, Cano J *et al.* Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol. 2006; 44 (9): 3251-3256.
- Marimon R, Cano J, Gené J *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2007; 45: 3198-3206.
- Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: um fungo raro de origem clínica. Med Mycol. 2008; 46 (6): 621-625.
- Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MDR, Pérez-Mejía A *et al.* Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. J Clin Microbiol. 2002; 40(8): 3004-3011.
- de Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC *et al.* Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. Mycol. 2008; 100(4): 647-661.
- Miranda LHM, Quintela LP, Santos IP *et al.* Histopathology of canine sporotrichosis: a study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). Mycopathol. 2009; 168: 79-87.

Miranda LHM, Quintela LP, Santos IB *et al.* Comparative Histopathological study of sporotrichosis and american tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro. *J Comp Path.* 2010; 143: 1-7.

Miranda LHM, Conceição-Silva F, Quintela LP *et al.* Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comparative Immunol, Microbiol and Inf Dis.* 2013; 1-8.

Miranda LHM. Avaliação da resposta inflamatória in vivo e in vitro na esporotricose felina em diferentes apresentações clínicas. (Doutorado). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG *et al.* Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res.* 2014; 10: 269.

Mora-Montes HM, Lopes Bezerra LM, Teixeira MM *et al.* Protein glycosylation pathways in *Sporothrix schenckii*. Abstract book – First International Meeting on Sporothrix and sporotrichosis. Rio de Janeiro; 2013. p.24

Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Conceição-Silva F. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. *Med Mycol.* 2011; 49(6): 612–620.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol.* 2002; 27(6): 427-431.

Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Ray RJ, Nosanchuk JD, Casadevall A and Hamilton AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2003; 71: 4026-4033.

Morrison AS, Lockhart SR, Bromley JG *et al.* An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. *Med Mycol Case Rep.* 2013; 2: 88–90.

Neufeld PM. Manual de Micologia Médica – Técnicas básicas de diagnóstico. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade. 1999. 240p.

Nicot J & Mariat F. Caractères morphologiques et position systématique de *Sporothrix schenckii*, agent de la sporotrichose humaine. *Mycopathologia et Mycologia Applicata.* 1973; 49: 53-65.

Noli C & Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol.* 2001; 12(6): 303-313.

Oliveira Nobre M, Nascente OS, Meireles MC, Ferreiro L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural.* 2002; 32(1): 175-184.

Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM *et al.* Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathol.* 2011; 172: 257-267.

Oliveira MME, Sampaio P, Almeida-Paes R *et al.* Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(6): 2159-62.

Oliveira MME. Análise Filogenética e implementação de ferramentas moleculares na identificação de isolados do complexo *Sporothrix* spp. (Doutorado). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC *et al.* Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoame de Micol.* 2014; 31(1): 2-6.

Oliveira MME, Santos C, Sampaio P *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res in Microbiol.* 2015 in press.

Peng-Cheng L, Yoshiike T, Yaguchi H, Ogawa H. Histopathological studies of *Sporothrix schenckii*- inoculated mice – Possible functions of polymorphonuclear leukocytes in normal and immunocompromised (congenitally athymic nude) mice. *Mycopathol.* 1993; 122: 89-93.

Pereira SA, Silva DT, Schubach TMP, Passos SRL. Manual de Procedimentos “Ensaio clínico controlado e randomizado, utilizando diferentes doses de cetoconazol e itraconazol para o tratamento de gatos com esporotricose assistidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/FIOCRUZ. 2007.

Pereira SA, Schubach TMP, Gremião IDF *et al.* Aspectos terapêuticos na esporotricose felina. *Acta Scientae Veterinariae.* 2009; 37(4): 311-321.

Pereira SA, Passos SRL, Silva JN *et al.* Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Rec.* 2010; 166: 290-294.

Pereira SA, Menezes RC, Gremião ID *et al.* Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Fel Med Surg.* 2011; 13: 220-223.

Pereira AV, Daiha MC, Pereira SA *et al.* Cryosurgery in a cat with localized sporotrichosis refractory to oral itraconazole. 1st International Meeting on *Sporothrix* and Sporotrichosis. 2013; 80.

Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB *et al.* The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev da Soc Bra de Med Trop* . 2014; 47(3): 392-393.

