

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUISA HELENA MONTEIRO DE MIRANDA

**PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA,  
UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI-*SPOROTHRIX*  
*SCHENCKII*, PARA O DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE  
CANINA**

Rio de Janeiro

2009

**DISSERTAÇÃO MPCDI - IPEC L.H.M.MIRANDA 2009**

Padronização da reação de imuno-histoquímica, utilizando soro policlonal de coelho anti-*Sporothrix schenckii*, para o diagnóstico da esporotricose canina

LUISA HELENA MONTEIRO DE MIRANDA

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Tânia Maria Valente Pacheco

Co-orientador: Prof. Dr. Rogerio Tortelly

Rio de Janeiro

2009

LUISA HELENA MONTEIRO DE MIRANDA

Padronização da reação de imuno-histoquímica, utilizando soro policlonal de coelho anti-*Sporothrix schenckii*, para o diagnóstico da esporotricose canina

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Tânia Maria Valente Pacheco  
Prof. Dr. Rogerio Tortelly

Aprovada em: 06/02/2009

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Bodo Wanke  
Doutor em Medicina

---

Dr. Rodrigo Caldas Menezes  
Doutor em Biologia Parasitária

---

Dra. Leila Maria Lopes Bezerra  
Doutora em Ciências

---

Dr. Fabiano Borges Figueiredo  
Doutor em Ciências

Ao meu avô Jayme, exemplo de homem.

À minha avó Norma, meu exemplo de vida.

Saudade eterna.

Aos meus pais e meus irmãos:

Tudo é por vocês.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dra. Tânia Maria Valente Pacheco e Prof Dr. Rogerio Tortelly, pela confiança e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho. Obrigada pelo carinho, pela assistência e pelo incentivo.

Ao Dr. Leonardo Pereira Quintella, que guiou meus passos desde o princípio: pelo apoio na análise histopatológica (ensinamentos que não tem preço); pelo trabalho de ler e reler tudo inúmeras vezes; pela paciência infinita; por influenciar as idéias deste estudo a cada dia. Esse trabalho tem um pouco a sua cara.

À querida Isabele Barbieri dos Santos, que também me guiou do início da trajetória e me motivou em cada etapa. Obrigada pela confiança e por me ensinar com entusiasmo cada coisa nova que aprende. A sua dedicação e responsabilidade infinitas são um exemplo para mim.

Ao Dr. Armando de Oliveira Schubach, orientador no projeto de iniciação científica, quando tudo começou. Obrigada pela oportunidade e pela confiança.

A Dra. Maria de Fátima Madeira, que caiu do céu todas as vezes que precisei (e não foram poucas), sempre com carinho e boa vontade.

À Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, pela dedicação à análise estatística.

Ao Dr. Rodrigo Caldas Menezes, agradável surpresa com que pude contar para o desenvolvimento deste trabalho. Espero que seja o primeiro de muitos.

Ao Rodrigo Méxas, pelo belo trabalho com as imagens deste estudo.

À Dra Leila Maria Lopes Bezerra, por ceder gentilmente o soro utilizado neste trabalho, permitindo que o projeto fosse realizado no tempo necessário.

Aos amigos Andreia Medeiros, Carla de Oliveira Honse, Luiz Rodrigo Paes Leme, Marina Furtado e Thais Okamoto, pelo carinho e pela torcida. Estamos crescendo juntos.

Aos amigos do Serviço de Anatomia Patológica: Adriana Gouvea Muniz, Antonio Carlos da Silva, Antonio Correa, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Marcos Francisco Lucas de Almeida e Maria Dulce Portugal Estrada Espinoza, pela colaboração nas diferentes etapas deste trabalho e pelo agradável convívio.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos: Fabiano Borges Figueiredo, Isabella Dib Ferreira Gremiao e Sandro Antonio Pereira, responsáveis pela obtenção das amostras utilizadas neste estudo; à Rosely Lopes, pelo aconchego diário; e a todos que fizeram ou fazem parte desta grande equipe.

Ao Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde (PAPES IV), FIOCRUZ, à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a este projeto.

À minha família, meus animais e meus queridos amigos. Os momentos mais importantes da minha vida sempre incluem vocês.

Miranda, L. H. M. **Padronização da reação de imuno-histoquímica, utilizando soro policlonal de coelho anti-*Sporothrix schenckii*, para o diagnóstico da esporotricose canina.** Rio de Janeiro, 2009. 68 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

O aumento do número de casos de esporotricose em cães descrito desde 1998 no Rio de Janeiro, aliado à escassez de leveduras nas lesões nestes animais requerem métodos diagnósticos rápidos e sensíveis. A sobreposição de áreas endêmicas e a ocorrência de reação cruzada em testes sorológicos entre a esporotricose e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Rio de Janeiro enfatizam a relevância do diagnóstico diferencial entre elas. A imuno-histoquímica (IHQ) é um método sensível e específico e pode ser uma alternativa ao diagnóstico. O presente estudo teve como objetivo descrever os achados histopatológicos das lesões cutâneas de esporotricose e LTA em cães, padronizar a técnica de IHQ utilizando soro anti-*Sporothrix schenckii* em lesões cutâneas de esporotricose canina, comparar esta técnica com as técnicas histológicas convencionais e investigar a ocorrência de reações cruzadas com *Leishmania* sp.. A análise histopatológica foi realizada em 94 casos de esporotricose e 35 casos de LTA. As lesões foram caracteristicamente granulomatosas supurativas nas duas doenças. Contudo, os granulomas supurativos bem formados e ricos em neutrófilos e o infiltrado inflamatório periférico perivascular, perifolicular e intersticial elevaram a chance do diagnóstico de esporotricose. Os granulomas mal formados e o infiltrado inflamatório periférico difuso com presença de linfócitos e macrófagos favoreceram o diagnóstico da LTA. A pesquisa de leveduras foi realizada em 87 casos. A impregnação pela prata de Grocott e a IHQ detectaram leveduras em, respectivamente, 43,7% e 65,5% dos casos, e as duas técnicas associadas em 74,7% dos casos. A detecção de antígenos de *S. schenckii* pela IHQ elevou a sensibilidade do diagnóstico histológico a 80,5%. Nas lesões de LTA utilizadas como controle negativo para a IHQ, nenhum tipo de marcação ocorreu. Assim, diante de quadros histopatológicos compatíveis com o descrito para esporotricose, a IHQ é um método complementar ao diagnóstico histológico, garantindo maiores sensibilidade e especificidade aos resultados.

**Palavras-chave:** Esporotricose, Leishmaniose Tegumentar Americana, cão, histopatologia, imuno-histoquímica.



Miranda, L. H. M. **Standardization of the immunohistochemistry reaction using anti-*Sporothrix schenckii* rabbit policlonal serum for the diagnosis of canine sporotrichosis.** Rio de Janeiro, 2009. 68f. Dissertation [Master degree in Clinical research in infectious diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

The increase in the number of cases of canine sporotrichosis in Rio de Janeiro described since 1998, along with the scarcity of yeast cells in canine lesions demand fast and sensible diagnostic methods. The overlap of endemic areas in Rio de Janeiro and the occurrence of cross-reaction between sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis (ATL) in serological tests emphasize the relevance of their differential diagnosis. Immunohistochemistry (IHC) is a sensible and specific method and can be an alternative for the diagnosis. The present study aims to describe the histopathological findings of sporotrichosis and ATL cutaneous lesions in dogs, to standardize IHC technique using anti-*Sporothrix schenckii* serum in canine sporotrichosis cutaneous lesions, to compare this technique with histological conventional techniques and to investigate the occurrence of cross-reactions with *Leishmania* sp.. Histopathological analysis was made in 94 cases of sporotrichosis and 35 cases of ATL. The lesions were typically suppurative granulomatous in both diseases. However, the well organized and neutrophil-rich suppurative granulomas and the perivascular, perifollicular and interstitial periferic inflammatory infiltrate increased the chance for the sporotrichosis diagnosis. The poorly organized granulomas and diffuse periferic inflammatory infiltrate with lymphocytes and macrophages support the ATL diagnosis. The investigation of yeast cells was performed in 87 cases. Grocott's silver stain and IHC detected yeast cells in 43,7% e 65,5% of cases respectively, and both techniques together in 74,7% of cases. The detection of *S. schenckii* antigens by IHC increased the sensibility of histologic diagnosis to 80,5%. In ATL lesions, which were used as negative control for IHC, no positive reaction was detected. Thus, in cases with histopathological presentation consistent with that described for sporotrichosis, IHC is an efficient complementar method for histologic diagnosis promoting increased sensibility and specificity to results.

**Keywords:** Sporotrichosis, American Tegumentary Leishmaniasis, dog, histopathology, immunohistochemistry.

## Lista de Ilustrações

Figura 1 – Reação de imuno-histoquímica. Método de estreptavidina -peroxidase. Fonte: Ramos-Vara, 2005.	13
Quadro 1 – Classificação do grau de concordância do <i>kappa</i> Landis & Koch (1977). Fonte: Landis & Koch (1977).	26
Figura 2 – Pele de cão. Esporotricose. Granulomas bem formados, com limites bem definidos e predomínio de células epitelióides. HE. Objetiva de 20x.	29
Figura 3 – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma mal formado. Infiltrado inflamatório granulomatoso com limites mal definidos e fibras colágenas entremeadas. HE. Objetiva de 20x.	29
Figura 4 – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma esporotricótico, exibindo neutrófilos em seu interior (setas) e plasmócitos ao seu redor (setas pontilhadas). HE. Objetiva de 20x.	30
Figura 5 – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma esporotricótico, exibindo neutrófilos em seu interior (seta) e plasmócitos ao seu redor (setas pontilhadas). HE. Objetiva de 20x.	30
Figura 6 – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma esporotricótico, formado por macrófagos (cabeças de seta), exibindo neutrófilos em seu interior (setas) e plasmócitos ao seu redor (setas pontilhadas). HE. Objetiva de 100x.	31
Figura 7 – Pele de cão. Esporotricose. Infiltrado inflamatório perifolicular de plasmócitos. HE. Objetiva de 20x.	31

- Figura 8 – Pele de cão. Esporotricose. Grande quantidade de leveduras de *S. schenckii*. Impregnação pela prata de Grocott. Objetiva de 40x. 35
- Figura 9 – Pele de cão. Esporotricose. Leveduras de *S. schenckii*. Formas arredondadas (setas), formas em charuto (cabeças de seta) e figuras de brotamento (setas pontilhadas). Impregnação pela prata de Grocott. Objetiva de 100x. 35
- Figura 10 – Pele de cão. Esporotricose. Leveduras de *S. schenckii*. Formas arredondadas (setas) e figuras de brotamento (cabeças de seta). PAS. Objetiva de 100x. 36
- Figura 11 – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Agregados de fagócitos mononucleares ativados (setas) dispersos em infiltrado inflamatório difuso. HE. Objetiva de 10x. 37
- Figura 12 – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Agregado de fagócitos monoculeares dispersos em infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. HE. Objetiva de 20x. 38
- Figura 13 – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Infiltrado inflamatório granulomatoso difuso. HE. Objetiva de 10x. 38
- Figura 14 – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Infiltrado inflamatório granulomatoso difuso. HE. Objetiva de 10x. 39
- Figura 15 – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii*. Parede fúngica fortemente marcada em relação ao citoplasma. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 100x. 44

- Figura 16 – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii* no centro de um granuloma supurativo. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 40x. 46
- Figura 17 – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii* no interior de um micro-abscesso. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 40x. 46
- Figura 18 – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii* no interior de um granuloma supurativo. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 100x. 47
- Figura 19 – Pele de cão. Esporotricose. Antígenos intracelulares de *S. schenckii* no interior do granuloma. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 40x. 47
- Figura 20 – Pele de cão. Esporotricose. Antígenos de *S. schenckii* no interior de um fagócito mononuclear ativado. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 100x. 48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da intensidade de cada tipo celular presente no infiltrado inflamatório de acordo com o grau de diferenciação dos granulomas supurativos em lesões de esporotricose canina.	32
Tabela 2 – Distribuição da intensidade de cada tipo celular presente no infiltrado inflamatório de acordo com o grau de diferenciação dos granulomas supurativos em lesões de LTA canina.	40
Tabela 3 – Impacto das principais características microscópicas dos infiltrados inflamatórios de lesões cutâneas no diagnóstico histopatológico da esporotricose e da LTA em cães	41 49
Tabela 4 – Valores de sensibilidades dos diferentes métodos utilizados, isolados e em associação, para diagnóstico de esporotricose canina.	
Tabela 5 – Comparação entre as sensibilidades dos diferentes métodos, isolados ou em associação.	50
Tabela 6 – Concordância entre os diferentes métodos, segundo o grau de concordância (Valor Kappa) e percentuais de concordâncias positiva e negativa.	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCG - *Bacillus Calmette-Guerin*

BSA - Albumina Sérica Bovina

BHI - Infusão de cérebro e coração

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DAB - Diaminobenzidina

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HE - Hematoxilina-eosina

IHQ - Imuno-histoquímica

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

LAPCLIN-DERMZOO - Laboratório de Pesquisa Clínica em  
Dermatozoonoses em Animais Domésticos

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

OR - Razão de Chances

PAS - Ácido periódico de Schiff

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SAP - Serviço de Anatomia Patológica

TBS - Tris-Buffered-Saline

UERJ - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 ESPOROTRICOSE	1
1.2 HISTÓRICO	2
1.3 ESPOROTRICOSE ANIMAL	5
<b>1.3.1 esporotricose canina</b>	<b>5</b>
1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	7
<b>1.4.1 Exame direto</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2 Cultivo micológico</b>	<b>8</b>
<b>1.4.3 Exame histopatológico</b>	<b>9</b>
<b>1.4.4 Imuno-histoquímica</b>	<b>12</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
4.1 AMOSTRAS	19
4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO	20
4.3 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- <i>Sporothrix schenckii</i>	21
4.4 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- <i>S. schenckii</i>	22

4.5 ANÁLISE DE DADOS	24
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	26
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
5.1 EXAME HISTOPATOLÓGICO	27
<b>5.1.1 Cães com esporotricose</b>	<b>27</b>
5.1.1.1 Processo inflamatório granulomatoso supurativo	27
5.1.1.2 Processo inflamatório granulomatoso não supurativo	33
5.1.1.3 Processo inflamatório inespecífico	33
5.1.1.4 Presença de leveduras de <i>S.schenckii</i>	34
<b>5.1.2 Cães com LTA</b>	<b>36</b>
5.1.2.1 Processo inflamatório granulomatoso supurativo	36
5.1.2.2 Processo inflamatório inespecífico	42
5.2 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- <i>S. schenckii</i>	43
<b>5.2.1 Reações com controles positivos</b>	<b>43</b>
<b>5.2.2 Reações com casos do grupo I e do grupo II</b>	<b>45</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma micose subcutânea, de evolução subaguda ou crônica, que acomete o homem e numerosos animais e se encontra dispersa mundialmente. Seu agente etiológico, o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, é encontrado em grande variedade de substratos, como vegetação, em solos úmidos e em matéria orgânica em decomposição (Schell, 1998).

A transmissão da esporotricose geralmente ocorre pela inoculação traumática do fungo na pele a partir de uma fonte infectante (Rippon, 1988). Diversos relatos de casos em indivíduos envolvidos em atividades relacionadas à manipulação de plantas e solo, como jardineiros, floristas e fazendeiros, associam a ocorrência da doença à exposição ocupacional ao agente etiológico (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

A inoculação de *S. schenckii* também pode ocorrer através de mordedura ou arranhadura de animais ou pelo contato com o exsudato de suas lesões (Dunstan et al., 1986; Kauffman, 1999; Barros et al, 2004). O felino doméstico é considerado a maior fonte de transmissão zoonótica da esporotricose, pois apresenta grande quantidade de leveduras de *S. schenckii* em suas lesões (Schubach et al., 2004).

Clinicamente, a doença acomete a pele e tecido subcutâneo e se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões de aspecto variável. Estas lesões podem ser ulceradas, nodulares, tuberculóides, císticas, gomosas, ulcero-vegetantes, verrucosas ou em placa. A apresentação cutâneo-linfática é freqüente, principalmente em seres

humanos, e se caracteriza pela formação de lesões cutâneas que acompanham o trajeto de vasos linfáticos (Barros et al., 2001, 2004). Ocasionalmente, a transmissão ocorre pela inalação de conídios, favorecendo o aparecimento da forma pulmonar. A difusão do agente pela via linfo-hematogênia favorece a forma disseminada (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

## 1.2 HISTÓRICO

A esporotricose foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1898, quando Schenk recebeu um paciente de 36 anos, do sexo masculino, que apresentava um abscesso subcutâneo no dedo indicador direito. A lesão se estendia pela mão e braço do paciente, acompanhava o trajeto dos vasos linfáticos e se mostrava refratária ao tratamento. O cultivo de material de lesão permitiu o isolamento de um fungo relacionado ao gênero *Sporotrichum* (Schenk, 1898). Posteriormente, em 1900, Hektoen & Perkins relataram um caso semelhante, em que um abscesso subcutâneo se desenvolveu no dedo de uma criança, após acidente com um martelo. A realização do cultivo do material desta lesão levou ao isolamento de um fungo idêntico ao descrito por Schenk. No título desta publicação, os autores se referiram pela primeira vez à espécie como *Sporothrix schenckii* (Hektoen & Perkins, 1900).

De Beurmann & Ramond descreveram a doença na França pela primeira vez em 1903 (De Beurmann & Ramond, 1903) e, em 1905, o fungo isolado foi classificado como *Sporotrichum beurmanni* por Matruchot & Ramond (Apud Rippon, 1988). Em 1910, Matruchot descreveu novamente o micro-organismo, nomeando-o *Sporotrichum schencki* (Apud Rippon, 1988). Esta designação foi utilizada até a década de 60,

quando estudo realizado por Charmichael (1962) demonstrou tratar-se do mesmo micro-organismo referido por Hektoen & Perkins (1900) e o fungo foi nomeado definitivamente como *Sporothrix schenckii*.

Os primeiros casos humanos de esporotricose no Brasil foram registrados por Lutz e Splendore, em 1907. Nesta ocasião, a doença naturalmente adquirida em animais também foi descrita pela primeira vez, com isolamento de *S. schenckii* a partir de lesões em ratos. Os autores ressaltaram a possibilidade da transmissão da doença por meio de mordeduras uma vez que o isolamento do agente também foi obtido a partir da cavidade bucal destes animais.

