



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

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

LUISA HELENA MONTEIRO DE MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IN VIVO* E *IN VITRO*
NA ESPOROTRICOSE FELINA EM DIFERENTES APRESENTAÇÕES
CLÍNICAS**

Rio de Janeiro

2013

TESE DPCDI - IPEC L.H.M.MIRANDA 2013

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IN VIVO* E *IN VITRO*
NA ESPOROTRICOSE FELINA EM DIFERENTES APRESENTAÇÕES
CLÍNICAS.

LUISA HELENA MONTEIRO DE MIRANDA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadoras: Dra. Tânia Maria Valente Pacheco e Dra. Fátima da Conceição Silva

Rio de Janeiro

2013

Ao meu maior presente - minha família:
Vocês são meus amores e minha razão.

Ao meu querido Cocker Spaniel Petit
Tudo começou no meu amor por você.
Saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Dra. Tânia Maria Valente Pacheco, Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) e Dra. Fátima da Conceição Silva, do Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC): muito obrigada pela confiança, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela assistência e pelo incentivo sempre.

Ao Dr. Leonardo Pereira Quintella, do Serviço de Anatomia Patológica (SAP), do IPEC, e ao Dr. Rodrigo Caldas Menezes, do LAPCLIN-DERMZOO, IPEC, por todo o apoio no meu aprendizado em patologia e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Marta de Almeida Santiago, do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), Bio-Manguinhos, pela enorme colaboração na padronização e desenvolvimento da técnica de citometria de fluxo utilizada neste estudo. Obrigada pela enorme dedicação e cuidado.

À Dra. Fernanda Nazaré Morgado, do IOC, pela calma e paciência em ensinar. Meu aprendizado foi muito grande com a sua ajuda.

À Simone Mendes, do IOC, pela disposição e paciência em ensinar e pela ajuda nas atividades do laboratório.

À Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, do Laboratório de Epidemiologia Clínica, IPEC, pela dedicação à análise estatística.

Ao Rodrigo Méxas, do Instituto Oswaldo Cruz, pelo belo trabalho com as imagens deste estudo.

À Bianca Porto Kuraiem, bolsista pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), CNPq, pela realização das técnicas de imuno-histoquímica e por toda a ajuda no desenvolvimento desta etapa.

Aos médicos veterinários do LAPCLIN-DERMZOO, IPEC: Dra. Amanda Akemi, Dra. Carla Honse, Dra. Denise Torres, Dra. Elaine Souza, Dra. Érica Guerino, Dra. Isabella Dib e Dr. Sandro Antonio Pereira pela colaboração no desenvolvimento deste projeto, na obtenção das amostras utilizadas neste estudo e inclusão de animais.

Aos amigos do SAP, IPEC: Antonio Carlos da Silva, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Luiz Claudio Ferreira, Marcos Francisco Lucas de Almeida, Maria Dulce Portugal Estrada Espinoza e Patricia Fonseca pela colaboração nas diferentes etapas deste trabalho e pelo agradável convívio.

Aos demais amigos do LAPCLIN-DERMZOO, IPEC, médicos veterinários, estagiários e funcionários, que, por serem tantos, não caberiam todos aqui, mas agradeço de coração por fazerem parte desta importante etapa: Artur Augusto, Carolina Perié, Daniela Duarte, Denise Amaro, Fabiano Borges Figueiredo, Jéssica Boechat, Jéssica Nunes, Luciana Casartelli, Monique Campos, Paula Vianna, Rafael Rocha, Roseli Lopes, Thatyana Pessanha, Tuanne Rotti e a todos que fizeram ou fazem parte desta grande equipe.

À Marina Furtado, pois dividimos muitos momentos de alegrias, tristezas, conquistas, aborrecimentos, boas e más notícias. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos e parceiros, de ontem, de hoje ou de sempre: Isabele Barbieri, Luiz Leme e Thais Okamoto. Não esqueço o quanto me ajudaram.

À Dra. Mary Jo Hamilton, da Universidade do Estado de Washington, por ceder gentilmente os anticorpos iniciais utilizados para a realização deste trabalho.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a este projeto.

À minha amada família, pelos bons momentos, pela paciência com os momentos não tão bons e por todo o apoio e amor incondicionais: meus pais José Roberto de Miranda e Sandra Regina Monteiro; meus irmãos, Luis Henrique Monteiro de Miranda e Hugo Monteiro de Miranda; meu querido e companheiro Daniel Duarte; meus irmãos João Veiga e Rachel Muricy e minha amada Jéssica Andrade. Aos meus mais queridos amigos, perto ou longe, vocês são muito importantes. Às minhas joias: meus animais.

“True human goodness, in all its purity and freedom, can come to the fore only when its recipient has no power. Mankind's true moral test [...] consists of its attitude towards those who are at its mercy: animals.”

(Milan Kundera – *The unbearable lightness of being*)

Miranda, L. H. M. **Avaliação da resposta inflamatória *in vivo* e *in vitro* na esporotricose felina em diferentes apresentações clínicas.** Rio de Janeiro, 2013. 88f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A ocorrência de formas graves de esporotricose felina, aliada a lesões sem granulomas e ricas em estruturas leveduriformes, evidencia a suscetibilidade destes animais para a doença e enfatiza a importância do estudo da sua patogenia. O objetivo deste estudo foi descrever o processo inflamatório e a carga fúngica das lesões em diferentes apresentações clínicas, e sua relação com o perfil de leucócitos no sangue periférico de gatos com esporotricose por meio da técnica de citometria de fluxo (CF) e com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV). Gatos com lesões cutâneas com isolamento de *Sporothrix* sp. foram incluídos no estudo, separados nos grupos L1, L2 e L3 (lesões em um, dois e três ou mais locais, respectivamente) e submetidos a coleta de sangue e de fragmentos de lesão. O estado geral dos animais foi classificado como bom, regular ou ruim. Ao exame histopatológico, as lesões foram agrupadas de acordo com o processo inflamatório (granulomatoso ou inespecífico), grau de ativação de fagócitos predominantes nos granulomas (macrófagos ou células epitelióides), organização do granuloma (bem formado ou mal formado) e intensidade dos tipos celulares no infiltrado. A carga fúngica foi verificada pelas técnicas de impregnação pela prata de Grocott (IPG) e imuno-histoquímica (IHQ). A CF foi aplicada no sangue periférico, utilizando anticorpos monoclonais para os marcadores CD4, CD8, CD21, CD14 e granulócitos. Cento e um animais foram incluídos no estudo: 20 do grupo L1, 22 do grupo L2 e 59 do grupo L3. O processo inflamatório granulomatoso supurativo (PIGS) foi observado em 99 casos. A maioria das lesões, sobretudo no grupo L3, apresentavam granulomas mal formados (p-valor=0,032) e com predomínio de macrófagos (p-valor=0,010). A IPG e a IHQ evidenciaram estruturas leveduriformes (EL) em 94 casos cada uma, sendo a concordância entre as duas observada em 92 casos. As duas técnicas associadas apresentaram sensibilidade de 98,0%. A carga fúngica de mais de 400 EL/ campo (400x) ocorreu em 48,5% dos casos com PIGS e foi predominante nos animais do grupo L3. Houve correlação entre granulomas mal formados e com predomínio de macrófagos e a carga fúngica superior a 100 EL/ campo (p-valor<0,01). A CF foi realizada em 33 casos de esporotricose e cinco animais não infectados (Grupo controle). O percentual de linfócitos T CD8⁺ foi maior nos animais dos grupos L2 e L3 (p-valor=0,01). O maior percentual de células CD4⁺ esteve associado ao grupo L1 e ao estado geral bom (p-valor=0,04 e 0,03, respectivamente). A expressão CD8^{low} ocorreu em 20 animais com esporotricose, sendo predominante no grupo L3 (p-valor=0,01), e não ocorreu no grupo controle. Esta expressão foi associada a granulomas com predomínio de macrófagos (p-valor=0,01) e ocorreu em 76,2% dos casos com carga fúngica acima de 100 EL/campo. Três animais foram positivos para FIV, quatorze para FeLV e dois para os dois testes. Não houve correlação entre estes testes e os demais achados. Estes resultados sugerem associação entre a resposta bem organizada, menor carga fúngica e aumento de linfócitos CD4⁺ com o controle da doença, manutenção do estado geral bom e lesões localizadas. No estado geral ruim, as lesões disseminadas e alta carga fúngica estavam relacionadas a existência de um padrão de resposta com aumento de células CD8⁺ e aumento da expressão de CD8^{low}.

Palavras-Chave: Esporotricose; Gato; Histopatologia; Citometria de fluxo; Resposta imune.

Miranda, L. H. M. **Evaluation of the inflammatory response *in vivo* and *in vitro* in feline sporotrichosis at different clinical presentations.** Rio de Janeiro, 2013. 88f. Thesis [Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas Clinical Research Institute.

ABSTRACT

The occurrence of severe forms of feline sporotrichosis, along with lesions without granulomas and rich in yeast-like forms, demonstrate the susceptibility of these animals to the disease and emphasizes the importance of the study of its pathogenesis. The aim of this study was to describe the inflammatory changes and fungal load at different clinical presentations and its relationship with the profile of leukocytes in peripheral blood of cats with sporotrichosis by means of flow cytometry (FC) technique and with Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and / or Feline Leukemia Virus (FeLV). Cats presenting cutaneous lesions with isolation of *Sporothrix* sp. in culture were included. They were separated in groups L1, L2 and L3 (lesions in one, two and three or more sites, respectively) and were subjected to blood sample collection and to biopsy of the lesion. The general condition of the animals was classified as good, fair or poor. Histologically, the lesions were described according to the inflammatory process (granulomatous or nonspecific), degree of activation of predominant phagocytes within the granulomas (macrophages or epithelioid cells), granulomas organization (well-formed or poorly formed) and intensity of cell types within the inflammation. The fungal load was assessed by Grocott silver stain (GSS) technique and immunohistochemistry (IHC). The FC was applied to peripheral blood by means of monoclonal antibodies to target CD4, CD8, CD21, CD14 and granulocytes. One hundred and one animals were included: 20 in group L1, 22 in group L2 and 59 in group L3. Histologically, 99 lesions showed suppurative granulomatous inflammation (SGI). Most lesions, specially in the group L3, showed poorly formed granulomas (p-value=0.032) and predominantly macrophages (p-value=0.010). The GSS and IHC showed yeast-like forms (YF) in 94 cases each one and their concordance was noted in 92 cases. Together, the two techniques showed sensitivity of 98.0%. The fungal load of more than 400 YF/Field (400x) occurred in 48,5% of cases by GSS and was predominant in group L3. There was a correlation between poorly formed granulomas with macrophages predominance and the fungal load exceeding 100 YF/Field (p-value<0.01). The CF was performed in 33 cases of sporotrichosis and five uninfected cats (control group). The percentage of CD8⁺ T cells was greater in the groups L2 and L3 (p-value=0.001). The higher percentage of CD4⁺ T cells was correlated to group L1 and to good general condition (p-value=0.04 and 0.03, respectively). The reduced expression of the CD8 molecule (CD8^{low}) occurred in 20 animals with sporotrichosis, being predominant in group L3 (p-value=0.01), and was not observed in control group. This expression was associated with granulomas with macrophage predominance (p-value=0.01) and occurred in 76.2% of cases with fungal load above 100 YF/field. Three animals were positive to FIV, fourteen to FeLV and two to both tests. There was no correlation between these tests and the other findings. These results suggest an association of the well-organized response, the lower fungal load and increased CD4⁺ T lymphocytes with the control of the disease, along with the good general condition and localized lesions. At the poor general condition, the disseminated lesions and high fungal load were related to a response pattern with an increase of CD8⁺ T lymphocytes and particularly of the CD8^{low} expression.

Keywords: Sporotrichosis; Cat; Histopathology; Flow cytometry; Immune response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação gráfica de dados da análise citofluorimétrica de leucócitos no sangue periférico de um gato saudável. Fonte: Tarrant (2005). 13
- Figura 2 – Padrões do fenótipo $CD8\alpha+\beta^{low}$, por meio da citometria de fluxo, utilizando anticorpo monoclonal específico para a cadeia β do receptor CD8 em gatos não infectados (A), gatos infectados pelo Vírus da Imundeficiência Felina (FIV) na fase aguda (B) e gatos infectados pelo FIV na fase crônica (C). lo= $CD8^{low}$; hi = $CD8^{high}$. Fonte: Bucci et al. (1998). 15
- Quadro 1 – Termos e definições usados na classificação histopatológica da esporotricose felina. 23
- Figura 3 – Estrutura leveduriforme exibindo figura de brotamento com base estreita (seta), compatível com *Sporothrix* sp.. Impregnação pela prata de Grocott. Fonte: LAPCLIN-DERMZOO, SAP, IPEC/FIOCRUZ 24
- Quadro 2 – Escala numérica de classificação da carga de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* sp. visualizadas em cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott (400x). 24
- Figura 4 – Reação de imuno-histoquímica. Método de estreptavidina-biotina-peroxidase. Fonte: Key, 2006. 26

- Figura 5 – Esporotricose felina. Diferentes apresentações clínicas. 31
Animal do grupo L1, com lesão em apenas um local (A);
animal do grupo L2, com lesão em dois locais não
contíguos (B); e animal do grupo L3, com lesões em três
locais não contíguos (C).
- Figura 6 – Esporotricose felina. Pele. Granuloma bem formado. 33
Hematoxilina-Eosina. Barra= 50µm.
- Figura 7 – Esporotricose felina. Pele. Granuloma fúngico – 34
agregados compactos de macrófagos repletos de
estruturas leveduriformes com pouca reação linfo-
plasmocitária e poucos neutrófilos. Hematoxilina-
Eosina. Barra= 50µm. 35
- Figura 8 – Esporotricose felina. Pele. Numerosos neutrófilos de 35
permeio ao infiltrado granulomatoso. Notar os núcleos
segmentados, característica de leucócitos
polimorfonucleares (granulócitos). Hematoxilina-
Eosina. Barra= 50µm.
- Figura 9 – Esporotricose felina. Pele. Denso infiltrado de 36
linfócitos. Notar a presença de numerosas células com
citoplasma escasso e núcleos arredondados e
hipercromáticos. Hematoxilina-Eosina. Barra= 50µm.
- Figura 10 – Esporotricose felina. Pele. Granuloma supurativo mal 36
formado fúngico. Notar a presença de agregado
compacto e com limites irregulares de macrófagos de
citoplasma amplo, repleto de estruturas leveduriformes,
associado a ocasionais neutrófilos de permeio.
Hematoxilina-Eosina. Barra= 50µm.