Previato LM, Medeiros AD, Previato JO. Unique glycolipids from the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. In: Abstract book – First International Meeting on Sporothrix and sporotrichosis. Rio de Janeiro; 2013. p.22.

Quintella LP, Passos SR, do Vale AC *et al.* Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J of Cut Pathol*. 2011; 38(1): 25-32.

Quintella LP, Passos SR, de Miranda LH *et al.* Proposal of a histopathological predictive rule of the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol*. 2012; 167(4): 837-846.

Raskin RE. Skin and subcutaneous tissues. In: Raskin RE, Meyer DJ. Atlas of canine and feline cytology. United States:W.B.Saunders Company; 2001. p.35-57.

Reis RS, Almeida Paes R, Muniz Mde M *et al.* Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(5): 769-774.

Reis EG, Gremião IDF, Kitada AAB *et al.* Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2012: 1-6.

Rezende JM. Epidemia, Endemia, Pandemia. *Epidemiologia Linguagem Médica*. 1998; (1): 153-155.

Riddell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950; 42: 265-270.

Rippon J. Sporotrichosis. In: Rippon JW. Medical Mycology - The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. Philadelphia: W.B.Saunders; 1988. p. 325-352.

Rodrigues AM. Anfotericina B subcutânea associada ao itraconazol no tratamento da esporotricose em gatos domésticos (Mestrado). Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.

Rodrigues AM, Teixeira MM, Hoog GS. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLOS Neglected Trop Dis*. 2013; 6(7): 1-14.

Rodrigues AM, de Hoog GS, de Cassia Pires D et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 219.

Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A *et al.* Biosynthesis and function of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000; 68: 3696-3703.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Reviews.* 2011; 4 (11): 275-288.

Romo-Lozano Y, Hernández-Hernández F, & Salinas E. Mast Cell Activation by Conidia of *Sporothrix schenckii*: Role in the Severity of Infection. *Scandinavian J of Immunol.* 2012; 76: 11–20.

Rosser EJ, Dunstan RW. Sporotrichosis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat.* 3rd edn. Philadelphia:Saunders Elsevier; 2006. p.608-612.

Schenck BR. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. *Johns Hopkins Hosp Bulletin.* 1898; 93: 285-299.

Schubach T, Melo M, Valle A, *et al.* Clinical evolution of feline and canine sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Braz J Vet Science* 2000;7 Supl:38.

Schubach TM & Schubach A. Esporotricose em gatos e cães – revisão. *Cli Vet.* 2000; 29: 21-24.

Schubach TM, Valle AC, Gutierrez Galhardo MC *et al.* Isolation of *sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol.* 2001; 39 (1): 147-149.

Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS *et al.* *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with or without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathol.* 2002; 153 (2): 83-86.

Schubach TMP, Okamoto T, Schubach A *et al.* Apresentação clínica da esporotricose em gatos. *Rev da Soc Bras de Med Trop.* 2003; 36 (Suppl I):218.

Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, *et al.* Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 224(10): 1623-1629.

Schubach TM. Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da esporotricose felina na região metropolitana do Rio de Janeiro [Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2004.

Schubach TMP; Schubach AO; Okamoto T et al. *Sporothrix schenckii* isolation from blood clot of naturally infected cats. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2004b; 41(6): 404-408.

Schubach A, Schubach TMP, Barros MBL, Wanke B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. Emerg Infect Dis. 2005; 11(12): 1952-1954.

Schubach TMP, Schubach A, Okamoto T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). Med Mycol. 2006; 44: 87-92.

Schubach TP, Menezes RC, Wanke B. Sporotrichosis. In: Greene CE. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed. USA: Saunders, 2012. p. 645-650.

Sykes et al., 2001; Sykes JE, Torres SM, Armstrong PJ, Lindeman CJ. Itraconazole for treatment of sporotrichosis in a dog residing on a Christmas tree farm. J Am Vet Med Assoc. 2001; 218(9): 1440-1443.

Silva MBT, Costa MMM, Torres CCS. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. Cad. Saúde Pública. 2012; 28(10): 1867-1880.

Singer J, Muncie J. Sporotrichosis: Etiological considerations and report of additional cases from New York. N Y State J Med. 1952; 52: 2147-2153.