Em 1912, De Beurmann & Gougerot apresentaram mais de 200 casos registrados ao longo de dez anos na França (Apud Lopes-Bezerra et al., 2006). Depois disso, foi observado um declínio da esporotricose na Europa e a doença começou a ser mais freqüente em outras regiões do mundo, como América Latina e Japão (Itoh et al., 1986; Kusuhara et al., 1988; Campos et al., 1994; Fleury et al., 2001; Espinosa-Taxis, 2001; Barros et al., 2004; Da Rosa et al., 2005; Macotella-Ruiz & Nochebuena-Ramos, 2006; Kovarik et al., 2008).

A esporotricose geralmente é observada de forma esporádica, em casos isolados e pequenos surtos familiares ou profissionais, com contaminação a partir de uma fonte de infecção comum (Campos et al., 1994; Bustamante & Campos, 2001; Lopes-Bezerra et al., 2006).

A maior epidemia de esporotricose descrita até o momento ocorreu em Witwatersrand, na África do Sul, na década de quarenta, e envolveu mais de três mil mineradores, infectados a partir da inoculação do fungo, presente em vigas de madeira contaminadas na estrutura das minas (Brown et al., 1947).

Em 1988, uma epidemia de esporotricose foi descrita nos Estados Unidos, envolvendo 84 trabalhadores de 15 estados, que participavam do programa anual de reflorestamento. Todos os casos foram associados à exposição a um tipo de musgo, contaminado com *S. schenckii*, obtido de um fornecedor em comum em Wisconsin (Dixon et al., 1991).

No Brasil, desde 1998, no estado do Rio de Janeiro, a esporotricose vem sendo descrita como uma epidemia, relacionada à transmissão pelo felino doméstico (Barros et al., 2001, 2004; Schubach et al., 2004). Durante o período de 1998 a 2004, 759 casos humanos, 1503 casos felinos e 64 casos caninos foram diagnosticados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) (Schubach et al., 2008). Dentre os casos humanos registrados, 83% revelaram ter tido contato com gatos com esporotricose e, destes, 56% relataram episódio de arranhadura ou mordedura por estes animais (Schubach et al., 2008).

A transmissão zoonótica pelo felino doméstico foi reconhecida pela primeira vez por Read & Sperling, em 1982, com o acometimento de diversos membros de uma família, um estudante de veterinária e um assistente a partir da manipulação de um gato infectado (Read & Sperling, 1982). Observações semelhantes foram descritas também por Dunstan e colaboradores (1986) e Larsson e colaboradores (1989). Em estudo posterior, a utilização de métodos moleculares revelou isolados idênticos de *S. schenckii* em lesões de um gato e do veterinário que o manipulou, demonstrando a transmissão zoonótica da esporotricose (Reed et al., 1993a).

O isolamento de *S. schenckii* de fragmentos de unhas e de swabs orais de gatos infectados aponta para o potencial do felino para transmissão da doença por meio de suas arranhaduras ou mordeduras (Schubach et al., 2001a, 2002a). Além disso, a

grande quantidade de leveduras encontrada nas lesões de gatos com esporotricose permite a transmissão pelo contato com estas lesões e sugere a ocorrência da doença em pacientes humanos sem histórico de traumas (Barros et al., 2001; Schubach et al., 2002a).

### **1.3 ESPOROTRICOSE ANIMAL**

A infecção experimental por *S. schenckii* já foi descrita por diversos autores em diferentes espécies de animais (Schenck, 1898; Hektoen & Perkins, 1900; Lutz & Splendore, 1907; De Beurmann & Gougerot, 1909) .

A esporotricose animal naturalmente adquirida é considerada pouco comum. Após os primeiros relatos em ratos (Lutz & Splendore, 1907), a doença foi descrita em grande variedade de hospedeiros, incluindo cães, gatos, cavalos, bois, camelos, golfinhos, ovelhas, mulas, aves, porcos, ratos, tatus e primatas não humanos (Werner & Werner, 1994; Welsh, 2003).

#### **1.3.1 ESPOROTRICOSE CANINA**

A suscetibilidade dos cães à esporotricose foi verificada experimentalmente por Schenck (1898) e Hektoen & Perkins (1900), por meio da inoculação subcutânea de *S. schenckii* nestes animais e posterior isolamento do agente a partir das lesões.

No Brasil, o primeiro caso de esporotricose canina naturalmente adquirida foi apresentado em congresso por Souza, em 1957 (Apud Migliano et al., 1963). Em 1963, Migliano e colaboradores descreveram mais dois casos em São Paulo. Ao longo das décadas seguintes, casos isolados foram descritos na literatura (Londero et al., 1964;

Freitas et al., 1965; Koehne et al., 1971; Dion & Speckman, 1978; Goad & Goad, 1986). Até a década de 90, uma casuística envolvendo 12 casos era a maior descrita até o momento em cães (Freitas et al., 1965).

A partir de 1998, devido à situação epidêmica da doença no Rio de Janeiro, houve um aumento do número de casos em cães nesta região. Na maioria dos casos observados nesta epidemia, foi relatado contato dos cães infectados com gatos com esporotricose, o que sugere participação do felino na transmissão da doença para os cães. Entretanto, não há registro da transmissão zoonótica a partir dos cães infectados (Schubach et al., 2006).

A esporotricose canina se caracteriza por lesões cutâneas ulceradas localizadas principalmente no nariz, pavilhão auricular e membros (Freitas et al., 1965; Farias et al., 1997; Schubach & Schubach, 2000; Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a). Macroscopicamente, as lesões cutâneas se apresentam nodulares e evoluem para ulceração (Schubach et al., 2006). A forma cutâneo-linfática, as lesões disseminadas e o acometimento osteoarticular e de mucosas também podem ocorrer (Goad & Goad, 1986; Schubach et al., 2006; Cafarchia et al., 2007).

Devido à semelhança das lesões cutâneas, o diagnóstico diferencial inclui diversas outras enfermidades de etiologia fúngica, como a criptococose, a blastomicose e a histoplasmose (Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a).

No Rio de Janeiro, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada o principal diagnóstico diferencial da esporotricose, pois, além de clinicamente semelhantes, apresentam sobreposição de áreas endêmicas. Aliado a isto, a positividade no teste intradérmico de Montenegro e em testes sorológicos para leishmaniose nos cães com esporotricose (Schubach et al., 2001b, 2002b; Santos et

al., 2007a), semelhante ao que ocorre em humanos (Barros et al., 2005), evidencia a necessidade de se estabelecer o diagnóstico diferencial entre elas.

#### **1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

O diagnóstico definitivo da esporotricose é realizado pelo isolamento e identificação do agente em cultivo a partir de amostras clínicas (Kwon-Chung & Bennett, 1992). O material é geralmente obtido por meio de *swab*, aspirado ou biópsia de lesão e semeado em ágar Sabouraud dextrose a 25 °C (Kauffman, 1999).

O exame histopatológico é uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico da esporotricose, sendo importante principalmente quando a realização de cultura fúngica não está disponível (Rodríguez & Sarmiento, 1998; Barros et al., 2005). As amostras clínicas utilizadas para a realização deste exame são amostras teciduais obtidas por biópsia e fixadas em formol. Para facilitar a visualização do agente em cortes histológicos, são aplicadas técnicas especiais de histoquímica, como a impregnação pela prata de Grocott e a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS).

Os ensaios imuno-enzimáticos para detecção de anticorpos também tem sido utilizados para sorodiagnóstico de esporotricose e monitoramento terapêutico em seres humanos (Penha & Lopes-Bezerra, 2000; Bernardes-Engemann et al., 2005; Almeida-Paes et al., 2007). A sorologia é uma alternativa útil particularmente em casos em que os resultados dos métodos micológicos tradicionais são negativos (Lopes-Bezerra et al., 2006).

De acordo com alguns estudos, as técnicas de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a detecção rápida e específica de *S.*

*schenckii* (Kano et al., 2001; Hu et al., 2003; Kanbe et al., 2005), por meio da aplicação de segmentos específicos de DNA e, quando disponíveis, podem ser uma alternativa ao diagnóstico.

### **1.4.1 EXAME DIRETO**

A técnica para exame direto mais utilizada para qualquer espécie fúngica é a montagem com hidróxido de potássio a 10%, que é gotejado sobre a lâmina e misturado à amostra. O exame direto é geralmente realizado no exsudato da lesão (Rippon, 1988).

Neste procedimento, a parede fúngica não é danificada e alguns artefatos e células do tecido são dissolvidos (Rippon, 1988). Entretanto, este método é considerado pouco sensível para o diagnóstico de esporotricose humana e canina devido à escassez de leveduras nestas lesões (Barros et al., 2004; Schubach et al., 2006).

### **1.4.2 CULTIVO MICOLÓGICO**

As colônias observadas a 25°C tem aspecto úmido e superfície rugosa. Sua coloração varia com o tempo, apresentando-se inicialmente brancacenta e, depois, enegrecida (Lopes-Bezerra et al., 2006). Os conídios podem ser enegrecidos ou hialinos e encontram-se dispostos ao longo das hifas septadas, formando arranjos semelhante a ramos de flores (Kauffman, 1999).

O dimorfismo de *S. schenckii* pode ser demonstrado em subcultivos incubados à temperatura de 37°C, quando o fungo se apresenta leveduriforme e se reproduz por



brotamento. O crescimento da fase de levedura *in vitro* pode ser obtido em meios enriquecidos, como ágar infusão de cérebro e coração (Brain-Heart Infusion - BHI) (Kauffman, 1999). As colônias obtidas são brancas e cremosas, apresentando, microscopicamente, estruturas leveduriformes, geralmente em forma de charuto ou arredondadas, das quais podem partir brotamentos claviformes alongados.

### **1.4.3 EXAME HISTOPATOLÓGICO**

Microscopicamente, as lesões cutâneas de esporotricose em seres humanos caracterizam-se por processo inflamatório granulomatoso supurativo (De Beurmann & Gougerot, 1907; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963).

Os granulomas são formados por agregados de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) em diferentes estágios de ativação (Adams, 1976; Hirsch & Johnson, 1984; Coelho, 1999). Os granulomas supurativos apresentam coleções de neutrófilos associadas aos agregados de células do SMF (Ackerman et al., 1997) e são geralmente associados a doenças causadas por agentes infecciosos (Hirsch & Johnson, 1984; Ackerman et al., 1997).

Na esporotricose humana, os granulomas supurativos observados são denominados “esporotricóticos” e são caracterizados pela presença de uma zona central supurativa, uma zona intermediária de fagócitos mononucleares e uma zona externa linfo-plasmocitária (De Beurmann & Gougerot, 1907; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963). Alguns autores descrevem também a ocorrência de granulomas do tipo tuberculóide (Pinkus & Grekin, 1950; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964). Quanto à distribuição, os granulomas podem se apresentar isolados, caracterizando padrão nodular, coalescentes, levando ao padrão difuso ou em padrão intersticial, separando

as fibras colágenas (Moore & Ackerman, 1946; Gadelha & Talhari, 1982). As células gigantes multinucleadas e a hiperplasia pseudoepiteliomatosa também podem estar presentes nas lesões cutâneas (Kauffman, 1999).

De acordo com estudos experimentais, o quadro histopatológico varia com o estágio da doença, revelando inicialmente a formação de abscessos, com participação de macrófagos e linfócitos, associados a grande quantidade de leveduras. Quando os macrófagos se tornam ativados e se diferenciam, formando os granulomas, a quantidade de leveduras diminui, acompanhada da redução dos abscessos e aumento do número de plasmócitos (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Hiruma et al., 1988).

Os estudos acerca da histopatologia da esporotricose em cães são escassos, mas geralmente descrevem lesões apresentando processo inflamatório crônico inespecífico ou granulomatoso, com presença de células gigantes multinucleadas (Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a). Embora estes achados sejam comumente observados, não são considerados específicos, podendo estar presentes na LTA, em outras enfermidades fúngicas ou em outras doenças de acometimento cutâneo (Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a).

As leveduras de *S. schenckii* observadas no tecido são ovais ou em forma de charuto, com tamanho variando entre 4,0 e 6,0  $\mu\text{m}$  (Kauffman, 1999), e podem exibir brotamento, geralmente único, e de base estreita (Schwarz, 1982). Na coloração pela hematoxilina-eosina (HE), as leveduras podem apresentar um halo claro ao seu redor (Kligman & Baldrige, 1951; Schwarz, 1982). Em cortes histológicos corados pela HE, as leveduras de *S. schenckii* devem ser diferenciadas das formas amastigotas de *Leishmania* sp., uma vez que o tamanho e o formato das duas é semelhante (Barros et al., 2005; Schubach et al., 2006). As formas amastigotas se apresentam ovaladas,

arredondadas ou piriformes, medindo entre 1,5 X 3,0 e 3,0 X 6,5  $\mu\text{m}$ , com citoplasma fracamente corado (Genaro, 2002), apresentando núcleo excêntrico e um cinetoplasto, visto como um ponto ou um bastão basofílico. A presença de restos celulares, comum na lesão tecidual, também pode ser confundida com qualquer um dos dois micro-organismos (Barros et al., 2005).

A utilização de técnicas especiais de histoquímica, como a da impregnação pela prata de Grocott e a coloração pelo PAS, permite definir a etiologia fúngica, por meio da visualização de leveduras nos cortes histológicos (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Ainda assim, a identificação do agente etiológico por métodos morfológicos nem sempre é possível, uma vez que as leveduras de *S. schenckii* são geralmente escassas nas lesões de esporotricose no homem e no cão (Moraes & Miranda, 1964; Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a). Além disso, estas técnicas são aplicadas para qualquer espécie fúngica e, embora uma observação cuidadosa da morfologia da levedura e do tipo de gemulação do fungo possa sugerir a sua espécie, isto nem sempre é possível (Reed et al., 1993b). Na impregnação pela prata, a precipitação do corante pode levar à formação de artefatos, redondos e enegrecidos, que podem ser confundidos com leveduras (Moskowitz et al., 1986).

Em lesões de esporotricose, a presença de *S. schenckii* no tecido é descrita também na forma de corpo asteróide, visualizado na coloração pela HE e no qual se observam prolongamentos eosinofílicos, irradiando de uma levedura central (Pinkus & Grekin, 1942; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964). A natureza desta estrutura ainda não foi totalmente elucidada, mas acredita-se que os prolongamentos eosinofílicos estejam relacionados à deposição de complexos antígeno-anticorpo e restos de células inflamatórias do hospedeiro (Da Rosa et al.,

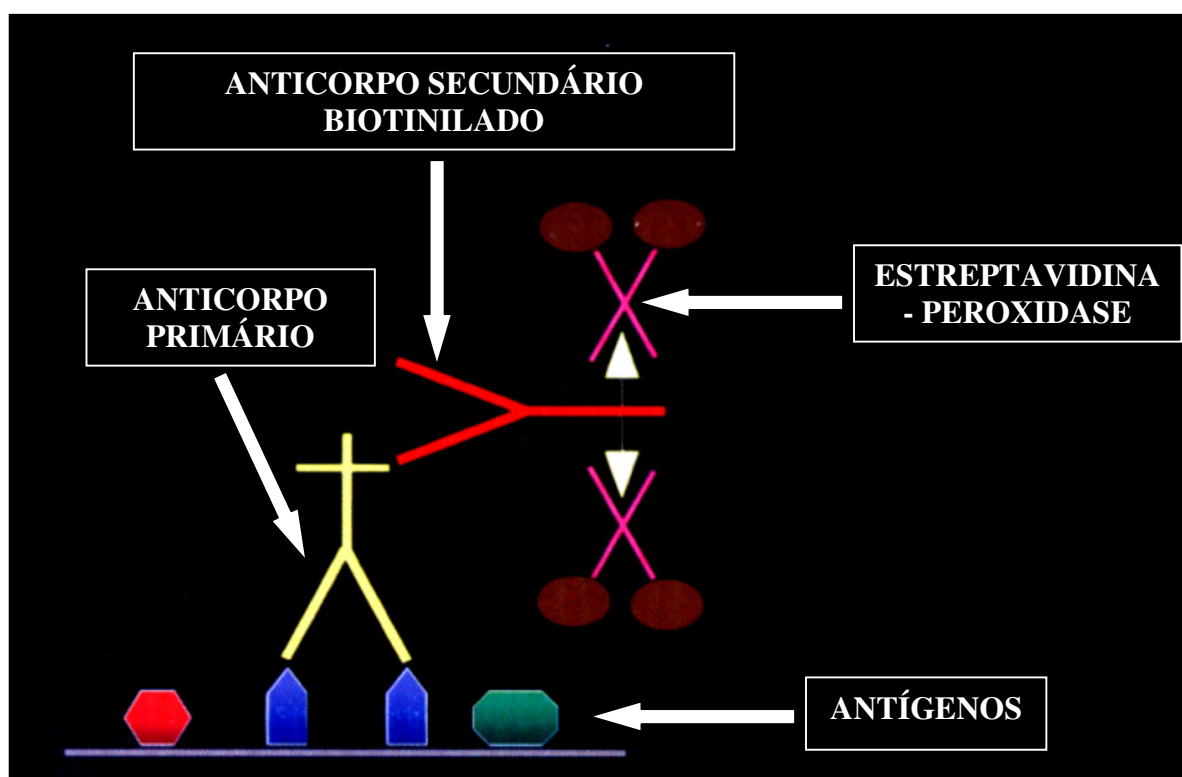
2008; Hussein, 2008). Estudos recentes sugerem que o corpo asteróide funciona como um elemento de resistência do micro-organismo, uma vez que a levedura central demonstra viabilidade (Da Rosa et al., 2008). Embora este achado, em muitos casos, seja freqüente em lesões de esporotricose, sabe-se que não é específico da doença (Moore, 1946; Narisawa et al., 1989; Hussein, 2008).

#### **1.4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

A imuno-histoquímica (IHQ) é um método imunológico que permite a demonstração de antígenos presentes no tecido, por meio da utilização de anticorpos primários específicos. A positividade deste método é baseada na ocorrência de ligações antígeno-anticorpo, demonstradas pela formação de cor no tecido, visível ao microscópio óptico (Ramos-Vara, 2005).

Para que a ligação antígeno-anticorpo seja visualizada pelo microscópio óptico, é necessária a utilização de sistemas de detecção. Estes sistemas utilizam enzimas que, em presença do respectivo substrato e de um cromógeno, produzem cor no local onde ocorre a ligação antígeno-anticorpo. O sistema estreptavidina-peroxidase (Figura 1) é considerado especialmente sensível e consiste na aplicação de um anticorpo secundário biotilado, que reconhece o anticorpo primário ligado ao antígeno. A seguir, um reagente contendo moléculas de estreptavidina conjugadas à enzima peroxidase é adicionado. A estreptavidina se liga com avidéz à biotina do anticorpo secundário. A formação de cor ocorre quando o peróxido de hidrogênio, substrato da enzima peroxidase, é adicionado à reação juntamente com o cromógeno (Ramos-Vara, 2005).

