

TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL: USO DE β -GLUCANA ASSOCIADA AO ITRACONAZOL

MARTINS, A. A.¹; ANTUNES, T. A.^{2*}; SILVA, F. V.³; MEINERZ, A. R.⁴; CLEFF, M. B.⁴; MADRID, I.²; OSÓRIO, L.G.⁴; FARIA, R.O.¹; MEIRELES, M. C. A.⁵; MELLO, J. R. B.¹.

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, o qual tem distribuição mundial, sendo a enfermidade adquirida através do implante traumático do agente na derme, por espinhos, contaminação de feridas abertas, bem como através de arranhaduras de animais portadores (SCHUBACH et al., 2001).

Após a inoculação com *S. schenckii* o sistema imunológico é ativado e a infecção irá desenvolver-se quando o indivíduo estiver com deficiência na resposta imune, seja por uso contínuo de corticóides, antibióticos, doenças imunossupressivas ou ainda pela grande quantidade de unidades infectantes inoculadas (SEVERO et al., 1999).

O itraconazol é o antifúngico de eleição e apresenta amplo espectro de ação tanto nas micoses superficiais como sistêmicas (NOBRE, 2002). Mesmo sendo o fármaco antifúngico mais utilizado na clínica veterinária de animais de companhia, são cada vez mais freqüentes os relatos de isolados de *S. schenckii* resistentes a esse fármaco e falhas terapêuticas em felinos com esporotricose (SCHUBACH et al., 2004).

Em vista da dificuldade terapêutica relacionada à esporotricose, aliado a toxicidade e prolongado tempo na terapia antifúngica tem se buscado novas alternativas para o controle desta infecção. A estimulação da resposta imune tem sido considerada de grande relevância no combate aos microrganismos patogênicos (FREITAS et al., 2004), sendo que dentre as substâncias imunoestimulante destaca-se a β glucana.

A glucana é um polissacarídeo extraído da parede celular interna do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos comprovaram que a glucana apresenta ampla e potente atividade sobre o sistema reticuloendotelial (SER), estando associada a um estado de hiperfagocitose e hipertrofia de órgãos reticuloendoteliais devido ao aumento no tamanho e número de macrófagos (SAKURAI, 1997). Suas principais atividades imunofarmacológicas estão relacionadas com efeitos anti-tumorais, aumento na proteção contra infecções virótica, bacterianas, parasitárias (LEE et al., 2001) e ação fungicida (PELIZON et al., 2005). O presente trabalho tem por objetivo Avaliar a eficácia do uso do imunomodulador β 1-3 glucana associado ao antifúngico Itraconazol no tratamento da esporotricose cutânea experimental.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, Fac. Veterinária, UFRGS

² Programa de Pós-graduação em Veterinária, Fac. Veterinária, UFPel

³ Bolsista FAPERGS, Fac. Veterinária, UFPel

⁴ Laboratório de doenças infecciosas-setor de Micologia. Faculdade de Veterinária-UFPel

⁵ Departamento de Veterinária Preventiva, Fac. Veterinária, UFPel

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 100 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), Wistar, machos, com sete semanas de idade, os quais foram alojados na sala de experimentação do Biotério Central da Universal Federal de Pelotas (UFPe), mantidos com controle de umidade, temperatura e com dieta de acordo com peso corporal e água *ad libitum*. O experimento foi previamente aprovado pela comissão de ética e experimentação animal (CEEA) da UFPe.

Para reprodução da esporotricose experimental os animais foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar direito, utilizando seringa de insulina com 0,1 ml do inóculo fúngico contendo 2×10^3 células/ml. O inóculo foi preparado a partir de isolado de *Sporothrix schenckii*, pigmentado e termotolerante, proveniente de caso clínico de esporotricose felina.

Os animais experimentais foram divididos em quatro grupos de 25 animais: grupo controle (G1), os quais receberam 0,5ml de água destilada estéril; grupo G2 tratados com 10mg/kg de itraconazol; grupo G3 tratados com 10mg/kg de itraconazol associado a 0,5 mg de β glucana e o grupo G4 tratados com 0,5 mg β glucana. O tratamento iniciou duas semanas após a inoculação, quando os ratos já apresentavam lesões características da esporotricose.

