

DIFERENÇAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS ENTRE ISOLADOS DE *Sporothrix schenckii* PIGMENTADOS E ALBINOS EM MODELO MURINO

MADRID, Isabel Martins¹; MATTEI, Antonella Souza²; XAVIER, Melissa Orzechowski¹; GUIM, Thomas¹; MARTINS, Anelise Afonso¹; FERNANDES, Cristina Gevher³; NOBRE, Márcia de Oliveira⁴; MEIRELES, Mário Carlos Araújo⁵

1 – Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Faculdade de Veterinária – Laboratório de Doenças Infecciosas – Setor Micologia – Universidade Federal de Pelotas (UFPel) imadrid_rs@yahoo.com.br

2 – Bolsista de Iniciação Científica – CNPq, UFPel

3 – Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Veterinária – UFPel

4 – Hospital de Clínicas Veterinária, UFPel

5 – Laboratório de Doenças Infecciosas – Setor Micologia – Faculdade de Veterinária - UFPel

INTRODUÇÃO

Sporothrix schenckii, causador da esporotricose, é um fungo dimórfico, que na forma miceliana apresenta hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas, com conidióforos delgados e, do qual surgem conídios hialinos, com parede celular fina. Ao longo das hifas existem os conídios pigmentados, com paredes celulares grossas, os quais variam em quantidade, determinando a intensidade da coloração da colônia. Os conídios pigmentados possuem grânulos de melanina DHN na parte externa da parede celular e, *in vitro*, já foi demonstrado que a melanina exerce importante função de proteção celular. Os conídios pigmentados foram mais resistentes à fagocitose, à radiação ultravioleta e aos radicais livres do que os albinos (Hogan et al., 1996; Nobre et al., 2004; Nobre et al., 2005).

A esporotricose é uma micose subcutânea, de evolução subaguda a crônica, caracterizada pela formação de nódulos que evoluem para úlceras e drenam exsudato castanho avermelhado, levando a formação de crostas; podendo apresentar-se na forma clínica cutânea (fixa, disseminada ou linfangite ascendente) ou extracutânea. A transmissão ocorre pelo implante traumático do *S. schenckii* na derme, através de espinhos de plantas, felpas, arranhões e mordeduras de felinos, tornando essa espécie, uma importante fonte de infecção (Findlay & Vismer, 1986; Mujica et al., 1992).

As lesões podem ser localizadas ou disseminadas dependendo da evolução da doença, determinadas por fatores que agravam a intensidade como a virulência da cepa, quantidade de células fúngicas no local da lesão, estado imunológico do indivíduo, espécie acometida entre outras (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Nobre et al., 2003).

O exame direto das lesões de esporotricose de felinos revela grande número de células fúngicas, geralmente pleomórficas, com forma esférica, ovóide, alongada e em forma de charuto e também são observadas células em brotamento. Enquanto em humanos imunocompetentes e nas outras espécies animais já estudados como cães e eqüinos as células fúngicas estão ausentes ou são raras (Lacaz et al., 1998; Lopes-Bezerra et al., 2006).

Sendo um fungo dimórfico, o *Sporothrix schenckii* apresenta-se na forma micelial no meio-ambiente e “*in vitro*” à temperatura de 25°C formando hifas e conídios, e forma leveduriforme em parasitismo e “*in vitro*” a 37°C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 25-27°C e a inibição do crescimento entre 39-40°C (Lacaz et al., 1998).

Em vista desta realidade, o estudo objetivou avaliar as diferenças clínicas e histopatológicas entre isolados de *Sporothrix schenckii* pigmentados e mutantes albinos, em modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram acompanhados 90 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) de linhagem Wistar (cepa UFPel), machos, com sete semanas de idade, divididos em três grupos (Controle - CONT, Melanina positiva - MEL⁺ e Melanina negativa - MEL⁻), cada grupo composto por 30 animais mantidos por nove semanas.

O isolado de *S. schenckii*, proveniente de caso clínico de esporotricose felina, foi cultivado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e cicloheximida, incubadas à 25°C por 10 dias. Após, as colônias foram removidas do meio de cultura com auxílio de estilete, centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS (solução salina tamponada), padronizadas na escala 4 de MacFarland e armazenadas em alíquotas a -70°C. O inóculo foi preparado com 0,1mL do isolado armazenado, sendo cultivado em duplicata por espalhamento em meio YEPD (peptona-dextrose-extrato de levedura) e incubado por sete dias. Após este período, as colônias foram removidas do meio de cultura com auxílio de estilete, centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS, homogeneizada e padronizados em 10⁶ conídios/mL. Para a produção do mutante albino, o isolado foi exposto a 300 ergs/mm³ de luz ultravioleta de acordo com a técnica descrita por Nobre, 2004.