Embora a IHQ possa ser utilizada em tecidos fixados por formol e incluídos em blocos de parafina, a fixação por formol pode modificar a estrutura de algumas proteínas, dificultando ou impossibilitando o reconhecimento de antígenos no tecido pelos anticorpos primários específicos. Para reverter o efeito da fixação sobre os antígenos, diversos métodos de recuperação antigênica encontram-se disponíveis para serem utilizados nos protocolos de IHQ (Ramos-Vara & Beissenherz, 2000; Yaziji & Barry, 2006). De acordo com Ramos-Vara & Beissenherz (2000), cerca de 84% dos antígenos fixados em formol requerem algum método de recuperação antigênica para serem reconhecidos pelos anticorpos específicos, sendo o método de aquecimento em vapor o mais eficiente para a maioria dos anticorpos testados.



**Figura 1** – Reação de imuno-histoquímica. Método de estreptavidina-peroxidase. Fonte: Ramos-Vara, 2005.

A utilização da IHQ para identificação de *S. schenckii* demonstra resultados satisfatórios em lesões de esporotricose humana (Marques et al., 1992; Rodríguez & Sarmiento, 1998), sendo descrita uma maior sensibilidade deste método quando comparado com as técnicas especiais de histoquímica. Além disso, a IHQ permite a identificação específica do agente etiológico, uma vez que é baseado em uma reação antígeno-anticorpo, elevando a eficácia do diagnóstico histológico.

## 2. JUSTIFICATIVA

A esporotricose canina é considerada pouco frequente e apresenta baixo potencial zoonótico, mas o seu diagnóstico pode contribuir para investigação da esporotricose felina, uma vez que os casos notificados em cães geralmente são relacionados a um contato prévio com um gato infectado, definido como principal fonte de transmissão zoonótica de esporotricose. (Santos et al., 2007a).

Além disso, no período de 1998 a 2003, o Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) do IPEC acompanhou um número elevado de casos de esporotricose e LTA em cães apresentando lesões cutâneas (Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a). O diagnóstico diferencial entre as duas doenças é realizado freqüentemente com base em evidências clínico-epidemiológicas e em testes sorológicos. No entanto, um índice de positividade significativo na sorologia para leishmaniose é descrito em cães e humanos com esporotricose (Barros et al., 2005; Santos et al., 2007a). A ocorrência destas reações cruzadas em cães com esporotricose pode levar a falsos diagnósticos de leishmaniose e à eliminação desnecessária desses animais (Reed et al., 1990; Santos et al., 2007a).

Desta forma, a demonstração do agente etiológico a partir do material obtido de lesões cutâneas é necessária para que seja estabelecido o diagnóstico diferencial entre a esporotricose e a LTA, sendo o isolamento de *S. schenckii* ou de *Leishmania* sp. em cultura o método de escolha (Santos et al., 2007a).

Embora o cultivo micológico seja o método de escolha para diagnóstico das micoses, este exame pode não ser solicitado ou não estar disponível e, mesmo quando realizado, pode não haver crescimento do fungo, geralmente por envio de material inadequado ou contaminação por micro-organismos saprófitas (Moore & Ackerman, 1946; Schwarz, 1982). Além disso, o fungo pode demorar semanas para crescer, o que torna necessária a manutenção da cultura por um longo tempo (Schwarz, 1982). Assim, em muitos casos, a identificação de *S. schenckii* a partir de blocos parafinados pode ser o único método de diagnóstico disponível, particularmente nas situações em que a suspeita de infecção fúngica não foi considerada no momento da realização da biópsia (Moskowitz, 1986; Werner & Werner, 1994).

Contudo, os estudos acerca das alterações histopatológicas da esporotricose canina ainda são poucos e, geralmente, trazem relatos de casos isolados (Londero et al., 1964; Freitas et al., 1965; Koehne et al., 1971; Dion & Speckman, 1978; Goad & Goad, 1986; Sykes et al. 2001) e/ou apenas breve descrição clínica e histopatológica das lesões (Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a). Aliado a isto, as técnicas especiais de coloração para detecção de estruturas fúngicas em cortes histológicos são consideradas pouco sensíveis para o diagnóstico da esporotricose humana e canina (Marques et al., 1992; Barros et al., 2004, 2005; Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a).

O método imuno-histoquímico é rápido e, uma vez que utiliza anticorpos específicos, promove um diagnóstico mais preciso do que o realizado pela análise da HE ou das técnicas histoquímicas especiais, baseado apenas em características morfológicas do agente (Schwarz, 1982). A IHQ para identificação de *S. schenckii* já foi aplicada para o diagnóstico da esporotricose humana, demonstrando alta sensibilidade



em relação às demais técnicas histoquímicas (Marques et al., 1992; Rodríguez & Sarmiento, 1998), mas sua padronização para diagnóstico da doença em cães ainda não foi realizada.

A utilização deste método para diagnóstico de leishmaniose pela detecção de formas amastigotas também é considerada uma opção particularmente sensível, mas a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* sp. e *S. schenckii* é descrita em alguns estudos, utilizando soro policlonal de coelho anti-*Leishmania*, em lesões ativas de seres humanos com esporotricose (Schubach et al., 2001c; Quintella, 2004). Na literatura consultada, não houve descrição de reações cruzadas entre os dois agentes na IHQ utilizando soro anti-*S.schenckii*.

Desta forma, este método é considerado uma alternativa sensível para detecção de *S. schenckii* e é possível que, assim como em seres humanos, represente uma importante técnica de diagnóstico da esporotricose canina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os aspectos histopatológicos de lesões cutâneas de esporotricose canina e padronizar a reação de IHQ, utilizando soro policlonal de coelho anti-*S.schenckii*, no diagnóstico da esporotricose em cães, comparando sua sensibilidade em relação às técnicas especiais de coloração aplicadas aos cortes histológicos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os aspectos histopatológicos observados em amostras de tecido de lesões cutâneas de esporotricose e LTA em cães, corados pela HE, estabelecendo critérios para direcionamento do diagnóstico.
- Avaliar as técnicas de histoquímica (impregnação pela prata de Grocott e PAS) e IHQ na detecção de leveduras em lesões cutâneas de esporotricose.
- Comparar a sensibilidade da IHQ e das técnicas de histoquímica em cortes histológicos de lesões com o isolamento em cultura para *S. schenckii*, utilizado como padrão de referência para o diagnóstico.
- Verificar a concordância entre os resultados das três diferentes técnicas estudadas.
- Investigar a ocorrência de reações cruzadas com *Leishmania* sp. na reação de IHQ.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

As lesões cutâneas ativas estudadas foram divididas em dois grupos:

- Grupo I: composto por amostras de tecido de biopsia de lesões cutâneas de 94 cães com esporotricose. Estes cães eram procedentes do estado do Rio de Janeiro e foram atendidos no LAPCLIN-DERMZOO do IPEC no período de 2001 a 2008. O diagnóstico da doença foi confirmado por isolamento de *S. schenckii* em cultivo micológico pelo Laboratório de Micologia do IPEC.

- Grupo II (Controle): composto por amostras de tecido de biopsia de lesões cutâneas obtidas de 35 cães com LTA, oriundos de áreas endêmicas no município do Rio de Janeiro. Nestes cães, o diagnóstico foi realizado no Serviço de Parasitologia do IPEC, por isolamento e caracterização de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, conforme previamente descrito por Cupollilo e colaboradores (1995).

Para comparação entre as técnicas de histoquímica e IHQ, o tamanho amostral do grupo I foi definido considerando a diferença entre sensibilidade das técnicas, assumindo a sensibilidade esperada das colorações especiais de 30% ( $p=0,3$ ) e da IHQ de 65% ( $p=0,65$ ) (Marques et al., 1992).

Para verificar a ocorrência de reações cruzadas com *Leishmania* sp., o tamanho amostral do grupo II foi definido com proporção esperada de falsos positivos de 10% ( $p=0,1$ ) (Santos et al., 2007a).

Nas duas amostras, o nível de significância ( $\alpha$ ) foi de 5% (IC=95%) e o erro absoluto de 0,1.

## 4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO

As amostras de tecido incluídas em blocos de parafina foram recuperadas do arquivo do SAP do IPEC e submetidas a cortes de 5  $\mu$ m em micrótomo. Para análise histopatológica, a coloração pela HE foi realizada nos cortes histológicos das lesões do grupo I e do grupo II. Para pesquisa de elementos fúngicos, as técnicas de impregnação pela prata de Grocott e coloração pelo PAS foram utilizadas apenas no grupo I.

Na análise microscópica dos cortes histológicos corados pela HE, determinou-se inicialmente o tipo de processo inflamatório – granulomatoso ou inespecífico. Foram considerados granulomatosos os infiltrados inflamatórios contendo células do SMF ativadas, formando agregados compactos ou cordões intersticiais abundantes. Nestes infiltrados, o grau de diferenciação predominante dos fagócitos – macrófagos ou células epitelióides – também foi verificado (Adams, 1974), assim como a presença de células gigantes multinucleadas. De acordo com a sua distribuição, os infiltrados granulomatosos foram classificados como difusos, nodulares ou intersticiais. Segundo sua organização, os granulomas foram considerados bem formados, quando apresentavam limites bem definidos e predominantemente células epitelióides, e mal formados, quando mal delimitados ou com predomínio de macrófagos.

A seguir, os demais tipos celulares presentes no infiltrado foram descritos e sua intensidade qualificada como discreta a moderada ou acentuada.

Na ausência de infiltrado granulomatoso, o processo inflamatório foi considerado inespecífico. De acordo com a sua distribuição, os infiltrados não granulomatosos foram classificados como difusos ou perivasculares, perifoliculares e intersticiais (Ackerman et al., 1997). Os infiltrados denominados perivasculares, perifoliculares e intersticiais foram considerados quando pelo menos uma das três características foi observada. Os tipos celulares presentes no infiltrado foram descritos e sua intensidade qualificada como discreta a moderada ou acentuada.

Outros achados histopatológicos presentes nos cortes histológicos estudados foram descritos sempre que observados.

Na impregnação pela prata de Grocott e a coloração pelo PAS, foram analisados todos os campos microscópicos de 2 cortes histológicos para cada uma das colorações.

#### **4.3 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- *S. SCHENCKII***

O soro policlonal de coelho anti-*S. schenckii* utilizado neste projeto foi produzido no Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e gentilmente cedido pela Dra. Leila Maria Lopes Bezerra. A obtenção do antígeno de *S. schenckii* e o protocolo de inoculação de coelhos para produção do soro foram previamente descritos por Lopes Alves e colaboradores (1994).

#### **4.4 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- *S. SCHENCKII***

Para a padronização da técnica, as primeiras reações foram realizadas apenas em cortes histológicos de controles positivos. Os controles positivos correspondiam a casos de esporotricose canina ou felina, confirmados por cultivo micológico, no período de 2003 a 2008, e cujos fragmentos de lesões encontravam-se arquivados em blocos de parafina no SAP e apresentavam quantidade moderada ou elevada de leveduras no exame histopatológico. Após obtenção da concentração ideal do soro primário, o método foi aplicado nos casos do grupo I, para comparação com os demais métodos histológicos e com o cultivo micológico, e nos casos do grupo II, para verificar a existência de reações cruzadas com *Leishmania* sp. neste método.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5 µm em micrótomo em lâminas silanizadas (Erviagas, ERV – SF PLUS®). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol à 60° C durante 20 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente, também por 20 minutos, e em imersões seqüenciais. Depois disso, procedeu-se à re-hidratação do tecido em imersões seqüenciais em álcool a concentrações decrescentes (100% a 70%) e banho em água corrente por dez minutos. As etapas seguintes da técnica de IHQ foram adaptadas de protocolos descritos em estudos anteriores (Quintella, 2004; Santos, 2007b).

A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio 30% (Merck) na concentração v/v de 40 mL/100mL em metanol (Quimex) durante 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente por 15 minutos.

Inicialmente, com o objetivo de verificar a necessidade da realização de recuperação antigênica para a eficiência da reação, foram procedidas, em paralelo, reações com a utilização e com a supressão desta etapa para comparação dos resultados. Para a recuperação antigênica, foi utilizada solução tampão citrato, em pH 6, preparado a partir de 4,2g de ácido cítrico (Proquímicos), em água destilada, q.s.p. 2000ml, sendo o pH ajustado com hidróxido de sódio (Merck) a 2N. Os cortes foram colocados na solução tampão em panela a vapor, onde permaneceram por 20 minutos, tempo necessário para que a solução tampão atingisse a temperatura de 96°C. Em seguida, os cortes permaneceram em temperatura ambiente para resfriamento por, aproximadamente, 20 minutos.

Depois disso, as lâminas foram submetidas a três lavagens sequenciais de cinco minutos em tampão TBS (Tris-Buffered-Saline – TBS, pH 7,6, Dako Corporation – S3001).

A inibição de reações inespecíficas foi realizada com soro normal de suíno (Novo Castra, NCL-S-SERUM) em albumina sérica bovina (BSA) (Sigma®) 1,5% a concentração de 1:20 durante 20 minutos e, em seguida, com solução de leite em pó (Molico®) na concentração m/v de 0,1 g/ml com BSA 3% em tampão TBS, durante 40 minutos. Entre as duas incubações, foi realizada lavagem em tampão TBS.

Os cortes foram incubados com o soro anti-*S.schenckii* diluído em BSA 1,5% em câmara úmida overnight a 4° C. Como controle negativo para reações inespecíficas, cortes histológicos do mesmo caso foram incubados com soro normal de coelho (DakoCytomation, Normal Rabbit Serum – X0902) na mesma diluição. Cortes histológicos adicionais também foram incubados apenas com BSA como controle negativo para biotina e peroxidase endógenas. Primeiramente, foram realizadas

diluições seriadas do anticorpo, desde 1:300 até 1:8000 (1:300, 1:600, 1:800, 1:1200, 1:1600, 1:2000, 1:2400, 1:4000 e 1:8000) para obtenção da concentração adequada do soro primário.

A seguir, os cortes foram lavados em TBS e procederam-se incubações seqüenciais de 25 minutos com anticorpo secundário biotinilado universal e com o conjugado estreptavidina-peroxidase (DakoCytomation, LSAB<sup>+</sup> System Kit – K0690), com lavagens em TBS após cada incubação.

Para a revelação, uma pastilha do cromógeno diaminobenzidina (DAB – DAB Tablets, Dako Corporation, S3000) foi diluída em 10 mL de tampão TBS e 1 mL desta solução com 7,5 µL de peróxido de hidrogênio 3% foi utilizado. A revelação foi controlada ao microscópio óptico (Nikon E200), em objetiva de 10x, pelo controle positivo, interrompendo-se a reação com água destilada no momento em que as leveduras, acastanhadas, se destacavam no tecido.

Depois de lavados em água corrente por três minutos e contra-corados com hematoxilina de Mayer, os cortes foram banhados rapidamente em água destilada e, a seguir, lavados em água corrente por três minutos.

A desidratação foi realizada por imersões seqüenciais em álcool a concentrações crescentes (70% a 100%), para posterior passagem por xilol, montagem das lâminas com lamínula e meio de montagem, e visualização em microscópio óptico.

## **4.5 ANÁLISE DE DADOS**

Os dados foram armazenados em banco de dados SPSS versão 11.0 e analisados pelo SPSS e pelo software R.



Na análise histopatológica, foram descritas as freqüências das variáveis obtidas: tipo de processo inflamatório, diferenciação do granuloma, organização do granuloma, distribuição do infiltrado granulomatoso e do infiltrado não granulomatoso, tipos celulares presentes no infiltrado e sua intensidade e presença de estruturas fúngicas pelas técnicas da impregnação pela prata de Grocott e coloração pelo PAS. Para verificar se a associação entre estas variáveis foi significativa, foi realizada análise dos dados pelo teste de independência qui-quadrado de Pearson. Entretanto, para tabelas constituídas pelo cruzamento de variáveis com apenas duas categorias (2x2) em que pelo menos uma das casas apresentou valor inferior a 5, optou-se por uma correção denominada teste exato de Fisher.

Para tabelas em que uma das variáveis apresentou três categorias (3x2) e em que pelo menos uma das casas apresentou valor inferior a 5, utilizou-se a correção do teste exato de Fisher por meio do software R.

Para descrever o impacto dos achados microscópicos observados no diagnóstico da doença em cada grupo estudado, foram calculados a Razão de Chances (OR) e seu respectivo intervalo de confiança (95%).

Em relação à presença de estruturas leveduriformes na impregnação pela prata de Grocott, no PAS e na IHQ, foram avaliados os valores de sensibilidade de cada teste em relação ao padrão de referência. Para verificar se a diferença entre as sensibilidades dos métodos, isolados ou em associação, foi significativa, foi utilizado o teste de McNemar para amostras pareadas. Para valores abaixo do nível de significância ( $p\text{-valor} < 0,005$ ), é possível afirmar que existe diferença entre os métodos.

O coeficiente Kappa (Cohen, 1960) foi calculado para a avaliação do grau de concordância entre os resultados das três técnicas (duas a duas). A interpretação do

coeficiente Kappa seguiu a classificação sugerida por Landis & Koch (1977), ilustrada no quadro 1.

<b>Grau de concordância</b>	<b>Valor Kappa</b>
Concordância quase perfeita	0,80 a 1,00
Concordância substancial	0,60 a 0,80
Concordância moderada	0,40 a 0,60
Concordância regular	0,20 a 0,40
Concordância discreta	0,00 a 0,20
Concordância pobre	-1,00 a 0,00

**Quadro 1:** Classificação do grau de concordância do *kappa* Landis & Koch (1977)  
Fonte: Landis & Koch (1977)

Em todas as análises explicitadas, utilizou-se um p-valor < 0,05 na indicação de associação estatisticamente significativa.

#### **4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Os procedimentos de biopsias realizados nos cães atendidos no LAPCLIN-DERMZOO e nos cães oriundos de áreas endêmicas de LTA até o ano de 2004 foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FIOCRUZ, e protocolado com o número P00060-00, sob responsabilidade dos pesquisadores Dr Armando de Oliveira Schubach e Dr<sup>a</sup> Tânia Maria Valente Pacheco. Para os cães atendidos a partir de 2004, os procedimentos foram novamente submetidos à CEUA e aprovados sob número de protocolo P0195-03, sob a responsabilidade da Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Madeira.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 EXAME HISTOPATOLÓGICO**

#### **5.1.1 CÃES COM ESPOROTRICOSE**

O estudo microscópico dos 94 casos (Grupo I) evidenciou processo granulomatoso supurativo em 80 (85,1%) casos, granulomatoso não supurativo em 1 (1,1%) e inespecífico em 9 (9,6%). Quatro (4,2%) casos não apresentaram alterações ao exame histopatológico, de modo que não foram incluídos nas demais análises.

