

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA

Avaliação da atividade *in vivo* e *in vitro* da terbinafina e itraconazol frente ao
Sporothrix schenckii

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora, pela Médica Veterinária Ana Raquel Mano Meinerz.

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Porto Alegre – RS - Brasil

2007

Ana Raquel Mano Meinerz

**Avaliação da atividade *in vivo* e *in vitro* da terbinafina e itraconazol frente ao
*Sporothrix schenckii***

Aprovada em 2007.

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Fernanda de Mello
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Membro da Comissão

Prof. Dra. Márcia de Oliveira Nobre
Membro da Comissão

Ao meu marido
e a minha família

AGRADECIMENTOS

Passaram-se quatro anos... Depois de todo esse tempo, devo agradecer...

Ao meu orientador, Prof. João Roberto Braga de Mello, pela confiança e pela oportunidade fundamentais para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Mário Carlos Araújo Meireles, pela a minha iniciação no “mundo científico”, pelas oportunidades e orientações tantas vezes solicitadas, além de todo apoio e amizade;

Ao Prof. Luiz Filipe Schuch e Márcia de Oliveira Nobre, pela orientação, paciência e amizade que me acompanharam ao longo desses anos;

Às colegas, amigas e futuras Doutoradas, Anelise Martins, Helen Silveira Coimbra Melissa Xavier, Isabel Madrid pela ajuda em todos os momentos;

A “velha guarda” Lorena Leonardo Souza (Lóren), Marlete Brum Cleff (Eme), Patrícia Nascente (Na), Renata Osório Faria (Rê) e Tatiana de Ávila Antunes (Antunes) pelos melhores momentos que ocorreram nesse período, assim também como pelo apoio dado aos momentos mais difíceis;

A minha “equipe de trabalho”, Ane, Rosema Santin, Luiza Osório, Mel, Kity, Cris, Anesinha que não só contribuíram de forma fundamental para a realização do trabalho como transformaram esse período em momentos memoráveis;

Às Médicas Veterinárias, aos funcionários, professores do Laboratório de Doenças Infeciosas e da Faculdade de Veterinária da UFPel que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho... Silvia Ladeira, Renata Schramm, João Zani, Paulinho, Toninho, Girlei, Paulinho.

Aos componentes da banca que atenderam ao convite pela atenção, Prof. Márcia Nobre, Prof. Mário C.A. Meireles e Prof. Fernanda Mello. Além do Prof. Augusto Langeloh e Prof. Sydney Harter pelas orientações e sugestões que certamente contribuíram para o enriquecimento deste estudo;

A CAPES pela Bolsa de Estudo e Taxa de Bancada e ao CNPq pelos recursos disponibilizados através do financiamento do projeto que fez parte deste trabalho;

RESUMO

Meinerz, Ana Raquel Mano. Avaliação da atividade *in vivo* e *in vitro* da terbinafina e itraconazol frente ao *Sporothrix schenckii*

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Considerando a importância do felino doméstico nos relatos zoonóticos da esporotricose, assim como os problemas relacionados a terapêutica da micose nessa espécie, o estudo objetiva avaliar a atividade *in vitro* da terbinafina e itraconazol frente ao *S. schenckii*; estudar a ação desses fármacos no tratamento da esporotricose sistêmica experimental; analisar as enzimas hepáticas e hemograma dos animais submetidos ao tratamento antifúngico; estudar as possíveis alterações macroscópicas nos animais inoculados com *S. schenckii* assim como realizar o retroisolamento do agente. Para o teste *in vitro*, foram utilizados 10 isolados de *S. schenckii* (seis felinos, três humanos e um de cão), os quais foram avaliados quanto a suscetibilidade frente aos fármacos através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI para as fases leveduriforme e filamentosa do agente. A leitura da CIM foi visual, correspondendo à menor concentração do antifúngico em que não houve crescimento visível do *S. schenckii* quando comparado ao controle positivo. O teste *in vivo*, foi realizado através da inoculação pelas vias intraperitoneal e veia lateral da cauda de células fúngicas (2×10^3 cél/mL) de dois isolados de *S. schenckii* (felino e canino) em 120 ratos norvegicus, divididos em quatro grupos: tratado terbinafina (250mg/kg) e itraconazol (100mg/kg); diluente terbinafina (250mg/kg de solução de água destilada com 5% de DMSO e 1% de Tween 20) e itraconazol (100mg/kg de água destilada estéril), sendo administrados através de sondagem oral uma vez ao dia, durante 30 dias. Paralelamente foram realizados hemogramas e avaliação das enzimas hepáticas (ALT e FA), assim como o acompanhamento da evolução clínica e análise histopatológica de todos animais experimentais. No final do período experimental os animais foram necropsiados e realizado análise macroscópica com a coleta dos órgãos para a obtenção do retroisolamento do *S. schenckii*. A CIM para a terbinafina obtida entre todos os isolados na fase leveduriforme de esporotricose felina variaram de 0,055µg/mL a 0,109µg/mL, enquanto que para os isolados humanos e de cão foi de 0,055µg/ml. Para o itraconazol, a CIM frente aos isolados de esporotricose felina foi de 0,875µg/mL a 1,75µg/mL, já para os casos humanos foi de 0,219µg/mL e para o isolado de cão de 1,75µg/mL. Para a fase filamentosa do agente foi observada uma CIM para a terbinafina entre os isolados de felinos de 0,875 µg/mL, enquanto que os isolados humanos e de cão a CIM foi de 0,219µg/mL. Para o itraconazol os isolados felinos resultaram numa CIM de 3,5µg/mL, já nos isolados de esporotricose humana e em cão a CIM foi de 1,75µg/mL. Quanto ao estudo *in vivo*, os animais tratados com terbinafina e itraconazol resultaram em menor frequência de alterações macroscópicas assim como na obtenção do retroisolamento do agente em relação aos grupos controle. Não foi detectada alterações nas enzimas hepáticas, hemograma e nas avaliações macro e histopatológicas dos animais submetidos ao tratamento antifúngico. Com esses resultados conclui-se que a terbinafina e itraconazol possuem atividade *in vitro* frente ao *S. schenckii* e que as doses estudadas dos fármacos são eficazes no tratamento da esporotricose experimental sistêmica, assim como não produzem alterações das enzimas hepáticas avaliadas e do hemograma.

Palavras-chave: *S. schenckii*, Suscetibilidade, Terbinafina, Itraconazol.

ABSTRACT

Meinerz, Ana Raquel Mano. Evaluation of the activity *in vivo* and *in vitro* of the terbinafine and itraconazole against to the *Sporothrix schenckii*

Adviser: João Roberto de Braga Mello

Considering the importance of the domestic feline in the zoonotic reports of the esporotrichosis, as well as the related problems the therapeutics of the mycosis in that species, the study objective was evaluate the activity in vitro of terbinafine and itraconazole against to S. schenckii; study the activity of those drugs in the treatment of the experimental systemic esporotrichosis; analyze the hepatic enzymes and blood count of the animals submitted to the antifungal treatment; study the possible macroscopic alterations in the animals inoculated with S. schenckii as well as realized the agent retroisolament. For the test in vitro, 10 isolated of S. schenckii were used (six felines, three humans and one canine), which were performed as the susceptibility against to the drugs through the microdiluição technique in broth in accordance with the CLSI for the phases yeast and mycelial of the agent. The reading of CIM was visual, corresponding to smallest concentration of the antifungal in that there was not visible growth of S. schenckii when compared to the positive control. The test in vivo, was performed through the of the inoculation intraperitoneal and lateral vein of the tail of fungal cells (2×10^3 cél/mL) of two isolated of S. schenckii (feline and canine) in 120 mice norvergicus, divided in four groups: treaty terbinafine (250mg/kg) and itraconazole (100mg/kg); diluent terbinafine (250mg/kg of solution of water distilled with 5% of DMSO and 1% of Tween 20) and itraconazol (100mg/kg of water distilled sterile), being administered by gavage once a day, for 30 days. Parallel blood counts and evaluation of the hepatic enzymes were accomplished (ALT and F.A), as well as the accompaniment of the clinical evolution and analysis histopathologic of all animal experimental. In the end of the experimental period the animals were autopsied and performed macroscopic analysis with the collection of the organs for the obtaining of the detected S. schenckii growth. CIM for the terbinafine obtained among all the isolated in the phase yeast of feline esporotrichosis oscillated between 0,055µg/mL the 0,109µg/mL, while for the isolated humans and canine was of 0,055µg/ml. For the itraconazole, the CIM against of the isolated of feline esporotrichosis was from 0,875µg/mL to 1,75µg/mL, for the human cases it went of 0,219µg/mL and for the isolated canine of 1,75µg/mL. For the mycelial phase a CIM was observed for the terbinafine among the isolated of felines of 0,875 µg/mL, while the isolated humans and canine CIM was of 0,219µg/mL. For the itraconazole the isolated felines resulted in a CIM 3,5µg/mL, in the isolated of human esporotrichosis and canine CIM was of 1,75µg/mL. As for the study in vivo, the animals treaties with terbinafine and itraconazole resulted in smaller frequency of macroscopic alterations as well as in the obtaining of the detected agent growth in relation to the groups control. It was not detected alterations in the hepatic enzymes, blood count and in the evaluations macro and histopathologic of the animals submitted to the antifungal treatment. With those results we are to report that the terbinafine and itraconazol apresent activity in vitro against to S. schenckii and that the studied doses of the drugs are effective in the treatment of the systemic experimental esporotrichosis, as well as they don't produce alterations of the appraised hepatic enzymes and blood count.

Key Words: *S. schenckii, Susceptibility, Terbinafine, Itraconazole.*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos experimentais utilizados para o estudo <i>in vivo</i>	37
TABELA 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da terbinafina e itraconazol frente a isolados leveduriformes de <i>Sporothrix schenckii</i> através da técnica de microdiluição em caldo	41
TABELA 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da terbinafina e itraconazol frente a isolados filamentosos de <i>Sporothrix schenckii</i> através da técnica de microdiluição em caldo.....	42
TABELA 4 - Valores referentes a Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA) dos animais experimentais submetidos a administração dos fármacos antifúngicos e seus respectivos diluentes.....	43
TABELA 5 - Alterações clínicas observadas nos animais experimentais com esporotricose sistêmica durante o período do estudo.....	44
TABELA 6 - Alterações anatomopatológicas observadas nos animais experimentais com esporotricose sistêmica durante o período de estudo.....	50
TABELA 7 - Obtenção do retroisolamento de <i>Sporothrix schenckii</i> a partir do cultivo do baço, fígado e testículos dos animais experimentais.....	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Casos de esporotricose felina, os quais originaram os isolados de <i>Sporothrix schenckii</i> utilizados para o estudo da suscetibilidade antifúngica. Laboratório de Micologia-UFPel.....	32
FIGURA 2 – Caso de esporotricose em cão, o qual originou o isolado de <i>Sporothrix schenckii</i> utilizado para o estudo da suscetibilidade antifúngica. Laboratório de Micologia-UFPel.....	32
FIGURA 3 – (a) esporotricose cutânea-linfática correspondente ao caso 1; (b) esporotricose cutânea fixa correspondente ao caso 2; (c) esporotricose cutânea disseminada correspondente ao caso 3. Laboratório de Micologia-UFPel.....	33
FIGURA 4 – (a) felino com esporotricose cutânea disseminada, o qual foi obtido o isolado fúngico utilizado para a inoculação experimental; (b) isolado de <i>S. schenckii</i> correspondente ao felino envolvido no estudo; (c) cão com esporotricose cutânea, o qual foi obtido o isolado fúngico utilizado para a inoculação experimental; (d) isolado de <i>S. schenckii</i> correspondente ao cão envolvido no estudo. Laboratório de Micologia-UFPel.....	37
FIGURA 5 – (a) retirada das colônias de <i>Sporothrix schenckii</i> do meio de cultura com auxílio de um bisturi estéril; (b) filtração das colônias em camada dupla de gaze estéril; (c) lavagem das colônias com PBS; (d) padronização do inóculo fúngico. Laboratório de Micologia-UFPel.....	38
FIGURA 6 – (a) inoculação experimental com o inóculo fúngico através da veia lateral da cauda; (b) inoculação experimental com o inóculo fúngico através da via intraperitoneal. Laboratório de Micologia-UFPel.....	39
FIGURA 7 – Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram aumento da espessura cauda.....	45
FIGURA 8 – Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram úlceras na cauda.....	45
FIGURA 9 – Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram aumento testicular.....	46
FIGURA 10 – Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram úlceras nos membros.....	47
FIGURA 11 - Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram edema no plano nasal.....	

FIGURA 12 - Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram úlceras no plano nasal.....	48
FIGURA 13 - Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental apresentando flacidez testicular.....	48
FIGURA 14 – Alterações anatomopatológicas observadas nos animais com esporotricose experimental sistêmica: (a) lesões nodulares e esbranquiçadas disseminadas; (b) lesões nodulares e esbranquiçadas nos testículos; (c) nódulo no parênquima subcutâneo; (d) lesões nodulares e esbranquiçadas no baço e fígado.....	50
FIGURA 15- Alterações anatomopatológicas presentes nos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente terbinafina.....	51
FIGURA 16- Alterações anatomopatológicas presentes nos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente itraconazol.....	51
FIGURA 17- Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> obtidos dos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente terbinafina.....	53
FIGURA 18- Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> obtidos dos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente itraconazol.....	53
FIGURA 19- Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> obtidos dos grupos tratado terbinafina e itraconazol.....	54

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
SUMÁRIO	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Sporothrix schenckii</i>	14
2.2 Esporotricose	15
2.3 Tratamento da esporotricose	20
2.3.1 Terbinafina.....	22
2.3.2 Itraconazol.....	24
2.4 Provas de suscetibilidade antifúngica	26
2.5 Relação das provas <i>in vitro</i> com os resultados <i>in vivo</i>	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Teste de suscetibilidade antifúngica	31
3.1.2 Manutenção e conversão dos isolados de <i>Sporothrix schenckii</i> utilizados.....	33
3.1.3 Preparo do inóculo fúngico.....	33
3.1.3.1 Inóculo da fase leveduriforme do <i>Sporothrix schenckii</i>	33
3.1.3.2 Inóculo da fase filamentosa do <i>Sporothrix schenckii</i>	34
3.1.4 Preparo das diluições antifúngicas.....	34
3.1.5 Leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
3.2 Avaliação das enzimas hepáticas e hemograma dos animais experimentais submetidos ao tratamento com os antifúngicos e seus respectivos diluentes	35
3.3 Avaliação dos antifúngicos no tratamento da esporotricose experimental sistêmica	36
3.3.1 Isolados de <i>Sporothrix schenckii</i> envolvidos no estudo.....	37

3.3.2 Preparo do inóculo fúngico.....	38
3.3.3 Inoculação experimental.....	38
3.3.4 Tratamento dos animais experimentais com esporotricose sistêmica.....	39
3.3.5 Acompanhamento clínico dos animais experimentais com esporotricose sistêmica.....	39
3.3.6 Necropsia dos animais experimentais.....	40
3.3 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Suscetibilidade <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Sporothrix schenckii</i> frente aos antifúngicos terbinafina e itraconazol.....	41
4.2 Avaliação das enzimas hepáticas e hemograma dos animais experimentais submetidos ao tratamento antifúngico e seus respectivos diluentes.....	43
4.3 Avaliação da atividade dos fármacos antifúngicos no tratamento da esporotricose experimental sistêmica.....	43
4.3.1 Avaliação clínica dos animais experimentais com esporotricose sistêmica.....	44
4.3.2 Alterações anatomopatológicas nos animais experimentais com esporotricose experimental sistêmica.....	49
4.3.3 Obtenção do retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i>	52
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose, doença micótica de ocorrência mundial, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* afeta o homem e várias espécies de animais domésticos, especialmente a espécie felina. Os felinos representam importante papel na transmissão do agente para outros animais e ao homem, sendo crescente os relatos zoonóticos da micose envolvendo, especialmente, felinos machos, não castrados e de livre acesso à rua, devido aos hábitos inerentes dessa espécie (LOPES et al., 1999; NOBRE et al., 2002 (b); LOPES-BEZERRA et al., 2006).

O homem pode se contaminar com *S. schenckii* através de arranhadura, mordedura, contaminação por solução de continuidade cutânea preexistente, ou contato direto da pele levemente irritada com lesões ulceradas e exsudativas de felinos infectados. Estudos sugerem, que a transmissão da esporotricose pelos felinos aos humanos é facilitada devido ao grande número de microrganismos encontrados nas lesões desses animais enfermos (NOBRE et al., 2001; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

O crescente uso de fármacos antibacterianos e imunossupressores, os avanços das técnicas de transplantes de órgãos e tratamento do câncer, assim como a maior sobrevivência das vítimas da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) resultaram no aumento do número de pacientes suscetíveis a esporotricose, conseqüentemente, de indivíduos sujeitos a falhas terapêuticas, recidiva assim como o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos de uso corrente. Aliado a esses fatores, a aquisição, cada vez mais freqüente, do felino como animal de companhia, convivendo no mesmo “nicho urbano” favorece a transmissão da esporotricose ao homem a partir do animal portador do *S. schenckii* (NETO et al., 1999; BONIFAZ et al., 2001).

Devido ao caráter zoonótico, a esporotricose é considerada uma micose de interesse para a saúde pública, no entanto, os fármacos utilizados atualmente no tratamento da enfermidade não satisfazem completamente a necessidade médica humana e veterinária, devido, principalmente aos problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos antifúngicos disponíveis (DE PAUW, 2000).