- Figura 11 – Esporotricose felina. Pele. Alta carga fúngica (>400 estruturas leveduriformes/campo). Impregnação pela prata de Grocott. Barra= 50µm. 37
- Figura 12 – Esporotricose felina. Pele. Numerosas estruturas leveduriformes (>400 estruturas leveduriformes/campo), marcadas em castanho. Imuno-histoquímica anti-*Sporothrix* sp.. Barra= 200µm. 40
- Figura 13 – Esporotricose felina. Pele. Poucas leveduras arredondadas, marcadas em castanho. Imuno-histoquímica anti-*Sporothrix* sp.. Barra= 20µm. 40
- Figura 14 – Esporotricose felina. Pele. Antígenos de *Sporothrix* sp. em castanho no citoplasma de macrófagos. Imuno-histoquímica anti-*Sporothrix* sp.. Barra= 20µm. 41
- Figura 15 – Análise representativa dos parâmetros de granulosidade (eixo X) versus tamanho (eixo Y) das amostras para delimitação das regiões de análise das populações de células mononucleares (A, R1) e granulócitos (B, R1). 42
- Figura 16 – Histograma representativo de marcação de CD4 na região de células mononucleares. O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y número de células. O cursor representa o percentual de células positivas para FITC (37,7% de células CD4+). 43

- Figura 17 – Histograma representativo de marcação de CD8 na região de células mononucleares. O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y o número de células. Os cursores de células positivas para FITC estão representados por FITCtotal (células CD8+), FITClow (células expressando CD8^{low}) e FITChigh (células expressando CD8^{High}). 43
- Figura 18 – Percentuais de leucócitos no sangue periférico. Gato. Histograma representativo de marcação de células CD4, CD8, linfócitos B e monócitos na região de células mononucleares e de granulócitos na região compreendendo todas as populações. O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y o número de células. O cursor FITC representa o percentual de células positivas para cada marcador. 45
- Gráfico 1 – Mediana dos percentuais dos marcadores CD4, CD8 e monócitos no sangue periférico de gatos com esporotricose em diferentes apresentações clínicas, em comparação com o grupo controle. L1: Animais com lesões em um local; L2: Animais com lesões em dois locais; L3: Animais com lesões em três ou mais locais. 46

- Figura 19 – Histograma representativo de marcação de CD8 na região de células mononucleares, com variação das expressões de CD8^{low} e CD8^{high}: Ausência de expressão CD8^{low} (A), baixa expressão CD8^{low} (B) e alta expressão CD8^{low}(C). O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y número de células. Os cursores de células positivas para FITC estão representados por FITCtotal (células CD8+), FITClow (células expressando CD8^{low}) e FITChigh (células expressando CD8^{High}). 47
- Gráfico 2 – Mediana dos percentuais dos marcadores CD4 e CD8 no sangue periférico de gatos com esporotricose de acordo com seu estado geral. 48
- Gráfico 3 – Mediana dos percentuais de CD8^{low} no sangue periférico de gatos com esporotricose, de acordo com as células do Sistema Mononuclear Fagocitário predominantes no granuloma (A); com a presença de granuloma fúngico (B) e com a carga fúngica (C). 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esporotricose Felina: Frequências de cada variável clínico-epidemiológica em relação a apresentação clínica.	76
Tabela 2 - Esporotricose Felina: Frequências de cada achado histopatológico nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo nos três grupos estudados.	77
Tabela 3 - Esporotricose felina: Avaliação da carga fúngica nos cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott em cada um dos grupos estudados nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo.	78
Tabela 4 - Esporotricose felina: Avaliação da carga fúngica nos cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott em relação aos achados clínico-epidemiológicos.	79
Tabela 5 - Avaliação da carga fúngica nos cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott em relação aos achados histopatológicos.	80
Tabela 6 - Esporotricose felina: comparação entre as técnicas de impregnação pela prata de Grocott e de imuno-histoquímica em relação aos resultados de carga fúngica nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo.	81
Tabela 7 - Mediana de cada marcador celular estudado nos animais com esporotricose e no grupo controle, pela técnica de citometria de fluxo.	82

Tabela 8 - Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado na amostra total e em cada grupo, pela técnica de citometria de fluxo.	83
Tabela 9. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado em diferentes variáveis, pela técnica de citometria de fluxo.	84
Tabela 10. Esporotricose felina: Mediana de células positivas para cada marcador celular estudado em relação a pesquisa de antígenos de FeLV, pela técnica de citometria de fluxo.	85
Tabela 11. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado pela técnica de citometria de fluxo, em relação a organização do granuloma e as células do sistema mononuclear fagocitário predominantes.	86
Tabela 12. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado pela técnica de citometria de fluxo, em relação a intensidade dos tipos celulares presentes.	87
Tabela 13. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado pela técnica de citometria de fluxo, em relação a presença de granuloma fúngico e a carga fúngica.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA – Albumina sérica bovina
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CF – Citometria de fluxo
- EL – Estruturas leveduriformes
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina (Feline Immunodeficiency Virus)
- HE – Hematoxilina-Eosina
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Vírus)
- FeLV - Vírus da Leucemia Felina (Feline Leukemia Virus)
- IHQ – Imuno-histoquímica
- IL-1 – Interleucina -1
- IL-4 – Interleucina-4
- IL-10 – Interleucina-10
- IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- IPG – Impregnação pela prata de Grocott
- IOC – Instituto Oswaldo Cruz
- LAPCLIN/DERMZOO - Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
- LATED - Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
- MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (Major histocompatibility complex)
- NK – Matadoras naturais (Natural Killer)
- PAS – Ácido periódico de Schiff

PBS – Solução salina tamponada (Phosphate-Buffered Saline)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

RPMI – Instituto Memorial Roswell Park (Roswell Park Memorial Institute)

SAP – Serviço de Anatomia Patológica

SMF – Sistema mononuclear fagocitário

SPSS - Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (Statistical Package for Social Sciences)

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF – Fator de necrose tumoral (Tumoral necrosis factor)

TLR – Receptores “Toll-like” (Toll-like receptors)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Sporothrix</i> sp. E ESPOROTRICOSE	1
1.2 HISTÓRICO	2
1.3 ESPOROTRICOSE HUMANA	4
1.4 ESPOROTRICOSE ANIMAL	5
1.4.1 Esporotricose Canina	5
1.4.2 Esporotricose Felina	6
1.5 DIAGNÓSTICO	7
1.6 PERFIL HISTOPATOLÓGICO	9
1.7 RESPOSTA IMUNE	11
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 AMOSTRA	20
4.2 PROCEDIMENTOS	21
4.3 HISTOPATOLOGIA	22
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- <i>Sporothrix</i> sp.	25
4.5 MARCAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO E ANÁLISE CITOFUORIMÉTRICA	27
4.6 ANÁLISE DE DADOS	29
5 RESULTADOS	30
5.1 AMOSTRA	30

5.2 PARTE I – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	32
5.2.1 Histopatologia pela coloração de hematoxina e eosina	32
5.2.1.1 Processo inflamatório granulomatoso supurativo	32
5.2.1.2 Processo inflamatório inespecífico	36
5.2.2 Impregnação pela prata de Grocott	37
5.2.3 Imuno-histoquímica utilizando soro policlonal de coelho anti-<i>Sporothrix</i> sp.	39
5.2.3.1 Padronização da técnica	39
5.2.3.2 Estudo de casos	39
5.3 PARTE II - ANÁLISE CITOFLUORIMÉTRICA	41
5.3.1 Padronização da técnica	41
5.3.2 Estudo de casos	44
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICES	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Sporothrix* sp. E ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma micose que acomete o ser humano e diversos animais e se encontra dispersa mundialmente, uma vez que seus agentes etiológicos, fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii* (Lópes-Romero et al., 2011), são encontrados com facilidade na vegetação, em solos úmidos e na matéria orgânica em decomposição (Schell, 1999).

Estudos moleculares demonstraram que *Sporothrix schenckii* é um complexo de diversas espécies, dentre elas *Sporothrix schenckii stricto sensu*, *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. luriei*, com diferentes prevalências de acordo com a localização geográfica (Marimon et al., 2006; Marimon et al., 2007; Romeo et al., 2011).

Sporothrix sp. é um fungo dimórfico que se apresenta em forma filamentosa na natureza ou em cultivo à temperatura de 25°C e em forma de levedura quando em parasitismo ou em cultivo à temperatura de 37°C. As colônias observadas a 25°C tem aspecto úmido e superfície rugosa. Sua coloração varia com o tempo, apresentando-se inicialmente brancacenta e, depois, enegrecida (Lopes-Bezerra et al., 2006). Os conídios podem ser enegrecidos ou hialinos e encontram-se soltos ou dispostos ao longo de conidióforos terminais de hifas septadas, formando arranjos semelhantes a ramos de flores (Kauffman, 1999).

O dimorfismo de *Sporothrix* sp. pode ser demonstrado em subcultivos incubados à temperatura de 37°C, quando o fungo se apresenta leveduriforme, ovalado ou em forma de charuto, medindo de 4-6 µm de diâmetro, e se reproduz por brotamento. O crescimento da fase de levedura *in vitro* pode ser obtido em meios enriquecidos, como ágar infusão de cérebro e coração (Brain-Heart Infusion - BHI) (Kauffman, 1999). As colônias obtidas são brancas e cremosas, apresentando, microscopicamente, estruturas leveduriformes, geralmente em forma de charuto ou arredondadas, das quais podem partir brotamentos claviformes alongados.

A transmissão de *Sporothrix* sp. geralmente ocorre pela inoculação traumática do fungo na pele a partir de uma fonte infectante (Rippon, 1988). Diversos relatos de casos em indivíduos envolvidos em atividades relacionadas à manipulação de plantas e solo, como jardineiros, floristas e fazendeiros, associam a ocorrência da doença à exposição ocupacional ao agente etiológico (Kwon-Chung & Bennett, 1992). A inoculação de *Sporothrix* sp. também pode ocorrer através de mordedura ou arranhadura de animais ou pelo contato com o exsudato de suas lesões (Dunstan et al., 1986; Schubach et al., 2002; Barros et al., 2004). O felino doméstico possui potencial zoonótico elevado, uma vez que suas lesões apresentam grande quantidade de estruturas leveduriformes (Read & Sperling, 1982; Schubach et al., 2004a).

1.2 HISTÓRICO

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

De Beurmann & Ramond (1903) descreveram a doença na França pela primeira vez em 1903 e, em 1905, o fungo isolado foi classificado como *Sporotrichum beurmanni* por Matruchot & Ramond (Apud Rippon, 1988). Em 1910, Matruchot descreveu novamente o micro-organismo, nomeando-o *Sporotrichum schencki* (Apud Rippon, 1988). Esta designação foi utilizada até a década de 1960, quando estudo realizado por Carmichael (1962) demonstrou tratar-se do mesmo micro-organismo referido por Hektoen & Perkins (1900) e o fungo foi nomeado definitivamente como *Sporothrix schenckii*.

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

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

A esporotricose geralmente é observada de forma esporádica, em casos isolados e pequenos surtos familiares ou profissionais, com contaminação a partir de uma fonte de infecção comum (Campos et al., 1994; Bustamante & Campos, 2001; Lopes-Bezerra et al., 2006). Na década de 1940, foi descrita uma epidemia de esporotricose em Witwatersrand, na África do Sul, envolvendo mais de três mil mineradores, infectados a partir da inoculação do fungo, presente em vigas de madeira contaminadas na estrutura das minas (Brown et al., 1947). Esta epidemia foi a maior descrita até o início do século XXI.

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

A partir de 1998, a esporotricose passou a se apresentar de forma epidêmica no estado do Rio de Janeiro, com aumento do número de casos em seres humanos, gatos e cães (Barros et al., 2001, 2004; Schubach et al., 2004a; Schubach et al., 2006). Durante o período de 1998 a 2009, aproximadamente 2200 casos humanos, 3244 casos felinos e 120 casos caninos foram diagnosticados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) – Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (Barros et al., 2010). Segundo dados do Serviço de Vigilância em Saúde do IPEC, 2340 novos casos de esporotricose humana foram confirmados entre 2008 e 2011, o que torna a casuística no estado do Rio de Janeiro a maior da história (Silva et al., 2012).

Dentre os casos humanos registrados até 2004, 83% revelaram ter tido contato com gatos com esporotricose e, destes, 56% relataram episódio de arranhadura ou mordedura por estes animais

(Schubach et al., 2008). A transmissão zoonótica da doença parece explicar a implantação da epidemia e a sua manutenção de forma endêmica (Barros et al., 2010).

A transmissão zoonótica pelo felino doméstico foi reconhecida pela primeira vez por Read & Sperling, em 1982, com o acometimento de diversos membros de uma família, um estudante de veterinária e um assistente a partir da manipulação de um gato infectado (Read & Sperling, 1982). Observações semelhantes foram descritas também por Dunstan et al. (1986) e Larsson et al. (1989). Em estudo posterior, a utilização de métodos moleculares revelou isolados idênticos de *S. schenckii* em lesões de um gato e do veterinário que o manipulou, demonstrando a transmissão zoonótica da esporotricose (Reed et al., 1993). A espécie *S. brasiliensis* é, atualmente, a principal espécie associada a epidemia por transmissão zoonótica descrita no Rio de Janeiro, Brasil (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011; Barros et al., 2011).

O isolamento de *Sporothrix* sp. de fragmentos de unhas e de “swabs” orais de gatos infectados aponta para o potencial desses animais para a transmissão do agente etiológico por meio de suas arranhaduras ou mordeduras (Schubach et al., 2001, 2002). Além disso, a grande quantidade de leveduras encontrada nas lesões cutâneas de gatos com esporotricose permite a transmissão pelo contato com estas lesões e parece explicar a ocorrência da doença em pacientes humanos sem histórico de traumas (Barros et al., 2001; Schubach et al., 2002).

1.3 ESPOROTRICOSE HUMANA

A esporotricose humana acomete preferencialmente a pele e tecido subcutâneo e se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões de aspecto variável, desde lesões únicas (forma fixa) até formas disseminadas. A apresentação cutâneo-linfática é a mais frequente no Rio de Janeiro e se caracteriza pela formação de lesões cutâneas que acompanham o trajeto de vasos linfáticos (Barros et al., 2001, 2004). Ocasionalmente, a transmissão ocorre pela inalação de conídios, favorecendo o aparecimento da forma pulmonar. A difusão do agente pela via linfo-hematogênea favorece a forma disseminada (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Em seres humanos, a esporotricose não costuma acometer o estado geral do indivíduo imunocompetente (Barros et al., 2001). Em indivíduos infectados pelo Vírus da

Imunodeficiência Humana (HIV) com imunodeficiência, nos quais a resposta imune pelos linfócitos T CD4⁺ encontra-se alterada, a esporotricose geralmente se manifesta de forma grave (Rocha et al., 2001; Carvalho et al., 2002).

1.4 ESPOROTRICOSE ANIMAL

A infecção experimental por *S. schenckii* já foi descrita por diversos autores em diferentes espécies de animais (Schenck, 1898; Hektoen & Perkins, 1900; Lutz & Splendore, 1907; De Beurmann & Gougerot, 1909). A esporotricose animal naturalmente adquirida é considerada pouco comum. Após os primeiros relatos em ratos (Lutz & Splendore, 1907), a doença foi descrita em grande variedade de hospedeiros, incluindo cães, gatos, cavalos, bois, camelos, golfinhos, ovelhas, mulas, aves, porcos, ratos, tatus e primatas não humanos (Werner & Werner, 1994; Welsh, 2003).

1.4.1 Esporotricose Canina

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

No Brasil, o primeiro caso de esporotricose canina naturalmente adquirida foi apresentado em congresso por Souza, em 1957 (Apud Migliano et al., 1963). Em 1963, Migliano e colaboradores descreveram mais dois casos em São Paulo. Ao longo das décadas seguintes, casos isolados foram descritos na literatura (Londero et al., 1964; Freitas et al., 1965; Koehne et al., 1971; Dion & Speckman, 1978; Goad & Goad, 1986). A descrição de 12 casos em 1965 no estado de São Paulo foi a maior descrição até a década de 1990 (Freitas et al., 1965).

A partir de 1998, devido à situação epidêmica da doença no Rio de Janeiro, houve um aumento do número de casos em cães nesta região, tendo sido descritos 120 casos de esporotricose canina até 2009. Na maioria dos casos observados nesta epidemia, foi relatado contato dos cães infectados com gatos com esporotricose, o que sugere participação do felino na transmissão de *Sporothrix* sp. para os cães. Entretanto, não há registro da transmissão zoonótica a partir dos cães infectados nesta epidemia (Schubach et al., 2006).

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

1.4.2 Esporotricose Felina

De Beurmann et al. (1909) demonstraram experimentalmente a suscetibilidade de gatos ao *S. schenckii*, observando o desenvolvimento da doença com lesões localizadas e disseminadas. Entretanto, a esporotricose felina naturalmente adquirida só foi relatada em 1952 por Singer & Muncie nos EUA, e em 1956 no Brasil (Freitas et al., 1956).

Em 1996, Davies & Troy descreveram 48 casos de esporotricose felina, atendidos durante o período de 40 anos (Davies & Troy, 1996). No início dos anos 1990, a maior série de casos da doença em gatos incluía oito casos (Freitas et al., 1965), até a epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro, com a descrição de 773 gatos infectados entre 2002 e 2005 (Pereira et al, 2010).