Os animais foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar dos membros posteriores, esquerdo e direito, com 0,2mL do inóculo em cada ponto de inoculação, e o grupo controle, utilizou-se a mesma quantidade de PBS (solução salina tamponada).

As lesões no coxim plantar esquerdo foram classificadas, em todos os animais de cada grupo, semanalmente, avaliando-se a formação dos nódulos, úlceras, drenagem de exsudato com formação de áreas de necrose e crostas e regressão da lesão, como também o aparecimento destas lesões em outras áreas corpóreas. Todos os itens foram avaliados de acordo com o grau de gravidade e envolvimento tecidual no seguinte escore: - (ausente), + (pouco), ++ (médio) e +++(muito).

As biópsias foram realizadas no coxim plantar direito de três animais de cada grupo. Nas duas primeiras semanas do experimento, as biópsias foram realizadas a cada três dias e a partir deste período, em que ocorre a fase de transição do inóculo filamentososo para leveduriforme, foram realizadas semanalmente.

Os animais foram anestesiados para a retirada da amostra tecidual do coxim plantar com auxílio de *punch* de 6mm de diâmetro. A amostra obtida da biopsia foi fragmentada e acondicionada para o estudo histopatológico e micológico.

O fragmento do tecido foi acondicionado em frasco contendo formalina tamponada a 10%, sendo posteriormente incluído em parafina, e feito cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE) e pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Os cortes corados com HE serão utilizados para a classificação da lesão tecidual e infiltrados celulares e os corados com PAS possibilitarão a visualização, quantificação e avaliação do brotamento das células fúngicas.

O exame micológico foi realizado para o retroisolamento, sendo a amostra cultivada em ágar Sabouraud dextrose acrescido cloranfenicol e incubado a 25° e 37°C por até 10 dias; realizando assim, o exame macromorfológico e micromorfológico das colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grupos experimentais, MEL⁺ e MEL⁻, desenvolveram lesões características de esporotricose no ponto de inoculação, embora tenham ocorrido diferenças clínicas entre os grupos. O acompanhamento clínico realizado semanalmente demonstrou, na primeira e segunda semana, a presença de nódulos e edema do coxim plantar em ambos os grupos. Na terceira e quarta semana, os animais apresentavam úlceras, as quais, drenavam exsudato acastanhado. Na quinta semana, 86,7% do grupo MEL⁺, apresentava envolvimento da articulação e também aumento dos linfonodo poplíteo, enquanto no grupo MEL⁻ 53,3% apresentavam esta característica. A partir da sétima semana, 10% do

grupo MEL⁺ já apresentavam evolução para a resolução da lesão enquanto no grupo MEL⁻ foi 23%. No final do experimento 73,3% dos animais do grupo MEL⁺ apresentavam lesões de esporotricose em outras áreas cutâneas enquanto que no grupo MEL⁻, 46,6% tinham esta característica clínica de esporotricose.

Possivelmente, a rápida evolução das lesões do grupo MEL⁺ seja devido a fagocitose dos conídios pigmentados ocorrer em uma velocidade menor quando comparados à fagocitose dos conídios mutantes (Romero-Martinez et al., 2000). As lesões em animais experimentais imunocompetentes tendem a aparecer após a primeira semana, seguido de um quadro clínico agudo e grave. A partir da sétima semana ocorre a resolução das lesões (Mujica et al., 1992; Yoshike et al., 1993), em alguns casos, este período pode ser prolongado, devido à ativação das lesões locais (Hiruma et al., 1991) e/ou em razão do desenvolvimento de esporotricose cutânea disseminada (González del Polania & Saraiva, 1990). Inicialmente ocorreram diferenças entre os grupos albino (MEL⁻) e pigmentado (MEL⁺), no final todos os grupos tenderam para a resolução das lesões no ponto de inoculação, em alguns casos havendo reativação da lesão.