Até 1940 a terapia à base de iodo era a única substância disponível para o tratamento das formas cutâneas e linfocutâneas da esporotricose, constituindo-se uma

terapia de baixo custo e eficaz, tanto para os animais como para o homem. Porém, devido aos freqüentes efeitos colaterais, o seu uso foi limitado, principalmente na espécie felina, que é sensível aos preparados contendo iodo (STERLING & HEUMANN, 2000; NOBRE et al., 2002 (a); ROCHETTE et al., 2003). Já a anfotericina B, antibiótico poliênico, é preconizada para as formas disseminadas da micose em humanos, demonstrando boa atividade, no entanto são comuns os relatos de toxicidade associado ao seu uso, principalmente nefrotoxicidade. O itraconazol, por sua vez, emergiu nos anos noventa como uma alternativa terapêutica com reduzida toxicidade em comparação aos fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento da esporotricose além de ter maior espectro de ação. Porém, devido, ao seu uso indiscriminado, observou-se o crescente número de isolados resistentes, resultando em falhas no tratamento da esporotricose humana e felina (NEGRONI & ARECHALAVA, 1993; KAUFFMAN et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2000; BONIFAZ et al., 2001; GHOSH et al., 2001; STALKUP et al., 2002; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; SCHUBACH et al., 2004).

Os freqüentes relatos da resistência *in vitro* de *S. schenckii* à anfotericina B e aos derivados azólicos, bem como os problemas relacionados a toxicidade desses fármacos, apontam para a necessidade de mais estudos sobre o emprego de novos fármacos antifúngicos para o tratamento da esporotricose. Nesse contexto a terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, se destaca por sua atividade *in vitro* primariamente fungicida, frente a várias espécies de fungos filamentosos e dimórficos, inclusive o *S. schenckii*, demonstrando ainda menor toxicidade em relação aos outros antifúngicos utilizados no tratamento da micose (HAY, 1999; PEREZ, 1999; RYDER, 1999; JAIN & SEHGAL, 2000; JESSUP et al., 2000; DARKES et al., 2003; KOHLER et al., 2004; CHAPMAN et al., 2004; COSKUN et al., 2004).

Em vista da importância do felino doméstico na transmissão da esporotricose para outros animais e para o homem, assim como a problemática envolvendo a terapia da esporotricose na espécie felina, o estudo tem como objetivo avaliar a suscetibilidade *in vitro* do *S. schenckii* frente a terbinafina e itraconazol, assim como a atividade desses fármacos no tratamento da esporotricose experimental sistêmica, sendo esses normalmente utilizados no tratamento das formas cutânea e cutânea-linfática sem o estabelecimento do protocolo terapêutico para a forma sistêmica da micose; estudar as possíveis alterações macroscópicas nos animais inoculados com *S. schenckii*; além de realizar o retroisolamento do agente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Sporothrix schenckii*

Segundo dados históricos, descritos por Arenas (1993), Benjamin Schenck em 1898, nos Estados Unidos, definiu a esporotricose e seu organismo casual, denominando Sporotrichia. Em 1900, Hektoen & Perkins descreveram o segundo caso de esporotricose, atribuindo o fungo isolado de *Sporothrix schenckii*. De Beurman & Gougerot, na França, realizaram estudos envolvendo inúmeros casos clínicos da enfermidade, atribuindo, em 1905 o nome de *Sporotrichum beurmanni* ao microrganismo destes relatos, tendo sido o agente considerado diferente ao isolado por Hektoen & Perkins. Mas, em 1921, foram consideradas idênticas as esporotricoses americana e francesa, sendo que em 1963, Carmichael determinou o nome do agente como *Sporothrix schenckii*.

Atualmente o *S. schenckii* pertence à divisão *Ascomycota*, subclasse *Euascmycetes*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae*, gênero *Sporothrix* e espécie *schenckii*. Várias outras espécies do gênero têm sido descritas, sendo a mais recente conhecida como *Sporothrix cyanescens*, no entanto, o *S. schenckii* é a única patogênica. A forma sexuada do agente não está totalmente definida, embora a análise molecular de rRNA ribossômico forneceu indiretamente como provável forma sexual o *Ophiostoma stenoceras*, que está relacionado para o *Ascomycetes* (LACAZ et al., 1991; KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

O *S. schenckii* é considerado saprófita de solo rico em matéria orgânica e celulose tendo sido isolado a partir de cascas de árvores, musgo (*Sphagnum*) e sementes de coníferas. Em temperatura ambiente ou em condições *in vitro* a 25°C, o agente tem rápido crescimento, apresentando-se como uma colônia inicialmente branca amarelada, sedosa, membranosa, às vezes com micélio aéreo, posteriormente tornando-se pregueada e escurecida. Microscopicamente são observadas hifas finas, septadas, ramificadas, medindo 1-2µm de diâmetro com conidióforos alongados, simpodiais, contendo ápices entumecidos, frutificando conídios hialinos, elípticos ou ovais dispostos em rosetas. Na sua forma parasitária ou quando cultivado a 37°C, a colônia adota forma leveduriforme, com aspecto de colônia bacteriana de coloração cinza ou

creme. A micromorfologia do agente evidencia células leveduriformes, pequenas, ovais ou no formato de “charutos”, com brotamento simples ou múltiplo (LACAZ et al, 1991; KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

A característica dimórfica do *S. schenckii* é comprovadamente um dos fatores relacionados a sua virulência, sendo que o dimorfismo lhe confere maior capacidade de proteção frente ao sistema imune do hospedeiro. Outros fatores associados a virulência do agente têm sido descritos, como a provável correlação entre a termotolerância e as formas clínicas da micose, considerando que isolados incapazes de crescer a temperaturas superiores a 35 e 37°C, estariam associados com lesões cutâneas características com a forma cutânea fixa da micose, enquanto que isolados termotolerantes estariam aptos a se desenvolver nos órgãos internos. Assim como a presença da melanina na parede fúngica, a qual confere ao agente proteção celular contra danos químicos e físicos (TACHIBANA et al., 1999). Em relação ao tempo de cultivo de conídeos, foi observado que os cultivados por um período de sete dias são mais virulentos, quando comparados com aqueles cultivados há 10 dias, sendo ainda detectadas diferenças entre a composição da parede celular desses conídeos. Estudos também observaram, que a forma leveduriforme é mais resistente frente ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e neutrófilos em comparação a fase filamentosa do agente (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; MORRIS-JONES et al., 2003; KAJIWARA et al., 2004).

2.2 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea, de evolução subaguda ou crônica, de ocorrência mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a micose é conhecida desde 1907, quando foi relatada a infecção no homem e em animais no estado de São Paulo por Lutz & Splendore. Posteriormente, Freitas et al. (1956) descreveram a enfermidade em gatos e Souza (1957) relatou a esporotricose em cães. No Rio Grande do Sul o primeiro relato de caso foi descrito por Londero et al. (1964), que diagnosticaram a esporotricose em dois cães, sendo que, atualmente, essa é a micose subcutânea de maior ocorrência no estado (LOPES et al., 1999; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

A esporotricose acomete o homem e várias espécies de animais, sendo os felinos os mais frequentemente infectados pelo agente. Normalmente, a infecção com *S. schenckii* ocorre devido à inoculação acidental ou traumática do agente na pele, por espinhos ou material vegetal o que, provavelmente, justifica a maior frequência da enfermidade em jardineiros, agricultores, tratadores de animais, floristas e manipuladores de sementes e mineiros, sendo considerada, portanto, uma micose ocupacional. A infecção pode também ocorrer através da contaminação de feridas abertas, ou da pele com solução de continuidade, por exsudatos provenientes de animais infectados, ou, ainda, mais raramente, pela inalação de conídios resultando em infecção pulmonar (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Os relatos de esporotricose humana descrevem frequentemente, os felinos domésticos como transmissores da doença, especialmente machos, não castrados e de livre acesso à rua, devido aos hábitos característicos desta espécie animal, sendo crescentes os relatos zoonóticos em diversos países (DUNSTAN et al., 1986; RAFAL & RASMUSSEN, 1991; KELLY & CLARK, 1991; MORISHITA et al., 2001), assim como no Brasil (LARSSON et al., 1989; FRANCO et al., 1993; MARQUES et al., 1993; NOGUEIRA et al., 1995; BRUSTEIN et al., 2000; COSTA et al., 2000 (a); SOUZA et al., 2000; CASTRO et al., 2001; FLEURY et al., 2001; MEINERZ et al., 2001; NOBRE et al., 2001; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2004; XAVIER et al., 2004; SCHUBACH et al., 2005).

Os relatos zoonóticos da esporotricose demonstram que o homem pode se contaminar através de arranhadura, mordedura, contaminação por solução de continuidade cutânea preexistente, ou contato direto da pele levemente irritada com lesões ulceradas e exsudativas dos animais enfermos. Estudos sugerem que a transmissão da esporotricose pelos felinos aos humanos, seja facilitada devido ao grande número de microrganismos encontrados nas lesões de gatos infectados, sendo que o agente foi isolado das unhas e cavidade bucal, destacando o risco de transmissão do *S. schenckii* através destas vias (SCHUBACH et al., 2000; LOPES-BEZERRA et al., 2006; SOUZA et al., 2006).

A esporotricose caracteriza-se por uma diversidade de formas clínicas, tendo apresentação nas formas cutâneas (fixa, linfocutânea e disseminada com o envolvimento cutâneo) e extracutânea (pulmonar primária e disseminada). Na forma fixa, a infecção permanece no sítio de inoculação, o tipo linfocutâneo, por sua vez, se caracteriza por uma lesão primária acompanhada pelo desenvolvimento de nódulos secundários

acompanhando a cadeia linfática regional. Já a forma disseminada é caracterizada pela extensão das lesões a grandes áreas da pele, sendo, normalmente, associada, a um quadro concomitante de imunodepressão. A apresentação extracutânea da micose é de rara ocorrência, porém a forma pulmonar decorrente da inalação de esporos fúngicos, ou de caráter secundário, devido a disseminação hematogena, são as mais relatadas. A disseminação hematogena do agente, pode também resultar em osteoartrite, e mais raramente endoftalmite e meningite (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Essa variabilidade de sintomas clínicos, bem como a regressão ocasional espontânea da esporotricose pode estar associado a capacidade de resposta imune do animal infectado frente ao agente. A forma linfocutânea está, provavelmente, relacionada com a menor exposição prévia do indivíduo ao *S. schenckii*. A exposição prolongada com pequenas quantidades de antígenos fúngicos, pode conferir, gradualmente, imunidade do hospedeiro frente ao fungo, o que sugere que a forma localizada da micose seria uma forma de reinfecção, em pacientes que desenvolveram a imunidade contra o fungo, enquanto que a forma linfocutânea ocorreria em pacientes sem o contato prévio com o agente. Já a forma extracutânea ocorre, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos, sendo demonstrado que os linfócitos CD4 são importantes na imunidade contra o agente em humanos. Em felinos, estudos procuram relacionar a coexistência de enfermidades imunossupressoras, como as retrovíroses felinas, com a esporotricose. No entanto, essa relação ainda não está comprovada, mas estudos demonstraram que animais portadores do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) ou da Imunodeficiência Felina (FIV) podem desenvolver as formas mais graves da micose (MANCIANTI et al., 1992; COURCHAMP et al., 2000; SIERRA et al., 2000; MEINERZ et al., 2002; KAJIWARA et al., 2004).

Nos animais, especialmente em cães e gatos, a esporotricose ocorre na forma de três síndromes clínicas, sendo elas: forma cutânea, onde a lesão cutânea permanece localizada, com a formação de nódulos alopecicos que tendem a ulcerar; a forma linfocutânea, onde os nódulos se desenvolvem no ponto de inoculação com a progressão da infecção para os tecidos subcutâneos e linfáticos; e a forma disseminada, relatada mais frequentemente nos felinos quando comparado a outras espécies. A forma sistêmica é causada pela disseminação da infecção, por via hematogena ou pela difusão tecidual a partir do local de inoculação, para ossos, articulações, pulmões e outras vísceras, estando associada, normalmente, a animais com a sistema imune

comprometido, principalmente a resposta celular. Embora seja rara, a inalação do agente pode resultar na forma pulmonar da doença, ou na sua disseminação sistêmica (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

A esporotricose felina pode mimetizar outras infecções granulomatosas e neoplasias cutâneas. As lesões se concentram, principalmente na região cefálica, membros e cauda, podendo ser semelhantes àquelas decorrentes de criptococose, ou, inicialmente, se assemelham a lesões provocadas por brigas, na forma de abscesso, podendo evoluir para lesões necróticas, erosivas, ulceradas e crostosas. As áreas lesadas, normalmente, são indolores e não pruriginosas, dessa forma é imprescindível, para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo, recorrer a exames complementares (LAPPIN, 1993; SCHUBACH et al., 2003; GADEA & CUENCA-ESTRELLA, 2004).

A cultura micológica de exsudatos, tecidos ou aspirados de lesões, permite à confirmação do diagnóstico para a esporotricose, sendo rara a visualização direta do microrganismo em exsudato humano, devido à pequena quantidade do agente fúngico presente. Ao passo que em felinos o exame citológico frequentemente revela a presença do agente, normalmente esses são polimorfos, podendo estar intra ou intercelularmente. Para o diagnóstico de certeza, o exame micológico é indispensável, sendo que o *S. schenckii* se desenvolve bem no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol acrescido de cicloheximida, podendo, também, ser cultivado nos meios ágar fubá, infusão cérebro-coração (BHI) e ágar batata. O dimorfismo do agente pode ser demonstrado quando este é cultivado a 25°C e a 37°C (LACAZ et al, 1991; KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992; GADEA & CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Outros exames podem auxiliar no diagnóstico da esporotricose, como as provas bioquímicas, sendo as mais realizadas, a prova de hidrólise da uréia; resistência para cicloheximida e a tolerância a adição de cloreto de sódio no meio de cultivo. Assim como o hemograma, sendo que humanos com esporotricose demonstram, normalmente a presença de leucocitose, eosinofilia e índice de sedimentação eritrocitária aumentada. A inoculação experimental de *S. schenckii* pelas vias intraperitoneal, intratesticular ou no coxim plantar de animais laboratoriais, como o camundongo, rato ou hamster pode ser útil na demonstração da patogenicidade do microorganismo. A inoculação do microrganismo pela via intraperitoneal ou intraescrotalmente em roedores, resulta dentro de duas a três semanas, na detecção do agente no fígado, baço ou testículos. A esporotricose experimental também pode ser útil na observação da resposta imune do hospedeiro, assim como, na obtenção do retroisolamento do agente (POLANIA et al.,

1990.; DIXON et al., 1992., MUJICA et al., 1992; TACHIBANA et al., 1999; TACHIBANA et al., 2001; LIMA et al., 2003; NOBRE et al., 2003; NOBRE et al., 2004; NOBRE et al., 2005).

O exame histopatológico pode complementar o diagnóstico da esporotricose, sendo que os tecidos afetados corados pelas técnicas histoquímicas de hematoxilina-eosina (H.E.), Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) e metenamina argêntica de Gomori permitem evidenciar a forma leveduriforme do *S. schenckii*. Em H.E. as células fúngicas se apresentam pleomórficas, com corpos celulares pequenos, medindo entre 3 a 5µm envoltos por um halo. Quando corados em P.A.S. apresentam corpo celular basofílico, halo claro e rima periférica vermelha. Corados pela prata metenamina de Gomori, observam-se formas de naveta, arredondadas com brotamento simples, claviformes e/ou brotamentos arredondados. As leveduras podem ainda estar revestidas por imunoglobulinas, assumindo aspecto de corpúsculos asteróides (fenômeno de Splendore- Hoeppli), sendo este achado sugestivo da infecção pelo agente. No entanto, as formas parasitárias do agente podem não ser visualizadas, mesmo em casos de lesões ativas, com cultura positiva.. A reação inflamatória observada no exame histopatológico resultante de todas as formas clínicas de esporotricose é do tipo mista purulenta e granulomatosa (FLEURY et al., 2001; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

A formação de granulomas com microabcedação central pode ser observada na epiderme, derme, tecido subcutâneo ou outros tecidos, caso esteja na forma disseminada. O granuloma causado pelo *S. schenckii* pode apresentar centro supurativo, necrótico, circundado por inflamação granulomatosa epitelióide, com grande número de células gigantes, multinucleadas e halo linfoplasmocitário com tecido de granulação e fibrose. Células epitelióides, células gigantes e linfonodos encapsulados por tecido conjuntivo fibroso são infiltrados celulares clássicos no interior dos granulomas (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Os achados histopatológicos para as espécies canina e felina, se caracterizam por uma epiderme acantótica e ulcerada com crostas e excudação variável, sendo frequente a presença de abscessos na epiderme hiperplásica. Nos felinos pode ser observada uma intensa inflamação composta por macrófagos e alguns neutrófilos em um padrão piogranulomatoso nodular a difusa na derme superficial e profunda. Ocasionalmente podem estar presentes linfócitos e plasmócitos. O que diferencia a esporotricose felina das demais espécies é a grande quantidade de elementos fúngicos, os quais são facilmente visualizados, mesmo em colorações de rotina (MORRIS-JONES, 2002;

SCHUBACH et al., 2003).

2.3 Tratamento da esporotricose

Até 1940 os iodetos eram as únicas substâncias disponíveis para a esporotricose cutânea ou cutânea linfática. Sugere-se que o mecanismo de ação seja devido a atuação desses compostos sobre a resposta imune do hospedeiro, realçando o sistema halogênio-peroxidase dos polimorfos nucleares, porém estudos *in vitro* não confirmaram a atividade do iodo frente ao *S. schenckii* (DE PAUW, 2000; NOBRE et al., 2002 (a); LUMBRERAS et al., 2003; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004).