##### **5.1.1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO GRANULOMATOSO SUPURATIVO**

Dentre os 80 casos que apresentaram processo inflamatório granulomatoso supurativo, a distribuição deste infiltrado foi difusa em 71,3% dos casos, nodular em 23,7% e intersticial nos demais (5,0%).

A diferenciação predominante das células do SMF em células epitelióides ocorreu em 73,8% dos casos e em macrófagos em 26,2%. Os granulomas bem formados (Figura 2) foram observados em 37,5% dos casos. A presença de células gigantes do tipo Langhans foi detectada em apenas um caso.

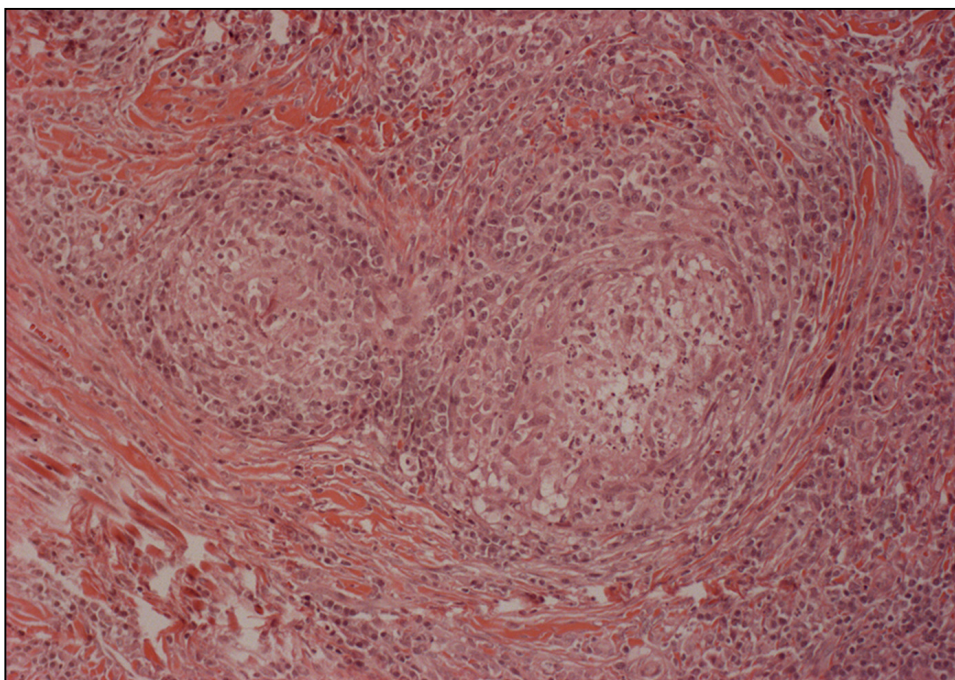
O infiltrado de plasmócitos ao redor dos granulomas foi detectado em 90,0% das todos os casos com granulomas supurativos (n=80) e em 93,2% dos casos com granulomas supurativos de células epitelióides (n=59). Houve associação entre a organização do granuloma e a presença de infiltrado de plasmócitos ao redor do

granuloma ( $p=0,022$ ): os granulomas foram mal formados (Figura 3) em 58,3% dos casos em que o infiltrado de plasmócitos esteve presente ( $n=72$ ) e em todos os casos em que este infiltrado estava ausente ( $n=8$ ).

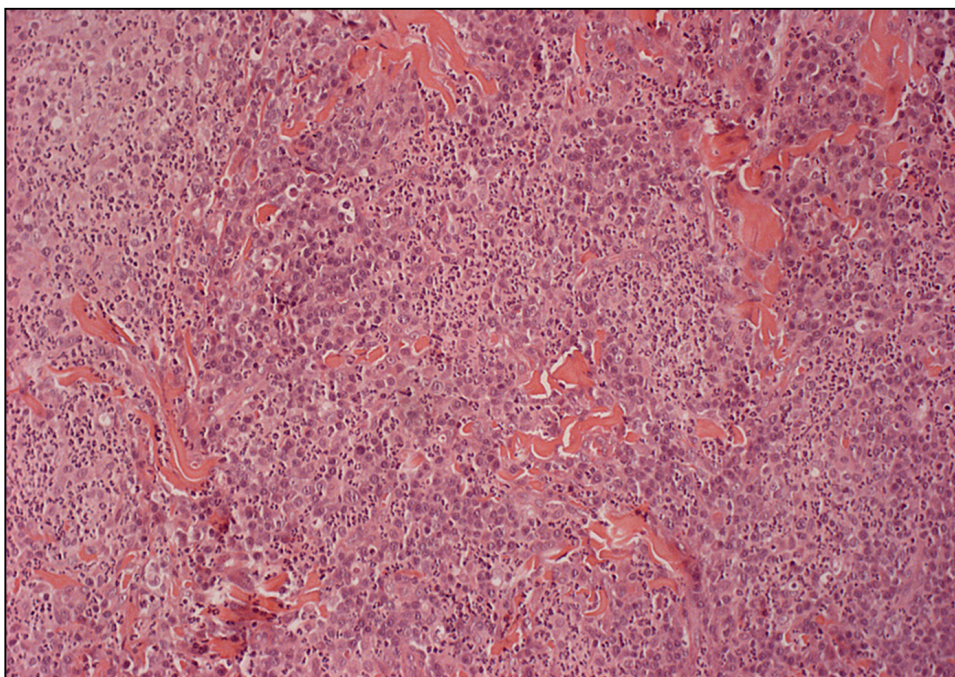
As figuras 4, 5 e 6 ilustram lesões com granulomas esporotricóticos, caracterizados pela presença de uma zona central de neutrófilos, uma zona intermediária de macrófagos e uma zona externa de plasmócitos.

O infiltrado inflamatório periférico não granulomatoso ocorreu em 83,8% dos casos, com a ocorrência de plasmócitos em todos eles (Figura 7). Sua distribuição foi perivascular, perifolicular e intersticial em 71,3% dos casos, dos quais 3,4% também apresentaram infiltrado liquenóide. Em 12,5% dos casos, a distribuição deste infiltrado foi difusa.

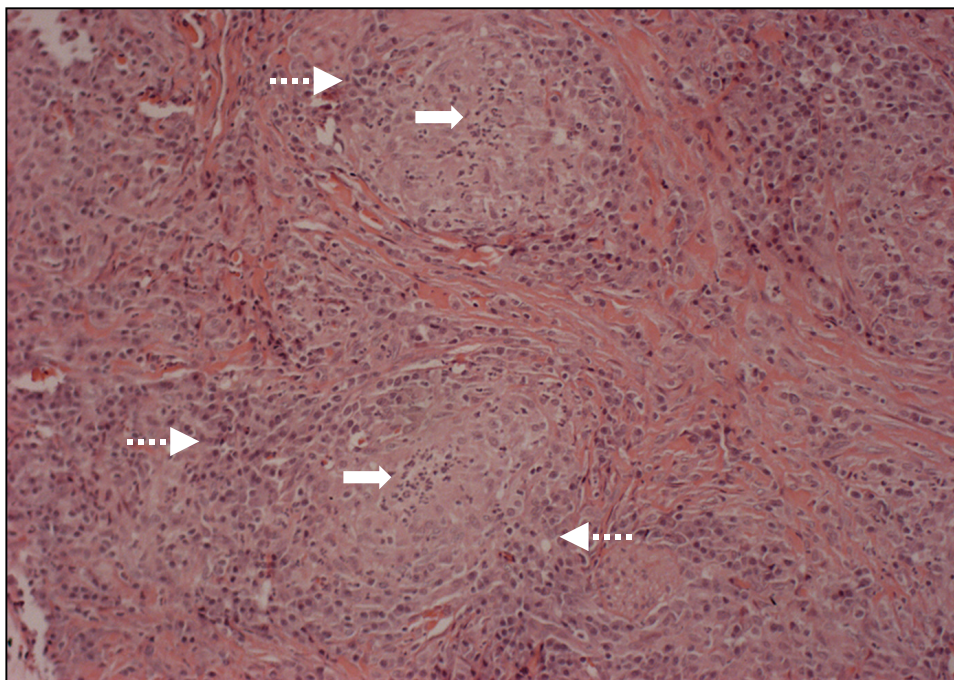
A presença de neutrófilos no infiltrado periférico ocorreu em 66,7% das lesões que apresentaram granulomas com macrófagos ( $n=21$ ) e em 39,0% das que apresentaram granulomas com células epitelióides ( $n=59$ ), sendo essa diferença significativa ( $p=0,041$ ).



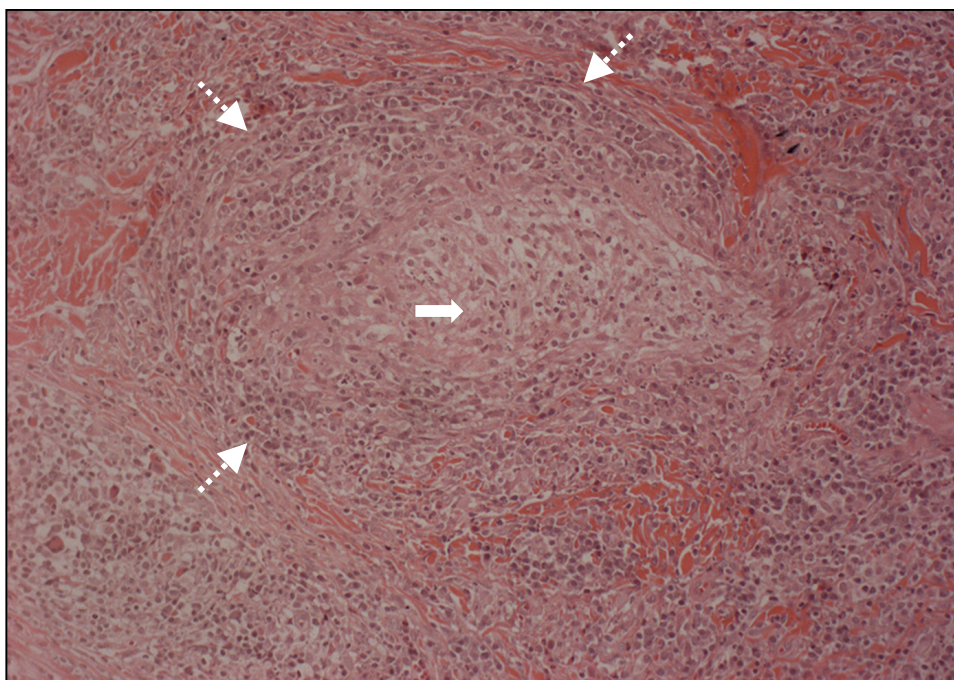
**Figura 2** – Pele de cão. Esporotricose. Granulomas bem formados, com limites bem definidos e predomínio de células epitelióides. HE. Objetiva de 20x.



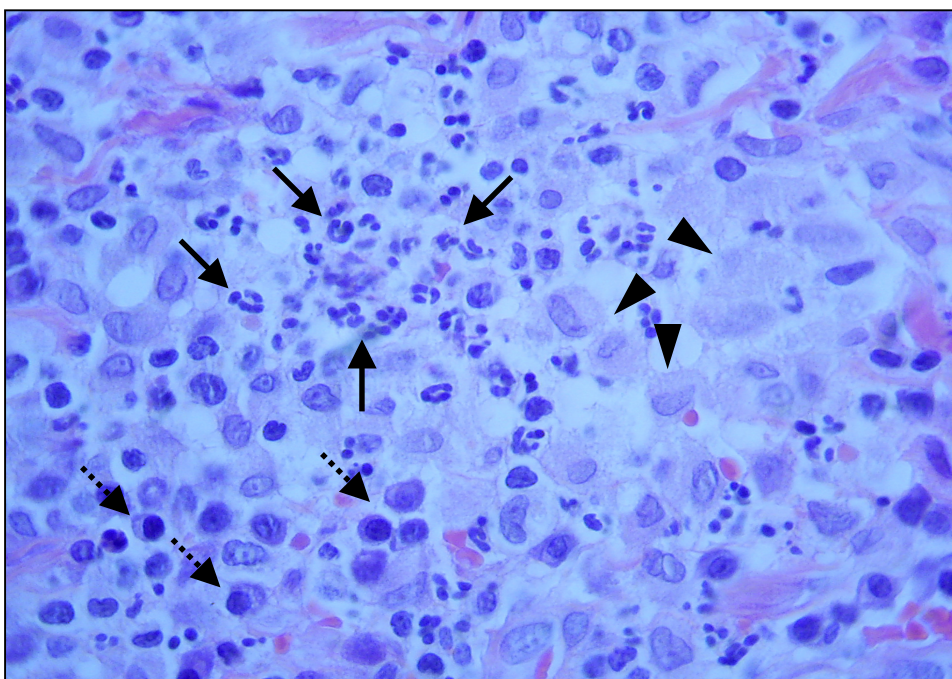
**Figura 3** – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma mal formado. Infiltrado inflamatório granulomatoso com limites mal definidos e fibras colágenas entremeadas. HE. Objetiva de 20x.



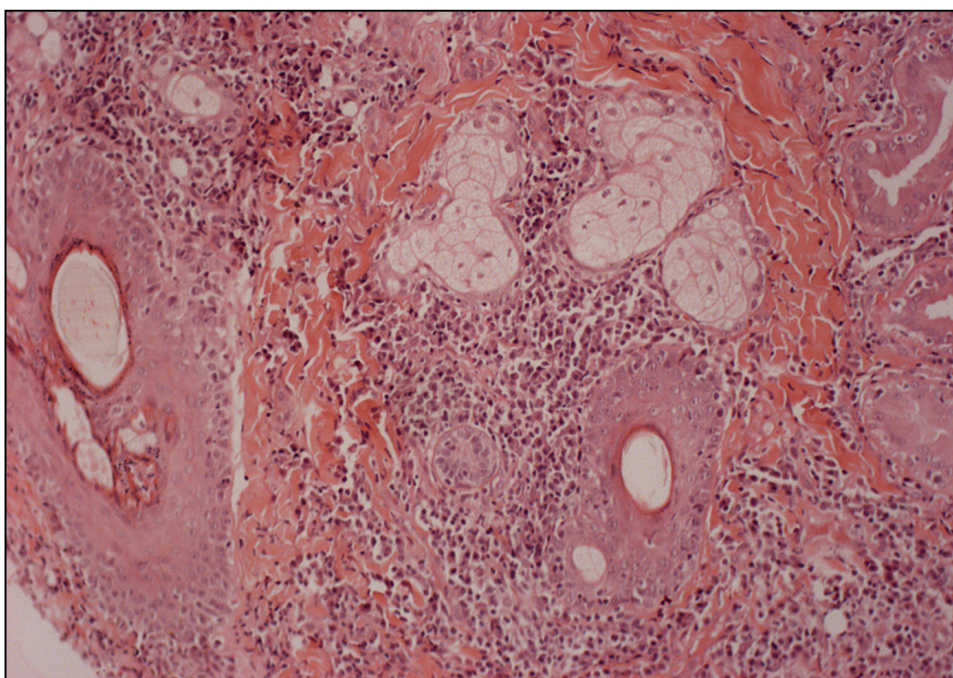
**Figura 4** – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma esporotricótico, exibindo neutrófilos em seu interior (setas) e plasmócitos ao seu redor (setas pontilhadas). HE. Objetiva de 20x.



**Figura 5** – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma esporotricótico, exibindo neutrófilos em seu interior (seta) e plasmócitos ao seu redor (setas pontilhadas). HE. Objetiva de 20x.



**Figura 6** – Pele de cão. Esporotricose. Granuloma esporotricótico, formado por macrófagos (cabeças de seta), exibindo neutrófilos em seu interior (setas) e plasmócitos ao seu redor (setas pontilhadas). HE. Objetiva de 100x.



**Figura 7** – Pele de cão. Esporotricose. Infiltrado inflamatório perifolicular de plasmócitos. HE. Objetiva de 20x.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a intensidade de cada tipo celular e a diferenciação predominante do granuloma, conforme ilustrado na tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição da intensidade de cada tipo celular presente no infiltrado inflamatório de acordo com o grau de diferenciação dos granulomas supurativos em lesões de esporotricose canina.

Tipo celular	Intensidade	Diferenciação predominante dos fagócitos mononucleares do granuloma		p-valor* (teste exato de Fisher)
		Macrófagos %	Células epitelióides %	
NIG (N=80)	Ausente	-	-	1,000
	Discreta a Moderada	47,6	47,5	
	Acentuada	52,4	52,5	
PRG (N=80)	Ausente	19,0	6,8	0,352
	Discreta a moderada	52,4	59,3	
	Acentuada	28,6	33,9	
PPL (N=80)	Ausente	14,3	17,0	0,942
	Discreta a moderada	47,6	50,8	
	Acentuada	38,1	32,2	
LPL (N=80)	Ausente	19,0	33,9	0,292
	Discreta a moderada	57,1	37,3	
	Acentuada	23,9	28,8	
NPL (N=80)	Ausente	33,3	61,0	0,080
	Discreta a moderada	23,9	17,0	
	Acentuada	42,8	22,0	
MPL (N=80)	Ausente	85,7	67,8	0,158
	Discreta a moderada	14,3	32,2	
	Acentuada	0,0	0,0	

Nota: NIG: Neutrófilos no interior do granuloma; PRG: Plasmócitos ao redor do granuloma; PPL: Plasmócitos na periferia da lesão; LPL: Linfócitos na periferia da lesão; NPL: Neutrófilos na periferia da lesão; MPL: Macrófagos na periferia da lesão.

\*p-valor <0,05 na indicação de significância estatística.



Em relação aos demais achados observados, a epiderme exibiu ulceração em 22,1% dos casos e hiperplasia em 10,5%. A presença de edema na derme foi observada em 20,0% dos casos e os microabscessos intra-epiteliais em 5,0% dos casos.

#### **5.1.1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO GRANULOMATOSO NÃO SUPURATIVO**

Em apenas um caso, observou-se processo inflamatório granulomatoso não supurativo. Microscopicamente, a lesão exibiu granulomas mal formados, de distribuição difusa, predomínio de células epitelióides e infiltrado de plasmócitos ao seu redor em intensidade discreta a moderada. O infiltrado inflamatório periférico, de distribuição perivascular, perifolicular e intersticial, revelou presença de plasmócitos, linfócitos e neutrófilos.