O antifúngico e a água destilada estéril foram administrados por via oral (VO) com auxílio de sonda orogástrica uma vez ao dia, a β 1-3 glucana por via subcutânea (SC) uma vez por semana. Os animais foram submetidos ao mesmo manejo, sendo que o grupo G1 e G2 receberam solução salina via SC semanalmente, e o G4 recebeu por VO água destilada estéril diariamente.

Semanalmente três animais de cada grupo experimental foram eutanasiados e necropsiados. Após a necropsia dos animais, o coxim plantar direito foi desinfetado com álcool 70%, dissecado, macerado, lavado e filtrado em camada dupla de gaze estéril. O filtrado foi cultivado em diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) pela técnica de semeadura por espalhamento em placa (duplicata) no ágar Mycosel®, sendo mantidos a 25°C por 6 dias, quando foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs). Ao final das seis semanas de tratamento todos os animais restantes foram eutanasiados e necropsiados para realização das UFCs, retroisolamento do agente e pesquisa de disseminação para órgão internos.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Na quantificação fúngica do ponto de inoculação foi observado, no grupo tratado com a associação β 1-3 Glucana e Itraconazol (G3), uma menor quantidade de unidades formadoras de colônias, enquanto que os grupos G2 e G4 apresentaram maior contagem em relação ao G3 e menor em relação ao G1, durante todo o experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) no ponto de inoculação durante seis semanas de experimento.

Grupos	2ª semana (x10²)	4ª semana (x10²)	6ª semana (x10²)
Controle (G1)	293,83	100,83	163,37
Itraconazol (G2)	135,33	3,33	3,66
Itra + Glu (G3)	91,83	0	1,66
Glucana (G4)	108,5	2,66	6,33

A diferença entre os grupos tratados e o grupo controle ($p < 0,05$) aumentou a partir da quarta semana, onde os grupos G2, G3 e G4 demonstraram menor crescimento de células fúngicas no ponto de inoculação, no entanto, o grupo G3 teve uma ação inibitória melhor sobre o crescimento do agente fúngico em comparação aos grupos G2 e G4. Estes resultados concordam com outros trabalhos que avaliaram a glucana a partir das unidades formadoras de colônia, onde os grupos tratados com o imunostimulante demonstraram uma menor quantificação nas UFCs, sugerindo um melhor controle sobre o agente da doença. Freitas et al. (2004) demonstrou, durante infecção por sepsis em modelo experimental, uma menor quantificação das UFCs nos grupos que receberam glucana assim como, uma maior sobrevivência dos animais e um aumento no número de leucócitos no local desafiado. Outros autores demonstraram que a glucana age estimulando diretamente os macrófagos através do aumento da capacidade fagocítica, o que contribui para a redução da bacteremia, limitando os danos aos órgãos reticuloendoteliais e conseqüentemente, proporcionando uma maior sobrevivência (ARAÚJO-FILHO et al., 2006; WAKSHULL, 1999).

Estudo utilizando a associação de glucana e itraconazol, demonstrou uma melhor eficácia no tratamento da cromoblastomicose refratária ao antifúngico, no qual foi observado, após o uso da associação, aumento significativo da linfoproliferação de células do paciente. Além disso, verificou-se alteração no padrão de citocinas, demonstrado pela diminuição na produção de IL-10 e aumento significativo de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), tendo a associação de glucana ao itraconazol contribuído para a regressão das lesões desta micose (AZEVEDO et al., 2006).

Ao final do experimento foi observado um total de 54% de isolamento do agente em órgãos internos no grupo G3 (itraconazol+glucana), enquanto que nos grupos G1, G2 e G4 obteve-se, respectivamente, 95% (21/22), 86% (19/22) e 77% (17/22) dos órgãos positivos. Em relação aos órgãos acometidos, o isolamento do *S.schenckii* ocorreu em maior quantidade nos linfonodos poplíteos, seguidos de testículos, fígado e baço (Figura 1). Esses resultados se assemelham aos encontrados na literatura (POLANIA et al.; 1990), onde ao inocular o *S.schenckii* via subcutânea observou disseminação fúngica após uma semana da inoculação, com a demonstração do microrganismo no cultivo dos órgãos afetados.