As lesões cutâneas encontradas em gatos com esporotricose caracterizam-se inicialmente por nódulos subcutâneos que evoluem para ulceração. Na maioria dos casos, estas lesões estão localizadas na cabeça, principalmente no plano nasal e pavilhões auriculares, sendo freqüente a ocorrência de três ou mais lesões (Schubach et al., 2004a). O quadro clínico observado na esporotricose felina é variável, sendo descritas infecções subclínicas, lesões únicas, disseminadas e formas sistêmicas fatais (Schubach et al., 2004a, 2003a).

Em felinos, o comprometimento sistêmico é descrito freqüentemente mesmo em animais imunocompetentes (Barbee et al., 1977; Schubach et al., 2004a). Assim como em humanos infectados pelo HIV, em felinos, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) também podem causar imunossupressão pelo declínio dos níveis de linfócitos CD4⁺, favorecendo infecções secundárias por outros agentes (Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009). Entretanto, a co-infecção da esporotricose com FIV e FeLV não parece estar relacionada com a gravidade da esporotricose (Schubach et al., 2003b, 2004a, 2004b; Pereira et al., 2010).

1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo da doença é obtido pelo isolamento e identificação de *Sporothrix* sp. em cultivo micológico a 25°C, com posterior conversão leveduriforme a 37°C (Kwon-Chung & Bennett, 1992). O material é geralmente obtido por meio de *swab*, aspirado ou biópsia de lesão e inicialmente semeado em ágar Sabouraud dextrose a 25°C (Kauffman, 1999).

Os ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos também tem sido utilizados para sorodiagnóstico de esporotricose e monitoramento terapêutico em seres humanos (Penha & Lopes-Bezerra, 2000; Bernardes-Engemann et al., 2005; Almeida-Paes et al., 2007). A sorologia é uma alternativa útil particularmente em casos em que os resultados dos métodos micológicos tradicionais são negativos (Lopes-Bezerra et al., 2006). O método de ensaio imunoenzimático (ELISA- “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) foi descrito para diagnóstico sorológico da esporotricose em gatos (Fernandes et al., 2011) e demonstrou altas sensibilidade e especificidade. Este método é considerado de fácil realização, rápido e barato, mas sua aplicação na rotina diagnóstica ainda não foi estabelecida.

As técnicas de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”), permitem a detecção rápida e específica de *S. schenckii* (Kano et al., 2001; Hu et al., 2003; Kanbe et al., 2005), por meio da aplicação de segmentos específicos de DNA e, quando disponíveis, podem ser uma alternativa ao diagnóstico em casos específicos.

O exame histopatológico é uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico, importante quando o isolamento em cultura não pode ser realizado (Rodríguez & Sarmiento, 1998; Barros et al.,

2005). A utilização de técnicas especiais de histoquímica, como a da impregnação pela prata de Grocott (IPG) e a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS), permite definir a etiologia fúngica, por meio da visualização de estruturas leveduriformes (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Ainda assim, a identificação do agente etiológico por métodos morfológicos nem sempre é possível, uma vez que as leveduras de *Sporothrix* sp. são geralmente escassas nas lesões de esporotricose no ser humano e no cão (Moraes & Miranda, 1964; Schubach et al., 2006). Por outro lado, em gatos, as lesões cutâneas de esporotricose apresentam alta carga fúngica, proporcionando boa sensibilidade para a evidenciação de elementos fúngicos nos exames citopatológico (Pereira et al., 2011) e histopatológico (Schubach et al., 2004a).

As leveduras de *S. schenckii* observadas no tecido são ovais ou em forma de charuto, com tamanho variando entre 4,0 e 6,0 μm (Kauffman, 1999), e podem exibir brotamento, geralmente único, e de base estreita (Schwarz, 1982). Na coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE), as leveduras podem apresentar um halo claro ao seu redor (Kligman & Baldrige, 1951; Schwarz, 1982).

Em lesões de esporotricose humana, a presença de *S. schenckii* no tecido é descrita também na forma de corpo asteróide, visualizado na coloração pela HE e no qual se observam prolongamentos eosinofílicos, irradiando de uma levedura central (Pinkus & Grekin, 1942; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964). A natureza desta estrutura ainda não foi totalmente elucidada, mas acredita-se que os prolongamentos eosinofílicos estejam relacionados à deposição de complexos antígeno-anticorpo e restos de células inflamatórias do hospedeiro (Da Rosa et al., 2008; Hussein, 2008). Estudos recentes sugerem que o corpo asteróide funciona como um elemento de resistência do micro-organismo, uma vez que a levedura central demonstra viabilidade (Da Rosa et al., 2008). Embora este achado, em muitos casos, seja freqüente em lesões de esporotricose, sabe-se que não é específico da doença (Moore, 1946; Lurie, 1963; Narisawa et al., 1989; Hussein, 2008).

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

Para que a ligação antígeno-anticorpo seja visualizada pelo microscópio óptico, é necessária a utilização de sistemas de detecção. Estes sistemas utilizam enzimas que, em presença do respectivo substrato e de um cromógeno, produzem cor no local onde ocorre a ligação antígeno-anticorpo. O sistema estreptavidina-peroxidase é considerado especialmente sensível e consiste

na aplicação de um anticorpo secundário biotilado, que reconhece o anticorpo primário ligado ao antígeno. A seguir, um reagente contendo moléculas de estreptavidina conjugadas à enzima peroxidase é adicionado. A estreptavidina se liga com avidéz à biotina do anticorpo secundário. A formação de cor ocorre quando o peróxido de hidrogênio, substrato da enzima peroxidase, é adicionado à reação juntamente com o cromógeno (Ramos-Vara, 2005).

A utilização da IHQ para identificação de *S. schenckii* demonstra resultados satisfatórios em lesões de esporotricose humana e canina (Marques et al., 1992; Rodríguez & Sarmiento, 1998; Miranda et al., 2011), sendo descrita uma maior sensibilidade deste método quando comparado com as técnicas especiais de histoquímica. Além disso, a IHQ permite a identificação específica do agente etiológico, uma vez que é baseado em uma reação antígeno-anticorpo, elevando a eficácia do diagnóstico histológico. As técnicas histológicas especiais devem ser utilizadas, pois detectam adequadamente as estruturas fúngicas no tecido. A IHQ pode ser combinada aos demais métodos, garantindo maior sensibilidade aos resultados.

1.6 PERFIL HISTOPATOLÓGICO

Microscopicamente, as lesões cutâneas de esporotricose são tipicamente granulomatosas supurativas em diferentes espécies (De Beurmann & Gougerot, 1907; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Schubach et al., 2004a; Miranda et al., 2009; Quintella et al., 2011, 2012). Os granulomas são formados por agregados de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) em diferentes estágios de ativação (Adams, 1976; Hirsch & Johnson, 1984). Os granulomas supurativos apresentam coleções de neutrófilos associadas aos agregados de células do SMF (Ackerman et al., 1997) e são geralmente associados a doenças causadas por agentes infecciosos (Hirsch & Johnson, 1984; Ackerman et al., 1997).

De acordo com estudos experimentais, o quadro histopatológico varia com o estágio da doença, revelando inicialmente a formação de abscessos, com participação de macrófagos e linfócitos, associados a grande quantidade de leveduras. Quando os macrófagos se tornam ativados e se diferenciam, formando os granulomas, a quantidade de leveduras diminui,

acompanhada da redução dos abscessos e aumento do número de plasmócitos (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Hiruma et al., 1988).

Na esporotricose humana, os granulomas supurativos observados são frequentemente caracterizados pela presença de uma zona central supurativa, uma zona intermediária de fagócitos mononucleares e uma zona externa linfo-plasmocitária, sendo denominados “granulomas esporotricóticos” (De Beurmann & Gougerot, 1907; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963). Alguns autores descrevem também a ocorrência de granulomas do tipo tuberculóide (Pinkus & Grekin, 1950; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964; Quintella 2011, 2012) e do tipo corpo estranho (Quintella et al., 2011). Quintella et al. (2012) observaram baixa frequência de granulomas esporotricóticos nas lesões de esporotricose estudadas (21,6%), sendo seu percentual idêntico ao encontrado para granulomas tuberculóides. Quanto à distribuição, os granulomas podem se apresentar isolados, caracterizando padrão nodular, coalescentes, levando ao padrão difuso ou em padrão intersticial, separando as fibras colágenas (Moore & Ackerman, 1946; Gadelha & Talhari, 1982). As células gigantes multinucleadas e a hiperplasia pseudoepiteliomatosa também podem estar presentes nas lesões cutâneas (Kauffman, 1999; Quintella et al., 2011, 2012).

Em cães, as lesões de esporotricose são caracterizadas microscopicamente por processos granulomatosos supurativos (Miranda et al. 2009; Miranda et al., 2010), semelhante ao descrito em humanos (Quintella et al., 2011). Geralmente, as lesões de esporotricose canina apresentam escassez de estruturas fúngicas. A presença do agente em grande quantidade em cortes histológicos pode eventualmente ocorrer (Migliano et al., 1963; Bernstein et al., 2007; Miranda et al., 2009), mas está normalmente associada a formas mais graves da doença e parece relacionada a fatores como doenças concomitantes, desnutrição e uso de fárcamacos imunossupressores como corticosteróides (Schubach et al., 2006; Bernstein et al., 2007; Cafarchia et al., 2007).

Em relação a esporotricose felina, a descrição microscópica das lesões de forma sistemática e detalhada ainda não foi realizada. Alguns autores caracterizaram as lesões de esporotricose em gatos como granulomatosas supurativas (Dunstan et al., 1986; Gonzales Cabo et al., 1989). Em estudo realizado por Schubach et al. (2002; 2004a), a presença de infiltrado inflamatório difuso, com predomínio de macrófagos e neutrófilos, foi observada em todos os casos estudados, com formação de granuloma na minoria (12,2%).

1.7 RESPOSTA IMUNE

A importância da imunidade celular e do processo granulomatoso na resposta à infecção por *Sporothrix* sp. é evidenciada por diversos autores. Estudos experimentais demonstraram que lesões de esporotricose em camundongos com deficiência na imunidade mediada por células exibem formação de granulomas incapazes de destruir a célula fúngica fagocitada (Miyaji & Nishimura, 1982; Dickerson et al., 1983). Isto evidencia a importância da colaboração entre células do SMF e células T na eliminação da infecção pelas células fagocitárias do granuloma. Shiraishi et al. (1992), em estudo experimental, verificaram que a utilização de inibidores da função de macrófagos pode aumentar a suscetibilidade de camundongos ao fungo, o que sugere que a ativação destas células é uma ferramenta importante no controle da infecção por *Sporothrix* sp.. Em estudo realizado por Pen-Cheng et al. (1993), camundongos imunocompetentes e camundongos deficientes em células T foram experimentalmente infectados com *S. schenckii*. Nos animais imunocompetentes, as lesões evoluíram com formação de granulomas e fragmentação de estruturas leveduriformes, enquanto, nos deficientes as estruturas leveduriformes permaneceram intactas durante todo o período observado.

A participação da imunidade humoral na resposta a esporotricose também é descrita (Maia et al., 2006). Carlos et al. (2003) sugerem que componentes da parede do fungo tendem a induzir resposta do tipo granulomatosa, enquanto exoantígenos induzem a resposta do tipo humoral. Entretanto, Tachibana et al. (1999) não conseguiram demonstrar o aumento da resistência ao fungo com a transmissão passiva de soro anti-*S.schenckii* em camundongos, mas sim com a transferência de linfócitos CD4⁺, o que reforça o papel da imunidade celular frente a esta infecção.

Carlos et al. (2009) observaram que a imunidade inata também participa da resposta a esporotricose, por meio de receptores Toll-like (TLR), presentes em células fagocitárias do hospedeiro e ativadas por lipídios da parede fúngica. Esta ativação promove a indução da resposta adaptativa, por meio da produção de espécies reativas do oxigênio.

Uma redução da imunidade celular *in vitro* e *in vivo* parece ocorrer entre a quarta e a sexta semana de infecção por *S. schenckii* em camundongos, com redução da resposta

linfoproliferativa e da produção de interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) por macrófagos. Como consequência, observam-se aumento da carga fúngica e piora no estado geral do hospedeiro. Após a oitava semana, a resposta celular tende ao crescimento (Carlos et al., 1992; Carlos et al., 1994). Carlos et al. (1994) sugerem que esta redução da imunidade celular possa ocorrer devido a atividade de citocinas do tipo Th2, como a interleucina-10 (IL-10) e a interleucina-4 (IL-4), envolvidas com a imunidade humoral. Estas citocinas são liberadas durante todo o período da infecção, mas aumentam ao longo das semanas, especificamente a partir da quinta semana (Maia et al., 2006).

Estudos de resposta imune *in situ* na esporotricose humana utilizando a técnica de IHQ indicam que a forma cutânea fixa parece associada à resposta imune mais balanceada, com menor carga fúngica e ao controle da infecção. Na forma cutâneo-linfática, observaram-se maiores carga fúngica e destruição tissular pelo processo inflamatório, podendo, desta forma, facilitar a disseminação do agente pelos vasos linfáticos (Morgado et al., 2011).

Destaca-se ainda que a capacidade do fungo de interagir com as células do hospedeiro e se multiplicar também podem influenciar no curso da doença, uma vez que determinam a sua virulência. O papel da virulência do fungo na evolução da esporotricose pode ser evidenciado pela associação entre cepas termotolerantes e a forma cutâneo-linfática da esporotricose, quando comparadas às cepas que não se multiplicam em temperaturas acima de 37°C, relacionadas a forma cutânea fixa (Kwon-Chung & Bennet, 1992). Outro importante fator de virulência deste fungo está associado a sua capacidade de interação com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, facilitando a disseminação do fungo no tecido (Lima et al., 1999). Adicionalmente, a inibição da fagocitose em macrófagos tratados com extrato lipídico da parede fúngica de *S. schenckii*, observada por Carlos et al. (2003), indicam que lipídios da parede do fungo tenham papel no aumento da sua virulência.

É importante ressaltar, entretanto, que, na epidemia da doença no Rio de Janeiro, os mesmos isolados de *Sporothrix* sp. circulam entre seres humanos, cães e gatos (Reis et al., 2009), mas apresentações clínicas graves e carga fúngica elevada são raras em seres humanos e frequentes na esporotricose felina. Isso sugere que outros fatores, além da virulência do fungo, podem interferir na gravidade da esporotricose felina.

O papel de cada tipo de resposta imune frente à esporotricose e sua associação com fatores de virulência e com a imunidade do hospedeiro já são estudados na esporotricose humana e no modelo murino. Contudo, a investigação acerca da suscetibilidade dos gatos a esta infecção ainda é pouco discutida. Apesar do alto potencial de transmissão zoonótica que esta

suscetibilidade confere a estes animais e da doença resultante disto, pouco se sabe até o momento da resposta imune de gatos frente à esporotricose.

A técnica de citometria de fluxo (CF) permite a distinção de diferentes leucócitos e de seus subtipos no sangue periférico e sua contagem percentual em uma amostra, com base na análise de suas características físicas (tamanho e granulosidade) e afinidade por anticorpos específicos, conjugados a fluorocromos. A ligação específica entre antígenos e estes anticorpos pode ser detectada pela emissão de fluorescência pela célula marcada (Weiss, 2002; Tarrant, 2005). A figura 1 ilustra o perfil de leucócitos no sangue periférico de um gato saudável, com base na análise de suas características físicas.