#### **5.1.1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO INESPECÍFICO**

Em nove casos, o processo inflamatório observado foi inespecífico. A presença de plasmócitos foi detectada em todos os casos, de neutrófilos e de linfócitos em quatro casos cada, de macrófagos em dois e de eosinófilos em um. Dois casos exibiram infiltrado inflamatório essencialmente plasmocitário. Em relação a sua distribuição, o infiltrado foi perivascular, perifolicular e intersticial em seis casos, sendo um deles exibindo também infiltrado liquenóide. O padrão difuso esteve presente em três casos.

Em relação a outros achados, a presença de edema foi observada em três casos.

#### **5.1.1.4 PRESENÇA DE LEVEDURAS DE *S.schenckii***

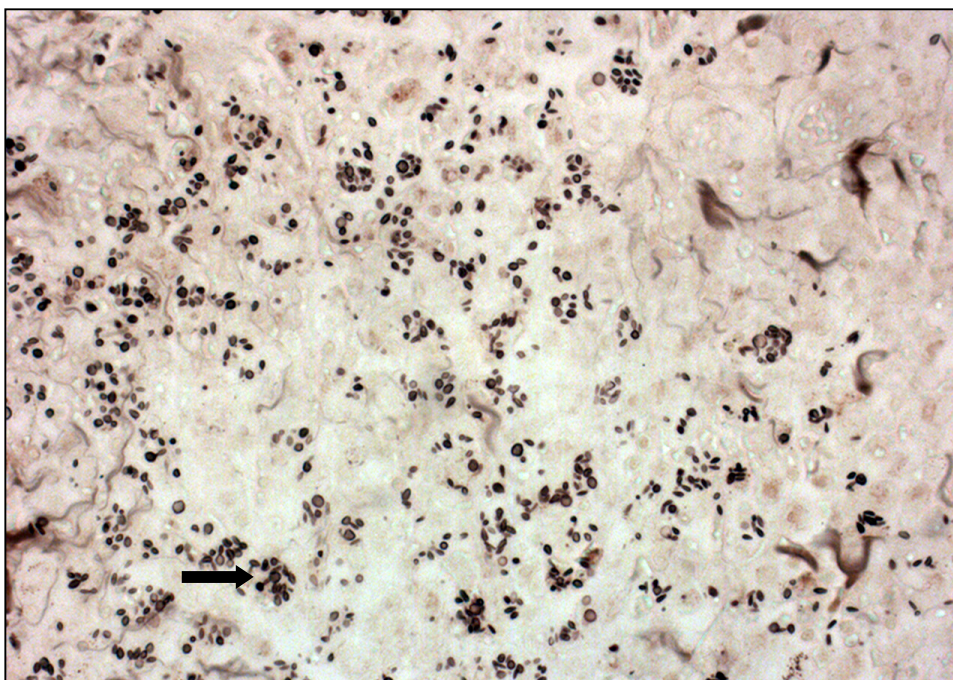
A presença de leveduras de *S. schenckii* foi observada em 38 (42,2%) casos, dos quais 37 foram caracterizadas por processo inflamatório granulomatoso supurativo e um por processo inflamatório crônico inespecífico.

A impregnação pela prata e a coloração pelo PAS revelaram leveduras em 38 e 17 casos, respectivamente, o que sugere uma sensibilidade superior do primeiro (42,2%) em relação ao segundo (18,9%). Aliado a isto, nenhum caso negativo na impregnação pela prata se mostrou positivo no PAS. Dos casos positivos (n=38), 57,9% apresentaram escassez de leveduras (no máximo 5 leveduras) e, em apenas 21,1% observou-se grande quantidade das leveduras (superior a 25 leveduras) nos cortes histológicos analisados (Figura 8).

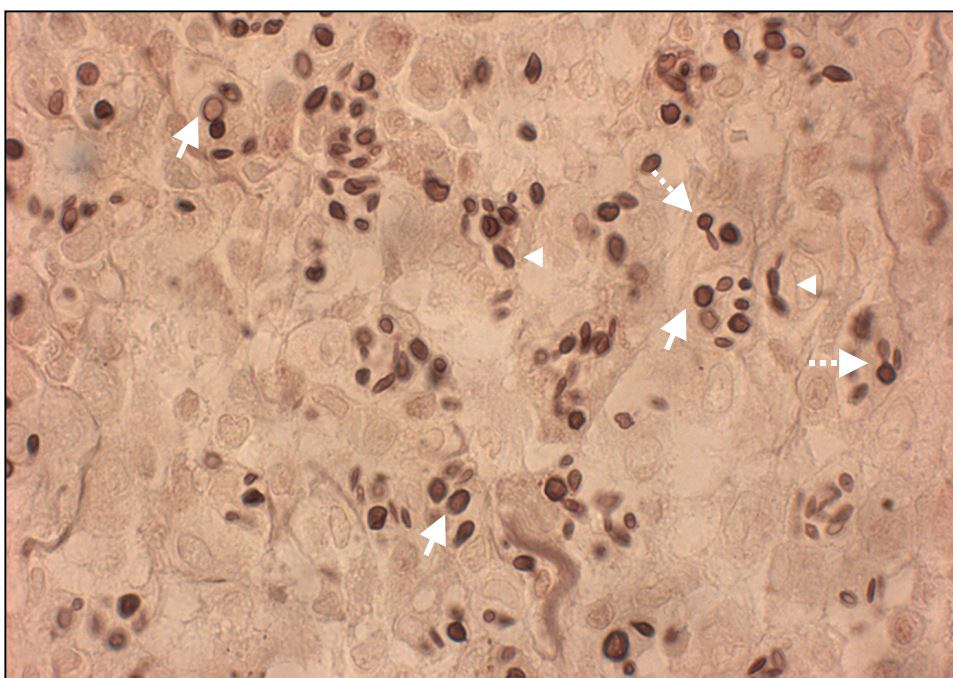
Em casos com intensidades acentuada (n=42) e discreta a moderada (n=38) de neutrófilos no interior do granuloma, a presença de leveduras foi detectada em, respectivamente, 52,4% e 36,8% dos casos. Dentre casos com grande quantidade de leveduras (n=8), sete exibiram granulomas com intensidade acentuada de neutrófilos no seu interior e sete apresentaram granulomas mal formados.

As leveduras encontradas apresentaram-se mais freqüentemente arredondadas ou ovaladas. Em lesões com grande quantidade de leveduras, observaram-se também as formas em charuto (Figuras 9 e 10). As leveduras se localizaram com freqüência no interior dos granulomas, em especial nas áreas de supuração.

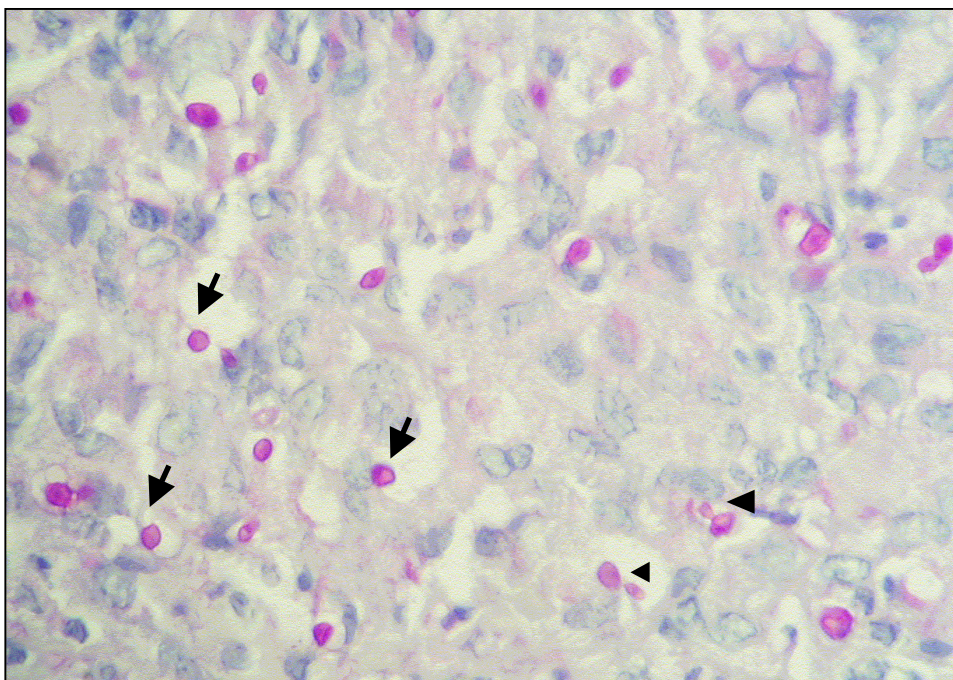
A presença de corpo asteróide não foi observada nos casos descritos em nenhuma das colorações estudadas.



**Figura 8** – Pele de cão. Esporotricose. Grande quantidade de leveduras de *S. schenckii*. Impregnação pela prata de Grocott. Objetiva de 40x.



**Figura 9** – Pele de cão. Esporotricose. Leveduras de *S. schenckii*. Formas arredondadas (setas), formas em charuto (cabeças de seta) e figuras de brotamento (setas pontilhadas). Impregnação pela prata de Grocott. Objetiva de 100x.



**Figura 10** – Pele de cão. Esporotricose. Leveduras de *S. schenckii*. Formas arredondadas (setas) e figuras de brotamento (cabeças de seta). PAS. Objetiva de 100x.

## 5.1.2 CÃES COM LTA

O estudo microscópico das 35 lesões cutâneas de LTA canina (Grupo II) revelou processo inflamatório granulomatoso supurativo em 26 (74,3%) casos e processo inflamatório inespecífico em 9 (25,7%).

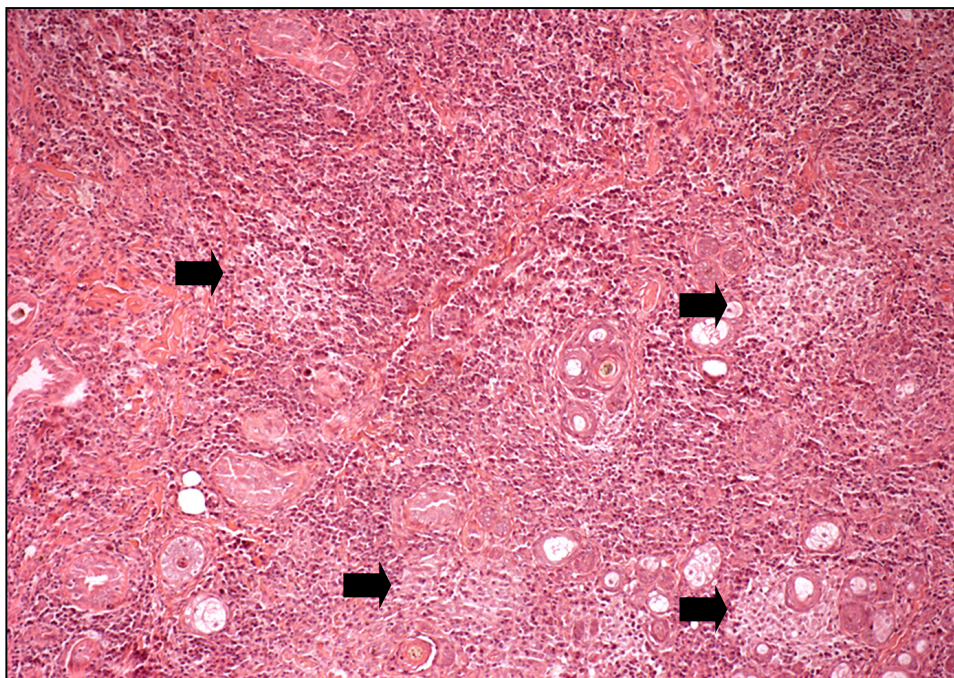
### 5.1.2.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO GRANULOMATOSO SUPURATIVO

Dentre as lesões de LTA estudadas, 26 se caracterizaram por processo inflamatório granulomatoso supurativo. Destas, 69,2% apresentaram granulomas

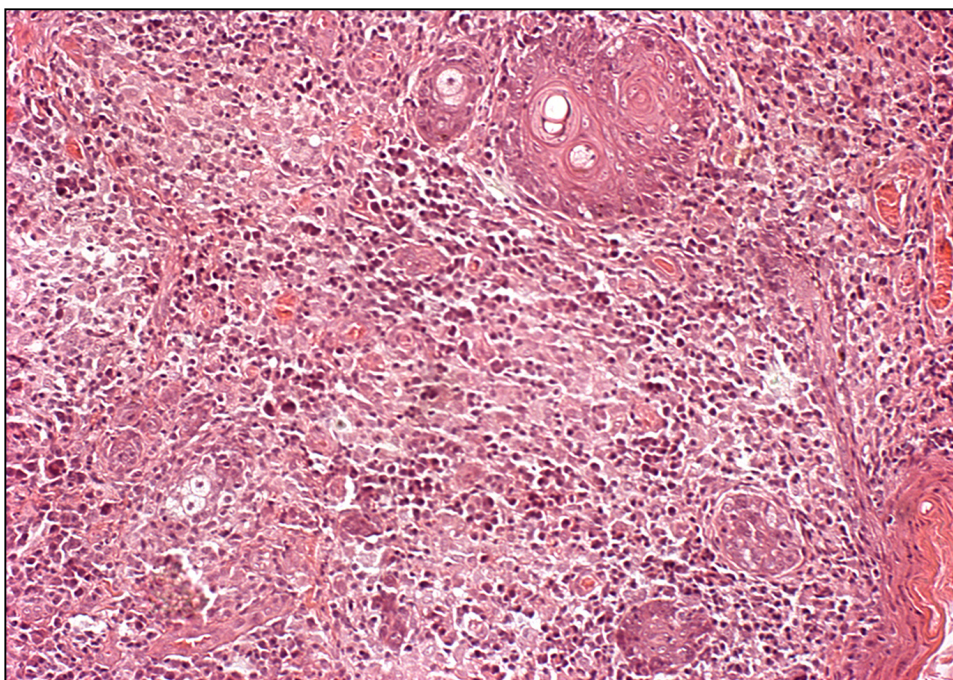
compostos predominantemente por células epitelióides e 30,8% apresentaram granulomas compostos predominantemente por macrófagos. Os granulomas mal formados foram observados em 96,2% dos casos (Figuras 11 e 12). Em relação à distribuição, este infiltrado apresentou-se difuso (Figura 13 e 14) em 61,5% dos casos e nodular em 38,5%.

Em 88,5% dos casos, observaram-se plasmócitos ao redor do infiltrado granulomatoso. Em apenas dois (7,7%) casos, os neutrófilos se apresentaram em intensidade acentuada no interior do granuloma.

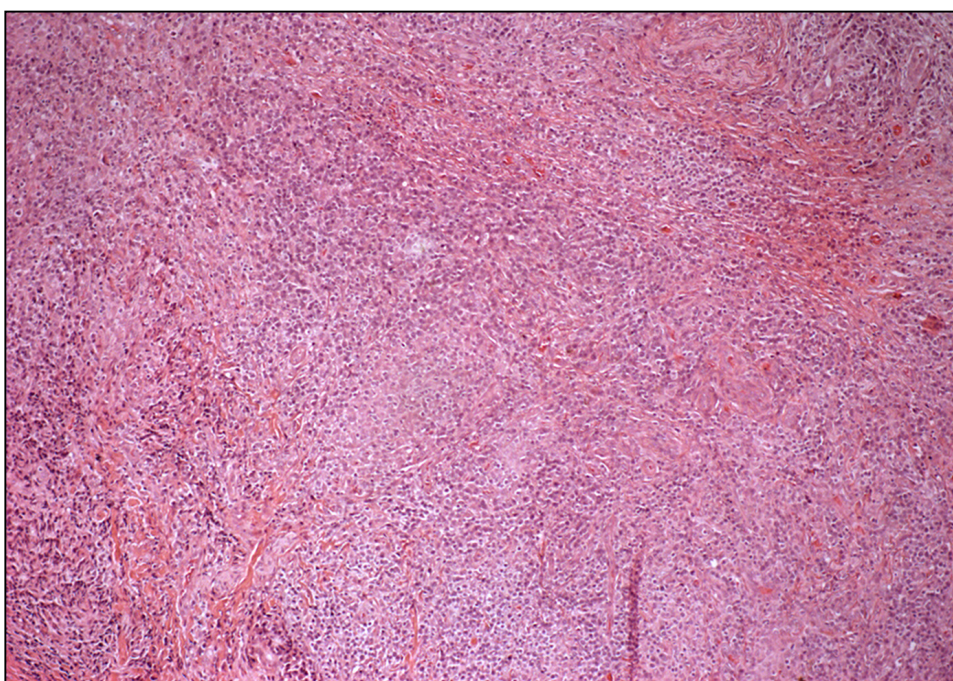
A presença de infiltrado não granulomatoso na periferia dos granulomas foi observada em 96,1% dos casos. A distribuição deste infiltrado foi difusa em 53,8% dos casos e perivascular, perifolicular e intersticial em 42,3%.



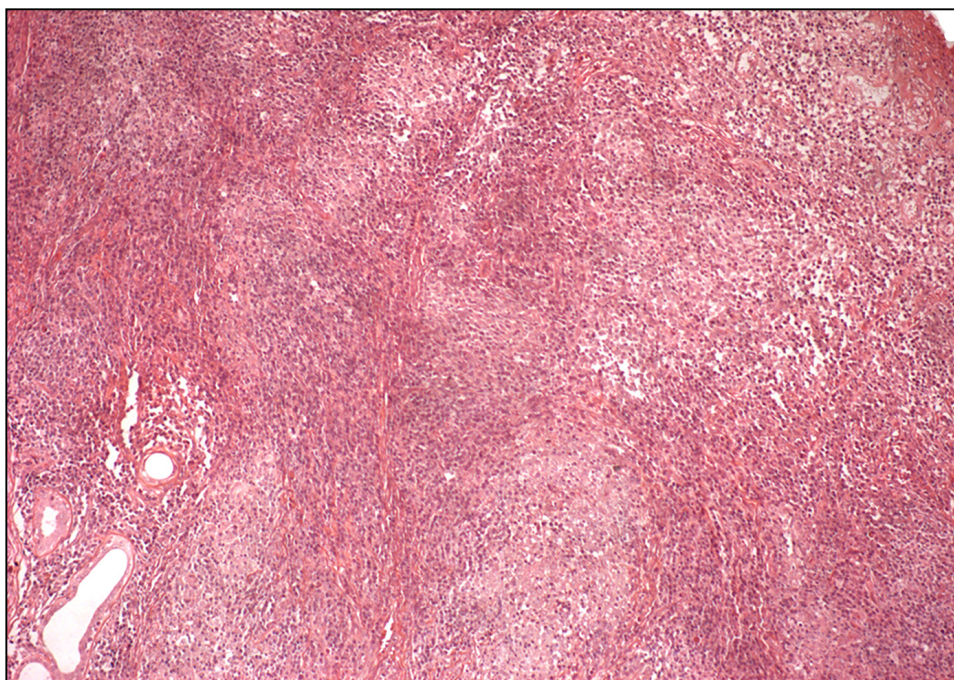
**Figura 11** – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Agregados de fagócitos mononucleares ativados (setas) dispersos em infiltrado inflamatório difuso. HE. Objetiva de 10x.