Atualmente o uso do iodo, na forma de iodeto de sódio e potássio é uma alternativa terapêutica de baixo custo no tratamento da esporotricose de cães, eqüinos e para o próprio homem, sendo administrado normalmente, como solução saturada, pela via oral, na concentração de 20%. Em cães de grande porte, são indicadas soluções nas doses de 40mg/kg de 8/8 ou 12/12 horas e em gatos o iodeto deve ser administrado em doses inferiores, aconselhando-se 10mg/kg a cada 12 horas, sendo que o tratamento deve prosseguir por pelo menos um mês após a obtenção da cura clínica. No entanto, o esquema terapêutico é frequentemente interrompido devido ao aparecimento de reações alérgicas e tóxicas, especialmente em felinos que apresentam maior sensibilidade aos preparados contendo iodo. Os principais sintomas de intoxicação observados nessa espécie animal são, a presença de secreções óculos-nasais, seborréia seca e ressecamento da pelagem, vômito, anorexia e depressão, sendo recomendado a suspensão do tratamento (LUMBRERAS et al., 2003; CATALÁN & MONTEIRO, 2006).

A anfotericina B, antibiótico poliênico, foi introduzida em 1956, representando o primeiro antifúngico de administração sistêmica comercialmente disponível e desde então tem sido o tratamento de escolha para a esporotricose nas formas extracutâneas, cutâneas recalcitrantes e disseminadas em humanos. O fármaco atua se ligando ao ergosterol da membrana da célula fúngica, induzindo mudanças na permeabilidade de membrana com conseqüente extravasamento de componentes e morte celular. Quando administrada pela via oral possui baixa distribuição, com menos de 5% de biodisponibilidade, sendo necessária administração endovenosa para alcançar e manter

concentrações adequadas no plasma (POLAK, 1999; ODDS, 2003; CATALÁN & MONTEIRO, 2006).

A anfotericina B além de se ligar ao ergosterol também pode, embora em menor extensão, se ligar a outros esteróis, como ao colesterol, o que justifica, em grande parte, a magnitude da toxicidade associada ao seu uso. Assim, mesmo com boa atividade sobre o *S. schenckii*, os frequentes efeitos adversos limitam o seu uso, sendo que os efeitos colaterais mais descritos são a hipocalcemia e hipertermia. Outros efeitos são observados com relativa frequência, sendo os principais a anorexia, náuseas, vômito, cefaléia, mialgia e flebite. Reações anafiláticas podem ocorrer em 1% dos usuários, aconselhando-se a interrupção do esquema terapêutico. A nefrotoxicidade, um dos efeitos adversos mais importantes, ocorre, geralmente, no início da terapia, normalmente reversível, sendo decorrente da diminuição na taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, resultando em azotemia e oligúria (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004).

Buscando minimizar os efeitos adversos da anfotericina B e aumentar a sua eficácia terapêutica, foram desenvolvidas novas formulações do fármaco, surgindo os análogos do composto como o éster metílico da anfotericina B, que demonstrou ser menos tóxico, apresentando, no entanto, efeitos relacionados ao sistema nervoso central. Os complexos lipossomais de anfotericina B são outra nova opção, indicados para maximizar a penetração do fármaco, porém, com a desvantagem de elevar muito os custos do tratamento (LYMAN & WALSH, 1992; ODDS, 2003; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004;).

A anfotericina B tem uso restrito em animais devido, principalmente, aos seus efeitos nefrotóxicos. Para cães a forma convencional do fármaco (desoxicolato) deve ser administrado 0,25 a 0,5mg/kg, endovenoso, dissolvido em 500mL a 1L de solução dextrose a 5%, durante seis a oito horas, três vezes por semana, por um período de dois a quatro meses. Já a forma lipossomal deve ser administrada na dose de 2,25mg/kg, endovenosa a cada 72 horas. Em felinos a forma convencional da anfotericina B deve ser utilizada nas doses de 0,25 a 0,5mg/kg, nas mesmas condições descritas para cães (ROCHETTE et al., 2003).

Os antifúngicos do grupo dos triazóis, especialmente o itraconazol, emergiram como uma alternativa terapêutica eficaz e com reduzidos efeitos colaterais em relação aos fármacos tradicionalmente utilizados na terapia da esporotricose, sendo atualmente o fármaco de eleição para o tratamento das formas cutâneas e linfocutâneas da micose.

No entanto devido, principalmente, ao seu uso indiscriminado são cada vez mais freqüentes os relatos de resistência e falhas terapêuticas no tratamento da micose em animais e humanos (LUMBRERAS et al., 2003; ODDS, 2003; SCHUBACH et al., 2004).

A ação de outros antifúngicos mais recentes, como a terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, tem sido avaliada como uma alternativa para o tratamento da esporotricose. Este fármaco vem demonstrando uma boa atividade *in vitro* frente ao *S. schenckii*, assim como, boa tolerabilidade e ação no tratamento da esporotricose cutânea e cutânea linfática (PETRANYI et al., 1987; HULL & VISMER, 1992; HAY, 1999; RYDER, 1999; PEREZ, 1999; KAUFFMAN et al., 2000; JAIN & SEHGAL, 2000; JESSUP et al., 2000; MORISHITA et al., 2001; TANUMA et al., 2001; ODDS, 2003; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; CHAPMAN et al., 2004; COSKUN et al., 2004; KHOLER et al., 2004; TRILLES et al., 2005; KHOLER et al., 2006), necessitando, no entanto, mais estudo a fim de avaliar sua eficácia no tratamento da esporotricose felina.

2.3.1 Terbinafina

As alilaminas pertencem a um grupo de antifúngicos sintéticos descobertos acidentalmente durante estudos de um produto com a atividade sobre o sistema nervoso central, que resultou em um derivado ciananil chamado naftifina. Essa classe de antifúngico é composta por fármacos com grande afinidade pelas enzimas fúngicas, existindo duas alilaminas disponíveis no mercado, a naftifina e terbinafina. A primeira está disponível apenas na apresentação tópica e a terbinafina além de várias apresentações tópicas, ainda está disponível na formulação oral (JESSUP et al., 2000; DARKES et al., 2003).

A terbinafina age inibindo a enzima esqualeno epoxidase e bloqueia a conversão da esqualeno para lanosterol, e desse modo, eliminando o ergosterol dentro da membrana celular fúngica alterando a biossíntese dos esteróis fúngicos, acarretando a deficiência do ergosterol, ocasionando a morte da célula fúngica. A inibição da enzima não é mediada através do citocromo P-450, o que a diferencia dos azóis, não afetando os níveis de cortisol e testosterona mesmo quando administrada em altas doses (ODDS, 2003; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004).

A terbinafina é bem absorvida por via oral, sendo que cerca de 70-80% no

sistema gastrointestinal e somente uma fração deste fármaco é absorvida por via tópica. A sua biodisponibilidade é discretamente alterada pela ingestão de alimentos, demonstrando uma alta disponibilidade quando administrada junto a refeições com alto teor de lipídios. A sua lenta redistribuição no sangue assim como o acúmulo no tecido periférico são fatores que provavelmente influenciem na longa meia-vida de eliminação do fármaco. O agente sofre metabolização hepática e aproximadamente 80% é excretado na urina e o restante nas fezes (POLAK, 1999; CATALÁN & MONTEIRO, 2006).

A natureza lipofílica e queratofílica da terbinafina leva ao seu acúmulo no tecido adiposo e queratinizado, sendo por essas características, o fármaco de primeira escolha para o tratamento das dermatofitoses e onicomicoses. Estudos demonstraram que seu espectro de ação *in vitro* e *in vivo* pode ser ampliado para uma gama de fungos patogênicos responsáveis por micoses superficiais e infecções sistêmicas, como a histoplasmose, pneumocistose e aspergilose (HAY, 1999; JAIN & SEHGAL, 2000; WALZER & ASHBUGH, 2002).

Com relação ao uso da terbinafina no tratamento da esporotricose, vários autores confirmam a boa atividade utilizando o fármaco nas formas cutâneas e linfocutâneas da micose com doses variando de 125mg a 1000mg (HULL & VISMER, 1992; MORISHITA et al., 2001; TANUMA et al., 2001; CHAPMAN et al., 2004; COSKUN et al., 2004). Quanto ao uso do antifúngico na Clínica Veterinária, estudos administrando o fármaco em felinos nas doses de 10 a 40mg/kg não observaram efeitos colaterais, sendo incluída, além do iodeto de potássio e itraconazol, na terapêutica de felinos com esporotricose, porém são ainda escassos as análises que confirmem a sua ação no tratamento da esporotricose felina e em cães (MANCIANTI et al., 1999; KOTNIK et al., 2001; ROCHETTE et al., 2003).

Assim como os estudos clínicos, as análises referentes a suscetibilidade *in vitro* do *S. schenckii* frente a terbinafina também resultaram na boa atividade do fármaco, sendo que demonstraram atividade fungicida frente ao agente, com valores de CIM iguais ou menores aos antifúngicos tradicionalmente utilizados no tratamento da esporotricose (PETRANYI et al., 1987; HULL & VISMER, 1992; HAY, 1999; RYDER, 1999; PEREZ, 1999; JESSUP et al., 2000).

Os efeitos colaterais devido ao uso da terbinafina, quando ocorrem, são pouco intensos e temporários. Os sinais de intoxicação mais comuns incluem: anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, urticária e exantema, quando administrados pela via oral ou

tópica. Com o uso tópico pode ocorrer eritema, prurido ou sensação de ardor no local da aplicação. Raramente, podem ser observadas reações cutâneas graves, alteração do paladar, perda do apetite e alterações hepatobiliares. A hepatotoxicidade associada a terbinafina é de rara ocorrência, sendo poucos os relatos desse efeito (BALFOUR & FAULDS, 1992; LAZAROS et al., 1996; AMICHAÏ & GRUNWALD, 1998; FERNADES et al., 1998; SULLIVAN, 1999).

2.3.2 Itraconazol

Os antifúngicos do grupo dos azóis são estruturalmente relacionados, compondo fármacos de amplo espectro com similar mecanismo de ação, variando a farmacocinética, a toxicidade e uso clínico. A estrutura química compreende, basicamente, um ou mais anéis de cinco átomos de carbono (anel azólico), unidos ao restante da molécula por ligação do tipo C-N. Os imidazóis contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico enquanto que, para os triazólicos, um terceiro átomo de nitrogênio foi introduzido na estrutura (POLAK, 1999; JAHAM et al., 2000).

Embora haja diferenças estruturais entre os azóis, sugere-se que os fármacos pertencentes ao grupo compartilhem semelhantes mecanismos de ação, atuando através da inibição da biossíntese do ergosterol, que é o produto final da via metabólica de esteróis fúngicos. Isso ocorre devido à inibição seletiva da enzima 14 alfa-demetilase, dependente do citocromo P-450, que participa da seqüência de eventos envolvida na conversão de lanosterol a ergosterol. Consequentemente, ocorre um acúmulo de uma série de precursores metilados com a concomitante diminuição, ou mesmo a ausência, do produto final da via biossintética. Com a substituição do ergosterol por precursores metilados há a formação de membranas plasmáticas defectivas, com permeabilidade alterada. A atividade antifúngica é primariamente fungioestática, podendo ser fungicida em doses elevadas frente a determinadas espécies fúngicas (JAHAM et al., 2000).

Em se tratando especificamente do itraconazol, o fármaco tem recebido maior destaque, devido ao largo espectro de ação frente a leveduras e fungos filamentosos responsáveis pelas micoses superficiais e sistêmicas com efeitos tóxicos bastante reduzidos, por demonstrar maior afinidade pelo sistema enzimático fúngico. O itraconazol se liga mais especificamente ao citocromo celular fúngico do que àqueles pertencentes aos mamíferos, demonstrando com isso pouca ou nenhuma interação com

o sistema enzimático humano. Esse fator determina a toxicidade seletiva dos azóis, mesmo que alguns processos metabólicos da célula humana também dependam de reações mediadas pelo citocroma P-450, os azóis demonstram maior afinidade pelo sistema enzimático fúngico (WU et al., 2004; CATALÁN & MONTEIRO, 2006).

O itraconazol foi autorizado em 1992 para uso nos quadros de blastomicose, aspergilose e histoplasmose, inclusive em pacientes imunossuprimidos. Em especial para a esporotricose, o fármaco demonstrou alta atividade tanto em estudos *in vitro* como estudos *in vivo* e estudos clínicos nas formas cutâneas, linfocutâneas e extra-cutâneas da micose nas doses de 100 a 200mg/dia com bons resultados terapêuticos (RESTREPO et al., 1986; BAKER et al., 1989; GRANT & CLISSOLD, 1989; CONTI-DIAZ et al., 1992; LESHER, 1992; BREELING & WEINSTEIN, 1993; WINN et al., 1993; SCHARKEY-MATHIS, 1993; MERCURIO & ELEWISKI, 1993; BADLEY & VAN SCOY, 1996; RAMIREZ et al., 1998; NOGUCHI et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2000; BONIFAZ et al., 2001; MCGINNIS et al., 2001; STALKUP et al., 2002; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004).

Na Clínica Veterinária, o itraconazol é o fármaco antifúngico mais amplamente utilizado. As suas indicações incluem o tratamento da dermatofitose, blastomicose e aspergilose nasal em cães nas doses de 5 a 10mg/kg. Em felinos é utilizado no tratamento das dermatofitoses e criptococose nas mesmas doses prescritas para cães, sendo que para a esporotricose as doses podem variar de 10 a 40mg/kg (NOBRE et al., 2002 (a); ROCHETTE et al., 2003).

O itraconazol é bem absorvido pela via oral, aconselhando-se a sua administração, para melhor biodisponibilidade, juntamente com refeições ricas em lipídios. A absorção é altamente dependente do pH gástrico, por isso recomenda-se, para a sua máxima absorção, evitar a administração simultânea de fármacos que diminuam a acidez estomacal como cimetidina e ranitidina. O fármaco demonstra ampla distribuição na maioria dos tecidos orgânicos em níveis superiores às concentrações sanguíneas, explicando, assim, a sua eficácia no tratamento de um grande número de micoses. No entanto, são consideradas desprezíveis a sua concentração no fluido cérebro-espinhal, saliva e fluidos oculares. Seu metabolismo é hepático, sendo eliminado através das fezes e tendo alguns de seus metabólitos encontrados na urina (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; CATALÁN & MONTEIRO, 2006).

O itraconazol é comercializado na forma de cápsulas e solução oral. A cápsula apresenta absorção variável, enquanto que a apresentação líquida é formulada com

ciclodextrina que estabiliza o antifúngico e aumenta a sua absorção, resultando em maiores níveis séricos e teciduais. A formulação líquida melhora em 30% a disponibilidade do agente e deve ser administrada preferencialmente à cápsula, para todos os pacientes imunossuprimidos com doença sistêmica. Ainda está disponível uma formulação intravenosa do itraconazol, também solubilizada em ciclodextrina, oferecendo maior absorção e maiores índices séricos do que qualquer formulação oral do fármaco. A formulação endovenosa é o tratamento de primeira escolha para histoplasmose e blastomicose. No entanto a ciclodextrina é excretada pela urina, o que limita o uso em pacientes com a função renal reduzida, sendo contra-indicada em pacientes com patologias renais (DE PAUW, 2000; KAUFFMANN et al., 2000).

Mesmo sendo o itraconazol considerado um fármaco com reduzida toxicidade em relação aos outros azóis, são descritos como os principais efeitos colaterais náuseas, vômitos, hipocalcemia, hipertensão e cefaléia, sendo contra-indicado na gravidez, lactação e em pacientes com doença hepática. Em felinos foi descrito efeitos como anorexia e ocasionalmente sinais gastrointestinais. Ainda podem ser observados, em algumas espécies, aumento de enzimas hepáticas como a fosfatase alcalina, sendo aconselhável monitorar o paciente mensalmente (AMICHAÏ & GRUNWALD, 1998; KAUFFMANN et al., 2000; ROCHETTE et al., 2003).

2.4 Provas de suscetibilidade antifúngica

As técnicas utilizadas na execução das provas de antifungigrama têm sido adaptações daquelas tradicionalmente empregadas para bactérias, sendo as mais utilizadas a diluição em caldo, diluição e difusão em ágar. Porém, devido a variáveis observadas nos meios de cultura empregados, pH do meio e os tampões utilizados, as concentrações do inóculo, o tempo e temperatura de incubação e ainda a inibição parcial nos testes com azólicos tornava-se impraticáveis as comparações desses resultados entre os laboratórios. Ao passo que com o aumento de pacientes imunodeprimidos, conseqüentemente suscetíveis a doenças micóticas onde o tratamento antifúngico está sujeito a recidiva, falhas terapêuticas e aparecimento de resistência, o teste *in vitro* tornaram-se fundamentais no auxílio da escolha terapêutica, ou mesmo para detectar os casos de resistência, auxiliar nos estudos de interações entre os fármacos e nas pesquisa

de novos agentes antifúngicos (CUENCA-ESTRELLA & TUDELA, 2002; SANGLARD, 2003).

Nessas circunstâncias, o Comitê Nacional para a Padronização Clínica e Laboratorial (National Committee for Clinical and Laboratory Standards-NCCLS) desenvolveu estudos sobre as características biológicas dos fungos, as propriedades físico-químicas dos antifúngicos e, sobretudo, as condições técnicas do ensaio, resultando em publicações de documentos que padronizavam as técnicas antifúngicas (CORMICAN & PFALLER, 1996; SANGLARD, 2003).

Em 1997 o NCCLS publicou o documento M27-A, o qual descreve a metodologia aplicada para o estudo da suscetibilidade antifúngica frente a fungos leveduriformes. O método se baseia no cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM), implantando a técnica de diluição em caldo (NCCLS, 2002b). Em 2002 foi publicada a segunda edição deste documento (NCCLSM27-A2), incluindo modificações na técnica de macrodiluição, surgindo a técnica de microdiluição em caldo, a qual consiste na preparação de diferentes concentrações do antifúngico em um meio líquido, nos quais adiciona-se o inóculo do fungo. Essa técnica demonstra várias vantagens em relação a anterior, como a maior facilidade na sua execução e além da possibilidade de determinar a CIM, estabelece também a concentração fungicida mínima (CFM) (NCCLS, 2002b).