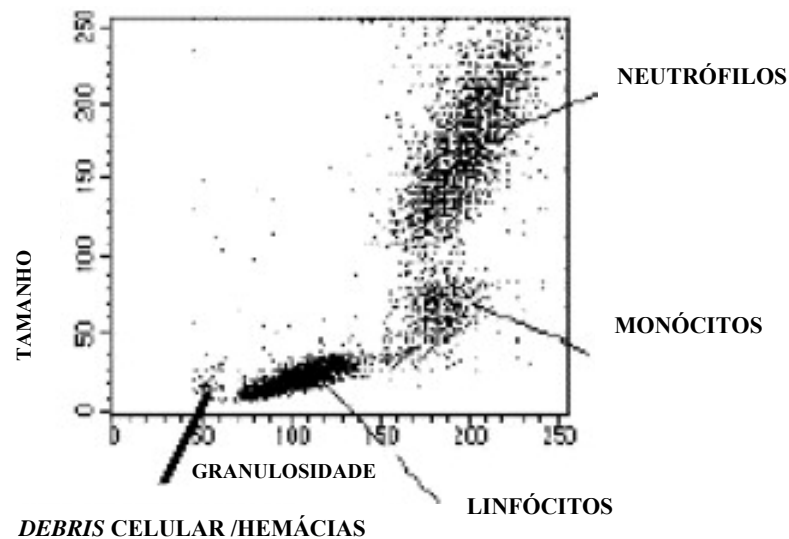


Figura 1. Representação gráfica de dados da análise citofluorimétrica de leucócitos no sangue periférico de um gato saudável. Fonte: Tarrant (2005).

A CF é uma ferramenta eficiente para pesquisas acerca da resposta imune e sua associação com a patogênese de uma doença em seres humanos e outros animais (Walker et al., 1994; Byrne et al., 2000; Tarrant, 2005; Janols et al., 2010; Verma et al., 2010). Essa técnica pode ser utilizada, como exemplo, para estudo da população de linfócitos e de suas subpopulações, possivelmente envolvidas na patogênese das diversas apresentações clínicas da esporotricose felina. Atualmente, existem anticorpos monoclonais específicos para marcadores celulares de felinos comercialmente disponíveis para uso em CF (Weiss, 2002).

Em felinos infectados por FIV, estudos utilizando a técnica de CF demonstram que, assim como em seres humanos infectados pelo HIV, a imunossupressão ocorre associada a redução de linfócitos $CD4^+$, podendo levar à redução ou inversão da relação $CD4:CD8$ (Novotney et al., 1990; Tompkins et al., 1991; Bishop et al., 1992; Walker et al., 1994; Hoffmann-Fezer, 1996; Tarrant, 2005). Em gatos infectados pelo FeLV, descreve-se a redução de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ (Tompkins et al., 1991). Em felinos com esporotricose, co-infectados ou não por FIV e FeLV, o perfil de leucócitos no sangue periférico ainda é desconhecido.

A ocorrência de uma subpopulação de células $CD8^+$ com baixa expressão ($CD8^{low}$) é descrita associada a pacientes com HIV (Schmitz et al., 1998; Trautmann et al., 2003; Kienzle et al., 2005) e em gatos infectados pelo FIV (Willett et al., 1993; Bucci et al., 1998; Gebhard et al., 1999; Shimojima et al., 2004; Paillot et al., 2005.) e pelo vírus da doença de Borna (Berg et al., 1999).

Esta expressão apresenta um padrão citofluorimétrico distinto e é avaliada com base em diferentes intensidades de fluorescência emitidas pelas células $CD8^+$, permitindo a identificação de duas subpopulações – $CD8^{low}$ e $CD8^{high}$ (Figura 2).

O receptor $CD8$ encontra-se geralmente na forma de um heterodímero, constituído de uma cadeia α e uma cadeia β . Diferentes estudos em gatos atribuem a existência da expressão de $CD8^{low}$ à variação da expressão da cadeia β , levando aos fenótipos $CD8\alpha^+\beta^{low}$ e $CD8\alpha^+\beta^-$ (Berg et al., 1999; Shimojima et al., 1998; Shimojima et al., 2004). Shimojima et al. (1998) observaram que a intensidade de expressão da cadeia α não varia nos linfócitos $CD8\beta^{low}$. Em humanos, a expressão de $CD8^{low}$ é geralmente relacionada a fraca expressão da cadeia α em células Natural Killer (NK) ou células T citotóxicas não restritas ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC - “Major histocompatibility complex”), que, em sua maioria, não expressam a cadeia β (Baume et al., 1990).

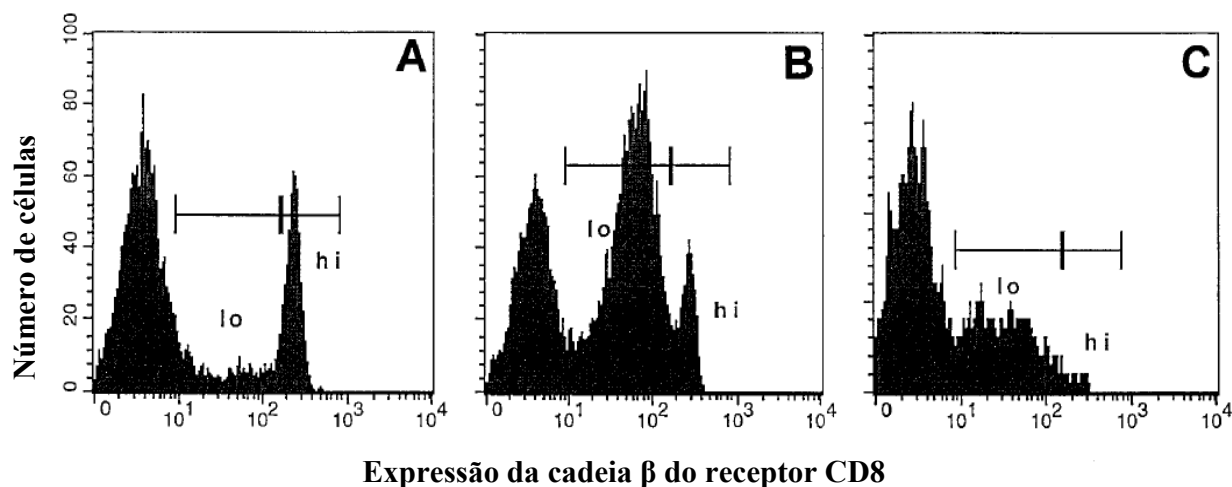


Figura 2. Padrões do fenótipo $CD8\alpha^+\beta^{low}$, por meio da citometria de fluxo, utilizando anticorpo monoclonal específico para a cadeia β do receptor CD8 em gatos não infectados (A), gatos infectados pelo Vírus da Imundeficiência Felina (FIV) na fase aguda (B) e gatos infectados pelo FIV na fase crônica (C). lo= $CD8^{low}$; hi = $CD8^{high}$. Fonte: Bucci et al. (1998).

A expressão $CD8^{low}$ parece estar associada a células com forte atividade antiviral em humanos infectados pelo HIV e em gatos infectados pelo FIV. Contudo, o relato desta expressão em seres humanos hígidos (Baume et al., 1990) e camundongos com infecções de outras etiologias (Kizaki et al., 1991; Grisotto et al., 2001) sugere que não esteja associada apenas a resposta antiviral. Entretanto, seu papel nestas situações ainda é pouco conhecido. Este perfil é descrito também em gatos hígidos (Berg et al., 1999), mas em menor percentual do que em presença de infecção por vírus. Nestes animais, a ocorrência da expressão $CD8^{low}$ em doenças fúngicas ainda não foi descrita.

2. JUSTIFICATIVA

No Rio de Janeiro, o alto percentual da transmissão da esporotricose a partir de gatos infectados, por meio de mordedura, arranhadura ou do contato com o exsudato de suas lesões, observado desde 1998, evidencia a importância destes animais na manutenção da epidemia (Schubach et al., 2008; Barros et al., 2010).

A ocorrência de formas graves da doença e a presença de lesões cutâneas sem formação de granulomas e ricas em estruturas leveduriformes em gatos aparentemente imunocompetentes (Nobre et al., 2001; Schubach et al. 2004a, 2003a) evidenciam alta suscetibilidade destes animais à infecção por *Sporothrix* sp. e sua alta capacidade de transmissão zoonótica. O controle da infecção felina é desejável para diminuição da carga parasitária e o comprometimento dos animais infectados enfatiza a necessidade de conhecer sua resposta imune à esporotricose.

Ao contrário de alguns animais como canídeos e murinos, é difícil o encontro de reagentes e kits para o estudo da reação inflamatória em felinos. Este fato limita os estudos acerca desta espécie e, por isto, deve-se tentar padronizar técnicas e procedimentos que permitam o maior conhecimento neste grupo de animais. Isto se torna mais relevante no caso da esporotricose, porque, além de os gatos serem implicados na transmissão zoonótica, são animais de difícil manejo, com baixo percentual de cura com o tratamento (Schubach et al., 2004a).

A técnica de CF pode ser uma ferramenta útil para análise de leucócitos no sangue periférico de felinos com esporotricose, contribuindo assim para melhor compreensão da patogenia da doença nesses animais e a resposta imune associada, incluindo as suas diferentes formas clínicas. Paralelamente, a aplicação da IHQ para detecção de *Sporothrix* sp. e a caracterização do processo inflamatório *in situ* permitem a correlação da carga fúngica com os demais achados. Desta forma, pode-se ampliar o conhecimento acerca da suscetibilidade de felinos à esporotricose, da resposta terapêutica e do curso da infecção nesses animais, melhorando o controle da doença nos animais e, conseqüentemente, auxiliando no controle da transmissão zoonótica.

O estudo do perfil histopatológico de lesões cutâneas de esporotricose felina, a aplicação da técnica de citometria de fluxo para detecção de leucócitos no sangue periférico de gatos com esporotricose e sua correlação com diferentes apresentações clínicas da doença poderão permitir o aprofundamento do conhecimento acerca da resposta imune em felinos infectados e da suscetibilidade destes animais ao fungo. Espera-se que os resultados possam contribuir para estudos da patogenia e do prognóstico da doença nestes animais e, conseqüentemente, favorecer o controle da infecção humana.

Posteriormente, as técnicas padronizadas poderão dar suporte à rotina de pesquisa do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN/DERMZOO) no desenvolvimento de estudos imunopatológicos de doenças infecciosas em animais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta inflamatória *in vivo* e *in vitro* na esporotricose felina em diferentes apresentações clínicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o processo inflamatório observado nas lesões cutâneas em cortes histológicos corados pela HE;
- Padronizar a técnica de imuno-histoquímica, utilizando soro policlonal de coelho anti-*Sporothrix* sp. para detecção de estruturas leveduriformes em cortes histológicos de lesões cutâneas de esporotricose felina;
- Verificar a frequência de estruturas leveduriformes e antígenos de *Sporothrix* sp. e da carga fúngica nas lesões cutâneas pelas técnicas de IPG e IHQ e comparar as sensibilidades das duas técnicas;
- Padronizar a técnica de CF, para identificação *in vitro* de leucócitos presentes nas amostras de sangue periférico;
- Descrever, utilizando a técnica de CF, o perfil de leucócitos presentes no sangue periférico dos animais;
- Correlacionar o perfil da resposta imune *in vitro* com as diferentes apresentações clínicas da esporotricose e com o perfil histopatológico das lesões;

- Comparar as diferentes apresentações clínicas, o processo inflamatório e a carga fúngica com o *status* sorológico para FIV e FeLV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

A amostra foi obtida da coorte de felinos domésticos (*Felis catus*) atendidos na rotina ambulatorial do LAPCLIN/DERMZOO do IPEC-Fiocruz, entre o período de julho de 2009 e maio de 2012.

A amostra utilizada foi obtida por conveniência. Foram considerados elegíveis para o estudo gatos apresentando lesões cutâneas ulceradas com isolamento de *Sporothrix* sp. em cultura, e sem uso prévio de terapia anti-fúngica ou corticosteróide.

Foram excluídos os casos em que o fragmento de biopsia foi considerado superficial (sem representação da derme reticular) ou não representativo (infiltrado inflamatório sem ocupar no mínimo um terço da amostra).

Como controle negativo para a análise citofluorimétrica, foram utilizados animais clinicamente hígidos. A amostra do grupo controle foi obtida por meio de colaboração com um gatil particular, no município do Rio de Janeiro.

Todos os animais foram incluídos no estudo (grupo de animais com esporotricose ou grupo controle) após autorização de seus proprietários, por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os procedimentos realizados nos animais, assim como a utilização e estocagem de suas amostras biológicas, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FIOCRUZ, com o número de licença LW-28/10.

4.2 PROCEDIMENTOS

Os animais foram submetidos à exame clínico geral e dermatológico, avaliando-se seu estado geral, sinais extra-cutâneos, número, localização e característica das lesões.

O estado geral destes animais foi classificado como bom, regular ou ruim, sendo o estado geral bom considerado na ausência de sinais extra-cutâneos (0/4). A presença de sinais como dispnéia, conjuntivite, emagrecimento, desidratação, mucosas hipocoradas e prostração, quando leves, indicaram estado geral regular (+/4 ou ++ / 4) e, quando acentuadas, estado geral ruim (+++/4 ou ++++ / 4).

De acordo com a apresentação clínica das lesões, os animais foram divididos em três grupos: L1, L2 e L3 (Schubach et al., 2004a). No grupo L1, foram incluídos animais apresentando lesões em apenas um local; no grupo L2, animais apresentando lesões em dois locais não contíguos; e no grupo L3, animais exibindo lesões em três ou mais locais não contíguos.

Os animais foram submetidos a procedimentos de sedação, coleta de sangue e biopsia.

Para o procedimento de sedação, foi utilizado cloridrato de quetamina 10% (Agener® - União Saúde Animal SA, São Paulo – SP, Brasil), na dosagem de 10 mg/kg, e maleato de acepromazina 1% (Acepran – Univet SA, São Paulo –SP, Brasil), na dosagem de 0,1 mg/kg, pela via intramuscular.

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção à vácuo da veia jugular externa. Foram coletados aproximadamente 6 mL de sangue, sendo 4 mL em tubo com heparina (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) para realização de CF e 2 mL em tubo sem anti-coagulante (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) para verificação do *status* sorológico dos animais para FIV e FeLV, através da detecção de anticorpos para FIV e de antígenos de FeLV, por meio da utilização de um “kit” de ELISA comercial (Snap® FIV/FeLV Combo Test, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA).

A seguir, foi feita a coleta de exsudato de lesões cutâneas ulceradas por meio de *swabs* estéreis para a realização de exames micológicos (isolamento e identificação fúngica em meios de cultura) (Kwon-Chung & Bennet, 1992).

Para o procedimento de biopsia, a anti-sepsia da lesão foi feita com álcool 70%. A anestesia local infiltrativa foi realizada na região a ser biopsiada, utilizando cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstrictor, na dosagem de até 7mg/kg. Os fragmentos foram obtidos da borda da lesão,

utilizando-se *punch* de 0,4 cm e foram representativos da área ulcerada e do tecido cutâneo adjacente, evitando áreas de necrose. Em casos de animais com múltiplas lesões, foram escolhidas para coleta lesões ulceradas características, evitando-se aquelas com presença de infecção secundária ou com área necrótica extensa. Lesões localizadas em regiões de difícil realização do procedimento, como pálpebras, pavilhão auricular e extremidades, foram evitadas.

O fragmento coletado foi fixado em formol tamponado a 10% para realização de exame histopatológico e imuno-histoquímico para pesquisa de estruturas leveduriformes e antígenos de *Sporothrix* sp. no Serviço de Anatomia Patológica (SAP), IPEC/Fiocruz.

Os animais do grupo controle foram submetidos a coleta de sangue periférico por meio de punção à vácuo da veia jugular externa, sem procedimento de sedação. O sangue foi coletado da mesma forma ao descrito acima para os animais com esporotricose e utilizado para a realização da análise citofluorimétrica e para os testes sorológicos para FIV e FeLV.

4.3 HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos das biopsias incluídos em blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5µm em micrótomo e corados pela HE e IPG.

No estudo histopatológico, as lesões foram descritas considerando-se o tipo de processo inflamatório – granulomatoso ou inespecífico e distribuição do infiltrado. Em casos de processo inflamatório granulomatoso, foram verificados os fagócitos predominantes nos granulomas – macrófagos ou células epitelióides, organização do granuloma e tipo de granuloma. O quadro 1 foi adaptado do estudo de Miranda et al. (2010) e apresenta as definições dos termos histopatológicos aplicados neste estudo.