**Figura 12** – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Agregado de fagócitos monocleares dispersos em infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. HE. Objetiva de 20x.



**Figura 13** – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Infiltrado inflamatório granulomatoso difuso. HE. Objetiva de 10x.



**Figura 14** – Pele de cão. LTA. Granuloma mal formado. Infiltrado inflamatório granulomatoso difuso. HE. Objetiva de 10x.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a intensidade de cada tipo celular e a diferenciação predominante do granuloma, conforme ilustrado na tabela 2.

Em relação aos demais achados, a presença de ulceração foi observada em 53,8% dos casos e, em 26,9% dos casos, a epiderme encontrava-se hiperplásica.

As lesões granulomatosas supurativas de esporotricose e de LTA foram comparadas por meio da análise da OR e de seu intervalo de confiança para as diferentes variáveis estudadas. A tabela 3 compara as principais características microscópicas observadas nos infiltrados inflamatórios das lesões de esporotricose e LTA.

**Tabela 2.** Distribuição da intensidade de cada tipo celular presente no infiltrado inflamatório de acordo com o grau de diferenciação dos granulomas supurativos em lesões de LTA canina.

Tipo celular	Intensidade	Diferenciação predominante dos fagócitos mononucleares do granuloma		p-valor* (teste exato de Fisher)
		Macrófagos	Células epitelióides	
		%	%	
NIG (N=26)	Ausente	-	-	0,592
	Discreta a Moderada	87,5	94,4	
	Acentuada	12,5	5,6	
PRG (N=26)	Ausente	12,5	11,1	0,835
	Discreta a moderada	37,5	55,6	
	Acentuada	50,0	33,3	
PPL (N=26)	Ausente	0,0	5,6	1,000
	Discreta a moderada	25,0	16,7	
	Acentuada	75,0	77,7	
LPL (N=26)	Ausente	0,0	5,6	1,000
	Discreta a moderada	50,0	50,0	
	Acentuada	50,0	44,4	
NPL (N=26)	Ausente	12,5	44,4	0,169
	Discreta a moderada	75,0	55,6	
	Acentuada	12,5	0,0	
MPL (N=26)	Ausente	37,5	27,7	0,308
	Discreta a moderada	25,0	55,6	
	Acentuada	37,5	16,7	

Nota: NIG: Neutrófilos no interior do granuloma; PRG: Plasmócitos ao redor do granuloma; PPL: Plasmócitos na periferia da lesão; LPL: Linfócitos na periferia da lesão; NPL: Neutrófilos na periferia da lesão; MPL: Macrófagos na periferia da lesão.

\*p-valor <0,05 na indicação de significância estatística.



**Tabela 3.** Impacto das principais características microscópicas dos infiltrados inflamatórios de lesões cutâneas no diagnóstico histopatológico da esporotricose e da LTA em cães

Variável	Categoria	Esporotricose n (%)	LTA n (%)	Razão de chances (OR)	Intervalo de confiança OR (95%)
Organização do granuloma	Bem formado	30 (37,5)	1 (3,8)	<b>15,00</b>	<b>1,93– 116,45</b>
	Mal formado	50 (62,5)	25 (96,2)		
Diferenciação predominante de células do SMF no granuloma	Macrófagos	21 (26,3)	8 (30,8)	0,80	0,30 – 2,11
	Células epitelióides	59 (73,7)	18 (69,3)		
Intensidade do infiltrado de NIG	Acentuada	42(52,5)	2 (7,7)	<b>13,26</b>	<b>2,94 – 59,90</b>
	Discreta a moderada	38 (47,5)	24 (92,3)		
PRG	Ausente	8 (10)	3 (11,5)	0,85	0,21 – 3,50
	Presente	72 (90)	23 (88,5)		
PPL	Ausente	13 (16,3)	1 (3,8)	3,85	0,60 – 39,03
	Presente	67 (83,7)	25 (96,2)		
LPL	Ausente	24 (30)	1 (3,8)	<b>9,71</b>	<b>1,37 – 83,66</b>
	Presente	56 (70)	25 (96,2)		
NPL	Ausente	43 (53,7)	9 (34,6)	1,2	0,88 – 5,51
	Presente	37 (43,3)	17 (65,4)		
MPL	Ausente	58 (72,5)	8 (30,8)	<b>4,93</b>	<b>2,26 – 15,60</b>
	Presente	22 (27,5)	18 (69,2)		
Distribuição do IPL	Perivascular, Perifolicular e intersticial	56 (70)	11 (42,3)	<b>5,48</b>	<b>2,33 – 17,98</b>
	Difusa	11 (13,8)	14 (53,7)		

Nota: NIG: Neutrófilos no interior do granuloma; PRG: Plasmócitos ao redor do granuloma; PPL: Plasmócitos na periferia da lesão; LPL: Linfócitos na periferia da lesão; NPL: Neutrófilos na periferia da lesão; MPL: Macrófagos na periferia da lesão; IPL: Infiltrado na periferia da lesão.

De acordo com a tabela 3, ao exame histopatológico, lesões com presença de granulomas bem formados apresentaram chance 15 vezes maior de serem diagnosticadas como esporotricose do que como LTA em relação às aquelas com granulomas mal formados. Adicionalmente, observou-se que a intensidade acentuada do infiltrado de neutrófilos no interior dos granulomas elevou a chance do diagnóstico de esporotricose em 13,26 vezes em relação à LTA quando comparada a lesões com intensidade discreta a moderada de neutrófilos. Em contrapartida, a presença de linfócitos e de macrófagos no infiltrado periférico à lesão granulomatosa elevou em 9,71 e 4,93 vezes, respectivamente, a chance do diagnóstico de LTA em cães em relação à esporotricose quando comparado às lesões em que estes tipos celulares estiveram ausentes. Em relação à distribuição, lesões com infiltrado inflamatório periférico perivascular, perifolicular e intersticial apresentaram chance 5,48 vezes maior de serem diagnosticadas como esporotricose do que como LTA em relação às lesões com infiltrado inflamatório periférico de distribuição difusa.

### **5.1.2.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO INESPECÍFICO**

Em nove casos, o processo inflamatório observado foi inespecífico. A distribuição do infiltrado foi perivascular, perifolicular e intersticial em seis casos e difusa em três. Os plasmócitos estiveram presentes em todos os casos, os linfócitos em oito, os neutrófilos em quatro e os macrófagos em seis casos.

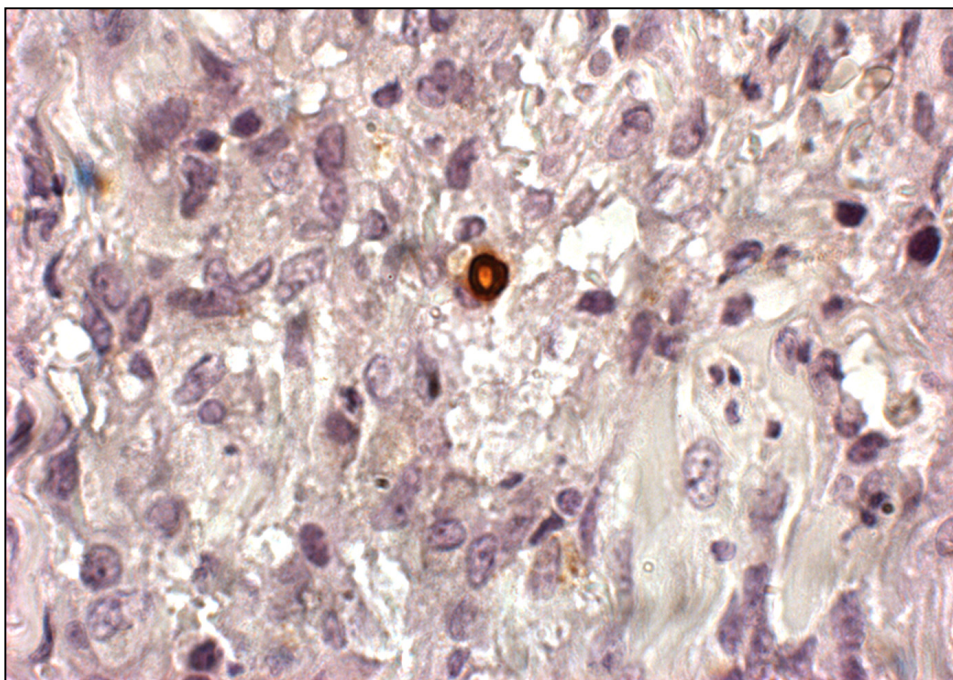
As presenças de edema e de ulceração foram detectadas cada uma em um caso.

## **5.2 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- *S. SCHENCKII***

### **5.2.1 REAÇÕES COM CONTROLES POSITIVOS**

Para a padronização do protocolo de IHQ para marcação de leveduras de *S. schenckii*, foram realizadas 12 reações utilizando apenas cortes histológicos de controles positivos.

A marcação de leveduras foi obtida com o soro anti-*S.schenckii* em todas as concentrações utilizadas (1:300, 1:600, 1:800, 1:1200, 1:1600, 1:2000, 1:2400, 1:4000 e 1:8000). As leveduras marcadas apresentaram a parede fortemente acastanhada em relação ao seu interior (Figura 15). Por vezes, nas áreas inflamatórias, fragmentos de leveduras fortemente marcados foram observados.



**Figura 15** – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii*. Parede fúngica fortemente marcada em relação ao citoplasma. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 100x.

Na incubação com o soro imune, a marcação de antígenos de *S. schenckii* foi verificada pela presença de grânulos castanhos, ora mais grosseiros, ora mais refinados no citoplasma de células fagocitárias. Na incubação com o soro normal de coelho, as marcações de leveduras e antígenos não foram observadas.

Em relação à recuperação antigênica, a marcação de leveduras foi obtida mesmo na supressão desta etapa. Em contrapartida, a marcação no citoplasma de células fagocitárias foi excessiva nas reações em que a recuperação antigênica foi utilizada quando comparada àquelas em que foi suprimida, prejudicando o contraste entre as leveduras e o tecido. Desta forma, no protocolo utilizado nas reações seguintes, a recuperação antigênica não foi realizada.

A incubação com o soro primário anti-*S.schenckii* demonstrou redução na marcação celular sem perda da marcação do agente até a concentração de 1:4000.

Nas reações utilizando a concentração de 1:8000, as leveduras exibiram marcação ligeiramente mais fraca.

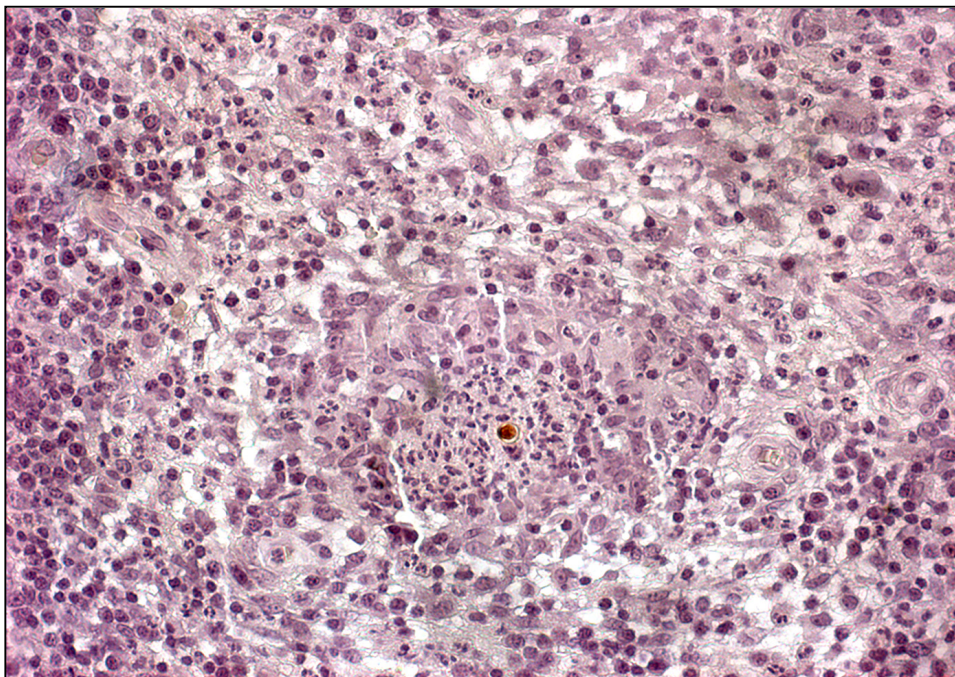
A incubação com o soro normal de coelho demonstrou discreta marcação inespecífica no tecido até a concentração de 1:2400. Nas reações utilizando BSA em substituição ao soro primário, nenhuma marcação foi observada.

De acordo com estes resultados, a concentração considerada ótima para as reações seguintes foi a de 1:4000, pois permitiu boa marcação de fungos e seus antígenos fagocitados sem perda de contraste com o tecido.

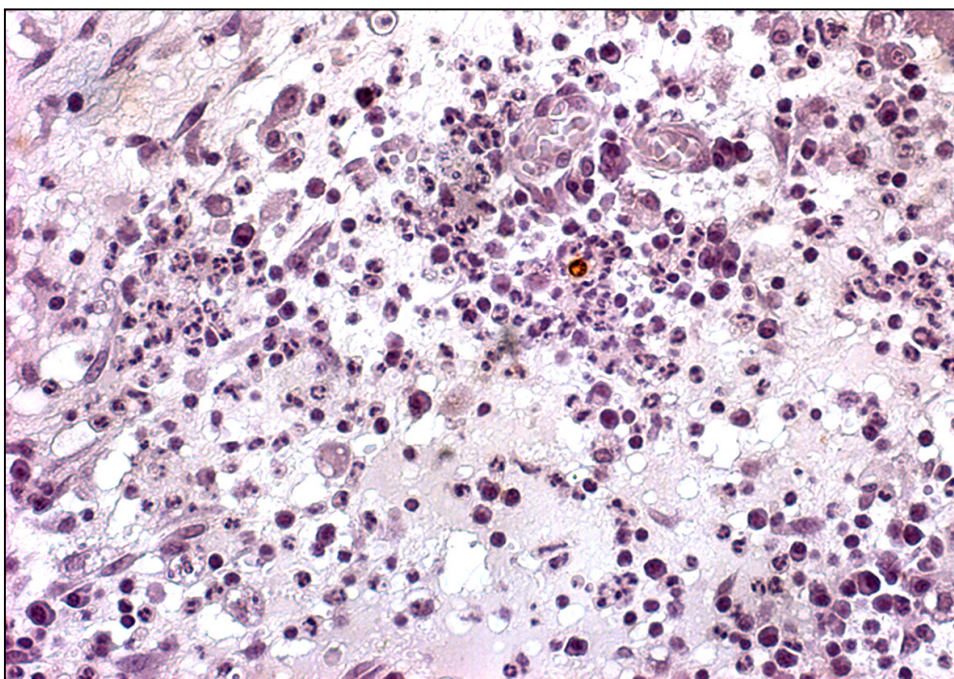
### **5.2.2 REAÇÕES COM CASOS DO GRUPO I E DO GRUPO II**

Dentre as 90 amostras estudadas no grupo I, 87 foram submetidas à análise imuno-histoquímica. As três lesões restantes não puderam ser utilizadas devido ao desgaste do bloco de parafina.

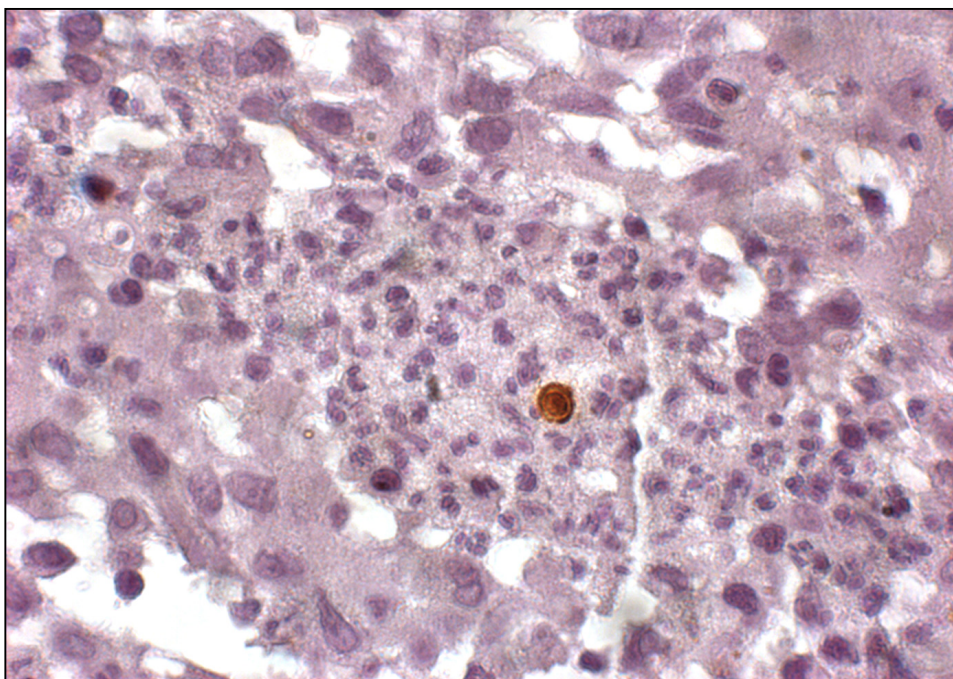
A detecção de leveduras (Figuras 16 a 18) por meio da técnica de IHQ utilizando soro policlonal de coelho anti- *S. schenckii* foi verificada em 57 (65,5%) lesões dentre as 87 estudadas. A presença de antígenos intracelulares (Figuras 19 e 20) foi observada em 24 (27,6%) casos. Na incubação com o soro normal de coelhos, nenhum tipo de marcação foi observado.