A CIM para um antifúngico com atividade fungicida representa a menor concentração do fármaco capaz de produzir inibição total do crescimento fúngico ou a menor concentração do agente fungistático que produzir diminuição proeminente em turvação em tempo e temperaturas variáveis conforme o microrganismo estudado. Para o itraconazol e os novos triazólicos, posaconazol, ravuconazol e voriconazol, a leitura da CIM pode ser definida como a menor concentração do fármaco que proporciona qualquer grau de crescimento discernível (NCCLS, 2002b).

As provas de suscetibilidade antifúngica para fungos leveduriformes foram mais desenvolvidas em relação aos fungos filamentosos devido à importância das leveduras na clínica médica e ainda pelas dificuldades na realização das provas antifúngicas para fungos filamentosos, entre elas a dificuldade de padronização do inóculo, tempo e temperatura de incubação. Em 2002, o NCCLS publicou documento M38-A para a realização de provas de suscetibilidade frente aos fungos filamentosos (NCCLS/M38-A, 2002), sendo similar ao proposto para as leveduras. O método M38-A foi adaptado a espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus* além da forma filamentosa do *Sporothrix*

schenckii, não sendo, no entanto, utilizados, para avaliar a suscetibilidade da fase leveduriforme de fungos dimórficos (NCCLS, 2002a).

Em relação ao comportamento do *S. schenckii* frente às provas de suscetibilidade, sabe-se que os testes de antifungograma para os fungos dimórficos ainda não são confiáveis, devido, principalmente, aos problemas referentes à reprodutibilidade intra e inter-laboratoriais, especialmente da sua fase filamentosa, onde a principal dificuldade está na padronização do inóculo. Ao passo que na sua forma leveduriforme o seu crescimento pode ser mais lento em comparação as bactérias ou as outras leveduras (MAGDALI et al., 2000).

O *S. schenckii* apresenta particularidades que devem ser levadas em consideração para a execução dos testes de suscetibilidade. Dentre elas, se destaca a diferença entre a suscetibilidade conforme a forma do agente utilizada, onde os estudos demonstram maior sensibilidade quando utilizado a sua fase leveduriforme. Outro fator relevante é que os documentos descritos no NCCLS preconizam uma temperatura de incubação de 35°C, embora a temperatura ideal para o crescimento *in vitro* do *S. schenckii* esteja entre 25°C a 30°C. Aliado ao fato de que a maioria dos estudos que determinaram a suscetibilidade *in vitro* de antifúngicos frente ao *S. schenckii* utiliza como inóculo a fase filamentosa mesmo sendo a fase leveduriforme a forma patogênica. Salientando ainda que os métodos de referência descritos no NCCLS propõem apenas condições para a realização das provas de sensibilidade na sua forma filamentosa (TRILLES et al., 2005).

O NCCLS serviu de base para a criação do *El European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas* (EUCAST-ESCMID), baseado no método NCCLS-M27-A. Porém, com algumas modificações, como o período de incubação para a obtenção do CIM (24-48h) assim como, a substituição da leitura visual para o cálculo da porcentagem da inibição, incorporando a leitura espectrofotométrica (EUCAST, 2003). O EUCAST em termos gerais apresenta uma correlação elevada com as técnicas referentes ao NCCLS, constituindo uma alternativa válida para os estudos de sensibilidade antifúngica (CUENCA-ESTRELLA & TUDELA, 2002).

2.5 Relação das provas *in vitro* com os resultados *in vivo*

Paralelamente aos estudos de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos, foram desenvolvidas análises a fim de determinar a concentração do fármaco (CIM) que poderia ser utilizada para as provas *in vivo*, resultando, no entanto, na determinação de pontos de corte para um número limitado de fármacos antifúngicos (fluconazol, itraconazol e 5-flucitosina) frente a determinadas espécies de *Candida* (CORMICAN & PFALER, 1996; ESPINEL-INGROFF, 1996; TOMÁS et al., 2004).

Os testes de suscetibilidade antifúngica, em sua maioria, são realizados em condições padronizadas utilizando uma fase constante de crescimento do microrganismo com condições fixas de pH, temperatura, umidade e concentração de oxigênio. Porém, em infecções, essa situação normalmente não persiste, existindo vários fatores que podem influenciar a correlação entre as provas *in vitro* com as *in vivo*. Dentre os fatores, deve-se levar em consideração os intrínsecos ao antimicrobiano, ao hospedeiro e ao patógeno (ALVES et al., 1999; RIVAS & SERRANO, 2003).

Em relação aos fatores que podem influenciar a correlação entre as provas de suscetibilidade com os estudos *in vivo* se destaca o sistema imunológico do organismo suscetível, sendo a imunidade fundamental para debelar um microrganismo patogênico, onde qualquer falha dessa resposta pode alterar a evolução da infecção. Assim como existe a possibilidade de uma interação entre o fármaco e as células do hospedeiro, podendo resultar na diminuição da resposta imunológica (RIVAS & SERRANO, 2003; GADEA & CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Sob um ponto de vista farmacológico, uma infecção só pode responder a um tratamento se esse for capaz de alcançar concentrações ativas e adequadas. As concentrações do fármaco devem ser comprovadas através do cociente entre as concentrações do antifúngico no soro ou tecido, com a desvantagem da dificuldade de determinar os parâmetros farmacocinéticos na região da infecção. É importante considerar que porcentagens dos fármacos, se unem as proteínas plasmáticas, permanecendo uma pequena parcela ativa. Ainda, sabe-se que alguns antifúngicos quando metabolizados resultam em metabólitos com ação antimicrobiana variável, necessitando determinar essa atividade. Deve-se ainda considerar as variações individuais do paciente saudável com o enfermo, sendo ainda obscura a relação ideal entre os parâmetros farmacocinéticos e a sensibilidade *in vitro* dos microrganismos. A

localização da infecção é um outro fator que pode interferir no desenvolvimento do quadro clínico, assim como condições de anaerobiose e pH, que podem influenciar diretamente sob a atividade de um fármaco (ODDS, 2003; SANGLARD, 2003).

Assim como os fatores relacionados aos fármacos, vários são os aspectos associados ao microrganismo que podem influenciar na resposta de um determinado antifúngico. Dentre esses se destacam a concentração do inóculo, fase de crescimento, fatores de virulência como toxinas, enzimas extracelulares, produtos metabólicos, além de fatores de aderência e a resistência a ação do soro (CUENCA-ESTRELLA & TUDELA, 2002).

Os estudos em modelos experimentais podem oferecer a possibilidade de integrar os efeitos do fármaco e as defesas do organismo hospedeiro, sendo que alguns autores indicam uma boa correlação entre os resultados *in vitro* e a evolução da enfermidade nos animais. A principal limitação desses estudos, se deve a extrapolar os achados experimentais para a espécie humana. Principalmente devido a farmacocinética dos animais experimentais ser diferente ou diferir da dos seres humanos (RIVAS & SERRANO, 2003; GADEA & CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Mesmo com as dificuldades de se determinar a melhor forma de conseguir métodos confiáveis para a correlação dos testes *in vitro* com os *in vivo*, essa é fundamental, principalmente para utilizar o valor observado da CIM como utilidade terapêutica, sendo que esses valores obtidos nos testes de suscetibilidade *in vitro* deveriam limitar um ponto de corte (ALVES et al., 1999; RIVAS & SERRANO, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em três etapas, que consistiram: estudo da atividade *in vitro* dos fármacos antifúngicos frente ao *S. schenckii*; análise das enzimas hepáticas e hemograma e avaliação do tratamento antifúngico (terbinafina e itraconazol) frente a esporotricose experimental sistêmica.

3.1 Teste de suscetibilidade antifúngica

Para o estudo da suscetibilidade do *S. schenckii* frente aos fármacos antifúngicos, foram utilizados 10 isolados provenientes de seis casos de esporotricose felina (Figura 1), três humanos (Figura 2) e um isolado de cão (Figura 3), sendo esses oriundos da Micoteca do Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

O antifungigrama foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo conforme o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) adaptada para um fungo dimórfico conforme a metodologia descrita por Trilles et al (2005).



Figura 1- Casos de esporotricose felina, os quais originaram os isolados de *Sporothrix schenckii* utilizados para o estudo da suscetibilidade antifúngica. Laboratório de Micologia-UFPEL.



Figura 2- Caso de esporotricose em cão, o qual originou o isolado de *Sporothrix schenckii* utilizado para o estudo da suscetibilidade antifúngica. Laboratório de Micologia-UFPEL.



Figura 3- (a) esporotricose cutâneo-linfática correspondente ao caso 1; (b) esporotricose cutânea fixa correspondente ao caso 2; (c) esporotricose cutânea disseminada correspondente ao caso 3. Laboratório de Micologia-UFPel.

3.1.2. Manutenção e conversão dos isolados de *Sporothrix schenckii*

Todas as amostras de *S. schenckii* foram mantidas na sua fase miceliana a partir de subculturas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI), mantidos sob refrigeração em temperatura média de 4°C, realizando subcultivos em intervalos de seis meses, como o recomendado por Kohler et al. (2004).

A conversão do *S. schenckii* para a fase leveduriforme foi obtida através do cultivo dos isolados em meio líquido BHI incubados durante 10 dias à 37°C sob agitação (100 ciclos/minutos). Posteriormente a cultura foi filtrada em camada dupla de gaze estéril, centrifugada (1500 rpm/ 15 minutos) e lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS).

3.1.3 Preparo do inóculo fúngico

3.1.3.1 Inóculo da fase leveduriforme do *Sporothrix schenckii*

Os inóculos fúngicos, foram preparados a partir de colônias leveduriformes de 48-72 horas de *S. schenckii*, cultivadas em meio BHI líquido sob constante agitação a 37°C. As colônias foram ressuspensas em tubos contendo solução salina estéril depois de agitadas por 15 segundos em Vortex e ajustada a turbidez em 0,5 da escala de MacFarland. A suspensão fúngica foi diluída em solução salina (1:50) homogeneizada e

submetida a uma diluição (1:20) em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) acrescido do tampão de Ácido Morfolino Propanosulfônico (MOPS). Após, o inóculo fúngico foi distribuído no sentido das linhas das microplacas em volumes de 100 μ L.

3.1.3.2 Inóculo da fase filamentosa do *Sporothrix schenckii*

O inóculo correspondente a fase filamentosa do *S. schenckii* foi obtido a partir de colônias de 10 dias incubadas a 25°C em meio Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e cicloheximida. A colônia foi recoberta por 1mL de solução salina estéril, adicionando-se uma gota (0,01mL) de Tween 20, com o posterior preparo da suspensão fúngica através da suave raspagem das colônias com auxílio de ponteiros estéreis sobre as hifas. Essa suspensão (1mL) foi colocada em um tubo estéril, sendo que após 5 minutos, período necessário para a sedimentação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril, homogeneizada por 15 segundos em agitador Vortex. A suspensão fúngica foi diluída em RPMI (diluição 1:50) com tampão MOPS alcançando a $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL. O inóculo foi distribuído no sentido das linhas das microplacas em volumes de 100 μ L.

3.1.4 Preparo das diluições dos antifúngicos

A partir da solução mãe dos fármacos terbinafina e itraconazol nas concentrações de 1600 μ g/mL foi realizada nove diluições seriadas em DMSO alcançando uma concentração final dos antifúngicos de 3 μ g/mL. Essas concentrações foram diluídas á 1% em meio RPMI 1640 com tampão MOPS estabelecendo concentrações com intervalos de 16 μ g/mL a 0,03 μ g/mL. Alíquotas de 100 μ l dessas concentrações foram dispensadas seqüencialmente nas placas de microtitulação, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez.

3.1.5 Leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes de suscetibilidade antifúngica foram realizados em duplicata, sendo uma coluna da microplaca para o controle positivo, preenchida com meio RPMI1640 com MOPS e inóculo fúngico e outra coluna referente ao controle negativo, contendo o meio RPMI1640.

Para a realização da leitura da CIM utilizando a fase leveduriforme do *S. schenckii*, as microplacas foram incubadas à 35°C por cinco dias. Já para o estudo da fase filamentosa do agente, as microplacas foram incubadas a 30°C por um período de seis dias. A leitura da CIM foi de acordo com a metodologia descrita por Trilles et al. (2005), onde correspondeu a menor concentração do antifúngico capaz de produzir proeminente inibição do crescimento do *S. schenckii* quando comparado ao controle-positivo.

3.2 Avaliação das enzimas hepáticas e hemograma dos animais experimentais submetidos ao tratamento com os antifúngicos e seus respectivos diluentes

A primeira etapa do estudo consistiu na avaliação das enzimas hepáticas e hemograma (série branca e vermelha) dos animais experimentais através da análise da Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA), hemograma completo e análise histopatológica dos órgãos pertencentes ao sistema respiratório, digestório, tecido sub-cutâneo, testículos, baço, fígado e rins.

Para estas análises laboratoriais foram utilizados como modelos biológicos 40 ratos norvegicus, albinos linhagem Wistar, com oito semanas de idade, machos com massa corporal média de 300g. Os animais foram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sendo mantidos em condições constantes de umidade, temperatura (25°C) e 12 horas de ciclo de claro e escuro recebendo dieta e água “ad libitum” durante o período experimental.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais contendo 10 animais em cada grupo, sendo eles: tratado terbinafina (tratados com 250mg/Kg de terbinafina diluída em uma solução contendo 1% de Tween 20 e 5% de DMSO); tratado itraconazol (tratados com 100mg/kg de itraconazol diluído em água destilada estéril) e

os grupos diluente terbinafina e itraconazol, os quais foram administrados os respectivos diluentes de cada fármaco.

Os fármacos e diluentes foram administrados diariamente pela via oral com o auxílio de uma sonda orogástrica por um período de 30 dias, quando foi coletado sangue (1mL) através de punção intracardiaca para análises laboratoriais, com a posterior necropsia para estudo histopatológico.

As enzimas hepáticas foram analisadas através do Kit comercial Lab-test executado de acordo com as normas do fabricante com a posterior leitura em aparelho espectrofotométrico. O hemograma foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas Veterinária (HCV) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas-UFPEL e análise histopatológica no Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas-UFPEL.

3.3 Avaliação dos antifúngicos no tratamento da esporotricose experimental sistêmica

Para a realização do estudo *in vivo* foram utilizados os mesmos modelos biológicos nas condições descritas anteriormente. Sendo que para essa fase experimental, foram utilizados 120 ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albinos linhagem Wistar.

Os animais experimentais foram divididos em quatro grupos experimentais para cada isolado do *S. schenckii* estudado, sendo os grupos: tratado terbinafina composto de 40 animais os quais foram administrados 250mg/Kg de terbinafina diluída em uma solução contendo 1% de Tween 20 e 5% de DMSO; tratado itraconazol com 40 animais, os quais foram administrados 100mg/kg de itraconazol diluído em água destilada estéril e os grupos diluente terbinafina e diluente itraconazol contendo 20 animais em cada grupo em que foi administrado os respectivos diluentes de cada fármaco (Tabela 1).

Tabela 1- Grupos experimentais utilizados para o estudo *in vivo*

Grupos experimentais	Isolado 1 (nº de animais)	Isolado 2 (nº de animais)
Tratado terbinafina	20	20
Diluyente terbinafina	10	10
Tratado itraconazol	20	20
Diluyente itraconazol	10	10

3.3.1 Isolados de *Sporothrix schenckii* envolvidos no estudo

Todos os animais experimentais foram inoculados com a fase filamentosa do *S. schenckii*, sendo utilizados dois isolados, os quais corresponderam, respectivamente, ao caso de esporotricose cutânea disseminada felina e um ao caso de esporotricose cutânea em um cão (Figura 4).

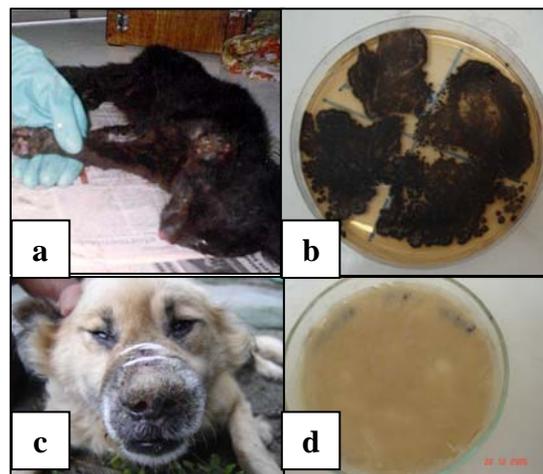


Figura 4- (a) felino com esporotricose cutânea disseminada, o qual foi obtido o isolado fúngico utilizado para a inoculação experimental; (b) isolado de *S. schenckii* correspondente ao felino envolvido no estudo; (c) cão com esporotricose cutânea, o qual foi obtido o isolado fúngico utilizado para a inoculação experimental; (d) isolado de *S. schenckii* correspondente ao cão envolvido no estudo- Laboratório de Micologia-UFPeL.

3.3.2 Preparo do inóculo fúngico

O inóculo fúngico foi preparado utilizando colônias de *S. schenckii* cultivadas a 25°C por um período de 7 a 10. As colônias foram retiradas do meio de cultura com auxílio de um bisturi estéril, posteriormente foram filtradas em camada dupla de gaze estéril, centrifugada (1500 rpm/15 minutos), lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS) homogeneizado e padronizado em 2×10^3 células de *S. schenckii*/mL (Figura 5).