Na análise pela IPG, foram considerados positivos os casos em que foram observadas estruturas leveduriformes (Figura 3). Os casos foram considerados negativos quando não foram observadas estruturas leveduriformes após análise de cerca de 50 campos microscópicos de grande aumento (400x). A carga fúngica foi avaliada na área da lesão com maior riqueza fúngica, adaptada da escala numérica de Quintella et al. (2011) e apresentada no quadro 2.

Termo Histopatológico	Categorias	Definição
Granuloma/infiltrado granulomatoso		Infiltrado inflamatório contendo células do SMF ativadas, formando agregados compactos ou cordões intersticiais.
Processo Inflamatório Inespecífico/não granulomatoso		Infiltrado inflamatório sem granulomas
Granuloma/infiltrado granulomatoso supurativo	Típico	Granuloma com infiltrado de neutrófilos.
	Fúngico	Granulomas com infiltrado de neutrófilos e nos quais os macrófagos se apresentam repletos de estruturas leveduriformes em toda a extensão do granuloma, dificultando a distinção de células adjacentes. Reação linfo-plasmocitária escassa.
Intensidade do infiltrado de neutrófilos	Discreto a moderado	Infiltrado de neutrófilos dispersos uniformemente, sem predomínio sobre outros tipos celulares.
	Acentuado	Infiltrado de neutrófilos denso, predominante em relação aos outros tipos celulares, ou formando agregados uniformemente distribuídos.
Intensidade do infiltrado de linfócitos	Discreto a moderado	Infiltrado de linfócitos dispersos uniformemente, sem predomínio sobre outros tipos celulares.
	Acentuado	Infiltrado de linfócitos denso, predominante em relação aos outros tipos celulares, ou formando agregados uniformemente distribuídos.
Intensidade do infiltrado de plasmócitos	Discreto a moderado	Infiltrado de plasmócitos dispersos uniformemente, sem predomínio sobre outros tipos celulares.
	Acentuado	Infiltrado de plasmócitos denso, predominante em relação aos outros tipos celulares, ou formando agregados uniformemente distribuídos.
Células do SMF ativadas no granuloma	Macrófagos	Células grandes, poligonais, com núcleo amplo e excêntrico e o citoplasma pálido, eosinofílico, finamente granular, com bordas distintas.
	Células epitelióides	Células grandes, alongadas, com núcleo reniforme a alongado, excêntrico e citoplasma amplo, pálido e eosinofílico, sem distinção de bordas.
Organização do granuloma/infiltrado granulomatoso	Mal formado	Granuloma mal delimitado e/ou com predomínio de macrófagos.
	Bem formado	Granuloma bem delimitado com predomínio de células epitelióides.
Distribuição do infiltrado granulomatoso	Intersticial	Células do SMF dispersas entre as fibras colágenas.
	Nodular	Infiltrado de células do SMF formando nódulos.
	Difuso	Infiltrado dérmico denso das células do SMF, com destruição ou ocultação das estruturas existentes.

Quadro 1- Termos e definições usados na classificação histopatológica da esporotricose felina. Adaptado de Miranda et al., 2010.

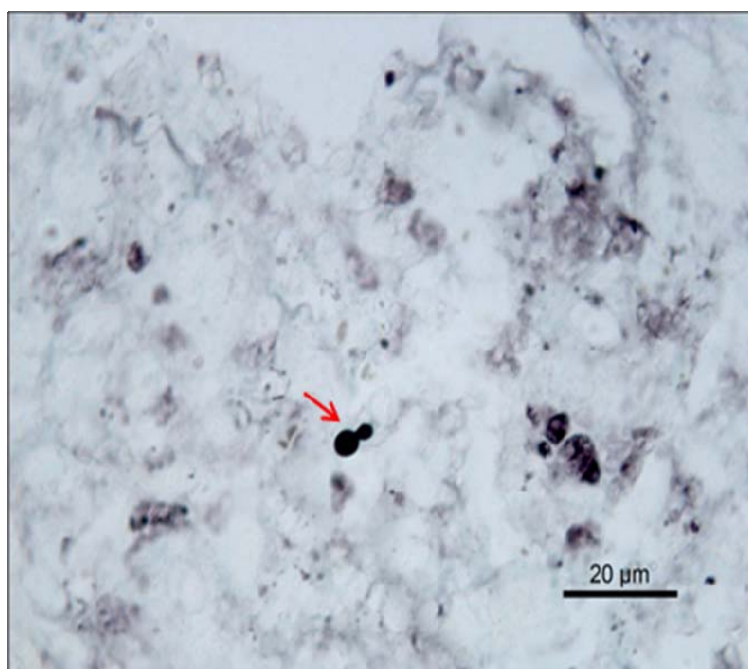


Figura 3: Estrutura leveduriforme exibindo figura de brotamento com base estreita (seta), compatível com *Sporothrix* sp.. Impregnação pela prata de Grocott. Fonte: LAPCLIN-DERMZOO, SAP, IPEC/FIOCRUZ

Classificação	Quantidade de estruturas leveduriformes
1	$\geq 1 < 20$ / campo
2	$> 20 \leq 100$ / campo
3	$> 100 \leq 400$ / campo
4	> 400 / campo

Quadro 2. Escala numérica de classificação da carga de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* sp. visualizadas em cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott (400x).

Nas análises em que foi aplicado o teste exato de Fisher, foram consideradas duas categorias para a carga fúngica: até 100 estruturas leveduriformes/campo e mais do que 100 estruturas leveduriformes/campo.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO SORO POLICLONAL DE COELHO ANTI- *Sporothrix* sp.

A obtenção do antígeno de *Sporothrix* sp. e o protocolo de inoculação de coelhos para produção do soro policlonal foram realizados conforme previamente descritos por Lopes Alves et al. (1994).

Para a padronização da técnica, as primeiras reações foram realizadas apenas em cortes histológicos de controles positivos. Os controles positivos correspondiam a casos de esporotricose felina, confirmados por cultivo micológico e cujos fragmentos de lesões encontravam-se arquivados em blocos de parafina no SAP e apresentavam quantidade moderada ou elevada de leveduras no exame histopatológico. A etapa de padronização foi realizada com base na técnica previamente descrita por Miranda et al. (2011)

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos de 5µm em lâminas silanizadas (Dako - cod S3003, Dako, Carpinteria, CA, EUA). Os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados em álcool. As etapas seguintes da técnica de IHQ foram adaptadas de protocolos descritos em estudos anteriores (Quintella et al., 2009; Santos, 2007b).

A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha) na concentração v/v de 0,4 mL/100mL em metanol (Quimex®, Chicago, IL) durante 40 minutos.

O bloqueio de ligações inespecíficas foi procedido com soro normal de suíno (NCL-S-SERUM, Novo Castra, Newcastle, UK) em albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) 1,5% na concentração de 1:20 durante 20 minutos e, em seguida, com solução de leite em pó (Molico®, Nestlé) na concentração m/v de 0,1 g/mL em BSA (3%) durante 40 minutos.

Os cortes foram incubados em câmara úmida overnight a 4° C com o soro policlonal de coelhos anti-*Sporothrix* sp. em BSA 1,5%. Como controle negativo para reações inespecíficas, cortes histológicos do mesmo caso foram incubados com soro normal de coelho (Normal Rabbit Serum – X0902, Dako, Carpinteria, CA, EUA) na mesma diluição. Primeiramente, foram

realizadas diluições seriadas do soro (1:800, 1:2000, 1:4000 e 1:8000) para verificação da concentração ideal do soro primário.

A seguir, foram procedidas incubações de 25 minutos com anticorpo secundário biotilado universal e com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB⁺ System Kit – K0690, Dako, Carpinteria, CA, EUA). A figura 4 ilustra a reação de IHQ, utilizando a técnica de biotina-estreptavidina-peroxidase.

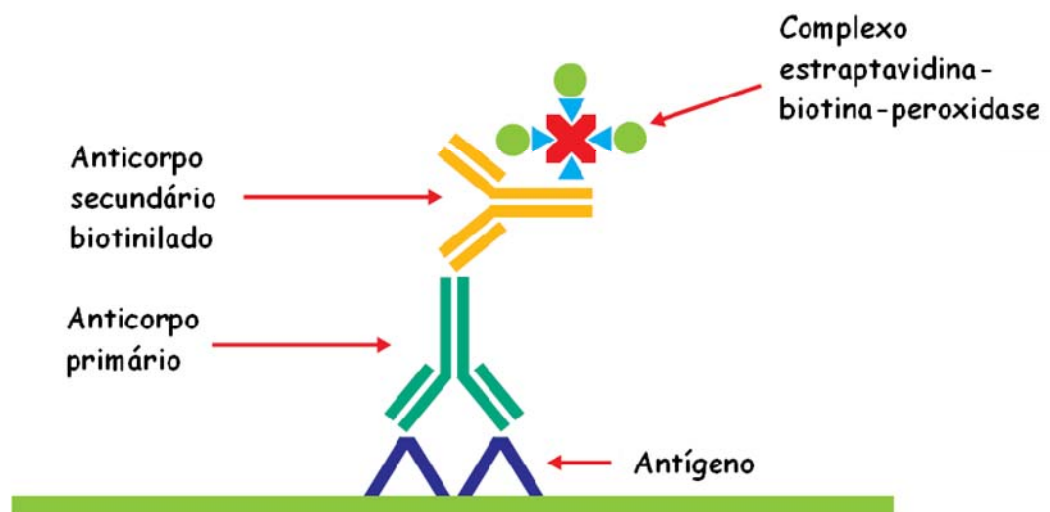


Figura 4: Reação de imuno-histoquímica. Método de estreptavidina-biotina-peroxidase. Fonte: Key, 2006.

Para a revelação, meia pastilha do cromógeno diaminobenzidina e meia pastilha de peróxido de hidrogênio (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foram diluídas em 7,5 mL de água destilada. A revelação foi acompanhada em microscópio óptico e interrompida com água destilada, uma vez que a reação fosse visualizada por meio do controle positivo. Posteriormente, os cortes foram contra-corados em hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha), desidratados em álcool e xilol e montados com lamínula e meio de montagem para visualização em microscópio óptico.

Na análise das lâminas, foi verificada a presença de estruturas leveduriformes e de antígenos intracelulares de *Sporothrix* sp.. Em casos em que foram observadas estruturas leveduriformes, a carga fúngica foi classificada de acordo com a escala numérica previamente definida para a análise dos cortes corados pela técnica de IPG (Quadro 2).

4.5 MARCAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO E ANÁLISE CITOFLUORIMÉTRICA

O sangue com heparina foi transportado, a temperatura ambiente, ao Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz. Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados em cabine de segurança biológica tipo 2 (NB2) (Veeco modelo Clean PlusVLFS 2, São Paulo, Brasil). As amostras foram processadas até 12 horas após a coleta.

Para a padronização da técnica, a marcação das células foi inicialmente realizada de duas formas: com a utilização de sangue total e com a separação do anel monocitário. Para a obtenção do anel monocitário, o sangue foi diluído, na concentração de 1:1, com meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e enriquecido com L-glutamina (0,3g/L) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). A separação do anel monocitário foi realizada utilizando o preparado comercial de “ficoll-hypaque” no gradiente de densidade 1077 (Histopaque®, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). A solução diluída de sangue em meio RPMI foi adicionada vagarosamente a um tubo contendo “ficoll-hypaque” para que fossem formadas duas fases. O tubo foi centrifugado durante 20 minutos, a 2000 rpm e temperatura de 20° C, sem utilização de freio. Após a centrifugação, o anel formado entre a camada de plasma e de ficoll-hypaque, rico em células mononucleares, foi retirado e as células lavadas duas vezes por centrifugação em meio RPMI, por 10 minutos, 2000 rpm e temperatura de 20° C. O sedimento foi ressuspensão em 0,5 mL de PBS-azida (Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). O PBS-azida foi preparado pela diluição de 100 mL de PBS, com adição de 2 mL de soro fetal bovino e 0,001g de azida sódica. A partir deste momento, a manipulação das células foi realizada em banho de gelo. Após a contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de Tripán (Trypan Blue Solution 0,4% - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), fez-se o ajuste em PBS-azida para aproximadamente 5×10^5 células por tubo tipo eppendorff (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA). Para cada animal, foram preparados seis tubos numerados que receberam os anticorpos monoclonais primários (tipo de marcação): anti-CD4 (linfócitos T CD4⁺), anti-CD8 (linfócitos T CD8⁺), anti-CD21 (linfócitos B), anti-CD14 (Monócitos) e anti-

granulócitos (VMRD Inc., Pullman, WA, USA). As alíquotas utilizadas inicialmente neste estudo foram gentilmente cedidas pela Dra. Mary Jo Hamilton, da Universidade do Estado de Washington. Para a padronização da concentração do anticorpo primário, as células foram inicialmente incubadas com as concentrações de 1:50 e 1:100. Os tubos foram incubados durante 20 minutos a 4°C.

Ao final da incubação, as células foram mais uma vez lavadas (PBS-azida) por centrifugação. O sedimento de cada tubo foi incubado em 60 µL de solução 1:500 do anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína - FITC (A10530 –Fluorescein Goat anti-Mouse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em PBS-azida, durante 20 minutos, ao abrigo da luz. Para verificação de possíveis marcações inespecíficas do conjugado secundário ligado ao FITC, para cada animal, foi feito um tubo controle (controle negativo) onde as células foram incubadas apenas com o conjugado secundário ligado à FITC sem adição dos anticorpos primários.

Os tubos foram novamente centrifugados, repetindo o procedimento de lavagem anterior. As suspensões de células foram, então, ressuspensas em 200 µL de paraformoldeído 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e transferidas para os tubos de citometria com numeração correspondente, sendo mantidas a temperatura de 4° C até o momento da análise pelo citômetro de fluxo.

A análise citofluorimétrica foi feita utilizando-se o citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), Bio-Manguinhos- Fiocruz, equipado com um laser de argônio (488nm) e um laser diodo vermelho (635nm).

Os protocolos de aquisição e análise foram realizados utilizando-se os programas CellQuest (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA), respectivamente. As avaliações foram baseadas nos gráficos de tamanho e granulosidade (para determinação das populações alvo e exclusão de debris) e nos gráficos de intensidade de marcação para FITC. A marcação de FITC foi avaliada no canal FL1 com filtro 530/30 capaz de detectar o comprimento de onda de emissão do fluorocromo FITC (emissão máxima 519nm).

Para estipular os perfis característicos de cada tipo celular (linfócitos, monócitos e granulócitos) com base na análise de padrões de tamanho e granulosidade, as amostras foram inicialmente analisadas sem a marcação com anticorpos primários.

A marcação de células e a análise citofluorimétrica foram realizadas nas amostras de sangue dos animais com esporotricose e dos animais do grupo controle.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram armazenados e analisados no programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) para Windows, versão 16.0 (SPSS Inc. 2007, Chicago, IL, USA).

Para análise descritiva dos resultados, foram calculadas as frequências e medidas-resumo das variáveis de interesse em cada grupo estudado.

Os diferentes grupos estudados foram comparados em relação aos resultados obtidos das análises histopatológica, IHQ e citofluorimétrica.

Para verificar se a associação entre as variáveis categóricas foi significativa, foi realizada análise dos dados pelo teste de independência qui-quadrado de Pearson. Para tabelas constituídas pelo cruzamento de variáveis com apenas duas categorias (2x2) em que pelo menos uma das casas apresentou valor inferior a 5, optou-se por uma correção denominada teste exato de Fisher.

No caso de variáveis contínuas, primeiramente, foi verificado se a distribuição dos dados é normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em caso de distribuição normal dos dados, para verificar se houve diferença entre os grupos, foi realizado o teste T. Em caso de distribuição não normal, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

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

5. RESULTADOS

5.1 AMOSTRA

De cento e vinte e sete gatos atendidos no LAPCLIN-DERMZOO, IPEC/FIOCRUZ entre julho de 2009 e maio de 2012, 101 foram incluídos no estudo. Dezesete gatos não foram incluídos por uso prévio de terapia anti-fúngica ou corticosteróide. Quatro gatos foram excluídos pelo não isolamento de *Sporothrix* sp. de suas lesões e cinco foram excluídos devido aos fragmentos de biopsia terem sido considerados não representativos ou superficiais.