Thibaut M. Etude morphologique de La phase mycélienne Du sporotrichum schenckii. Annales de Parasitologie. 1970; 45(4): 509-516.

Tizzard IR. Imunologia Veterinária uma introdução. 8ª ed. Elsevier; 2009.

Travassos, L. R. . *Sporothrix schenckii*. In: P J Szaniszlo, Editor. (Org.). Fungal dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans. New York: plenum press, 1985. p. 121-156.

Welsh RD. Sporotrichosis. J Am Vet Med Assoc. 2003; 223(8): 1123-1126.

Werner AH, Werner BE. Sporotrichosis in man and animal. Int J Dermatol. 1994; 33(10): 692-700.

Yasuda MAS, Magri MM, Kono AS. Imunologia das Micoses. In: Roberto Foccatia. Veronesi: Tratado de Infectologia. 3ªed. São Paulo:Atheneu; 2005. p.1315-1342.

Yu X, Wan Z, Zhang Z et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. Mycopathol. 2013; 176: 67-74.

Zancopé-Oliveira RM, Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, Gutierrez-Galhardo MC. New diagnostic applications in sporotrichosis. In: Skin biopsy perspectives. Rijeka: InTech Europe. 2011; 53-72.

Zhang Z, Liu X, Yang G *et al.* Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. Mycoses. 2006; 49 (4): 305-310.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA CLÍNICA–INI/

FIOCRUZ

Coordenadora da Pesquisa: Elaine Waite de Souza

Endereço: Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ – CEP 21045-900

Telefone (0XX21) 3865-9536

Nome do Projeto: ESPOROTRICOSE FELINA: RESPOSTA AO TRATAMENTO, ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CUTÂNEAS E IDENTIFICAÇÃO DE *Sporothrix* spp NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - BRASIL

Nome do paciente:_____ **Prontuário:**_____

Nome do responsável:_____

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica que será realizada no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO)-INI / FIOCRUZ, com o seguinte objetivo:

- Avaliar a evolução clínica e as alterações histopatológicas das lesões de esporotricose ao longo do período de tratamento em gatos naturalmente infectados e o perfil molecular dos isolados de *Sporothrix* spp desses animais e verificar a associação desses fatores com o desfecho do tratamento.

O presente documento tem o objetivo de esclarecê-lo sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, explicando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A participação de seu gato neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a permitir a participação dele no estudo ou retirá-lo a qualquer instante, bem como está garantido o atendimento de rotina no LAPCLIN-DERMZOO. O médico veterinário também poderá interromper a participação do seu gato a qualquer momento se julgar necessário.

Para que seu gato participe desse projeto, você deverá autorizar a realização de exames e posterior acompanhamento da doença. Serão realizadas fotografias em todas as consultas para o acompanhamento do tratamento. Os exames, procedimentos e medicações contra o fungo serão oferecidos de forma gratuita pela Instituição.

Os resultados desse estudo poderão ou não beneficiar diretamente a você e o seu animal, mas no futuro poderão beneficiar outros animais e pessoas com a mesma doença.

Os resultados dessa pesquisa serão publicados, preservando o anonimato e em caso de necessidade, as informações médicas estarão disponíveis para toda a equipe médica veterinária envolvida, para a Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, para autoridades sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que achar necessário à equipe de médicos veterinários antes de concordar que seu gato participe deste estudo, assim como durante o tratamento.

Procedimentos, exames e testes que poderão ser utilizados:

Antes do início do tratamento será realizado exame clínico geral e exame dermatológico. Seu animal será sedado na primeira consulta e em três consultas subsequentes para coleta de material biológico e acompanhamento do tratamento.

Após o início do tratamento, o animal deverá ser trazido ao LAPCLIN-DERMZOO uma vez ao mês para revisões da evolução clínica. O material biológico só será coletado novamente após 8 e 24 semanas do início do tratamento. Em caso de cura, o gato deverá ser trazido para as revisões agendadas para reavaliação clínica.

Todos os animais poderão ser acompanhados no LAPCLIN-DERMZOO após o término do estudo caso necessário.

Inconvenientes e riscos principais conhecidos atualmente:

Todo procedimento anestésico, como é o caso da sedação a ser realizada, pode acarretar risco de morte para qualquer animal. Muito raramente ocorrem reações indesejáveis, entretanto todas as etapas desse procedimento serão monitoradas adequadamente por equipe médica veterinária.