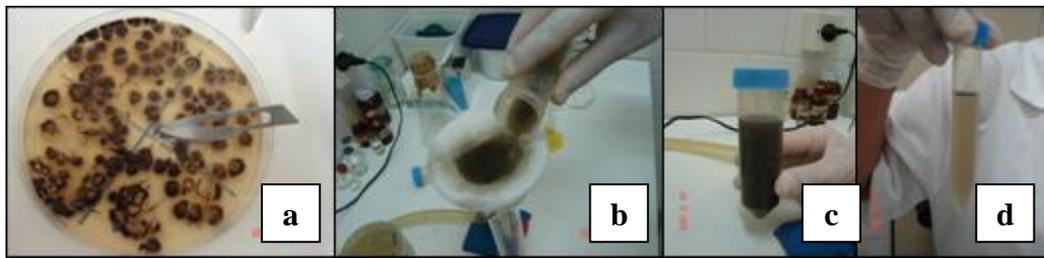


Figura 5- (a) retirada das colônias de *Sporothrix schenckii* do meio de cultura com auxílio de um bisturi estéril; (b) filtragem das colônias em camada dupla de gaze estéril; (c) lavagem das colônias com PBS; (d) Padronização do inóculo fúngico. Laboratório de Micologia-UFPEl.

3.3.3 Inoculação experimental

A suspensão de células fúngicas na concentração de 2×10^3 células de *S. schenckii*/mL foram inoculadas em volume de 0,1mL pela via intraperitoneal e a mesma dosagem pela veia lateral da cauda em todos os animais (Figura 6).

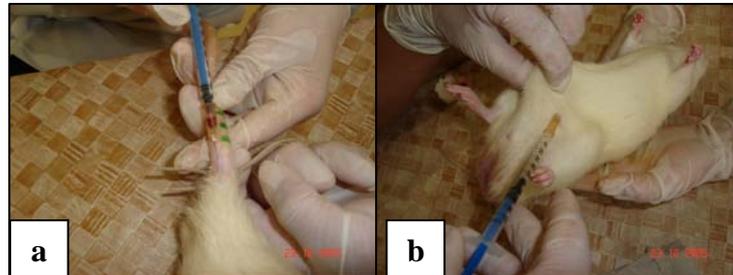


Figura 6- (a) inoculação experimental com o inóculo fúngico através da veia lateral da cauda; (b) inoculação experimental com o inóculo fúngico através da via intraperitoneal. Laboratório de Micologia-UFPeL.

3.3.4 Tratamento dos animais experimentais com esporotricose sistêmica

Três dias após os animais experimentais serem inoculados com *S. schenckii*, foi iniciado o tratamento dos grupos experimentais uma vez ao dia por um período de 30 dias conforme o descrito por Kan & Bennet (1988). A administração dos fármacos assim como os diluentes nas doses predeterminadas foi realizada em todos os animais pela via oral com o auxílio de uma sonda orogástrica.

3.3.5 Acompanhamento clínico dos animais experimentais com esporotricose sistêmica

Durante o período experimental, os animais foram avaliados diariamente, a fim de observar alterações físicas referentes ao plano nasal (edema e úlceras); cauda (espessura aumentada e úlceras) e testículos (aumento e alterações na consistência), sendo essas descritas em relatórios semanais.

3.3.6 Necropsia dos animais experimentais

No final do período experimental, os animais foram sacrificados através de superdosagens de fenobarbital (100mg/kg) e necropsiados para a análise anatopatológica, sendo coletados o fígado, testículos, baço, rins e sistema digestório para a obtenção do retroisolamento do agente.

O retroisolamento do *S. schenckii* foi obtido a partir do cultivo em duplicata a 25°C por até 15 dias de fragmentos do fígado, baço e testículos em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol acrescido de cicloheximida. Após esse período foi realizado a conversão para a fase leveduriforme (conforme descrito no ítem 3.1.2) para demonstração do dimorfismo do agente.

Os mesmos procedimentos descritos foram realizados com os animais que morreram durante o período experimental.

3.3 Analise estatística

Para avaliar estatisticamente a evolução dos tratamentos frente a esporotricose sistêmica experimental foi utilizado o programa Epi Info 6.0, utilizando o teste de qui-quadrado, segundo Mantel-Henzel, com grau de significância de 95%. Para a análise microbiológica foi utilizado o teste de qui-quadrado.

4 RESULTADOS

4.1 Suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *Sporothrix schenckii* frente aos antifúngicos terbinafina e itraconazol

A suscetibilidade da fase leveduriforme do *S. schenckii* frente a terbinafina para todos os isolados estudados de esporotricose felina, resultaram em uma CIM de 0,055µg/mL a 0,109µg/mL, enquanto que para os isolados dos casos de esporotricose humana e canina a CIM foi de 0,055µg/mL. Em relação ao itraconazol, a CIM frente aos isolados de esporotricose felina foi de 0,875µg/mL a 1,75µg/mL, já para os casos de esporotricose humana os valores da CIM foram de 0,219µg/mL, enquanto que para o isolado do caso clínico de esporotricose canina foi observada uma CIM do itraconazol de 1,75µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) da terbinafina e itraconazol frente a isolados leveduriformes de *Sporothrix schenckii* através da técnica de microdiluição em caldo

<i>Sporothrix schenckii</i>	CIM (µg/ml)	
	Itraconazol	terbinafina
1*	0,875	0,109
2*	0,875	0,109
3*	0,219	0,055
4*	1,75	0,055
5*	1,75	0,055
6*	1,75	0,055
7**	0,219	0,055
8**	0,219	0,055
9**	0,219	0,055
10***	1,75	0,055

*Isolado obtido de esporotricose felina; ** Isolado obtido de esporotricose humana;***Isolado obtido de esporotricose canina

Em se tratando da CIM para a terbinafina e itraconazol utilizando a fase filamentosa do *S. schenckii*, foi observado valores para a terbinafina entre os isolados de felinos de 0,875 µg/mL, enquanto que os isolados humanos e de cão a CIM foi de 0,219µg/mL. Para o itraconazol os isolados felinos resultaram numa CIM de 3,5µg/mL, já nos isolados obtidos a partir de casos de esporotricose humana e em cão a CIM foi de 1,75µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3- Concentração Inibitória Mínima (CIM) da terbinafina e itraconazol frente a isolados filamentosos de *Sporothrix schenckii* através da técnica de microdiluição em caldo

<i>Sporothrix</i>	CIM (µg/ml)	CIM (µg /ml)
<i>schenckii</i>	itraconazol	terbinafina
1*	3,5	0,875
2 *	3,5	0,875
3 *	3,5	0,875
4*	3,5	0,875
5 *	3,5	0,875
6*	3,5	0,875
7**	1,75	0,219
8**	1,75	0,219
9**	1,75	0,219
10***	1,75	0,219

*Isolado obtido de esporotricose felina; ** Isolado obtido de esporotricose humana;***Isolado obtido de esporotricose canina

4.2 Avaliação das enzimas hepáticas e hemograma dos animais experimentais submetidos ao tratamento antifúngico e seus respectivos diluentes

Os valores para Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA) foram compatíveis aos valores normais para a espécie estudada (HARKNESS & WAGNER, 1995) entre todos os grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores referentes a Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA) dos animais experimentais submetidos a administração dos fármacos antifúngicos e seus respectivos diluentes

Enzimas avaliadas	Tratado terbinafina	Diluyente terbinafina	Tratado itraconazol	Diluyente itraconazol
ALT (UI/L)	30 -36	20 -42	26 -45	29 - 45
FA (UI/L)	39,2 – 50,7	38 – 72,1	40 – 50,7	42,4 – 64,3

Valores normais para a espécie estudada: Alanina aminotransferase (U/L) 17 – 50; fosfatase alcalina (U/L) 39 – 216

Os parâmetros tanto da série vermelha como na série branca e proteínas plasmáticas totais (PPT) estiveram dentro dos limites fisiológicos normais para a espécie estudada (HARKNESS & WAGNER, 1995). Assim como nenhuma anormalidade foi observada no exame histopatológico dos órgãos coletados. No entanto, no decorrer do período experimental 25% (5/20) dos animais pertencentes ao grupo tratado terbinafina morreram imediatamente após sondagem oral. A análise histopatológica dos órgãos coletados durante a necropsia não evidenciou qualquer anormalidade associada aos antifúngicos ou aos diluentes em todos os grupos experimentais.

4.3 Avaliação da atividade dos fármacos antifúngicos no tratamento da esporotricose experimental sistêmica

4.3.1 Avaliação clínica dos animais experimentais com esporotricose sistêmica

As alterações observadas nos animais experimentais iniciaram na primeira semana após a inoculação com o *S. schenckii*, sendo observadas no decorrer das quatro semanas do estudo: aumento da espessura da cauda, úlceras na cauda, aumento testicular, edema nos membros, úlceras nos membros, edema do plano nasal, úlceras no nariz, flacidez testicular, caquexia e óbitos. Essas alterações analisadas estatisticamente resultaram em diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupo tratado terbinafina e itraconazol em relação aos seus respectivos diluentes, sendo que no grupo diluente foram observadas maior número de animais afetados em relação ao grupo tratado (Tabela 5).

Tabela 5- Alterações clínicas observadas nos animais experimentais com esporotricose sistêmica durante o período do estudo

Alterações clínicas	Tratado terbinafina (%)				Diluyente terbinafina (%)				Tratado itraconazol (%)				Diluyente itraconazol (%)			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
Semanas	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
Aumento da espessura da cauda	47,3	43,2	11,4	-	90	90	90	90	37,5	82,5	37,5	25	85	95	95	95
Úlcera na cauda	5,2	21,6	11,4	-	10	95	95	95	30	40	30	5	40	85	85	85
Aumento testicular	-	-	-	-	90	90	90	95	-	-	-	5	60	100	100	85
Edema dos membros	-	10,8	11,4	-	-	10	10	10	-	-	-	-	-	15	20	20
Úlceras nos membros	-	10,8	20	-	-	90	90	90	5	5	5	-	-	45	45	50
Edema no plano nasal	-	8,1	-	-	-	85	85	85	-	-	-	-	-	30	35	35
Úlceras no plano nasal	-	-	-	-	-	60	60	60	-	-	-	-	-	40	40	40
Flacidez testicular	-	-	-	-	-	-	-	75	-	-	-	-	-	-	5	35
Caquexia	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	5	35
Óbitos	5	25	5	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Em se tratando especificamente do aumento da espessura da cauda, foi observado no decorrer do período experimental a alteração em maior frequência entre os animais pertencentes ao grupo diluente terbinafina e itraconazol. Entre os grupos experimentais tratados com os antifúngicos foi observado redução do sinal clínico, onde no final da quarta semana nenhum animal do grupo tratado terbinafina permaneceu

afetado, enquanto que no tratado itraconazol 25% se mantiveram com as lesões (Tabela 5 e Figura 7).

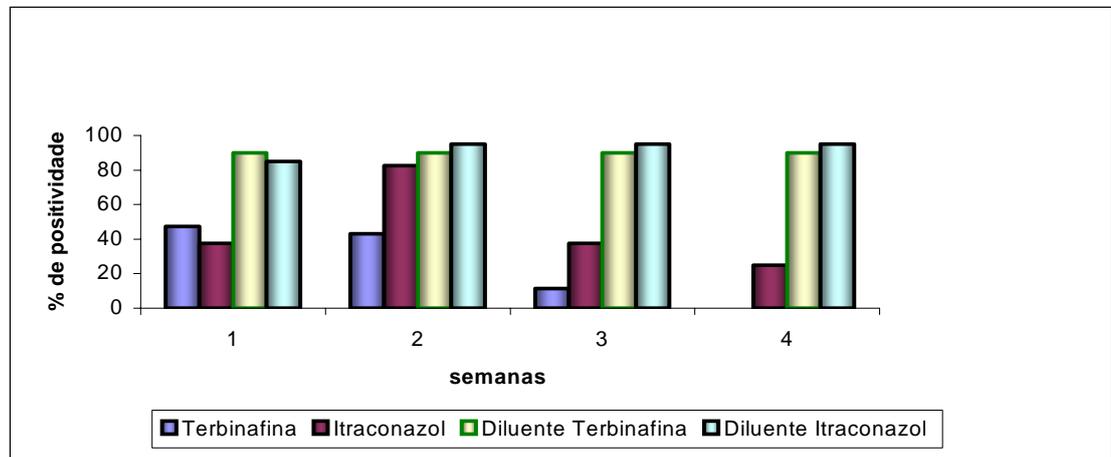


Figura 7- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram aumento na espessura da cauda.

Em relação a úlcera na cauda, o grupo tratado com terbinafina obteve uma redução semanal na frequência de animais afetados, não sendo observado nenhum animal com a alteração na última semana do estudo. O mesmo foi observado no grupo tratado itraconazol, permanecendo no final do período experimental com dois (2/40) animais afetados. Os grupos referentes aos diluentes dos fármacos, por sua vez, foi detectado o aumento da frequência de animais afetados (Tabela 5 e Figura 8).

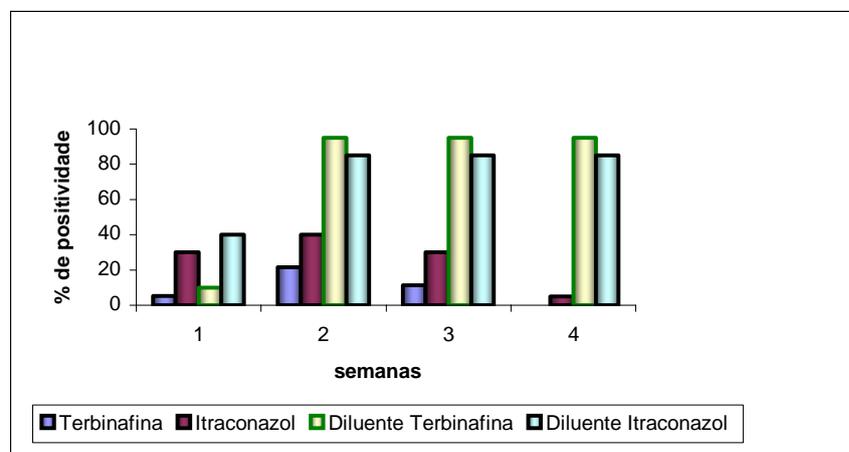


Figura 8- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram úlceras na cauda.

O aumento testicular não foi observado em nenhum animal pertencente ao grupo tratado terbinafina durante o estudo. Já no grupo tratado itraconazol a alteração foi observada a partir da terceira semana do experimento em 5% (2/40) dos animais. O grupo diluente terbinafina apresentou no decorrer do experimento, aumento progressivo de animais com aumento testicular, enquanto que nos animais pertencentes ao grupo diluente itraconazol, foi observada uma redução de animais afetados na quarta semana (Tabela 5 e Figura 9).

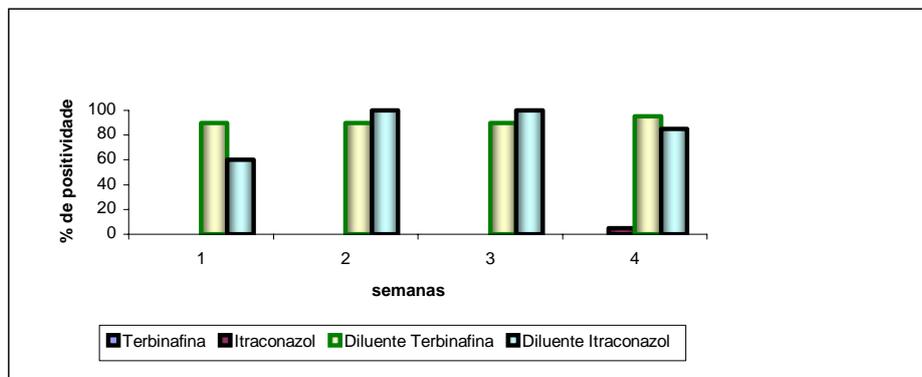


Figura 9- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram aumento testicular.

O edema nos membros foi observado entre os animais tratados terbinafina a partir da segunda semana do estudo, reduzindo o número de animais afetados na última semana experimental. No grupo tratado itraconazol, não foi detectado nenhum animal afetado no decorrer do experimento. Os animais do grupo diluente terbinafina e itraconazol apresentaram a alteração a partir da segunda semana, com aumento de animais acometidos no decorrer do estudo (Tabela 5).

As úlceras nos membros foram observadas a partir da segunda semana em ambos os grupos tratados (terbinafina e itraconazol), porém os animais obtiveram a cura clínica na última semana do experimento. Os diluentes apresentaram lesões a partir da segunda semana, prosseguindo afetados até a quarta semana do estudo (Tabela 5 e Figura 10).

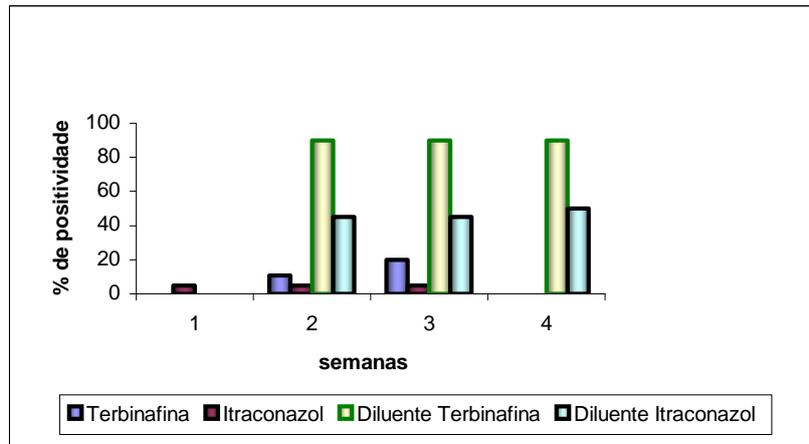


Figura 10- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram úlceras nos membros.