Todos os animais incluídos foram submetidos à análise histopatológica. A análise citofluorimétrica foi realizada em 33 animais com esporotricose e em cinco animais sem esporotricose (grupo controle).

Dentre os animais com esporotricose, 20 (19,8%) foram incluídos no grupo L1, 22 (21,8%) no grupo L2 e 59 (58,4%) no grupo L3 (Figura 5A-C). Setenta e dois (71,3%) eram machos e vinte e nove (28,7%) eram fêmeas. Cinquenta e três gatos (52,5%) apresentavam bom estado geral, trinta e dois (31,7%) apresentavam estado geral regular e dezesseis (15,8%), estado geral ruim. Em relação à faixa etária, a maioria dos gatos (n=52; 51,5%) tinham entre dois e cinco anos ($\geq 2 < 5$ anos), seguidos de 28 (27,7%) com menos do que dois anos ($>0 < 2$ anos) e 13 (12,9%) com idade a partir de cinco anos (≥ 5 anos). Em oito animais (adultos), este dado era desconhecido.



Figura 5: Esporotricose felina. Diferentes apresentações clínicas. Animal do grupo L1, com lesão em apenas um local (A); animal do grupo L2, com lesão em dois locais não contíguos (B); e animal do grupo L3, com lesões em três locais não contíguos (C).

O *status* sorológico para FIV e FeLV foi verificado em 99 animais. Quinze animais (15,2%) foram positivos para FeLV e três (3,0%) foram positivos para FIV. Dois (2,0%) animais foram positivos para ambos os testes, sendo um do grupo L2 e um do grupo L3.

A tabela 1 (Apêndice A) apresenta a distribuição de cada variável acima descrita entre os três grupos estudados.

Em relação aos animais do grupo controle, quatro eram machos, uma era fêmea e todos se apresentavam em bom estado geral. Todos os animais eram adultos, mas sua idade era desconhecida.

5.2 PARTE 1 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

5. 2.1 Histopatologia pela coloração de Hematoxilina-Eosina

Noventa e nove (98,0%) casos apresentaram processo inflamatório granulomatoso supurativo e dois (2,0%) apresentaram processo inflamatório inespecífico (N=101). A seguir, são descritas as características observadas em cada perfil.

5.2.1.1 Processo inflamatório granulomatoso supurativo

De noventa e nove casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo, 19 (19,2%) animais foram incluídos no grupo L1, 21 (21,2%) no grupo L2 e 59 (59,6%) no grupo L3. Setenta (70,7%) animais eram machos e vinte e nove (29,3%) eram fêmeas. Dentre os animais incluídos no grupo L3 (n=59), 49 (83,0%) eram machos e 10 (17,0%) eram fêmeas (p-valor=0,02). Em relação ao estado geral, 51 (51,5%) animais apresentavam bom estado geral, 32 (32,3%) apresentavam estado geral regular e 16 (16,2%), estado geral ruim. Todos os animais com estado geral ruim pertenciam ao grupo L3 (p-valor=0,01) e, dentre os animais do grupo L1 (n=19), 15 (78,9%) apresentavam bom estado geral. Quanto à faixa etária, 28 (28,3%) animais tinham menos do que dois anos, 51 (51,5%) tinham entre dois e cinco anos e 12 (12,1%), a partir de cinco anos. Em oito (8,1%) animais, este dado era desconhecido. Os testes sorológicos para FIV e FeLV revelaram quinze animais positivos para FeLV e dois para FIV.

Em relação às características do infiltrado inflamatório, o predomínio de células epitelióides apresentou-se diferentemente entre as faixas etárias (p-valor<0,01), sendo seu percentual de 10,7% nos animais com menos que dois anos de idade (n=28), de 19,6% nos animais de dois a cinco anos (n=51) e de 58,3% nos animais a partir de cinco anos de idade (n=12). Dentre os

animais com menos que dois anos de idade (n=28), um (3,6%) apresentou granulomas bem formados. A figura 6 ilustra um exemplo de granuloma bem formado. Nos animais com idade de dois a cinco anos e a partir de cinco anos, este percentual foi de 11,8% e 25,0%, respectivamente.

De acordo com o estado geral dos animais, houve diferença significativa (p -valor=0,04) em relação a presença de granuloma fúngico (Figura 7): dentre os 51 animais em bom estado geral, 11 (21,7%) apresentavam granulomas fúngicos em suas lesões. Nos animais com estado geral regular (n=32) e ruim (n=16), este percentual foi de 46,9% e 62,5%, respectivamente.

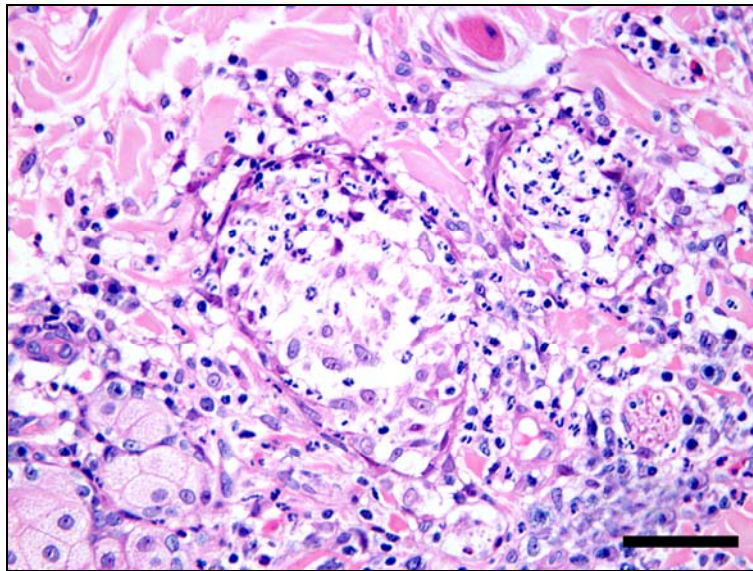


Figura 6. Esporotricose felina. Pele. Granuloma bem formado. Hematoxilina-Eosina. 400x. Barra=50 μ m.

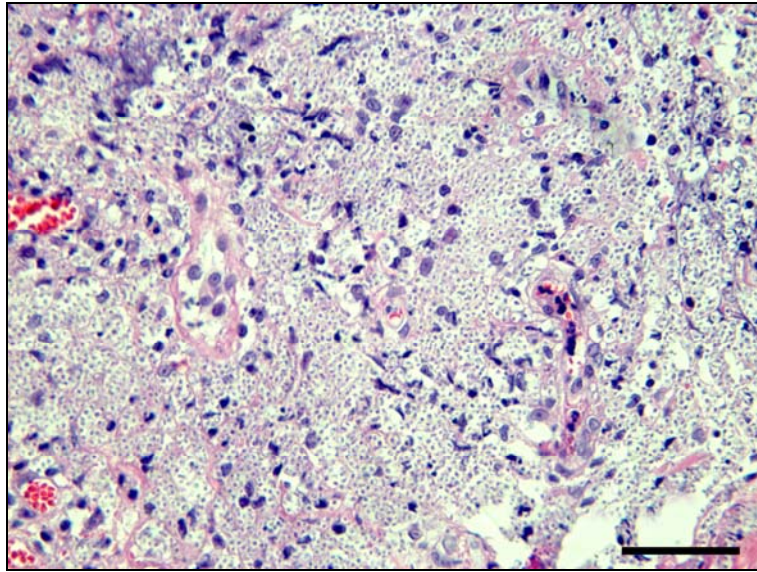


Figura 7. Esporotricose felina. Pele. Granuloma fúngico – agregados compactos de macrófagos repletos de estruturas leveduriformes com pouca reação linfo-plasmocitária e poucos neutrófilos. Hematoxilina-Eosina. 400x. Barra=50µm.

Foi verificada correlação positiva entre o estado geral bom e as intensidades acentuadas de neutrófilos e linfócitos (Figuras 8 e 9, respectivamente), sendo estatisticamente significativa no caso dos linfócitos (p -valor=0,022). A intensidade acentuada de neutrófilos ocorreu em 62 (62,6%) casos, sendo 59,7% observados em animais em bom estado geral, 29,0% em animais com estado geral regular e 11,3% em animais com estado geral ruim. Dentre os animais em bom estado geral ($n=51$), 37 (72,5%) exibiam intensidade acentuada de neutrófilos. Nos animais com estado geral regular ($n=32$) e ruim ($n=16$), este percentual foi de 56,3% e 43,8%, respectivamente. Entre os casos com intensidade acentuada de linfócitos ($n=40$), 26 (65,0%) apresentavam bom estado geral, 12 (30,0%) estado geral regular e 2 (5,0%) estado geral ruim. Nos animais acima de cinco anos ($n=12$), a intensidade acentuada de linfócitos foi observada em 66,7% dos casos. Nos animais de até dois anos e de dois a cinco anos, este percentual foi de 53,3% e 25,5%, respectivamente (p -valor=0,006).

A tabela 2 (Apêndice B) apresenta as frequências dos achados histopatológicos dos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo distribuídas em cada um dos três grupos estudados. No grupo L3, 94,9% dos casos exibiam a presença de granulomas mal formados (Figura 10) e 5,1% a presença de granulomas bem formados (p -valor=0,03). Em relação às células do SMF presentes nos granulomas, o grupo L3 apresentou predomínio de

macrófagos em 86,4% (p-valor=0,01). No grupo L1, a presença de granuloma fúngico foi observada em 5,3% dos casos, enquanto no grupo L3, este percentual foi de 49,2% (p-valor<0,01) (Tabela 2).

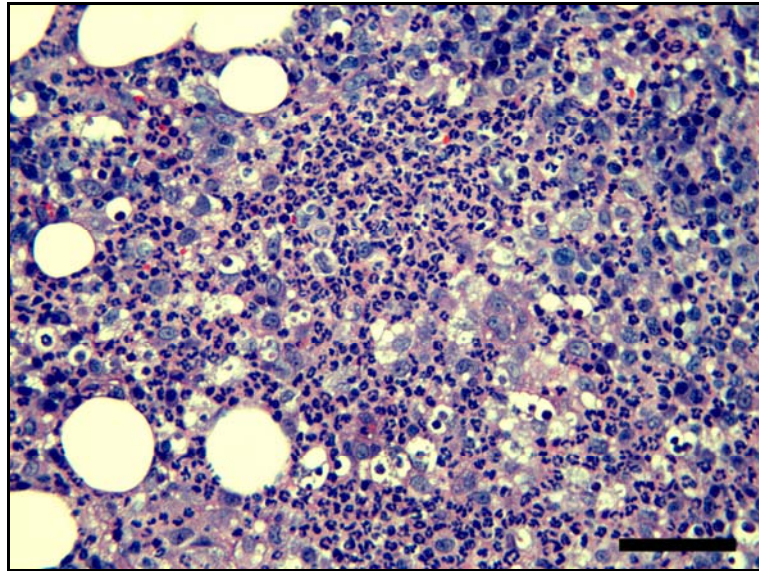


Figura 8. Esporotricose felina. Pele. Numerosos neutrófilos de permeio ao infiltrado granulomatoso. Notar os núcleos segmentados, característica de leucócitos polimorfonucleares (granulócitos). Hematoxilina-Eosina. 400x. Barra=50 μ m.

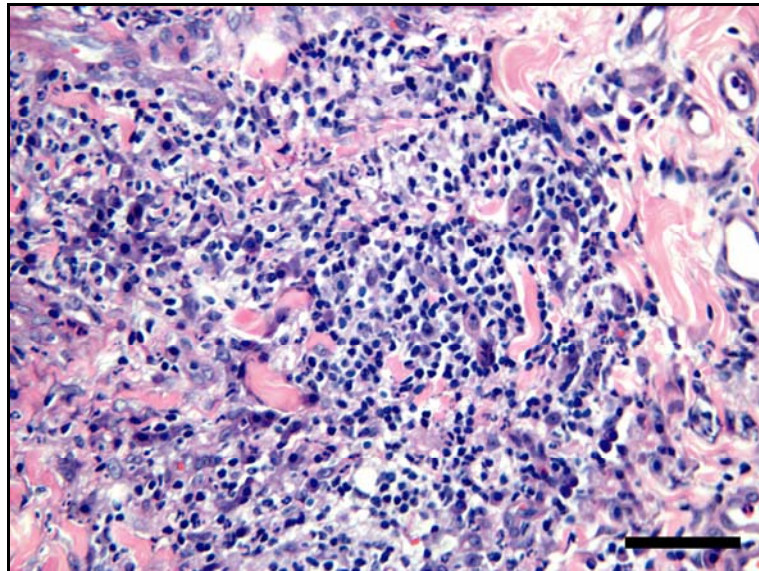


Figura 9. Esporotricose felina. Pele. Denso infiltrado de linfócitos. Notar a presença de numerosas células com citoplasma escasso e núcleos arredondados e hiper cromáticos. Hematoxilina-Eosina. 400x. Barra=50 μ m.

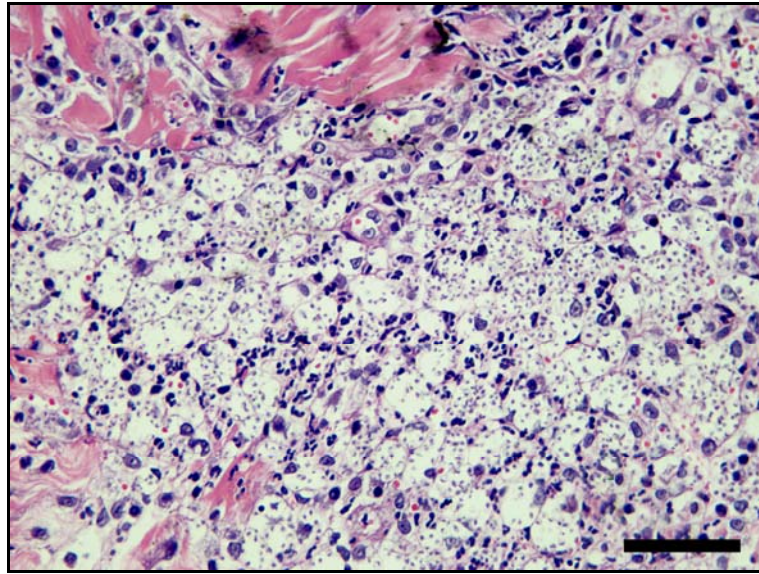


Figura 10. Esporotricose felina. Pele. Granuloma supurativo mal formado fúngico. Notar a presença de agregado compacto e com limites irregulares de macrófagos de citoplasma amplo, repleto de estruturas leveduriformes, associado a ocasionais neutrófilos de permeio. Hematoxilina-Eosina. 400x. Barra=50 μ m.

5.2.1.2 Processo inflamatório inespecífico

Em dois casos não foi observado infiltrado granulomatoso à análise histopatológica, sendo um do grupo L1 e outro do grupo L2. O infiltrado inflamatório inespecífico apresentou-se com distribuição intersticial. Os neutrófilos estiveram em intensidade acentuada nos dois casos. Os linfócitos se apresentaram com intensidade acentuada em um caso e leve a moderada no outro. Os plasmócitos estiveram em intensidade leve a moderada nos dois casos.

Os dois animais eram do sexo masculino, apresentavam bom estado geral, um tinha idade entre 2 e cinco anos e outro acima de cinco anos. Um dos animais era positivo para FIV.

5.2.2 Impregnação pela prata de Grocott

A IPG evidenciou estruturas leveduriformes nos dois casos caracterizados por processo inflamatório inespecífico. Em um deles, a carga fúngica foi de até 100 estruturas leveduriformes/campo e, no outro, mais de 100 estruturas leveduriformes/campo.

Nos demais casos (n=99), caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo, a IPG evidenciou a presença de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* sp. em 93 casos (94,0%), sendo 17 no grupo L1, 18 no grupo L2 e 58 no grupo L3.