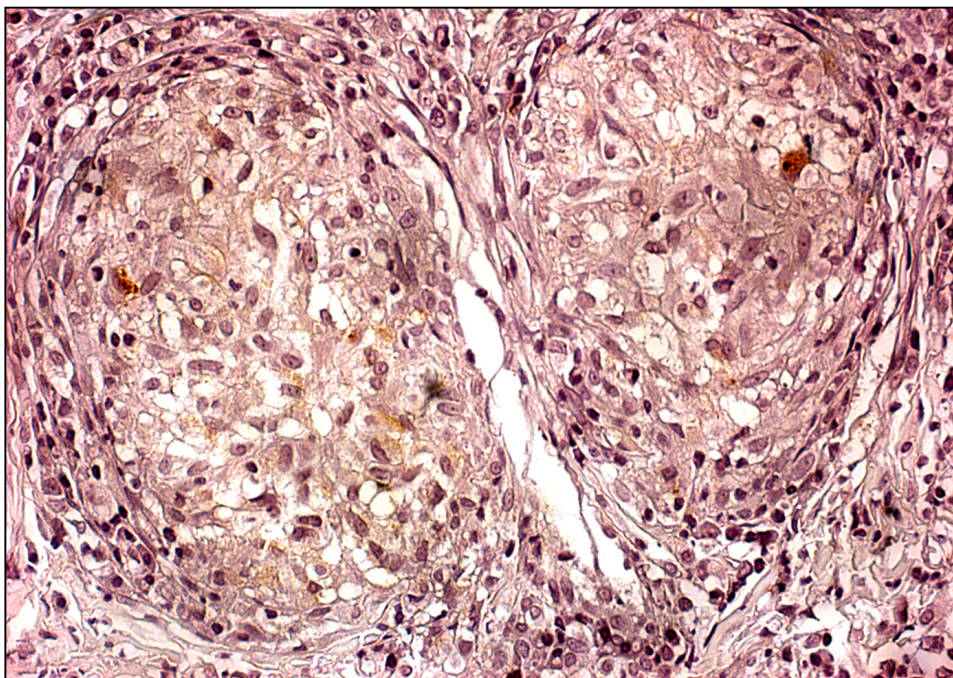
**Figura 16** – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii* no centro de um granuloma supurativo. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 40x.



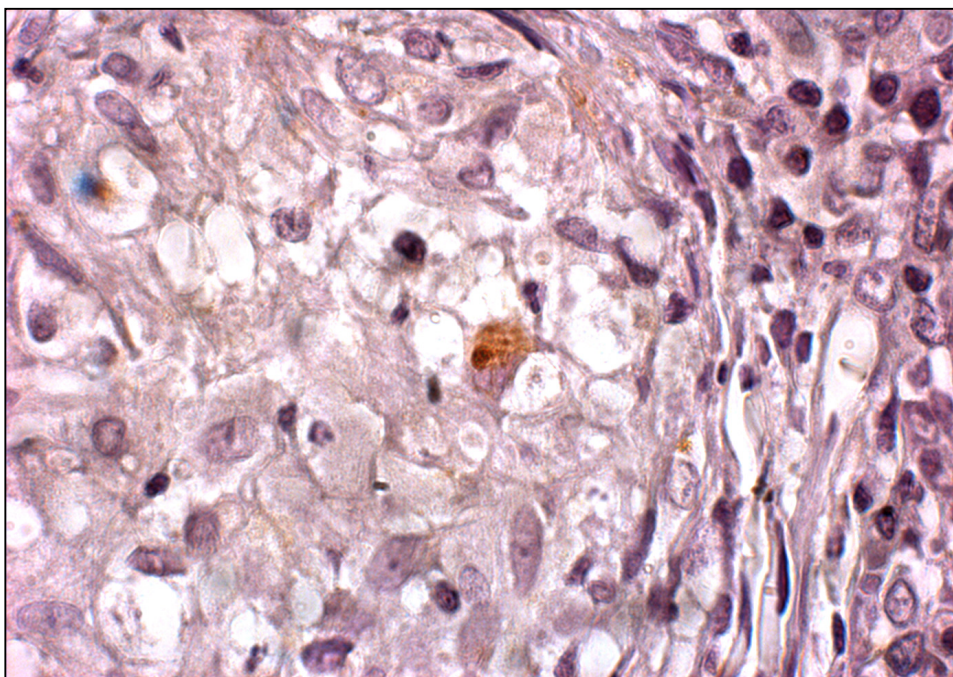
**Figura 17** – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii* no interior de um micro-abscesso. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 40x.



**Figura 18** – Pele de cão. Esporotricose. Levedura de *S. schenckii* no interior de um granuloma supurativo. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 100x



**Figura 19** – Pele de cão. Esporotricose. Antígenos intracelulares de *S. schenckii* no interior do granuloma. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 40x.



**Figura 20** – Pele de cão. Esporotricose. Antígenos de *S. schenckii* no interior de um fagócito mononuclear ativado. IHQ anti-*S. schenckii* 1:4000. Objetiva de 100x.

Em relação aos 87 casos analisados, a IHQ mostrou-se mais sensível para detecção de leveduras em relação à impregnação pela prata e à coloração pelo PAS, que detectaram leveduras em, respectivamente, 38 (43,7%) e 17 casos (19,5%).

Dentre os casos em que não foram observadas leveduras pela IHQ, oito foram positivos na impregnação pela prata.

Dentre os casos em que não foram detectadas leveduras pela impregnação pela prata e pela IHQ, cinco apresentaram antígenos intracelulares por meio da IHQ.

A aplicação paralela das técnicas de IHQ, considerando a detecção de antígenos e de leveduras de *S. schenckii*, e da impregnação pela prata elevou a sensibilidade do método histológico a 80,5%.



A tabela 4 ilustra os valores de sensibilidade de cada método isoladamente e dos métodos em associação.

**Tabela 4.** Valores de sensibilidades dos diferentes métodos utilizados, isolados e em associação, para diagnóstico de esporotricose canina.

<b>Método (s)</b>	<b>Sensibilidade (n=87)</b>
<b>PAS</b>	19,5%
<b>Impregnação pela prata de Grocott</b>	43,7%
<b>IHQ (Lev)</b>	65,5%
<b>IHQ (Lev + Ag)</b>	73,6%
<b>IHQ (Lev) + Impregnação pela prata de Grocott</b>	74,7%
<b>IHQ (Lev + Ag) + Impregnação pela prata de Grocott</b>	80,5%

Lev: leveduras; Ag: antígenos.

A diferença entre as sensibilidades da impregnação pela prata de Grocott e o PÁS mostrou-se estatisticamente significativa. A utilização da IHQ garantiu sensibilidade estaticamente significativa quando comparada às técnicas histoquímicas de coloração. A associação entre a IHQ, considerando detecção de leveduras e antígenos, e a impregnação pela prata de Grocott demonstrou diferença significativa em relação a todos os métodos, isolados ou em associação.

A tabela 5 ilustra os valores obtidos a partir do teste de McNemar para verificar diferença entre as sensibilidades de cada método isolado ou em associação.

**Tabela 5.** Comparação entre as sensibilidades dos diferentes métodos, isolados ou em associação.

<b>Métodos</b>	<b>Teste de McNemar ( p-valor*)</b>
<b>Impregnação pela prata de Grocott X PAS</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Impregnação pela prata de Grocott X IHQ(Lev)</b>	<b>0,002</b>
<b>PAS X IHQ(Lev)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Impregnação pela prata de Grocott X IHQ(Lev + Ag)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>PAS X IHQ(Lev+Ag)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IHQ(Lev) X IHQ(Lev+Ag)</b>	<b>0,016</b>
<b>Impregnação pela prata de Grocott X IHQ(Lev)+Impregnação pela prata de Grocott)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IHQ(Lev) X IHQ(Lev)+Impregnação pela prata de Grocott</b>	<b>0,008</b>
<b>Impregnação pela prata de Grocott X IHQ(Lev+Ag)+Impregnação pela prata de Grocott</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IHQ(Lev) X IHQ(Lev+Ag)+Impregnação pela prata de Grocott</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Lev: leveduras; Ag: antígenos.

\*p-valor <0,05 na indicação de significância estatística.

Em relação à concordância entre as três técnicas, foram detectados baixos graus de concordância (discreta e regular) na comparação da técnica de IHQ com as técnicas do PAS e impregnação pela prata. Isto parece relacionado aos baixos percentuais de concordância positiva observados, resultantes da maior sensibilidade da IHQ em relação às demais técnicas.

A tabela 6 compara a concordância entre os diferentes métodos e ilustra os percentuais de concordâncias positiva e negativa entre eles.

**Tabela 6.** Concordância entre os diferentes métodos, segundo o grau de concordância (Valor Kappa) e percentuais de concordâncias positiva e negativa.

Métodos	Grau de concordância (Valor Kappa)	Classificação do grau de concordância	Percentual de concordância positiva	Percentual de concordância negativa
Impregnação pela prata de Grocott X PAS	0,48	Moderada	19,54%	56,32%
Impregnação pela prata de Grocott X IHQ(Lev)	0,23	Regular	34,48%	25,29%
PAS X IHQ(Lev)	0,19	Discreta	18,39%	33,33%
Impregnação pela prata de Grocott X IHQ(Lev + Ag)	0,18	Discreta	36,78%	19,54%
PAS X IHQ(Lev+Ag)	0,16	Discreta	19,54%	26,44%

Lev: leveduras; Ag: antígenos.

Em relação ao grupo II, a ocorrência de reações cruzadas com formas amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* ou com seus antígenos não foi verificada neste estudo quando a técnica de IHQ descrita foi aplicada em 35 lesões de LTA canina.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigadas as alterações histopatológicas de um número elevado de casos de esporotricose em cães, com o objetivo de conhecer suas principais características microscópicas e delinear um quadro histológico sugestivo da doença. As lesões de esporotricose canina foram caracterizadas microscopicamente por processos granulomatosos supurativos, semelhante ao descrito em humanos (Lurie, 1963). A ausência de alterações histopatológicas em quatro casos provavelmente reflete a obtenção de um fragmento não representativo da lesão ou o desgaste do bloco de parafina, uma vez que, clinicamente, todos os casos incluídos no estudo apresentavam lesões ativas.

Os granulomas observados nos casos de esporotricose canina deste estudo apresentavam-se geralmente com focos de neutrófilos em seu interior e infiltrado de plasmócitos ao seu redor, como havia descrito Lurie (1963) para o granuloma esporotricótico em seres humanos. A presença de células gigantes, considerada comum por muitos autores (Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964; Gadelha & Talhari, 1982; Mohri, 1987) no granuloma da esporotricose em humanos, não se mostrou freqüente na doença canina. Achados semelhantes foram observados por Pinkus & Grekin (1950) em seu relato de caso humano. Em estudo experimental em camundongos, Hiruma e colaboradores (1988) também detectaram raras células gigantes nas lesões descritas.

A hiperplasia pseudoepiteliomatosa, descrita com freqüência na doença humana (Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964), não foi observada entre os casos estudados. Os microabscessos intraepiteliais, também considerados comuns em seres humanos (Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964), estiveram presentes em poucos casos estudados, indicando que as duas características não são comuns nas lesões de esporotricose canina. Entretanto, estes achados não são específicos da esporotricose e, mais uma vez, podem ocorrer em lesões causadas por outros fungos (Schwarz, 1982).

A presença freqüente de infiltrado inflamatório periférico à lesão, detectado nos casos de cães aqui apresentados é relatada por outros autores em humanos (Moore & Ackerman, 1946; Pinkus & Grekin, 1950; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964; Gadelha & Talhari, 1982), sendo os plasmócitos o tipo celular mais encontrado, geralmente com distribuição perivascular, perifolicular e intersticial. O infiltrado liquenóide, geralmente relacionado a doenças inflamatórias não infecciosas da pele (Gross et al., 1992), foi detectado em poucos casos, sempre associado aos infiltrados perivascular, perifolicular e intersticial, de modo que foi considerado um achado morfológico fortuito.

De acordo com trabalhos experimentais no homem e em camundongos, as lesões de esporotricose evoluem primeiramente com formação de abscessos e com quantidade elevada de leveduras. A seguir, as quantidades de leveduras e de neutrófilos parecem diminuir com a chegada de células do SMF, sua ativação e posterior diferenciação em células epitelióides, acompanhada do aumento das quantidades de linfócitos e de plasmócitos (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Pen-Cheng et al., 1993). Observações semelhantes acerca da formação de granulomas

foram descritas também em estudos experimentais utilizando *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (Adams, 1974, 1976).

A presença de plasmócitos envolvendo os granulomas nos casos estudados ocorreu em maior percentual em granulomas com predomínio de células epitelióides do que de macrófagos ativados, o que pode ser relacionado ao tempo de evolução, como observado por outros autores (Adams, 1974; Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Pen-Cheng et al., 1993). Adicionalmente, a diferença detectada entre a presença de neutrófilos em granulomas com macrófagos ativados e granulomas com células epitelióides foi significativa, sugerindo que, na esporotricose canina, os granulomas menos diferenciados, com predomínio de macrófagos ativados, são encontrados em fases mais agudas, dando lugar a seguir, a granulomas mais maduros, formados por células epitelióides, como observado em estudos experimentais com outros patógenos (Adams, 1974).

Assim, de acordo com os resultados obtidos da análise histopatológica aqui descrita, lesões cutâneas exibindo granulomas supurativos envolvidos por plasmócitos, associados a infiltrado periférico essencialmente plasmocitário, são um achado característico da esporotricose em cães, semelhante ao descrito no homem (Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964).

Entretanto, conforme mencionado, estes resultados, embora freqüentes, não devem ser considerados específicos, uma vez que a presença de processos granulomatosos supurativos foi descrita também em lesões cutâneas de LTA, de outras enfermidades fúngicas e de outras etiologias no cão e em seres humanos (Baker, 1947; Schwarz, 1982; Narisawa et al., 1989; Hirsh & Johnson, 1992; Welsh, 2003; Barros et al., 2005; Schubach et al. 2006; Santos et al., 2007a; Santos et al., 2007b).

De fato, de acordo com os resultados obtidos nos cães deste estudo, as lesões cutâneas de esporotricose e LTA são caracteristicamente granulomatosas supurativas. Contudo, a análise microscópica sistemática detalhada das lesões destes cães revelou que, embora o diagnóstico definitivo dependa da demonstração do agente etiológico, o exame histopatológico pode fornecer elementos que fortaleçam uma suspeita clínica e direcionem o diagnóstico. Nos casos estudados, os granulomas supurativos bem formados e ricos em neutrófilos elevaram a chance do diagnóstico de esporotricose em cães. Em contrapartida, lesões caracterizadas por granulomas mal formados e presença de linfócitos e macrófagos no infiltrado inflamatório periférico favoreceram o diagnóstico da LTA canina. Aliado a isto, os infiltrados periféricos de distribuição difusa estiveram associados principalmente a lesões de LTA, e os de distribuição perivascular, perifolicular e intersticial a lesões de esporotricose. Deve-se ressaltar que, em muitos casos, caracteristicamente, a presença freqüente de granulomas mal delimitados e de macrófagos no infiltrado periférico nos casos das lesões granulomatosas de LTA canina tornou imprecisos os limites entre os infiltrados granulomatosos e os não granulomatosos.

Estes resultados sugerem que, a partir de um quadro histopatológico sugestivo e de informações clínicas e epidemiológicas compatíveis, uma suspeita diagnóstica pode ser fortalecida, facilitando a busca do agente em cortes histológicos. Caso a suspeita favoreça o diagnóstico de LTA canina, a demonstração do parasita por meio do encontro de formas amastigotas nos cortes histológicos pode definir o diagnóstico, mas requer profissionais com experiência na visualização do agente, em especial em áreas onde a LTA e a esporotricose se sobrepõem, pois as formas amastigotas e as leveduras de *S. schenckii* apresentam características morfológicas semelhantes

(Barros et al., 2005; Schubach et al., 2006). Em casos de suspeita fúngica, as técnicas especiais de coloração podem ser solicitadas, mas, conforme mencionado anteriormente, a detecção de *S. schenckii* em cortes histológicos é considerada difícil para a esporotricose no homem e no cão devido à escassez de leveduras em suas lesões (Moraes & Miranda, 1964; Schwarz, 1982; Barros et al., 2005; Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a).

Entretanto, a presença do agente em grande quantidade em cortes histológicos pode eventualmente ocorrer, conforme observado em alguns cães deste estudo. Achados semelhantes foram descritos por outros autores em lesões de esporotricose canina (Migliano et al., 1963; Bernstein et al., 2007) e humana (Gadelha & Talhari, 1982). As lesões de esporotricose canina ricas em fungo, observadas geralmente em formas mais graves da doença, parecem ser relacionadas a diversos fatores, como a presença de doenças concomitantes, desnutrição e uso de drogas imunossupressoras como corticosteróides (Schubach et al., 2006; Bernstein et al., 2007; Cafarchia et al., 2007).

Alguns estudos revelam que o número de estruturas fúngicas é maior inicialmente, tendendo a diminuir com a formação e amadurecimento dos granulomas (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Peng-Cheng et al., 1993). No presente estudo, observou-se que a maioria das lesões exibindo quantidade elevada de leveduras acompanhava granulomas mal formados e ricos em neutrófilos, o que é compatível com lesões pouco maduras, de acordo com achados experimentais, sugerindo que a realização precoce do exame pode aumentar a possibilidade do encontro do agente. (Adams, 1974; Mohri, 1987; Hiruma et al., 1988; Peng-Cheng et al., 1993). Moraes & Miranda (1964) também observaram maior positividade em casos de granulomas com



intensidade acentuada de neutrófilos, concordando com os resultados encontrados para os cães deste estudo.

De acordo com Moraes & Miranda (1964) e com os casos descritos neste estudo, as leveduras de *S. schenckii* estão localizadas, em geral, no centro dos granulomas supurativos, no interior dos microabscessos, o que facilita a pesquisa do agente em lesões com suspeita de esporotricose.

A análise de quatro cortes de cada caso pelas técnicas especiais de histoquímica proporcionou sensibilidade satisfatória aos resultados, uma vez que a maioria dos trabalhos descreve positividade para leveduras obtida pelo método histológico inferior a 30% (Moraes & Miranda, 1964; Marques et al., 1992; Barros et al., 2005; Schubach et al. 2006; Santos et al. 2007a). Dentre as técnicas especiais utilizadas para pesquisa de elementos fúngicos, a impregnação pela prata de Grocott demonstrou maior sensibilidade em relação à coloração pelo PAS, resultados também descritos por Marques e colaboradores (1992) e Moskowitz e colaboradores (1986) em humanos.

O encontro de corpos asteróides de *S. schenckii* é considerado freqüente por muitos autores (Pinkus & Grekin, 1942; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964), mas, à semelhança do que ocorreu no presente estudo, outros não descreveram este achado em casos de esporotricose (Gadelha & Talhari, 1982). Segundo Pinkus & Grekin (1950), devido às dimensões desta estrutura, é improvável que passe despercebida à análise das lesões.