O edema do plano nasal foi observado em apenas 8% do grupo tratado terbinafina na segunda semana do estudo, não sendo observado, a alteração no decorrer do estudo nos grupos submetidos ao tratamento antifúngico. No entanto, nos grupos diluentes (terbinafina e itraconazol) foi detectado animais afetados até o final do estudo (Tabela 5 e Figura 11).

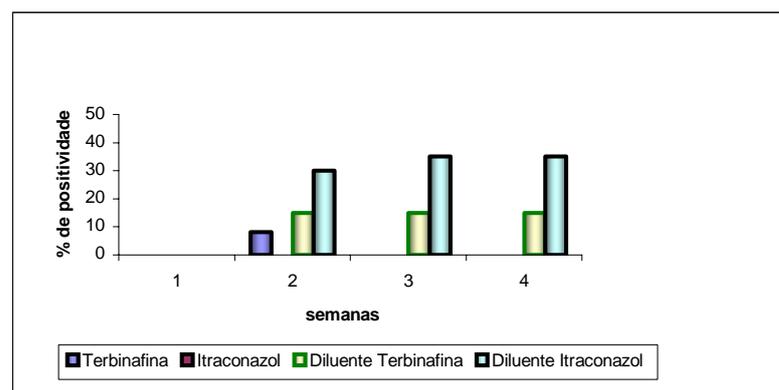


Figura 11- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram edema no plano nasal.

Em relação a úlceras no plano nasal, não foi observado nenhum animal afetado no grupo tratado terbinafina, assim como no grupo tratado itraconazol. Os animais pertencentes aos grupos diluentes, por sua vez, apresentaram úlceras até o final do experimento (Tabela 5 e Figura 12).

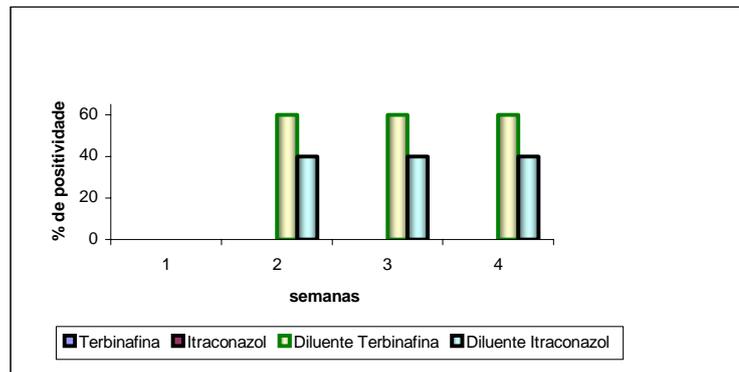


Figura 12- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental que apresentaram úlceras no plano nasal.

Quanto a flacidez testicular, apenas os grupos diluentes apresentaram a alteração, sendo que o grupo diluente terbinafina 75% dos animais apresentaram-se afetados na última semana do estudo, enquanto que o diluente itraconazol foi observado 35% dos animais com a alteração na última semana (Figura 13).

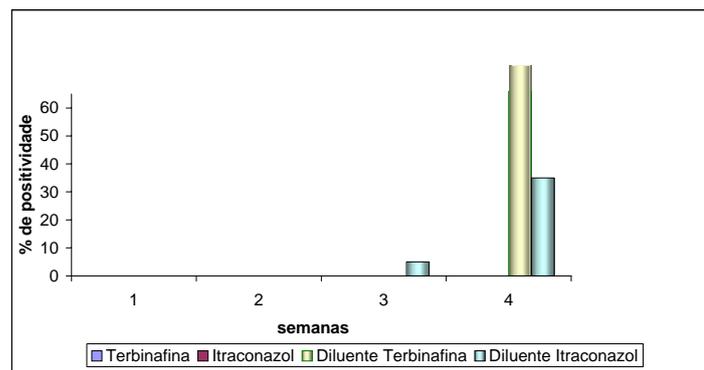


Figura 13- Percentual de animais com esporotricose sistêmica experimental apresentando flacidez testicular.

A caquexia não foi observada em nenhum dos animais tratados com os antifúngicos. Nos diluentes, entretanto, foi observado 25% (5/20) de animais do grupo diluente terbinafina com caquexia na quarta semana, e no grupo diluente itraconazol 5% (1/20) na terceira semana aumentando a frequência para 35% (7/20) na quarta semana (Tabela 5).

Durante o período experimental, ocorreu o óbito de (6/40) dos animais pertencentes ao grupo tratado terbinafina. Dois animais morreram na primeira semana do estudo, um na segunda, dois na terceira e um na última semana, totalizando seis animais. Todos foram imediatamente necropsiados e coletados órgãos do sistema digestório, respiratório, tecido sub-cutâneo e cérebro para análise histopatológica, a qual revelou hiperemia e congestão pulmonar, caracterizando assim um quadro asfixia aguda.

4.3.2 Alterações anatomopatológicas nos animais experimentais com esporotricose experimental sistêmica

Em relação as alterações anato-patológicas observadas nos animais com esporotricose sistêmica experimental, essas quando presentes, se apresentaram na forma de lesões nodulares e esbranquiçadas no baço, fígado, testículos, tecido subcutâneo e ainda a presença de icterícia dos órgãos, sendo que as lesões ocorreram de forma localizada e/ou disseminada (Figura 14).

As análises estatísticas evidenciaram que todos os animais pertencentes ao grupo tratado com terbinafina e itraconazol diferiram ($p < 0,05$) em relação ao grupo diluente, demonstrando que os animais que foram submetidos ao tratamento antifúngico apresentaram a menor frequência ou ausência de alterações anatomopatológicas (Tabela 6).

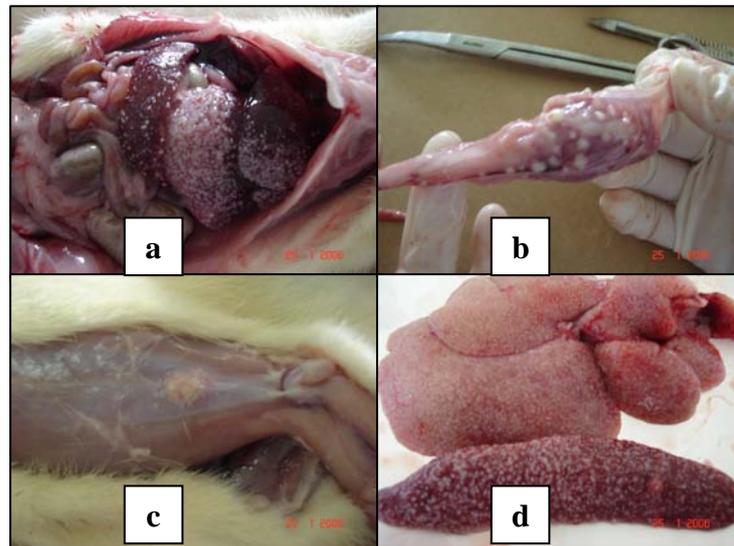


Figura 14- Alterações anatomopatológicas observadas nos animais com esporotricose experimental sistêmica: (a) lesões nodulares e esbranquiçadas disseminadas; (b) lesões nodulares esbranquiçadas nos testículos; (c) nódulo no parênquima subcutâneo; (d) lesões nodulares e esbranquiçadas no baço e fígado.

Tabela 6- Alterações anatomopatológicas observadas nos animais experimentais com esporotricose sistêmica durante o período de estudo

	Tratado terbinafina (%)	Diluyente terbinafina (%)	Tratado itraconazol (%)	Diluyente itraconazol (%)
Baço	-	100	25	95
Fígado	11,7	100	25	85
Testículos	26,4	100	67,5	95
Icterícia	-	25	-	-
Nódulos subcutâneo	8,8	100	12,5	85
Lesões disseminadas	-	100	-	85

Em se tratando dos grupos, tratado e diluyente terbinafina, foi evidenciado maior número de animais afetados no grupo diluyente em todos os parâmetros macroscópicos avaliados, sendo que os animais tratados não apresentaram alterações no baço, icterícia e lesões disseminadas (Figura 15).

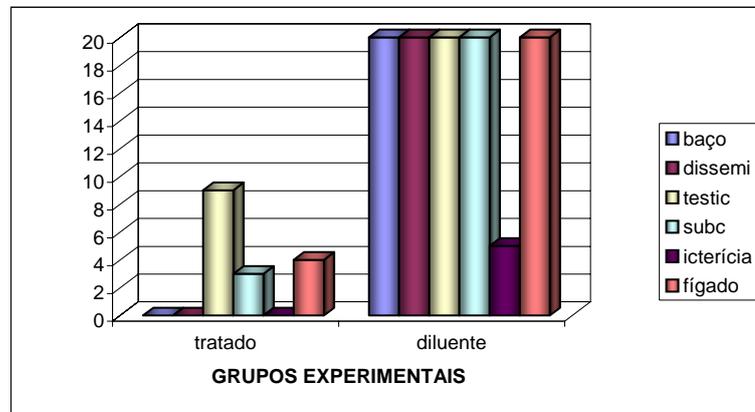


Figura 15- Alterações anatomopatológicas presentes nos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente terbinafina.

Em relação aos grupos tratado e diluente itraconazol, também foi observado maior frequência de alterações no grupo do diluente, exceto quanto as alterações testiculares em que no grupo tratado itraconazol foram observados 67,5% (27/40) animais com alterações no órgão enquanto que o seu grupo diluente apresentou 95% (19/20) animais com alterações macroscópicas (Tabela 6). Em relação a icterícia e lesões disseminadas não foi evidenciado nenhum animal pertencente ao grupo tratado itraconazol com as alterações (Figura 16).

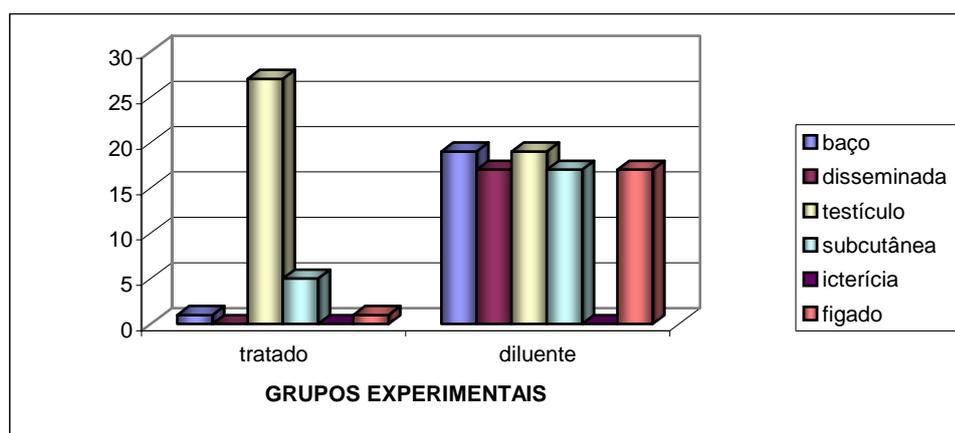


Figura 16- Alterações anatomopatológicas presentes nos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente itraconazol.

Em relação aos tratamentos terbinafina e itraconazol, houve diferença estatística ($p=0,0004$) quanto a variável aumento testicular, sendo que os animais pertencentes ao grupo tratado terbinafina apresentaram menor frequência de animais com a alteração 26,5% (9/34) em relação ao grupo tratado itraconazol 67,5% (27/40).

4.3.3 Obtenção do retroisolamento do *Sporothrix schenckii*

A obtenção do retroisolamento do *S. schenckii* a partir do cultivo dos órgãos (baço, fígado e testículos) em meios específicos a 25°C resultou no crescimento de colônias filamentosas enegrecidas e enrugadas, sendo que a análise microscópica dessas colônias foi observada a presença de hifas finas, hialinas, septadas com conidióforos simpodiais frutificando conídios dispostos em formatos de “margarida”. A 37°C, as colônias adotaram aspecto de colônia bacteriana, de coloração branca a acizentada, onde a microscopia revelava células leveduriformes, ovais a alongadas semelhantes a “charutos”. Esses achados são consistentes aos observados em estudos que descrevem a macro e micromorfologia do *S. schenckii*.

A análise estatística do retroisolamento obtido a partir do cultivo dos órgãos específicos resultou em diferenças entre os grupos tratados com os antifúngicos e seus respectivos diluentes, demonstrando que os grupos experimentais em que foram administrados os fármacos, obtiveram menor e/ou nenhum, retroisolamento positivo para o *S. schenckii* em relação aos grupos em foram administrados os diluentes (Tabela 7).

Tabela 7- Obtenção do retroisolamento de *Sporothrix schenckii* a partir do cultivo do baço, fígado e testículos dos animais experimentais

ÓRGÃOS	Tratado terbinafina (%)	Diluyente terbinafina (%)	Tratado itraconazol (%)	Diluyente itraconazol (%)
Baço	-	80	-	80
Fígado	-	100	5	80
Testículos	3	100	22,5	95

O retroisolamento do *S. schenckii* ocorreu em todos os órgãos avaliados no grupo diluente terbinafina, enquanto que nos animais tratados com terbinafina só foi observado o isolamento do agente no testículo de um animal (Figura 17).

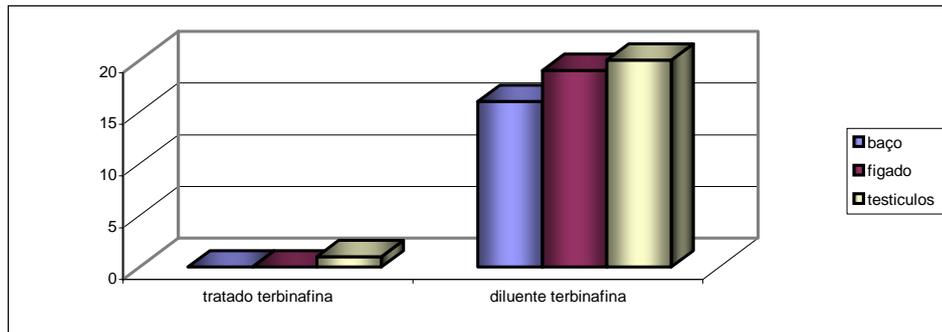


Figura 17- Retroisolamento do *Sporothrix schenckii* obtidos dos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente terbinafina.

Em relação ao grupo tratado itraconazol e seu respectivo diluente, foi observada maior freqüência de retroisolamento positivo para o *S. schenckii* entre o grupo diluente em relação aos tratados (Figura 18).

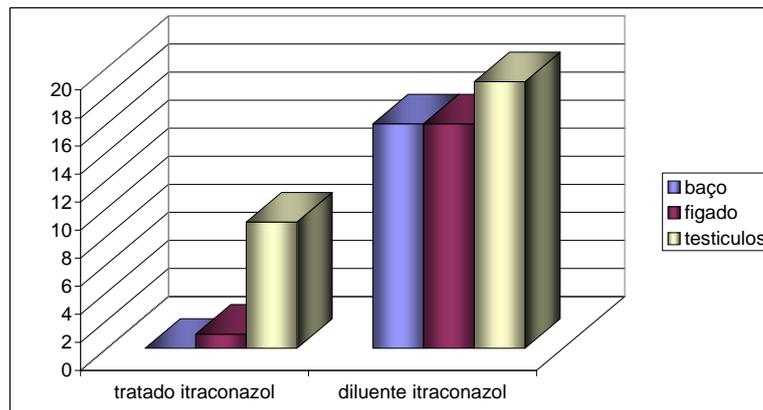


Figura 18- Retroisolamento do *Sporothrix schenckii* obtidos dos animais pertencentes aos grupos tratado e diluente itraconazol.

No entanto foi evidenciado diferenças estatísticas ($p=0,0142$) entre os grupos tratados terbinafina e itraconazol, tendo um maior número de animais com o isolamento positivo para o agente no testículo no grupo tratado itraconazol (Figura 19).

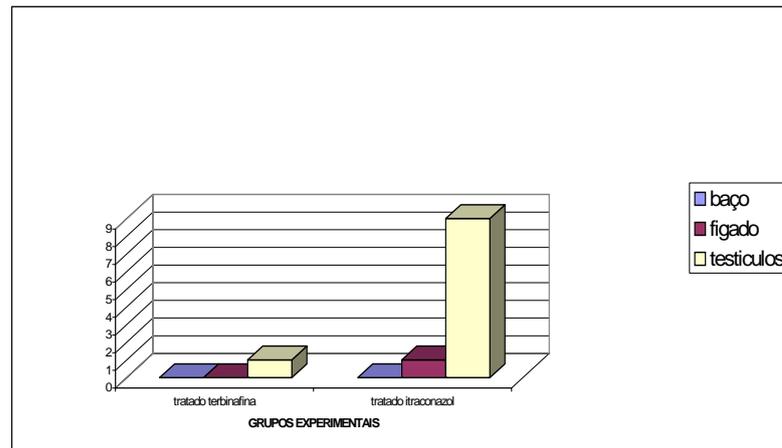


Figura 19- Retroisolamento do *Sporothrix schenckii* obtidos dos grupos tratado terbinafina e itraconazol

5 DISCUSSÃO

Quanto a avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *Sporothrix schenckii* frente aos antifúngicos terbinafina e itraconazol, mesmo não existindo um ponto de corte que estabeleça quais os valores da CIM que determine a sensibilidade ou resistência do *S. schenckii* frente a terbinafina, estudos tem considerado que valores de CIM entre 0,1 a 0,4 μ g/mL estão associados a sensibilidade do agente frente ao fármaco. Dessa forma, os resultados observados neste estudo demonstram atividade *in vitro* da terbinafina frente a fase leveduriforme e filamentosa, embora com valores de CIM maiores quando utilizada a fase filamentosa do agente. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, com CIMs menores ou iguais a outros antifúngicos recomendados para o tratamento da esporotricose, como a anfotericina B e itraconazol (PETRANYI et al., 1987; HULL & VISMER, 1992; HAY, 1999; JESSUP et al., 2000; REX et al., 2001; MCGINNIS et al., 2001; KOHLER et al., 2004; TRILLES et al., 2005; KOHLER et al., 2006; MEINERZ et al., 2005).