A tabela 3 (Apêndice C) ilustra a avaliação da carga fúngica em cada um dos três grupos. Em 48 (48,5%) casos, foram observados mais do que 400 estruturas leveduriformes/ campo de 400x (Figura 11). Em relação aos três grupos estudados, esta carga fúngica foi observada em 26,3% dos casos do grupo L1, 38,1% do grupo L2 e 59,3% do grupo L3, sendo esta diferença significativa, quando comparada aos demais valores de carga fúngica agrupados (p-valor=0,024).

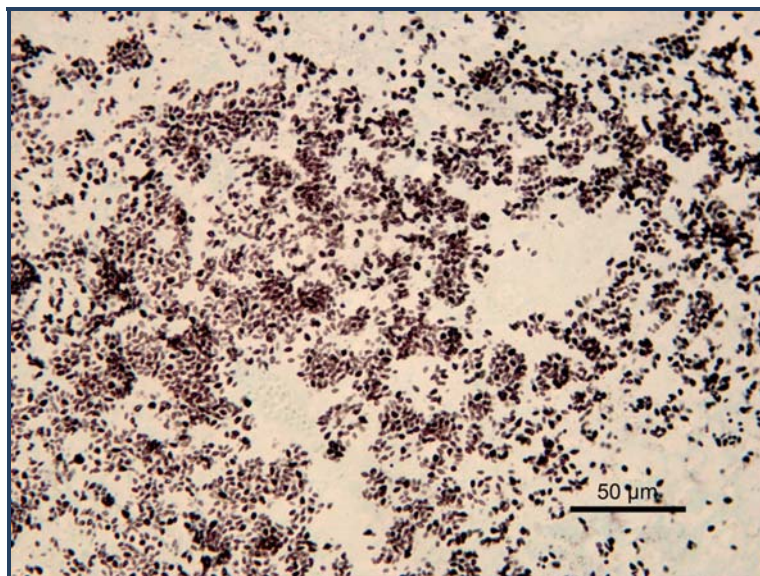


Figura 11. Espotricose felina. Pele. Alta carga fúngica (>400 estruturas leveduriformes/campo). Impregnação pela prata de Grocott. 400x. Barra=50μm.

Dentre os casos positivos para FIV e caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo (n=2), um apresentou carga fúngica de até 20 estruturas leveduriformes/campo de 400x e, no outro, não foram observadas estruturas leveduriformes. Quinze casos foram positivos para FeLV, sendo cinco com carga fúngica de até 20 estruturas leveduriformes/campo e oito com carga fúngica de mais de 400 estruturas leveduriformes/campo. Nos dois casos restantes, não foram observadas estruturas leveduriformes.

A tabela 4 (Apêndice D) apresenta os valores de carga fúngica observados nas variáveis clínico-epidemiológicas, com as quais nenhuma correlação significativa ocorreu.

Na tabela 5 (Apêndice E), descreve-se a carga fúngica encontrada nas diferentes variáveis histopatológicas. Observou-se carga fúngica superior a 100 estruturas leveduriformes/ campo de 400x em 3 (25,0%) dos casos com granulomas bem formados (n=12) e em 56 (64,5%) dos casos com granulomas mal formados (n=87) (p-valor <0,01). A carga fúngica superior a 100 estruturas leveduriformes/campo foi observada em 3 (12,5%) dos casos em que os granulomas apresentavam predomínio de células epitelióides (n=24) e em 53 (70,7%) dos casos com granulomas com predomínio de macrófagos (n=75) (p-valor <0,01). Dentre os casos apresentados intensidade leve a moderada de neutrófilos (n=37), 29,7% exibiam carga fúngica de até 100 estruturas leveduriformes/campo e 64,7% carga fúngica de mais de 100 estruturas leveduriformes/campo. Dentre os casos com intensidade acentuada (n=62), 6,5% não apresentavam estruturas leveduriformes, 41,9% exibiam carga fúngica de até 100 estruturas leveduriformes/campo e 51,6% carga fúngica maior do que 100 estruturas leveduriformes/campo (Tabela 5).

5.2.3 Imuno-histoquímica utilizando soro policlonal de coelho anti- *Sporothrix* sp.

5.2.3.1 Padronização da técnica

A utilização do soro em concentrações maiores (1:800 e 1:2000) demonstrou maior quantidade de marcação inespecífica nas reações em que foi utilizada. Na concentração de 1:8000, as estruturas fúngicas se apresentaram fracamente marcadas.

A concentração de 1:4000 foi considerada ideal para a utilização nas reações subsequentes, uma vez que permitiu a detecção das estruturas fúngicas com menor quantidade de marcação inespecífica.

5.2.3.2 Estudo de casos

Dos 101 casos estudados, a IHQ foi realizada em 100, sendo possível a detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* sp. (Figura 12 e 13) em 94 (94,0%) casos e a detecção de antígenos intracelulares (Figura 14) em 82 (82,0%) casos. Todos os casos onde foram observados antígenos intracelulares apresentavam também estruturas leveduriformes.

A concordância entre os resultados da técnica de IPG e da IHQ foi observada em 92 casos (91,1%), sendo 90 positivos e 2 negativos. Em associação, as duas técnicas apresentaram sensibilidade de 98,0%. Quatro casos foram positivos na IHQ e negativos na IPG e cinco casos foram positivos na IPG e negativos na IHQ. Todos os casos em que houve discordância foram classificados, onde positivos, com a carga fúngica de $>1 \leq 20$ estruturas leveduriformes/campo de 400x.

A tabela 6 (Apêndice F) apresenta os valores de carga fúngica para as duas técnicas nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo.

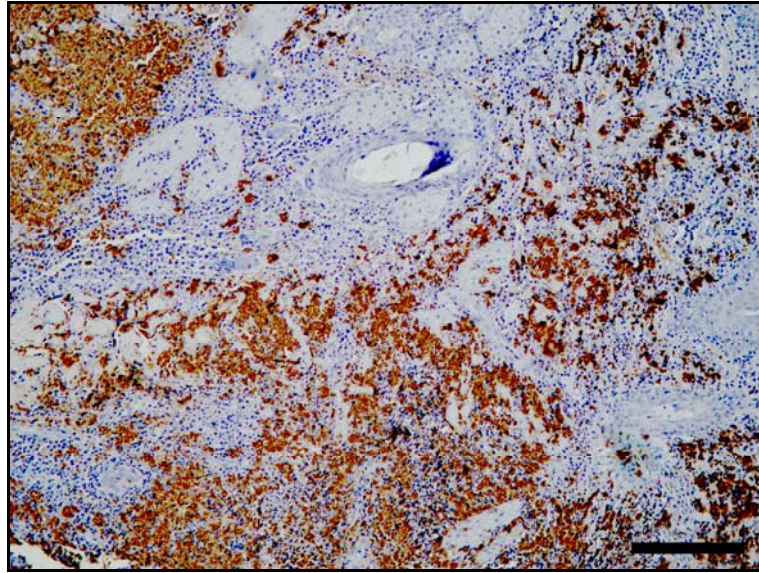


Figura 12. Esporotricose felina. Pele. Numerosas estruturas leveduriformes (>400 estruturas leveduriformes/campo), marcadas em castanho. Imuno-histoquímica anti-*Sporothrix* sp.. 400x. Barra=200µm.

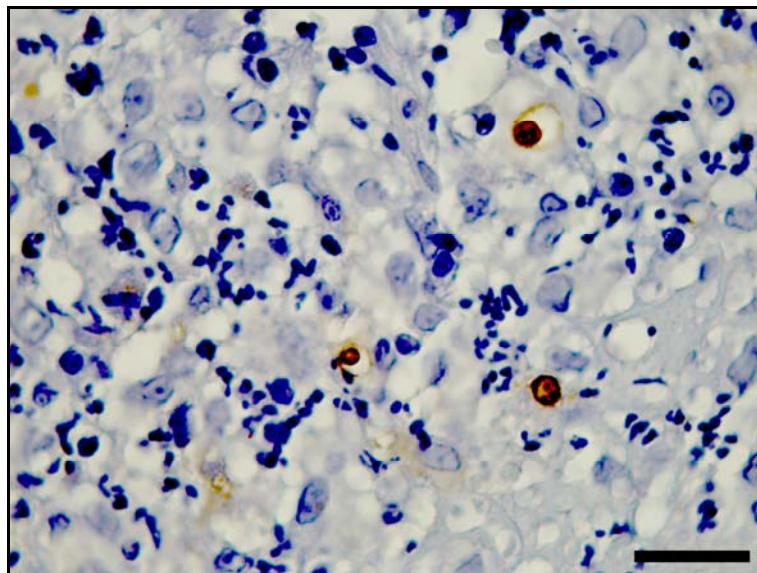


Figura 13. Esporotricose felina. Pele. Poucas estruturas leveduriformes arredondadas, marcadas em castanho. Imuno-histoquímica anti- *Sporothrix* sp.. 1000x. Barra=20µm.

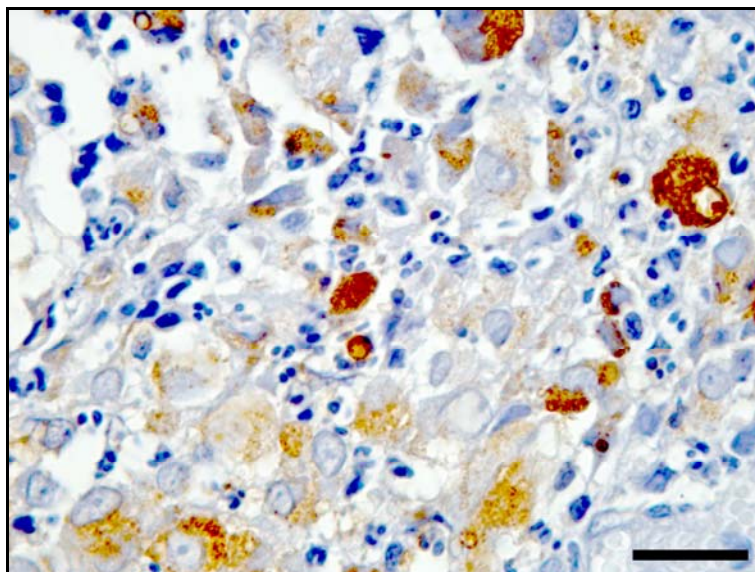


Figura 14. Esporotricose felina. Pele. Antígenos de *Sporothrix* sp., marcado em castanho no citoplasma de macrófagos. Imuno-histoquímica anti- *Sporothrix* sp. 1000x. Barra=20 μ m.

5. 3 PARTE 2 – ANÁLISE CITOFUORIMÉTRICA

5.3.1 Padronização da técnica

A realização da marcação de células com a utilização do sangue total revelou, na análise pelo citômetro, grande quantidade de marcação inespecífica e pouca conservação das células, com presença de grande quantidade de debris celulares. Desta forma, a separação do anel monocitário pela utilização do gradiente “ficoll-hypaque” foi considerada a técnica mais adequada para as

marcações subsequentes. A técnica utilizada permitiu também a obtenção de granulócitos das amostras de sangue periférico de felinos neste estudo.

De acordo com os perfis característicos da cada população no gráfico de tamanho e granulosidade, foram estipuladas as seguintes regiões (janelas): para as marcações de linfócitos e monócitos, foi feita uma região na população de células mononucleares (Figura 15A) e, para marcação de granulócitos, foi feita uma região maior compreendendo todas as populações (linfócitos, monócitos e granulócitos) (Figura 15B). Em todas as avaliações, foram adquiridos pelo menos 5000 eventos em cada região acima, excluindo-se, desta forma, os restos celulares e células mortas. As regiões definidas acima foram mantidas em todas as amostras avaliadas.

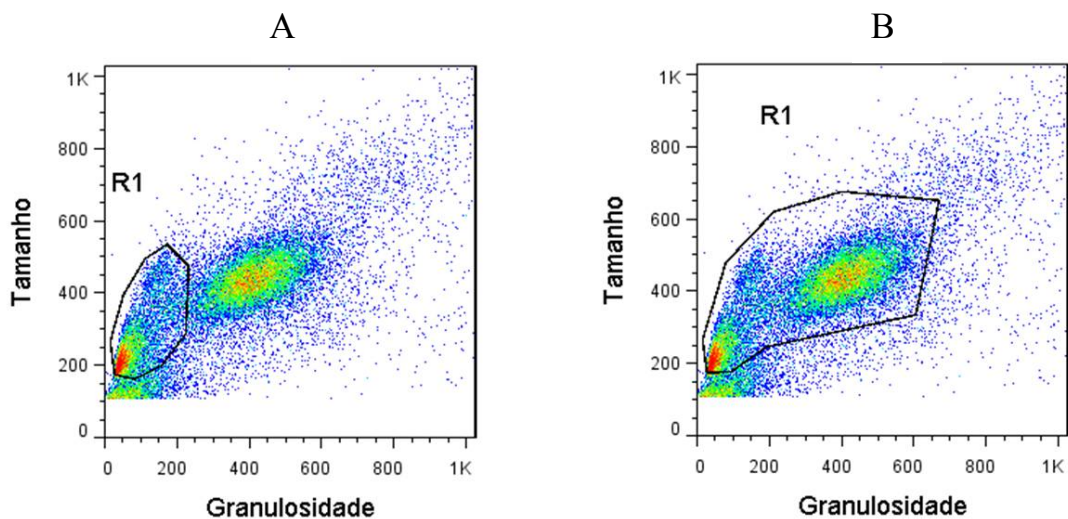


Figura 15: Análise representativa dos parâmetros de granulosidade (eixo X) versus tamanho (eixo Y) das amostras para delimitação das regiões de análise das populações de células mononucleares (A, R1) e granulócitos (B, R1).

Os resultados foram expressos pelo percentual de marcação encontrado nos histogramas de FITC (gráficos de FITC X número de células) dentro de cada região descrita acima (Figura 16). Para o anticorpo anti-CD8, foram avaliados dois tipos de marcação, para distinção de células com a expressão $CD8^{low}$ e de células com expressão $CD8^{high}$ (Figura 17).

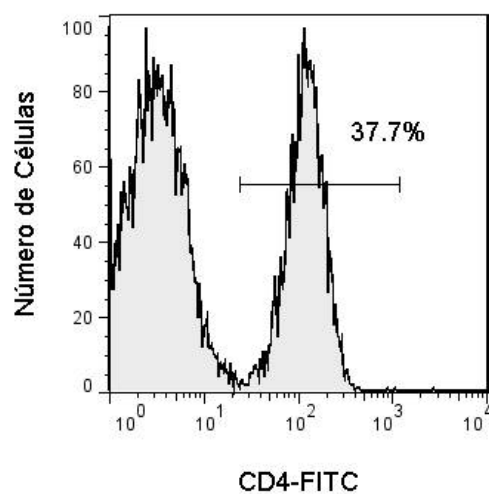


Figura 16: Histograma representativo de marcação de CD4 na região de células mononucleares. O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y o número de células. O cursor representa o percentual de células positivas para FITC (37,7% de células CD4⁺).

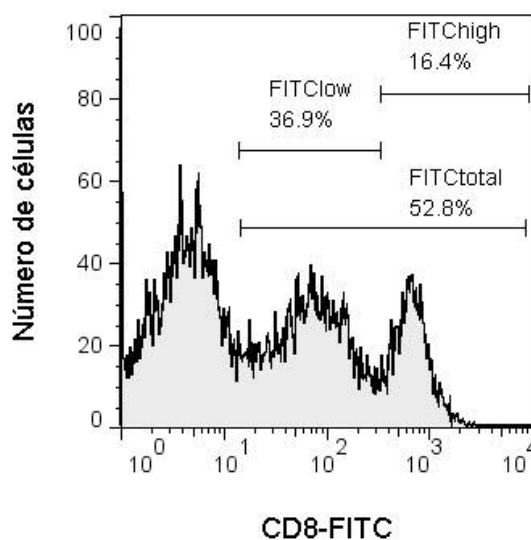


Figura 17. Histograma representativo de marcação de CD8 na região de células mononucleares. O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y o número de células. Os cursores de células positivas para FITC estão representados por FITCtotal (células CD8⁺), FITClow (células expressando CD8_{low}) e FITChigh (células expressando CD8_{High}).