No presente estudo, a utilização do método imuno-histoquímico (65,5%) proporcionou sensibilidade superior em relação a impregnação pela prata (43,7%) e ao PAS (19,5%) para a detecção de leveduras em lesões de esporotricose canina, sendo

a diferença entre as sensibilidades significativa. Resultados semelhantes foram descritos por Marques e colaboradores (1992). Moskowitz e colaboradores (1986) não observaram diferença de sensibilidade entre a impregnação pela prata e a IHQ, mas ressaltaram a presença freqüente de artefatos na coloração especial que podem ser confundidos com estruturas fúngicas especialmente quando estas são raras no tecido. As leveduras de *S. schenckii*, mesmo em quantidade escassa, são de fácil visualização pela IHQ, uma vez que assumem uma marcação castanha, contrastando com o fundo tecidual (Moskowitz et al., 1986; Marques et al., 1992).

Marques e colaboradores (1992), ao compararem o método imuno-histoquímico com as técnicas especiais de coloração para o diagnóstico de esporotricose em humanos, encontraram sensibilidade aumentada na combinação das técnicas. No presente estudo, oito casos positivos pela impregnação pela prata de Grocott foram negativos pela IHQ e a associação entre as técnicas promoveu uma sensibilidade significativa em relação à IHQ isoladamente. Isto sugere que a aplicação paralela da IHQ e das demais técnicas histológicas para detecção de fungos pode incrementar o diagnóstico da esporotricose, com a vantagem da especificidade garantida pelo método imunológico aos resultados.

A detecção de antígenos de *S. schenckii* nas lesões de esporotricose canina foi freqüente neste estudo e elevou a sensibilidade da IHQ para 73,6%. Desta forma, a associação da IHQ, considerando a detecção de leveduras e de antígenos, à impregnação pela prata de Grocott garantiu ao diagnóstico histológico uma sensibilidade de 80,5%. Em relação aos resultados observados em todos os métodos utilizados, isolados ou em associação, esta sensibilidade foi estatisticamente significativa, o que reforça a aplicação dos métodos em associação para elevar a

eficácia do diagnóstico histológico. Marques e colaboradores (1992) descreveram achados semelhantes, obtendo elevada sensibilidade para o diagnóstico da esporotricose pelos métodos histológicos, considerando a detecção de antígenos e de leveduras de *S. schenckii* pela IHQ e enfatizaram a possível contribuição destes achados no estudo da distribuição dos antígenos de *S. schenckii* e da patogênese da doença. Rodríguez & Sarmiento (1998) também obtiveram a marcação de antígenos intracelulares por meio da IHQ em lesões de esporotricose humana e correlacionaram o achado à degradação do fungo pela fagocitose.

É importante, nestes casos, enfatizar a importância dos controles negativos em cada reação, utilizando BSA e substituindo o soro imune primário por soro normal, de modo a certificar-se de que as marcações observadas são específicas. As marcações de antígenos no citoplasma de células fagocitárias, freqüentes neste estudo, foram consideradas específicas, devido a sua ausência nos controles negativos.

O encontro de antígenos em lesões sugestivas de esporotricose pode ser útil em casos em que não sejam observadas leveduras íntegras por meio das colorações especiais (Marques et al. 1992). Contudo, o valor destes achados para o diagnóstico ainda deve ser discutido.

A ocorrência de reações cruzadas entre *S. schenckii* e *Leishmania* sp. é descrita com freqüência em testes sorológicos em seres humanos e cães (Reed et al., 1990; Barros et al., 2005; Santos et al., 2007a) e na IHQ utilizando soro anti-*Leishmania* sp. para detecção de formas amastigotas em seres humanos (Schubach et al., 2001c; Quintella, 2004). Em cães, Santos (2007b) não encontrou reações cruzadas aplicando soro anti-*Leishmania* sp em cortes histológicos de lesões de esporotricose canina.

Neste estudo, a utilização do soro anti- *S. schenckii* não revelou qualquer tipo de marcação em cortes histológicos de lesões de LTA canina. Estes resultados demonstram que o método imuno-histoquímico pode ser uma alternativa para a diferenciação entre esporotricose e a LTA em cães.

É importante salientar também que, devido a escassez de leveduras sugestivas na maioria dos casos aqui descritos, o exame de cortes seriados do mesmo fragmento poderia elevar consideravelmente a chance da detecção do agente em processos inflamatórios granulomatosos supurativos em qualquer uma das técnicas utilizadas. Outros autores relataram sensibilidade satisfatória dos métodos histológicos para detecção do agente com a pesquisa em múltiplos recortes (Moraes & Miranda, 1964; Itoh et al., 1986). Segundo Marques e colaboradores (1992), quanto maior a profundidade dos fragmentos cutâneos, maior a possibilidade de encontro do agente. Além disso, amostras de tecido muito pequenas não são suficientes para realização de cortes seriados.

Diante de quadros histopatológicos compatíveis com o descrito para esporotricose, as técnicas histológicas especiais devem ser utilizadas, uma vez que detectam adequadamente as estruturas fúngicas no tecido, sendo a impregnação pela prata de Grocott a mais eficaz. A IHQ é uma alternativa ao diagnóstico histológico, podendo ser combinada aos demais métodos, garantindo maiores sensibilidade e especificidade aos resultados. Entretanto, devido à quantidade, geralmente pequena, de leveduras nas lesões, ainda que o resultado permaneça inconcluso, a hipótese de esporotricose deve ser considerada, especialmente nas áreas em que a epidemia ocorre. Nestes casos, a correlação com dados epidemiológicos torna-se particularmente útil.

## 7. CONCLUSÕES

1. O exame histopatológico revelou que, embora as lesões de esporotricose e de LTA em cães se apresentassem caracteristicamente granulomatosas supurativas, observações acerca da organização dos granuloma e da frequência de cada tipo celular no infiltrado inflamatório podem contribuir para o direcionamento da suspeita diagnóstica.

2. As três técnicas utilizadas foram eficientes na detecção de leveduras de *S. schenckii* em cortes histológicos de lesões de esporotricose canina. A maioria dos cães com esporotricose apresentou escassez de leveduras em suas lesões.

3. Foram observados antígenos intracelulares de *S. schenckii* pela técnica de IHQ, mesmo em lesões com ausência de leveduras.

4. Dentre as técnicas histoquímicas estudadas, a impregnação pela prata de Grocott mostrou-se mais eficiente do que a coloração pelo PAS. A técnica de IHQ revelou maior sensibilidade quando comparada à impregnação pela prata de Grocott e à coloração pelo PAS.

5. Todos os casos positivos na coloração pelo PAS foram positivos na impregnação pela prata de Grocott e pela IHQ. A presença de casos positivos na impregnação pela prata de Grocott e negativos na IHQ demonstrou que a associação entre as duas técnicas pode elevar significativamente ( $p=0,008$ ) a sensibilidade do método histológico.

6. Não foram observadas reações cruzadas com *Leishmania* sp. pelo método imuno-histoquímico em cortes histológicos de lesões de LTA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Adams DO. The granulomatous inflammatory response – A review. Am J Pathol 1976; 84(1): 164-91.

Adams DO. The structure of mononuclear phagocytes differentiation in vivo – I. Sequential fine histological studies of the effect of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Am J Pathol 1974; 76(1): 17-39.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PCF, Peralta JM, Nosanchuk JD et al. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 244-9.

Baker RD. Tissue changes in fungous disease. Arch Pathol 1947; 44: 459-66.

Barros MBL, Schubach AO, do Valle ACF, Galhardo MCG, Schubach TMP, Conceição-Silva F et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. Acta Trop 2005; 93: 41-7.

Barros MBL, Schubach AO, do Valle ACF, Galhardo MCG, Conceição-Silva F, Schubach TMP et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. Clin Infect Dis 2004; 38: 529-35.

Barros MBL, Schubach TMP, Galhardo MCG, Schubach AO, Fialho-Monteiro PC, Reis RS et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 777-9.

Bernardes-Engemann AR, Costa RC, Miguens BR, Penha CV, Neves E, Pereira BA et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. Med Mycol 2005; 43(6): 487-93.

Bernstein JA, Cook HE, Gill AF, Ryan KA, Sirninger J. Cytologic diagnosis of generalized cutaneous sporotrichosis in a hunting hound. Vet Clin Pathol 2007; 36(1): 94-6.

Brown R, Weintraub D, Simpson M. Timber as a source of sporotrichosis infection. In: Sporotrichosis infection on the mines of the Witwatersrand. A symposium. The Transvaal Chamber of Mines, Johannesburg; 1947: 5-33.

Bustamante B, Campos PE. Endemic Sporotrichosis. Curr Opin Infect Dis 2001; 14: 145-9.

Campos P, Arenas R, Coronado H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol* 1994; 33(1): 38-41.

Carfachia C, Sasanelli MT, Lia RP, Caprariis D, Guillot J, Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case report. *Mycopathologia* 2007; 163: 75-9.

Carmichael JW. *Chrysosporium* and some others aleuriosporic hyphomycetes. *Can J Bot* 1962; 40: 1137-51.

Coelho KLR. Granulomas. In: Montenegro MR, Franco M, editores. *Patologia: Processos gerais*. 4 ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; 20: 37-46.

Cupollilo E, Grimaldi G, Momem HA. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995; 89: 17-23.

Da Rosa WD, Gezuele E, Calegari L, Goñi F. Asteroid body in sporotrichosis. Yeast viability and biological significance within the host immune response. *Medical Mycology* 2008; 46: 443-8.

Da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 451-9.

De Beurmann L, Gougerot H, Vaucher. Sporotrichose expérimentale du chat. *C R Soc Biol* 1909; 66: 338-40.

De Beurmann L, Gougerot H. Sporotrichoses tuberculoides. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)* 1907; 8: 497-544.

De Beurmann L, Ramond. Abcès sous-cutanés multiples d'origine mycosique. *Ann Dermatol Syphiligr* 1903; 4: 678-85.

Dion WM, Speckmann G. Canine otitis externa caused by the fungus *Sporothrix schenckii*. *Can Vet J* 1978; 19: 40-1.

Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(6): 1106-13.

Dunstan RW, Langham RF, Reinman KA, Wakenell OS. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 37-45.

Espinosa-Texis A, Hernández-Hernández F, Lavallo P, Barba-Rubio J, López-Martínez R. Estudio de 50 pacientes com esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. Gac Méd Méx 2001; 137(2): 111-6.

Farias M, Costa P, Franco S, Ferreira H. Esporotricose canina e felina. Cães e gatos 1997; 66: 30-8.

Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, Fujita MS, Rosa OS, Weckwerth AC et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cats scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. Int J Dermatol 2001; 40: 318-22.

Freitas DC, Moreno G, Saliba AM, Bottino JA, Mós EN. Esporotricose em cães e gatos. Rev Fac Med Vet S Paulo 1965; 7: 381-7.

Gadelha AR, Talhari S. Demonstração do *Sporothrix schenckii* em cortes histológicos. Med Cutan Ibero Lat Am 1982; 10: 355-60.

Genaro O. Leishmaniose Tegumentar. In: Neves DP, editor. Parasitologia Humana. 10 ed. Belo Horizonte: Atheneu; 2002.

Goad DL, Goad MEP. Osteoarticular sporotrichosis in a dog. J Am Vet Med Assoc 1986; 189(10): 1326-8.

Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ. Lichenoid (interface) diseases of the dermis. In: Veterinary dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease. St. Louis: Mosby-Year Book; 1992. p. 141-62.

Hektoen L, Perkins CF. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. J Exp Med 1900; 55: 77-89.

Hirsh BC, Johnson WC. Pathology of granulomatous diseases – Mixed inflammatory granulomas. Int J Dermatol 1984; 23: 585-97.

Hiruma M, Yamaji K, Shimizu H, Ohata H, Kukita A. Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. Arch Dermatol Res 1988; 280(Supl): 94-100.

Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, Lu SC, Kuo TT, Hong HS. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1414-8.

Hussein MR. Mucocutaneous Splendore-Hoeppli phenomenon. J Cutan Pathol 2008; 979-88.

Itoh M, Okamoto S, Kariya H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. Dermatologica 1986; 172: 209-13.

Kanbe T, Natsume L, Goto I, Kawasaki M, Mochisuki T, Ishizaki H, Kikuchi A. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. J Dermatol Sci 2005; 38: 99-106.



- Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses* 2001; 44: 261-5.
- Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 231-6.
- Kligman AM, Baldrige GD. Morphology of *Sporotrichum schenckii* and *Histoplasma capsulatum* in tissue. *AMA Arch Pathol* 1951; 51(6): 567-74.
- Koehne G, Powell HS, Hail RI. Sporotrichosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 159(7): 892-4.
- Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol* 2008; 46: 53-6.
- Kusuhara M, Hachisuka H, Sasai Yoichiro. Statistical survey of 150 cases with sporotrichosis. *Mycopathologia* 1988; 102: 129-33.
- Kwon-Chung K, Bennett J. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992.
- Larsson CE, Gonçalves MA, Araujo VC, Dagli MLZ, Correa B, Fava Neto C. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos (1). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989; 31(5): 351-8.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1): 59-74.
- Londero AT, Castro RM, Fischman O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. *Sabouraudia* 1964; 3(4): 273-4.
- Lopes Alves L, Travassos LR, Previato JO, Mendonça-Previato L. Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology* 1994; 4(3): 281-8.
- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc* 2006; 78(2): 293-308.
- Lurie HI. Histopathology of sporotrichosis – Notes of the nature of the asteroid body. *Arch Path* 1963; 75: 421-37.
- Lutz A, Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *Rev Med S Paulo* 1907; 21:433-50.
- Macotella-Ruiz E, Nochebuena-Ramos E. Esporotricosis en algunas comunidades rurales de la Sierra Norte de Puebla. Informe de 55 casos (Septiembre 1995-Diciembre 2005). *Gac Méd Méx* 2006; 142(5): 377-80.

Marques MEA, Coelho KIR, Sotto MN, Bacchi CE. Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. *J Clin Pathol* 1992; 45: 1089-93.

Migliano MF, Freitas DC, Moreno G. Esporotricose em cães. *Rev Fac Med Vet S Paulo* 1963; 7(1): 225-33.

Miyaji M, Nishimura K. Defensive role of granuloma against *Sporothrix schenckii* infection. *Mycopathologia* 1982; 80: 117-24.

Mohri S. Study in sporotrichosis – III. Histological and Immunohistochemical study in experimental cutaneous sporotrichosis in man. *Yokohama Med Bull* 1987; 38 (1-2): 37-48.

Moore M, Ackerman LV. Sporotrichosis with radiate formation in tissue: report of a case. *Arch Derm Syph* 1946; 53: 253-64.

Moore M. Radiate formation on pathogenic fungi in human tissue. *Arch Pathol* 1946; 42: 113- 53.

Moraes MAP, Miranda EV. Sobre a presença de formações radiadas (asteróides) na esporotricose. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964; 6 (1): 5-11.

Moskowitz LB, Ganjei P, Ziegels-Weissman J, Clearly TJ, Penneys NS, Nadji M. Immunohistological identification of fungi in systemic and cutaneous mycoses. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 433-6.

Narisawa Y, Tetsuhito K, Iriki A, Masaki J, Kohda H. Tissue changes in cryptococcosis: histologic alteration from gelatinous to suppurative granulomatous tissue response with asteroid body. *Mycopathologia* 1989; 106: 113-9.

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. *Mycopathologia* 1993; 122: 89-93.

Penha CV, Lopes-Bezerra LM. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. *Med Mycol* 2000; 38(1): 1-7.

Pinkus H, Grekin JN. Sporotrichosis with asteroid tissue forms – Report of a case. *Arch Dermatol Syph* 1950; 61: 813-9.

Quintella LP. Padronização da técnica de imunoperoxidase utilizando soro policlonal anti-*Leishmania (L.) chagasi* no diagnóstico de lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana. Dissertação [Mestrado em Medicina - Anatomia Patológica] - Faculdade de Medicina da UFRJ; 2004.

Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42: 405-26.

Ramos-Vara JA, Beissenherz ME. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 307-11.

Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis – Transmission to man. *Arch Dermatol* 1982; 118:429-31.

Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993a; 16: 384-7.

Reed JA, Hemann BA, Alexander JL, Brigati DJ. Immunomycology: Rapid and specific immunocytochemical identification of fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded material. *J Histochem Cytochem* 1993b; 41(8):1217-21.

Reed S, Carvalho E, Sherbert C, Sampaio D, Russo D, Bacelar O et al. *In vitro* responses to *Leishmania* antigens by lymphocytes from patients with leishmaniasis or Chagas disease. *J Clin Invest* 1990; 85: 690-6.

Rippon J. The true pathogenic fungus infections and the opportunistic fungus infections. In: Rippon J, editor. *Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988.

Rodriguez G, Sarmiento L. The asteroid bodies of sporotrichosis. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 246-9.

Santos IB, Schubach TMP, Leme LRP, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA et al. Sporotrichosis-The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2007a; 143: 1-6.

Santos IB. Padronização da técnica de imunoperoxidase utilizando soro policlonal anti-*Leishmania (L.) chagasi* no diagnóstico de lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar canina. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - IPEC, FIOCRUZ; 2007b.

Schell W. Agents of chromoblastomycosis and sporotrichosis. In: Allejo L, Hay RJ, editores. *Topley & Wilson's – Microbiology and microbial infectious*. London: Arnold; 1998. p.315-36.

Schenck BR. On Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. *Johns Hopkins Hosp Bull* 1898; 240: 286-90.

Schubach AO, Barros MBL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 129-33.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi 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 TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1623-9.

Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DF et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 2002a; 153: 83-6.

Schubach TMP, Cuzzi-Maya T, Duarte R, Confort E, Okamoto T, Figueiredo FB et al. Avaliação da histopatologia, sorologia e intradermorreação para leishmaniose em cães com esporotricose e contatos domiciliares. In: VI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmaniose; 2002b; Uberaba, Brasil.

Schubach TMP, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol* 2001a; 39: 147-9.

Schubach TMP, Schubach AO, Silva V, Filho Monteiro P, Santos E, Duarte R et al. Avaliação da intradermorreação e sorologia para Leishmaniose em cães com esporotricose. In: XXII Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA); 2001b; Fortaleza, Brasil.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001c; 96: 987-96.

Schubach TMP, Schubach AO. Esporotricose em gatos e cães - revisão. *Clín Vet* 2000; 29: 21-4.

Schwarz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol* 1982; 13: 519-33.

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): 1440-3.

Welsh RD. Sporotrichosis. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1123-6.

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

Yaziji H, Barry T. Diagnostic immunohistochemistry: What can go wrong? *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 138-46.