Em relação ao itraconazol, também não há padronização de um valor da CIM que identifique resistência ou sensibilidade ao *S. schenckii*. No entanto, é preconizado que a suscetibilidade do agente frente ao fármaco traduz em CIM menor ou igual a 1 μ g/mL (MCGINNIS et al., 2001; REX et al., 2001). Considerando esses valores de CIM para o itraconazol frente ao agente, este estudo resultou na sensibilidade quando utilizado a fase leveduriforme do *S. schenckii* em três isolados de esporotricose felina e em todos os isolados humanos avaliados. No entanto, foi detectado através do teste, resistência frente ao isolado de cão e para os demais isolados provenientes de esporotricose felina. Com relação ao estudo da suscetibilidade utilizando a fase filamentosa, todos os isolados avaliados apresentaram-se resistentes frente aos itraconazol.

Embora estudos anteriores tenham demonstrado a boa atividade *in vitro* do itraconazol frente ao *S. schenckii* (KAUFFMAN et al., 2000; KOÇ et al., 2001; KOHLER et al., 2004; KOHLER et al., 2006), Catalán & Monteiro (2006) associam o fracasso terapêutico com a ocorrência de isolados resistentes. Segundo os autores, devido ao amplo espectro antifúngico do itraconazol, esse foi utilizado, muitas vezes, de

forma indiscriminada acarretando, principalmente, o aparecimento de resistência. Como demonstram os relatos descritos por Schubach et al (2004) em que resultaram na alta frequência de felinos tratados com o fármaco com remissão da micose e ainda Kohler et al (2004) que detectaram valores de CIM altos ($4\mu\text{g/mL}$) do itraconazol frente a isolados provenientes de casos de esporotricose disseminada felina.

Em se tratando das fases de *S. schenckii* utilizadas no estudo, foi observado valores maiores de CIM entre os isolados filamentosos em relação a fase leveduriforme. O mesmo foi demonstrado em estudos realizados por Triller et al (2005), onde as CIMs obtidas tanto para a terbinafina como o itraconazol, estudando a fase filamentosa do *S. schenckii*, foram maiores em relação aos obtidos com a fase leveduriforme. Mais recentemente Kohler et al. (2006) avaliando a suscetibilidade de isolados clínicos de casos de esporotricose humana e animal, utilizando as duas fases do agente, resultaram em valores de CIMs maiores quando aplicado o teste com a fase filamentosa do *S. schenckii*. Segundo os autores, essa diferença entre as fases filamentosa e leveduriforme frente as provas de suscetibilidade, geram a necessidade de novos estudos, que estabeleçam critérios diferenciados para a realização das provas *in vitro* para *S. schenckii*.

As manifestações clínicas decorrente da esporotricose experimental sistêmica foram compatíveis com as descritas por outros autores, onde inocularam conídios e/ou leveduras/mL em concentrações variando de 2×10^3 a $7,5 \times 10^6$ reproduzindo com sucesso a esporotricose nas suas diversas formas clínicas em variados modelos experimentais (HIRUMA & KAGAWA, 1983; POLANIA et al.,1990; DIXON et al.,1992; MUJICA et al., 1992; SHIRAISHI et al.,1992; TACHIBANA et al., 1999; LIMA et al., 2003; NOBRE et al., 2003; NOBRE et al., 2004; NOBRE et al., 2005).

Quanto a evolução da esporotricose experimental frente aos tratamentos antifúngicos e seus respectivos diluentes, foi observado diferenças estatísticas significativas entre o grupo diluente e os tratados terbinafina e itraconazol. Os grupos experimentais, nos quais, foram administrados os antifúngicos resultaram em menor número de animais afetados e/ou cura clínica.

Entre os grupos nos quais foram administrados os fármacos, a evolução clínica da micose não diferiu. No entanto foram detectadas diferenças estatísticas significativas em relação ao aumento da espessura da cauda, onde foi observado uma redução de animais afetados pertencentes ao grupo tratado com terbinafina em relação ao itraconazol.

Em relação a terbinafina, as doses administradas nos animais experimentais com a forma sistêmica da micose, resultaram na eficácia do tratamento, coincidindo com outros estudos clínicos que demonstraram a atividade do fármaco no tratamento de pacientes com esporotricose nas formas cutâneas e cutânea-linfática, com doses que variaram de 125-1000mg (HULL & VISMER, 1992; MORISHITA et al. 2001; TANUMA et al., 2001; CHAPMAN et al., 2004; COSKUN et al., 2004). No entanto na clínica Veterinária ainda são escassos os estudos que confirmem a ação da terbinafina no tratamento da esporotricose felina e em cães (MANCIANTI et al.,1999; KOTNIK et al., 2001; ROCHETTE et al., 2003).

Assim como o observado para a terbinafina, este estudo também resultou na boa atividade do itraconazol no tratamento da esporotricose experimental sistêmica. Outros autores demonstraram a eficácia do fármaco em doses variando de 100mg a 400mg/dia, para as diferentes formas de apresentação da doença (RESTREPO et al.,1986; BAKER et al., 1989; GRANT & CLISSOLD, 1989; SHAW et al., 1989; CONTI-DIAZ et al.,1992; LESHER, 1992; BREELING et al., 1993; MENESES et al.,1992; MERCURIO & ELEWISKI, 1993; WINN et al., 1993; SCHARKEY-MATHIS et al.,1993; BADLEY & VAN SCOY, 1996; HOWELL & TOOHEY, 1998; RAMIREZ et al.,1998; NOGUCHI et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2000; BONIFAZ et al ., 2001; KOÇ et al., 2001; MCGINNIS et al., 2001; HAMPTON et al, 2002; PREARO et al., 2002; STALKUP et al., 2002; COSKUN et al., 2004). Em Medicina Veterinária, é o antifúngico mais amplamente utilizado na clínica de pequenos animais, sendo recomendado nas doses de 5-10 mg/kg uma vez ao dia para o tratamento da esporotricose canina e felina, apresentando, normalmente, boa tolerabilidade para essas espécies (ROCHETTE et al., 2003).

Em se tratando especificamente da esporotricose sistêmica são escassos os estudos que demonstrem a atividade, especialmente da terbinafina, no tratamento da micose. Em relação ao itraconazol, Kauffman et al. (2000) indicam o fármaco como tratamento de manutenção, após a administração inicial da anfotericina B. No entanto, o presente estudo demonstrou que altas doses de terbinafina e itraconazol são promissoras no tratamento da apresentação sistêmica da esporotricose.

No presente estudo foram utilizadas doses superiores da terbinafina e itraconazol em relação as doses terapêuticas recomendadas normalmente para o tratamento de micoses. A ação dose-dependente desses fármacos também foi relatada por outros autores, como o demonstrado por Chapman et al. (2004), em que obtiveram melhor

resposta terapêutica utilizando doses maiores (1000mg) de terbinafina no tratamento de pacientes com esporotricose linfo-cutânea. O mesmo foi evidenciado com o itraconazol, onde as baixas concentrações do fármaco, estão diretamente associadas as falhas terapêuticas, sendo que o fármaco em concentrações maiores tem uma ação mais efetiva e o seu declínio a valores plasmáticos inferiores a 6 µg/mL está relacionado com a redução da sua atividade (CÁTALAN & MONTEIRO, 2006).

Além das doses, estudos apontam outros fatores como o diluente, que podem influenciar nas concentrações plasmáticas adequadas de um determinado fármaco. Kan & Bennet (1988) demonstraram que a terbinafina quando diluída em uma solução de água destilada com 5% de DMSO e 1% de Tween 20, alcança maiores concentrações plasmáticas. Baseados nessa constatação, este estudo aplicou a mesma metodologia, o que provavelmente colaborou com a boa ação do fármaco frente a esporotricose sistêmica.

Quanto as análises das enzimas hepáticas e hemograma, assim como a análise histopatológica dos animais experimentais submetidos ao tratamento antifúngico e seus respectivos diluentes, não foi demonstrado nenhuma alteração, mesmo utilizando doses elevadas de terbinafina (250mg/kg) e de itraconazol (100mg/kg). Outros estudos com modelos experimentais, utilizando doses entre 100 e 400mg/kg de terbinafina, para tratamento de enfermidades como meningite coccidoidal, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e leishmaniose experimental, não demonstraram nenhuma alteração durante o período estudado (SORENSEN et al., 2000; DANNAOUI et al., 2002; WALZER & ASHBUGH, 2002; SAMPAIO et al., 2003). O mesmo foi evidenciado com o itraconazol, onde Dannaoui et al. (2002) administraram terbinafina (150mg/kg) ou itraconazol (100mg/kg) em ratos com zigomicose experimental duas vezes ao dia, por via oral por um período de dez dias, sendo que ambos os fármacos foram diluídos em água estéril.

Os efeitos hepatotóxicos provocados pela terbinafina são de rara ocorrência, sendo que a elevação da ALT, FA e bilirrubina ocorre em menos de 10% dos pacientes expostos ao fármaco. Embora, sinais de disfunção hepática não sejam relevantes, tem sido descritos relatos de pacientes que desenvolveram hepatotoxicidade, com o aumento transitório das enzimas hepáticas, porém com o restabelecimento do paciente após a interrupção do tratamento (AMICHAÏ & GRUNWALD, 1998; TRÉPANNIER et al., 1998; FERNANDES et al., 1998; BURSTEIN et al., 2004). Em relação ao itraconazol, o aumento temporário das enzimas hepáticas é o efeito colateral mais frequentemente

descrito, durante o uso do fármaco em humanos, sendo geralmente, reversível e transitório. Porém a administração de doses elevadas por um período prolongado, aumenta a liberação do fármaco no soro, o que pode contribuir para a toxicidade hepática (LAZAROS et al., 1996; AMICHAÏ & GRUNWALD, 1998; ODDS, 2003).

Quanto aos resultados correspondentes ao hemograma, eritrograma (hematócrito, hemoglobina e contagem de hemácia), leucograma e Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) resultaram em níveis fisiológicos para a espécie estudada tanto em relação à terbinafina como para o itraconazol. Mesmo sendo raras as alterações no hemograma com o uso desses fármacos antifúngicos, Nagaoka et al (2003) relataram um caso de leucocitopenia em um paciente em que foi administrado itraconazol por um período de 16 semanas, onde apresentou alterações na contagem de células brancas.

Em relação as alterações anatomicopatológicas e histopatológicas nos animais com esporotricose experimental sistêmica assim como na obtenção do retroisolamento do *S. schenckii*, os resultados observados neste estudo foram semelhantes aos encontrados por outros autores. Como os realizados por Polania et al (1990) onde inocularam a fase leveduriforme do agente pela via subcutânea resultando na presença de edema, eritema, alopecia, necrose no local da inoculação, pús e úlcera, com a disseminação do *S. schenckii* após uma semana da inoculação, com a demonstração do microrganismo tanto no cultivo dos órgão afetados, como pelo exame histológico com a coloração de PAS. Além de Mujica et al. (1992) em que reproduziram a esporotricose por meio da inoculação intraperitoneal e na veia da cauda em ratas, resultando na disseminação do agente no fígado, baço e glândula suprarenal .

A avaliação da evolução clínica, assim como as alterações macroscópicas e a obtenção do retroisolamento do *S. schenckii* resultaram na boa atividade da terbinafina e itraconazol no tratamento da esporotricose experimental sistêmica. As análises dos resultados, demonstraram que a terbinafina obteve resultados semelhantes ou superiores ao itraconazol em determinadas variáveis analisadas. A eficácia do fármaco pode ser atribuída as suas características farmacocinéticas, sendo descrito que em cada semana de terapia diária, este permanece nos compartimentos cutâneos em altas concentrações, por até 2-3 meses após a interrupção da terapia (PETRANYI et al., 1987; BALFOUR & FAULDS, 1992). Essa característica, associada com a sua ação fungicida, pode explicar a ausência de falhas terapêuticas, não sendo descritos casos de reicidiva da enfermidade por mais de seis meses pós-tratamento (JAIN & SEHGAL, 2000; CHAPMAN et al., 2004).

Kovarik et al. (1995) estudando as características farmacocinéticas da terbinafina em animais experimentais administraram múltiplas doses do fármaco, analisando as suas concentrações em vários compartimentos corporais durante um período de quatro semanas. Os autores observaram que a meia-vida do agente é em média de 20 a 28 dias e essa longa meia-vida pode ser atribuída ao lento retorno do fármaco para o compartimento de protoplasma central de tecido periférico e gorduroso locais. O estudo conclui ainda que as altas concentrações de terbinafina em amostras de tecido combinadas com sua taxa lenta de redistribuição indica que as concentrações fungicidas são mantidas durante semanas a meses após o curso terapêutico. Hosseini-Yeganeh & Maclachlan (2002) administraram em ratos 6 mg/kg do fármaco pela via endovenosa, observando que nesse modelo experimental há uma distribuição a tempos maiores do que duas horas após a administração e uma rápida redistribuição do fármaco, atingindo o pico máximo de concentração após uma hora e meia de administração em uma única dose de 500 e 750 mg. Baseado nesses resultados, os autores acreditam que devido as características farmacocinéticas, espera-se que a terbinafina induza uma proteção contínua para as infecções fúngicas, assim pode ser relacionados a tratamentos por menores períodos.

Em contrapartida, estudos demonstram que terapias que utilizam antifúngicos de primeiro efeito fungistático, como o itraconazol, estão associadas ao retorno da enfermidade assim como falhas terapêuticas e a ocorrência de isolados resistentes, assim como o visto no uso do itraconazol para o tratamento da esporotricose felina, onde a remissão da micose pode ser freqüentemente observada (SCHUBACH et al., 2004).

No decorrer do período experimental, foram observados óbitos nos animais pertencentes ao grupo tratado terbinafina. As mortes de todos os animais envolvidos, ocorreram logo após a sondagem, sendo esses submetidos imediatamente a necropsia com a coleta dos órgãos para a avaliação histopatológica resultando em alterações condizentes a um quadro de asfixia aguda.

Os principais efeitos colaterais descritos com o uso da terbinafina são dificuldade de esvaziamento gástrico, náuseas e dores abdominais. No decorrer do estudo foi observado aumento da salivação antes da administração do fármaco e maior sensibilidade abdominal nos animais pertencentes ao grupo tratado com o antifúngico. Provavelmente esses fatores contribuíram para o retorno esofágico da terbinafina durante a sondagem oro-gástrica com o desenvolvimento de um quadro de asfixia e morte aguda. Kan & Bennet (1988) administrando em ratos 200mg/kg de terbinafina

preparada nos mesmos diluentes utilizadas no estudo (DMSO e Tween 20) também observaram a morte dos animais experimentais. Segundo os autores, a causa morte foi devido a falsa-via durante a sondagem oro-gástrica.

Considerando os escassos estudos em Medicina Veterinária em relação a terbinafina no tratamento da esporotricose, assim como o uso preconizado do itraconazol nas formas cutâneas de casos da micose em felinos e caninos, o estudo da atividade desses fármacos no tratamento da esporotricose experimental sistêmica contribuiu de forma relevante nos avanços dos estudos de fármacos antifúngicos frente a micoses sistêmicas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, nestas condições experimentais, permitem as seguintes conclusões:

A terbinafina demonstrou atividade *in vitro* frente a fase leveduriforme e filamentosa do *S. schenckii*;

O itraconazol demonstrou atividade *in vitro* frente a fase leveduriforme do *S. schenckii* em três isolados de esporotricose felina e em todos os isolados humanos avaliados. Os isolados estudados mostraram-se resistentes frente ao isolado de cão e para os demais isolados provenientes de esporotricose felina, assim como todos os isolados referentes a fase filamentosa do *S. schenckii*;

As enzimas hepáticas avaliadas (ALT e FA), assim como a análise histopatológica dos animais experimentais submetidos ao tratamento antifúngico e seus respectivos diluentes, não sofreram alterações durante o período do estudo;

Os grupos de animais pertencentes aos grupos tratado terbinafina e itraconazol resultaram na menor frequência e/ou ausência de animais afetados clinicamente em comparação aos diluentes;

As alterações anatomopatológicas ocorreram em maior frequência nos animais dos grupos diluentes em relação aos tratados terbinafina e itraconazol;

O retroisolamento do *S. schenckii* ocorreu de forma mais freqüente no grupo diluente terbinafina e itraconazol do que nos grupos tratados com os antifúngicos. Entre os grupos tratado terbinafina e itraconazol foi observada diferença estatística quanto o retroisolamento do agente nos testículos, sendo que os animais tratados com o itraconazol foi observado maior número de isolados positivos.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; CURY, A. E. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar. <http://www.newslab.com.br/antifung.htm>, 1999.

AMICHAÏ, B; GRUNWALD, M. H. Adverse drug reactions of the new oral antifungal agents-terbinafine, fluconazole and itraconazole. **International Journal of Dermatology**, v. 37, p. 410-415,1998.

ARENAS, R. Esporotricose. In: **Micologia medica ilustrada**. 1ªed. México: Nueva editorial interamericana, 1993, v.1, cap.13, p.145-160.

BADLEY, A. D; VAN SCOY, R. E. Lon-term follow up of multifocal of osteoarticular sporotrichosis treated with itraconazole. **Clinical Infectious Diseases** .v. 23, p. 94-95, 1996.