O retroisolamento do fungo *S. schenckii* foi obtido em todas as amostras das biópsias do coxim plantar dos grupos MEL⁻ e MEL⁺. As colônias obtidas a temperatura de 25°C, provenientes das amostras do grupo MEL⁻, apresentavam coloração creme-acinzentada enquanto que as do grupo MEL⁺ tinham coloração marrom-escura. A 37°C, observou-se colônias de coloração creme e aspecto cremoso nos cultivos de ambos os grupos.

Os cortes histopatológicos, corados através da técnica de HE e PAS, demonstraram de um modo geral, a formação de granulomas com infiltrado inflamatório local com a presença de macrófagos e numerosos elementos fúngicos fagocitados, alterações semelhantes já descritas na literatura (Hiruma et al., 1991). As lesões histopatológicas do grupo MEL⁻ se caracterizavam pela presença de piogranulomas bem organizados geralmente focais, enquanto que no grupo MEL⁺ foi observado piogranulomas multifocais profundos. Comparando-se os achados, desde a primeira biópsia, observa-se que no grupo MEL⁺, há uma maior quantidade do agente nas lesões e que esse tem maior capacidade de invasão tecidual.

Também foi observado que nas amostras do grupo MEL⁺, na primeira biópsia, havia maior quantidade de células leveduriformes intralésionais, o que não foi evidente no grupo MEL⁻. A partir da quarta biópsia, observou-se uma mudança desse padrão predominante, sendo expressivo o número de agentes intracelulares. A cepa pigmentada tende a estar na periferia dos focos necróticos enquanto que a cepa mutante tende a ficar no interior da necrose, determinando assim, por muitas vezes agudização das lesões.

De um modo geral, a cepa pigmentada é claramente mais patogênica e em maior quantidade na lesão quando comparada a cepa mutante. A cepa mutante incita uma resposta mais eficiente, que tende a restringir a disseminação tecidual do agente, pois se forma um granuloma mais rápido e com menor tendência de lesões multifocais.

CONCLUSÃO

O grupo MEL⁺ apresentou uma evolução clínica mais acentuada, com presença de nódulos e úlceras na região inoculada, como também em outras regiões corpóreas quando comparado com o grupo MEL⁻, possivelmente pela presença de melanina incitar uma maior resposta imunológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FINDLAY, GH; VISMER, HF. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. **Mycopathologia** 1986; 96: 115-122.

GONZÁLES DEL POLANIA, LAG; SARAIVA, N. Comportamiento experimental del *S. schenckii* y la *Leishmania mexicana* em el hamster. **Revista do Inst Med Trop** de São Paulo, 1990; 32:319-324.

HIRUMA, M.; KAWADA, A.; ISHIBASHI, A. Ultrastructure of asteroid bodies in Sporotrichosis. **Mycoses**, 34, p.103-107, 1991.

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

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

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Sporotrichosis In: **Medical Mycology**. Lea & Fibeger, Philadelphia, p.707-729, 1992.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Identificação dos fungos. In: **Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 1º ed. São Paulo: Sarvier/Fapesp, 1998, vol.1, cap.2, p.326-330.

LOPES-BEZERRA, L.M; SCHUBACH, A; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **An Acad Bras Cienc** 78: 293-308, 2006.

MUJICA, MT; AGOTEGARAY, M; CANOBA, A; DELASOIE, P; HAUSWIRTH, S; KOCIZIKI, G; TARTABANI, M; ALVAREZ, D. Esporotricose experimental em ratas. **Revista Argentina de Micologia**, 1992; 15:7-12.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; OLIVEIRA, I.A.; BERG, V.; JUNIOR, T.L.; FERNANDES, C.G.; MEIRELES, M.C.A. FERREIRO, L. Development of experimental sporotrichosis in a murine model with yeast and mycelial forms of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2003.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; MEIRELES, M.C.A. FERREIRO, L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2004.

NOBRE, MO; ANTUNES, TA; FARIA, RO; CLEFF, MB; FERNANDES, CG; MUSCHNER, AC; MEIRELES, MCA; FERREIRO, L. Difference in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. **Mycopathologia**, 2005; 00:1-7.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**, v.68, n.6, p.3697-3703, 2000.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MATSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med. Mycol.** 36, 21-27, 1998.

YOSHIKE, T; LEI, RC; KOMATSUZAKI, H; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *S. schenckii* In: *S. schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia**, 1993; 123:69-73.