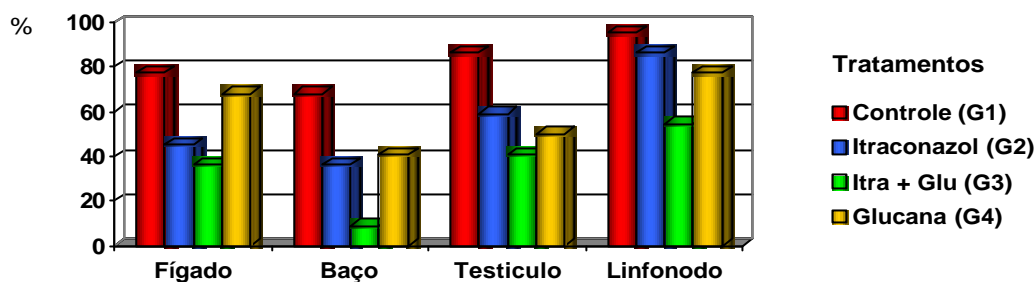


Figura 1. Frequência de isolamento *Sporothrix schenckii* em órgãos internos nos diferentes tratamentos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o imunestimulante 1-3 β Glucana interferiu no desenvolvimento do fungo *S. schenckii*. A associação glucana e Itraconazol teve uma maior eficácia no tratamento de esporotricose cutânea experimental, demonstrado pela diminuição nas unidades formadoras de colônias no ponto de inoculação e menor disseminação para órgãos internos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, C. M. P. S.; LEDA, Y A.; OLIVEIRA, T. K. M.; BARBOSA, A.;BRANCO, D.A.C. Efeito da glucana em um caso de cromoblastomicose refratário a antifúngico. **An. Bras. Dermatol.** v.80 supl.2, 2005.
- FREITAS, J.C.O.C.; MEDEIROS, A. D.; SALES, V. S. F. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. **Acta Cir. Bras.** v. 19, n. 3, 2004
- Araújo-Filho, I.; Rêgo, A.C.M.; Pinheiro, L.A.M.; Azevedo, I.M.; Medeiros, V.B.; Brandão-Neto, J.; Medeiros, A.C. Prevention of bacterial translocation using β -(1-3)-D-glucan in small bowel ischemia and reperfusion in rats **Acta Cirúrgica Brasileira** Vol 21 (Supl4)p.18-22, 2006.
- LEE, J. N.; LEE, D. Y.; JI, I.H.; KIM, G.E.; KIM, H. N.; SOHN, J.; KIM, S.; KIM, C. W. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 65, p. 837-841, 2001.
- NOBRE, Márcia de Oliveira; NASCENTE, Patrícia da Silva; MEIRELES, Mario Carlos Araújo; FERREIRO, Laerte. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.
- PELIZON, A. C.; KANENO, R.; SOARES, A. M. V. C.; MEIRA, D.A.; SARTORI, A. Immunomodulatory Activities Associated with β -Glucan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiological Research.** v. 54, p. 557-564, 2005.
- POLANIA, L.A.G.; ALZATE, A.; SARAIVA, N. Comportamiento experimental del *Sporothrix schenckii* y la Leishmania mexicana em el Hamster. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n. 5, p.319-324, 1990.
- SAKURAI, T. L. Different role of serum components and cytokines on alveolar macrophage activation by soluble fungal (1-3)- β -D-glucan. **Eur J Pharmacol.** v. 63, p. 255-334, 1997.

SCHUBACH, T.M.P; OKAMOTO, T; PELON, I.V; MONTEIRO, D.F; MELO, M; REIS, R.S; FIALHO, M.P.C; BLANCO, T.C.M; CUZZY, M.T; SCHUBACH, A. Clínica e terapêutica da esporotricose em gatos naturalmente infectados. **Ciência Animal**, v. 11,suplemento 1, 193p, 2001.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.L.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; REIS, R.S.; PEREZ, M.A.; WANKE, B. Feline sporotrichosis epidemic in the metropolitan area of Rio de Janeiro – clinical presentation and treatment of 347 cats (1998-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2004.

SEVERO, L. C.; FESTUGATO, M.; BERNARDI, C.; LONDERO, A. T. Widespread cutaneous lesion due to *Sporothrix schenckii* in a patient under a long term steroids therapy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p. 59-62, 1999.

WAKSHULL E. PGG-Glucan, a soluble $\beta(1-3)$ -glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-KB-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid $\beta(1-3)$ -glucan receptor. *Immunopharmacol*; 41:89-107,1999.