BAKER, J. H.; et al. Fungemia caused by amphotericin B-resistant isolate *Sporothrix schenckii*. Successful treatment with itraconazole. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 113, p. 1279-1281, 1989.

BALFOUR J, A.; FAULDS, D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. **Drugs**, v. 43, p. 699, 1992.

BONIFAZ, A; et al. Successful treatment of AIDS related disseminated cutaneous sporotrichosis with itraconazole. **AIDS Patient Care**, v. 15, p. 603-606, 2001.

BREELING, J. L; WEINSTEIN, L. Pulmonary sporotrichosis treated with itraconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 103, p. 113-114, 1993.

BRUSTEIN, R.; et al. Esporotricose felina na cidade do Rio de Janeiro e alguns municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, suplemento 1, p.132, 2000.

BURSTEIN, Z; et al. Hepatits tóxica colestásica por terbinafina: relato de caso. **La Revista de Gastroenterologia del Perú**, v. 24, p. 357-362, 2004.

BUSTAMANTE, B; CAMPOS, P. E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 2, p. 85-94, 2004.

CASTRO, A. P.; et al. Recorrência de esporotricose em gatos com envolvimento zoonótico. **Ciência Animal**, v. 11, suplemento 1, p.187. 2001.

CATALÁN, M; MONTEIRO, J. C. Antifúngicos sistémicos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P.; et al. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day) in the treatment of cutaneous lymphocutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, v. 47, p. 62-68, 2004.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases Society of America**, v. 38, p. 529-535, 2004.

CONTI-DIAS, I; CIVITA, E; GEZUELE, E. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. **Mycoses**, v. 35, p. 153-156, 1992.

CORMICAN, M. G.; PFALLER M, A. Standardization of antifungal susceptibility testing. **Journal Antimicrob Chemother.**,v. 38, p. 561-578,1996.

COSKUN, B; et al. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. **Mycopathologia**, v. 158, p. 53-56, 2004.

COSTA, D. M.; et al. Esporotricose felina: relato de quatro casos no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, suplemento1, p.131, 2000 a.

COSTA, U. M.; et al. Detection of Feline Leukemia Virus (FeLV) antigen from 1992 to june 2000 by indirect immunofluorescence test in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Virus Reviews & Research**. v. 5, p. 94, 2000 b.

COURCHAMP, F.; SAY, L.; PONTIER, D. Transmission of Feline Immunodeficiency Virus in a population of cats. **Wildlife research**, v. 27, p. 1-9, 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M; TUDELA, J. L. R. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 133-138, 2002.

DANNAOUI, E; et al. Efficacy of antifungal therapy in a nonneutropenic murine model of zygomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , v. 46, p. 1953-1959, 2002.

DARKES M. J, SCOTT, L. J, GOA, K. L. Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, p. 39-65, 2003.

DE PAUW, B. E. New antifungal agents and preparation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 147-150, 2000.

DIXON, D. M.; DUNCAN , R.; HURD, N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. From the largest U.S. Epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 951-954, 1992.

DUNSTAN, R. W.; et al. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.15, p.37-45, 1986.

ESPINEL-INGROF, A. Standardization of antifungal susceptibility testing: review update. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 13, p. 64 - 68, 1996.

FERNANDES, N. F; GELLER, S. A; FONG, T. L. Terbinafine hepatotoxicity: case report and review of the literature. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, p. 459-460, 1998.

FLEURY, R. N.; et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. **International Journal Dermatology**, v.40, p.318-322, 2001.

FRANCO, S. R. V. S.; et al. Esporotricose em gato doméstico: transmissão humana. **Rev do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 35, p. 327-330, 1993.

FREITAS, D.C.; et al. Esporotricose em cães e gatos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, v. 7, p. 381-387, 1956.

GADEA, I; CUENCA-ESTRELLA, M. Recomendaciones para el diagnostico micológico y studios de sensibilidad a los antifúngicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinical**, v. 22, p. 32-39, 2004.

GHOSH, A.; et al. *In vitro* susceptibility pattern of *Sporothrix schenckii* strains isolated from three centers in India. **India Journal of Medical Research**, v. 113, p. 214-220, 2001.

GRANT, S. M.; CLISSOLD, S. P. Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. **Drugs**, v. 37, p. 310-44, 1989.

HAMPTON, D. E; ADESINA, A; GHODOSH, J. Conjunctival sporotrichosis in the absence of antecedent trauma. **Cornea**, v. 21, p. 831-833, 2002.

HARKNESS, J. E; WAGNER, J. E. The biology and medicine of rabbits and rodents. Baltimore. Williams & Williams, 1995.

HAY, R. J. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. **Brazilian Journal Dermatology**, v. 141, p. 36-40, 1999.

HIRUMA, M; KAGAWA, S. The effect of heat on *Sporothrix schenckii* *in vitro* and *in vivo*. **Mycopathologia**, v. 84, p. 21-30, 1983.

HOSSEINI-YEGANEH, M; MACLACHLAN, A. J. Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2219-2228, 2002.

HOWELL, S. J; TOOHEY, J. S. T. Sporotrichal arthritis in South Central Kansas. **Clinic Orthopedics and Related Research**, v. 346, p. 208-214, 1998.

HULL, P. R; VISMER, H. E. Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafine. **Brazilian Journal Dermatology**, v. 126, p. 51-56, 1992.

JAHAM, C.; PARADES, M.; PAPICH, M. G. Antifungal dermatologic agents: azoles and allylamines. **Small Animal/ exotics**, v.22, p.548-558, 2000.

- JAIN, S; SEHGAL, V. N. Terbinafine, a unique oral antifungal: current perceptions. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 412-423, 2000.
- JESSUP, C. J.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. An evaluation of the *in vitro* of terbinafine. **Medical Micology**, v.38, p. 155-159, 2000.
- KAJIWARA, H; et al. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5073-5079, 2004.
- KAN, V. L.; BENNETT, J. E. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 32, p. 1619-23, 1988.
- KAUFFMAN, C. A.; HAIJJEH, R.; CHAPMAN, S. H. Practice guidelines for management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Disease Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 684-687, 2000.
- KELLY, S. E.; CLARK, W. T. Feline sporotrichosis: a case report with zoonotic involvement. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 21, p. 139-140, 1991.
- KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Sporotrichosis In: **Medical Mycology**. Lea & Fibeger, Philadelphia, p.707-729, 1992.
- KOÇ, A. N; UKSAL, U; OYMAC, O. Case report. Successfully treated subcutaneous infections with *Sporothrix schenckii* in Turkey. **Mycoses**, v. 43, p. 75-77, 2001.
- KOHLER, L. M; et al. *In vitro* susceptibilities isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4319-4320, 2004.
- KOHLER, L. M; et al. *In vitro* susceptibilities isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparision of yeast and mycelial forms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 52, p. 843-847, 2006.
- KOTNIK,T.; KOZUH, E. N.; et al. Terbinafine hydrochloride treatment of *Microsporium canis* experimentally- induced ringworm cats. **Veterinary of Microbiology**, v. 83, p. 161-168, 2001.
- KOVARIK, J. M; et al. Multiple-dose, pharmacokinetics, and distribution in tissue of terbinafine and metabolites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2738-2741, 1995.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. M. Esporotricose e outras micoses gomosas. In: **Micologia médica**. São Paulo, Sarvier, p.233-247, 1991.
- LAPPIN, M. R. Feline zoonotic diseases. **The Veterinary Clinics of North American**, v. 23, p. 57-78, 1993.
- LARSSON C. E.; et al. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, p.351-358, 1989.
- LAZAROS, G. A; et al. Terbinafine-induced cholestatic liver disease. **Journal Hepatology**, v. 24, p. 753-756, 1996.

- LESHER, J. L. JR. New antifungal agents. **Dermatologic Clinics**, v. 10, p. 799-805, 1992.
- LIMA, R. F; SCHAFFER, G. V; BORBA, C. M. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 933-938, 2003.
- LONDERO, A. T.; CASTRO, R. M.; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. **Sabouraudia**, v.3, p.273-274. 1964.
- LOPES, J. O; et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 541-545, 1999.
- LOPES-BEZERRA, L; et al. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 293-308, 2006.
- LUMBRERAS, C; LIZASOAIN, M; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistémico. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, p. 366-380, 2003.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses). **Revista de Medicina**, v.10, p.443-450, 1907.
- LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. **Drugs**, v. 44, p. 9-35, 1992.
- MAGDALI, S; et al. Susceptibilidad de *Sporothrix schenckii in vitro* em fase filamentosa y de levedura. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.20, 2000.
- MANCIANTI, F.; et al. Mycological findings in Feline Immunodeficiency virus-infected cats. **Journal of Medical Mycology**, v. 30, p. 257-259, 1992.
- MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; MILLANTA, F. Efficacy of oral terbinafine in feline dermatoflytosis due to *Microsporium canis*. **Journal Feline Medicine surg.**, v.1, p. 37-41, 1999.
- MARQUES, S. A.; et al. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 35, p. 327-330, 1993.
- MATSUMOTO, H.; et al. A case of fixed sporotrichosis with recurred in a child following itraconazole treatment. **Nippon Ishinki Gakkai Zasshi**, v. 41, p. 83-87, 2000.
- MCGINNIS, M. R; et al. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 39, p. 369-371, 2001.
- MENESES, C; BUSTAMANTE, B; HOLGADO, W. Itraconazol en el tratamiento de la sporotrichosis subcutanea. **Boletin de la Sociedad Peruana de Medicina Interna**, v. 5, p. 2-3, 1992.

- MEINERZ, A.R.M.; et al. Esporotricose com linfangite ascendente envolvendo felino doméstico. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu-PR, 21 a 25 de outubro de 2001. **Anais**, 299p.
- MEINERZ, A. R. M.; et al. Virus da leucemia Felina e a Relação com Microsporose e Esporotricose. I Congresso de Especialidades em Medicina Veterinária- Curitiba- PR, 2002. **Anais**, 184p.
- MEINERZ, A. R. M.; et al. Atividade *in vitro* da terbinafina e itraconazol sobre o *Sporothrix schenckii* V Congresso Latino-Americano de Micologia-Brasília-DF, 2005. **Anais**, 244, 2005 p.
- MERCURIO, M. G.; ELEWISKI, B. E. Therapy of sporotrichosis. **Seminars in Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 285-289, 1993.
- MIGLIANO, M. F.; FREITAS, D. C.; MORENO, G. Esporotricose em cães. **Revista da Faculdade de Veterinária de São Paulo**, v.7, São Paulo, p.225-233, 1963.
- MORISHITA, N.; et al. A case of lymphocutaneous sporotrichosis. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 42, p.149-54, 2001.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p. 27-31, 2002.
- MORRIS-JONES, R.; et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. **Infectino and Immunity**, v.71, p. 4026-4033, 2003
- MUJICA, M.T.; et al. Esporotricosis experimental en ratas. **Revista Argentina de Micologia**, v.15, p.7-12, 1992.
- NEGRONI, R & ARECHALAVA, A. I. Itraconazole: phamacokinetics and indications. **Archives of Medical Research**, v. 24, p. 387-393, 1993.
- NAGAOKA, Y; OKOCHI, H; TAMAKI, K. Leukocytopenia after administration of itraconazole. **Mycoses**, v. 46, p. 240-241, 2003.
- National Comittee for Clinical Laboratory Standards*, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A. National Comittee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, (a).
- National Comittee for Clinical Laboratory Standards*, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2. National Comittee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, (b).
- NETO, R. P. J; et al. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida- relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.57-61,1999.
- NOBRE, M. O.; et al. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 137-140, 2001.

- NOBRE, M. O.; et al. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v.32, p. 175-184, 2002 (a).
- NOBRE, M. O; et al. Differences in virulence between isolates of feline sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 160, p. 43-49, 2005.
- NOBRE, M. O; et al. Development of experimental sporotrichosis in a murine model with yeast and mycelial forms of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 161-166, 2003.
- NOBRE, M.O.; et al. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio grande do Sul (Brasil) e revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, p.36-41, 2002 (b).
- NOBRE, M.O.; et al. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2004.
- NOGUCHI, H; HIRUMA, M; KAWADA, A. Case report. Sporotrichosis successfully treated with itraconazole. **Mycoses**, v. 42, p. 571-576, 1999.
- NOGUEIRA, R. H. G.; et al. Relato de esporotricose felina (*Sporothrix scenckii*) com transmissão para o homem: aspectos clínicos, microbiológicos e anatomopatológicos. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 43-51, 1995.
- ODDS, F. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycologist**, v. 17, p. 51-55, 2003.
- PAREDES, S.; et al. Terbinafina en onicomicosis pediátrica: estudio prospectivo. **Revista Chilena de Dermatología**, v. 16, p. 188-190, 2000.
- PEREZ, A. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. **Mycoses**, v. 42, p. 111-114, 1999.
- PETRANYI, G.; MEINGASSNER, J. G.; MIETH, H. Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 31, p. 1365-8, 1987.
- POLAK, A. The past, present and future of antimycotic combination therapy. **Mycoses**, v. 42, p. 335-370, 1999.
- POLANIA, L.A.G.; ALZATE, A.; SARAIVA, N. Comportamiento experimental del *Sporothrix schenckii* y la *Leishmania mexicana* em el hamster. **Revista do Instituto Tropical de São Paulo**, v. 32, p.319-324, 1990.
- PREARO; et al. Case report: bilateral sporotrichosis. **Mycoses**, v. 45, p. 415-417, 2002.
- RAFAL, E. S.; RASMUSSEN, J. E. An unusual presentation of fixed cutaneous sporotrichosis: a case report and review of the literature. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, p. 928-932, 1991.

- RAMIREZ, J; BYRD, R. P; ROY, P. M. Chronic cavitary pulmonary sporotrichosis: efficacy of oral itraconazole. **The Journal of the Kentucky Medical Association**, v. 96, p. 103-105, 1998.
- RESTREPO, A.; et al. Itraconazole therapy in lymphangitic and cutaneous sporotrichosis. **Archives of the Dermatology**, v. 122, p. 413-417, 1986.
- REX, J. H; et al. Antifungal Susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 643-658, 2001.
- RIVAS, P; SERRANO, R. Q. Utilidad clínica de las pruebas de susceptibilidad antimicótica. **Revista Colombiana de Cancerología**, p. 34-42, 2003.
- ROCHETTE, F; et al. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 31-53, 2003.
- ROMERO-MARTINEZ, R.; et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**, v.68, p.3697-3703, 2000.
- RYDER, N. S. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. **Mycoses**, v. 42, p. 115-119, 1999.
- SAMPAIO, R. N. R; et al. Ineficácia in vivo da terbinafina em leishmaniose cutânea causada por *Leishmania amazonensis* em camundongos C57BL/6. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 531-533, 2003.
- SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, p. 74-78, 2003.
- SCHARKEY-MATHIS, P. K; KAUFFMAN, C. A; GRAYBILL, J. R. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. **The American Journal of Medicine**, v. 95, p. 279-285, 1993.
- SCHIRAIISHI, A; NAKAGAKI, K; ARAI, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathologia**, v. 120, p. 15-21, 1992.
- SCHUBACH T. M. P, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1623-1629, 2004.
- SCHUBACH, A; et al. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1952-1954, 2005.
- SCHUBACH, T. M. P.; et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **The Veterinary Record**, v. 152, p. 172-175, 2003.
- SCHUBACH, T.M.; et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v.39, p.147-149, 2000.

SHAW, J. C; LEVINSON, W; MONTANARO, A. Sporotrichosis in the Immunodeficiency Syndrome. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 21, p. 1145-1147, 1989.

SIERRA, P.; et al. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 158-161, 2000.

SORENSEN, S. N; et al. Comparative efficacies of terbinafine and fluconazole in treatment of experimental coccidioidal meningites in a rabbit model. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 3087-3091, 2000.

SOUZA, L. L.; et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 303-305, 2006.

SOUZA, M. D. M.; et al. Esporotricose felina e a importância zoonótica – relato de caso no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7 – suplemento 1, p.131, 2000.

SOUZA J. J. Esporotricose em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 7, Recife, 1957. **Anais**. Recife, p.367-371.

STALKUP, J. R.; BELL, K.; ROSEN, T. Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. **Cutis**, v. 69, p. 371-374, 2002.

STERLING, J. B; HEUMANN, W. R.. Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21st century-Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 691-697, 2000.

SULLIVAN, D. P. O. Terbinafine tolerability in general medical practice. **British Journal of Dermatology**, v. 141, p.21-25, 1999.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Medical Mycology**, v. 39, p. 295-298, 2001.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MUTSUYAMA, M. Involvement of CD4⁺ + T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Medical Mycology**, v.37, p.397-404, 1999.

TANUMA, H.; ASAI, T.; A. B. E. M.; NISHIYAMA, S.; KATSUOKA, K. Lymphatic vessel-type sporotrichosis: immunohistochemical evaluation and cytokine expression pattern. **Mycoses**, v. 44, p. 316-120, 2001.

TOMÁS, J. G; CALVO, C. R; RUESCA, R. B. Criterios de sensibilidad a los azoles. **Rev Esp Quimioterap**, v. 17, p. 83-90, 2004.

TRÉPANNIER, E. F; NAFZIGER, A; AMSDEN, G. W. Effect of terbinafine on theophylline pharmacokinetics in healthy volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 695-697, 1998.

TRILLES, L; et al. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 9, p. 3952-3954, 2005.

WALZER, P; ASHBAUGH, A. Use of terbinafine in mouse and rats models of *Pneumocystis carinii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 514-516, 2002.

WINN, R. E.; et al. Systemic sporotrichosis treated with itraconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 210-217, 1993.

WU, J. J; et al. Therapy of systemic fungal infections. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 532-538, 2004.

XAVIER, M. O.; et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1961-1963, 2004.