Na coleta de sangue poderá ocorrer, em alguns casos, a formação de uma área arroxeadada no local, que retornará ao normal em alguns dias.

No caso da biópsia, poderá ocorrer inflamação e infecção por bactérias. Caso isso ocorra, serão receitados os medicamentos apropriados.

A medicação via oral para combater o fungo, pode em alguns casos, ocasionar efeitos indesejáveis como: falta de apetite, vômito, diarreia e apatia (“tristeza”). Caso isso ocorra com seu animal, você deve entrar em contato com a equipe de médicos veterinários do LAPCLIN-DERMZOO.

Benefícios esperados:

Embora se espere, não podemos afirmar que, ao final do tratamento, o seu gato esteja curado da esporotricose. Também é esperado que ao final do estudo exista uma grande quantidade de informações capazes de contribuir para o tratamento de outros animais, colaborando para o controle da doença.

Declaro que li e entendi todas as informações relacionadas ao estudo em questão e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica veterinária, a qual estará a disposição sempre que eu tiver dúvidas a respeito dessa pesquisa.

Recebi uma cópia deste termo e pelo presente consinto voluntariamente a participação do meu gato neste estudo.

Nome responsável pelo gato _____ Data _____

Nome médico veterinário _____ Data _____

Nome testemunha _____ Data _____

APÊNDICE B - Procedência das principais substâncias químicas e meios de cultura utilizados

- Acetato de sódio - Sigma Chemical Co, USA
- Acido acético glacial – Proquímicos, BR
- Agarose - Sigma
- Batata dextrose Agar – Difco Becton Dickinson, Microbiology Systems, USA
- *Brain Heart Infusion* – Difco
- Cloridrato de ketamina 10% – Syntec, BR
- *Corn Meal* – Difco
- EDTA - Sigma
- Etanol – Merck, E. Merck, DE
- Extrato de malte agar – Difco
- Formol - Merck
- Glicose Anidra (Glicose) - Difco
- Hematoxilina-eosina – Sigma
- Itraconazol 100mg- Prati, BR
- Lactofenol de Amann com azul de algodão - Merck

- Lidocaína 1%- Hipolabor, BR
- Maleato de acepromazina 1% - Syntec, BR
- Mycosel – Difco
- *Phosphate buffered saline* - Difco
- Rafinose – Difco
- Ribitol (aldonol) - Difco
- Sacarose – Difco
- Tris base – Invitrogen, USA
- *Yeast Nitrogen Base* - Difco
- 100 pb DNA Ladder – Invitrogen, USA
- AmpliTaq DNA Polimerase - Invitrogen, USA

ANEXO I

Tabelas de graus de toxicidade laboratorial e clínica, adaptadas para felinos domésticos da “AIDS Table for Grading Severity of Adult Adverse Experiences, 1992” (AACTG, 1992).

Tabela de graus de toxicidade laboratorial

Toxicidade	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Laboratorial				
Bioquímica				
Uréia(mg/dL)	65-195	196-392	393-786	>786
Creatinina(mg/dL)	1,8-2,5	2,6-3,9	4,0-5,5	>5,5
AST(U/L)	43-99	100-199	200-399	>399
ALT(U/L)	83-166	167-334	335-670	>670
FA(U/L)	93-186	187-374	375-750	>750

Hematologia

Hemoglobina(g/dL)	8,0-7,1	7,0-6,1	6,0-5,1	<5,1
Hematócrito(%)	24-21	20-17	16-13	<12
Neutropenia(1000/mm ³)	2.500-1.500	1.499-1.000	999-500	<499

ANEXO II
Tabela de graus de toxicidade clínica

Toxicidade Clínica	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
REGRA GERAL	Leve: sinal ou sintoma passageiro ou leve; sem limitação de atividade; sem necessitar cuidado médico ou tratamento.	Moderado: limitação de atividade leve a moderada; podendo necessitar cuidado médico ou tratamento	Grave: limitação de atividade importante; necessidade de cuidado médico ou tratamento	Risco de vida potencial: limitação extrema de atividade; grande necessidade de cuidado médico e tratamento