Em relação à concentração do anticorpo primário, a concentração de 1:100 foi considerada adequada, uma vez que permitiu a marcação de células-alvo com ausência de marcação inespecífica. A concentração de 1:50 apresentou uma boa marcação das células alvo mas associada à marcação inespecífica..

5.3.2 Estudo de casos

A análise citofluorimétrica foi realizada em 33 animais com esporotricose e em cinco animais saudáveis. Dentre os animais com esporotricose, oito eram do grupo L1, dez do grupo L2 e quinze do grupo L3. Em um caso do grupo L3 e um caso do grupo controle, não foi realizada a marcação com o anticorpo anti-granulócitos. A figura 18 ilustra o padrão de expressão de cada anticorpo utilizado.

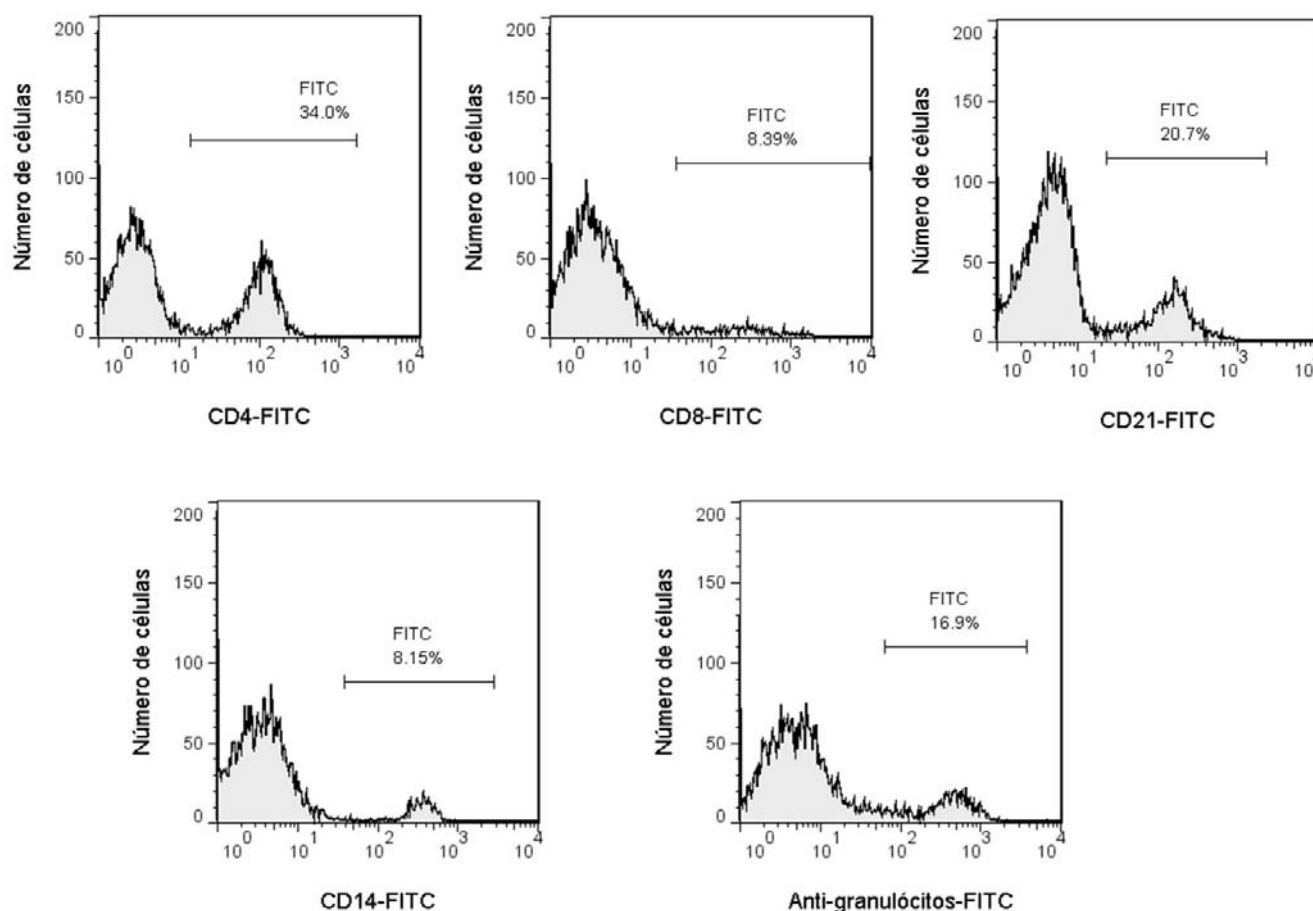


Figura 18. Percentuais de leucócitos no sangue periférico de gatos. Histogramas representativos de marcação de células CD4⁺, CD8⁺, linfócitos B e monócitos na região de células mononucleares e de granulócitos na região compreendendo todas as populações. O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y o número de células. O cursor FITC representa o percentual de células positivas para cada marcador.

A tabela 7 (Apêndice G) apresenta os resultados da análise citofluorimétrica. Os percentuais de linfócitos CD8⁺ e de monócitos foram maiores nos animais com esporotricose (p-valor=0,01 e p-valor=0,04, respectivamente) e o percentual de linfócitos B foi maior nos animais do grupo controle.

Na tabela 8 (Apêndice H), observam-se as medianas para cada anticorpo utilizado em cada um dos três grupos de animais com esporotricose e no grupo controle. Quando comparando os três grupos e o grupo controle, houve diferença significativa nos percentuais de células CD4⁺ (p-valor=0,04), CD8⁺ (p-valor=0,04) e monócitos (p-valor=0,02). De acordo com o teste de Mann-Whitney, o percentual de células CD8⁺ foi inferior nos animais do grupo controle, sendo esta

diferença significativa quando comparados aos grupos L2 e L3 (p-valor=0,01 e p-valor=0,01, respectivamente). O percentual de células CD4⁺ foi superior nos animais do grupo L1 quando comparado ao grupo controle (p-valor=0,01), ao grupo L2 (p-valor=0,03) e ao grupo L3 (p-valor=0,02). O percentual de monócitos também foi inferior no grupo controle, com diferença significativa em relação ao grupo L3 (p-valor=0,03). A inversão da relação CD4/CD8 foi observada em 17 animais, sendo um animal do grupo L1 (N=8; 12,5%), seis do grupo L2 (N=10; 60,0%) e 9 do grupo L3 (N=15, 60,0%) (p-valor=0,07). Nenhum animal do grupo controle apresentou inversão da taxa CD4/CD8. Esta inversão foi observada nas medianas dos percentuais dos grupos L2 e L3. O gráfico 1 compara os grupos de animais com esporotricose e o grupo controle, em relação ao percentual de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e monócitos.

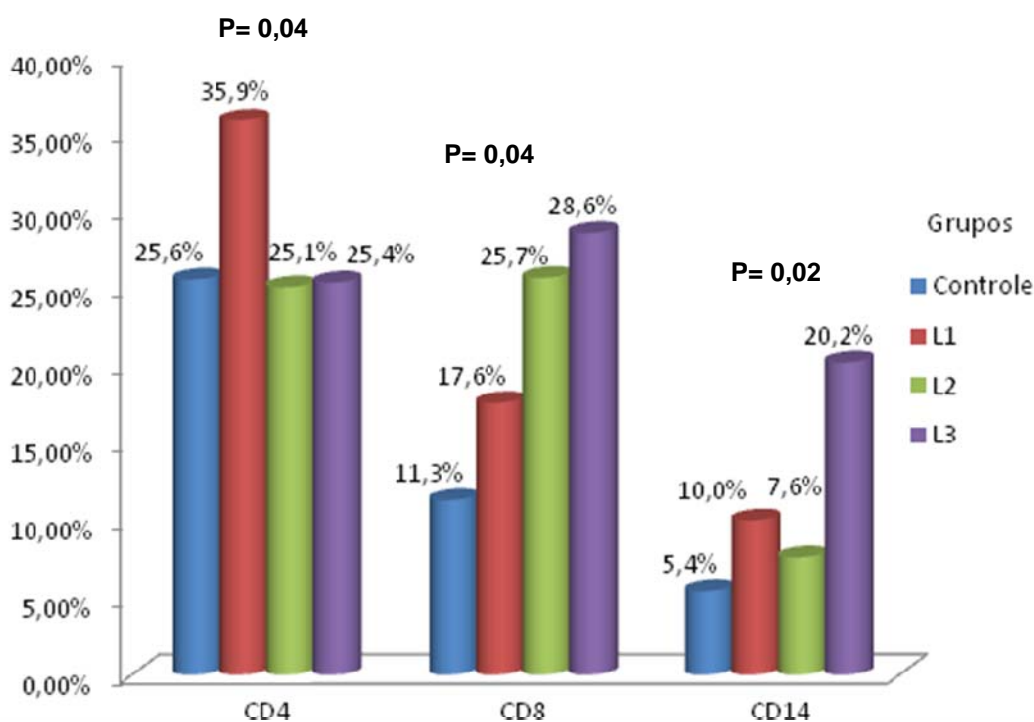


Gráfico 1. Mediana dos percentuais dos marcadores CD4, CD8 e monócitos no sangue periférico de gatos com esporotricose em diferentes apresentações clínicas, em comparação com o grupo controle. L1: Animais com lesões em um local; L2: Animais com lesões em dois locais; L3: Animais com lesões em três ou mais locais. *P-valor<0,05. Teste de Kruskal-Wallis.

A expressão CD8^{low} foi observada em 20 animais com esporotricose, sendo dois do grupo L1 (N=8, 25,0%), cinco do grupo L2 (N=10, 50%) e treze do grupo L3 (N=15, 86,7%) (p-

valor=0,01). Esta expressão não foi observada nos animais do grupo controle. A figura 19 ilustra as diferentes expressões do marcador CD8.

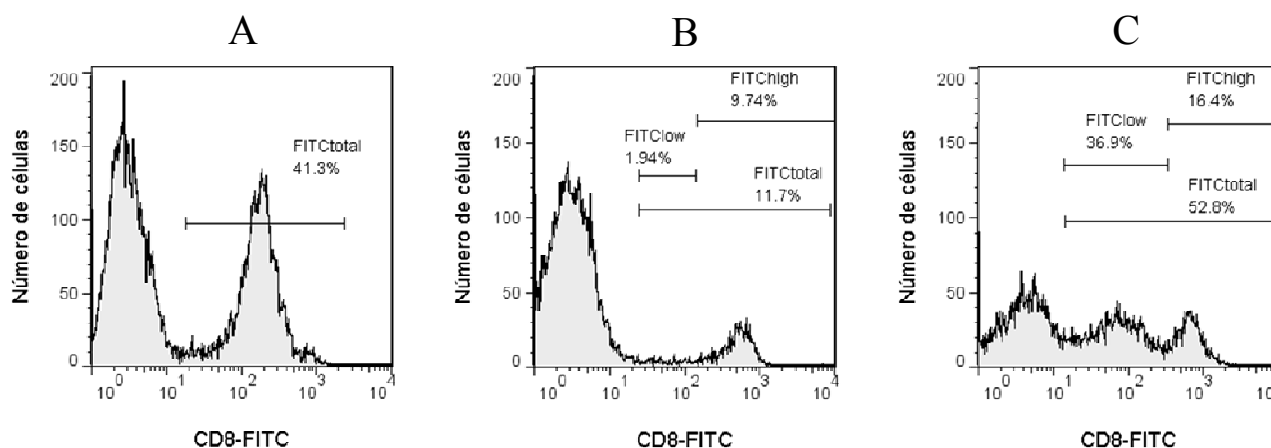


Figura 19. Histograma representativo de marcação de CD8 na região de células mononucleares, com variação das expressões de $CD8^{low}$ e $CD8^{high}$: Ausência de expressão $CD8^{low}$ (A), baixa expressão $CD8^{low}$ (B) e alta expressão $CD8^{low}$ (C). O eixo X representa a intensidade de marcação para FITC e o eixo Y número de células. Os cursores de células positivas para FITC estão representados por FITCtotal (células $CD8^+$), FITClow (células expressando $CD8^{low}$) e FITChigh (células expressando $CD8^{High}$).

A tabela 9 (Apêndice I) apresenta a mediana de cada anticorpo segundo as variáveis estado geral, idade e sexo nos animais com esporotricose. Em relação ao estado geral, a mediana dos percentuais de células $CD4^+$ foi maior nos animais em bom estado geral, sendo a diferença significativa quando comparada aos animais em estado geral ruim (p-valor=0,03), de acordo com o teste de Mann-Whitney. O gráfico 2 compara o estado geral dos animais estudados, segundo o percentual de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue periférico de gatos com esporotricose. O percentual de linfócitos B foi maior nos animais em estado geral ruim, sendo a diferença significativa em relação aos animais em estado geral regular (p-valor=0,028). Não foram observadas diferenças significativas entre o sexo e as diferentes faixas etárias estudadas, em relação aos marcadores celulares utilizados.

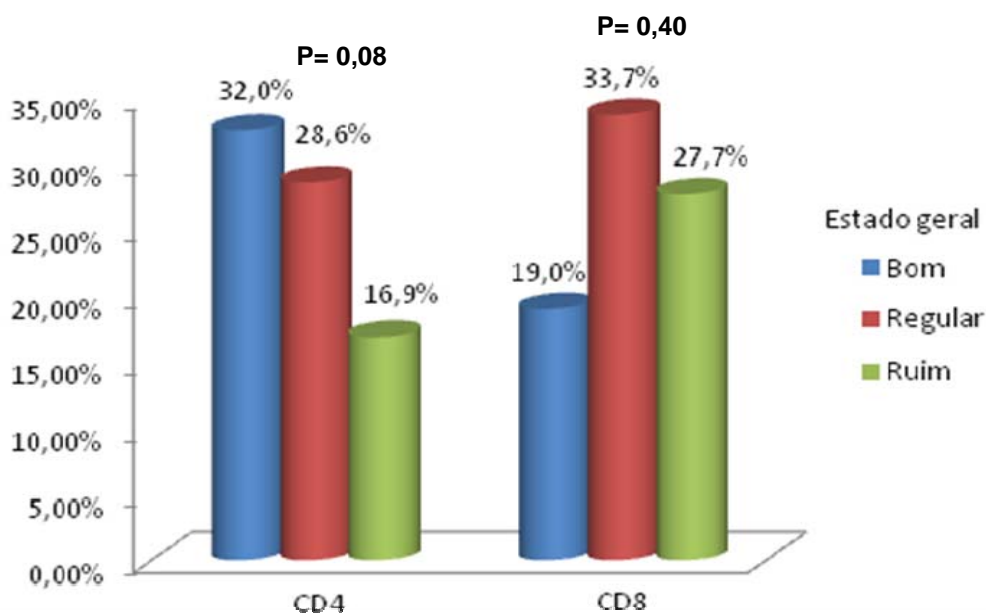


Gráfico 2. Mediana dos percentuais dos marcadores CD4 e CD8 no sangue periférico de gatos com esporotricose de acordo com seu estado geral. P-valor<0,05. Teste de Kruskal-Wallis.

Dentre os 33 casos em que foi realizada a análise citofluorimétrica, o *status* sorológico para FIV e FeLV foi verificado em 32. Nenhum destes animais apresentou teste sorológico positivo para FIV e quatro obtiveram teste positivo para FeLV. Nos animais com sorologia positiva para FeLV, houve menor percentual também de células CD4⁺ e maior percentual de linfócitos B. Todos os animais do grupo controle foram negativos para os dois testes. A tabela 10 (Apêndice J) apresenta as medianas de células positivas para cada marcador em relação a pesquisa de antígenos de FeLV.

Em relação à análise histopatológica, todos os casos avaliados por CF foram caracterizados por processo granulomatoso supurativo. No gráfico 3, destacam-se os percentuais de linfócitos CD8^{low} no sangue periférico de gatos com esporotricose, de acordo com dados histopatológicos e de carga fúngica. As tabelas 11, 12 e 13 (Apêndices L, M e N, respectivamente) apresentam as medianas de células positivas para cada marcador em relação à análise histológica.

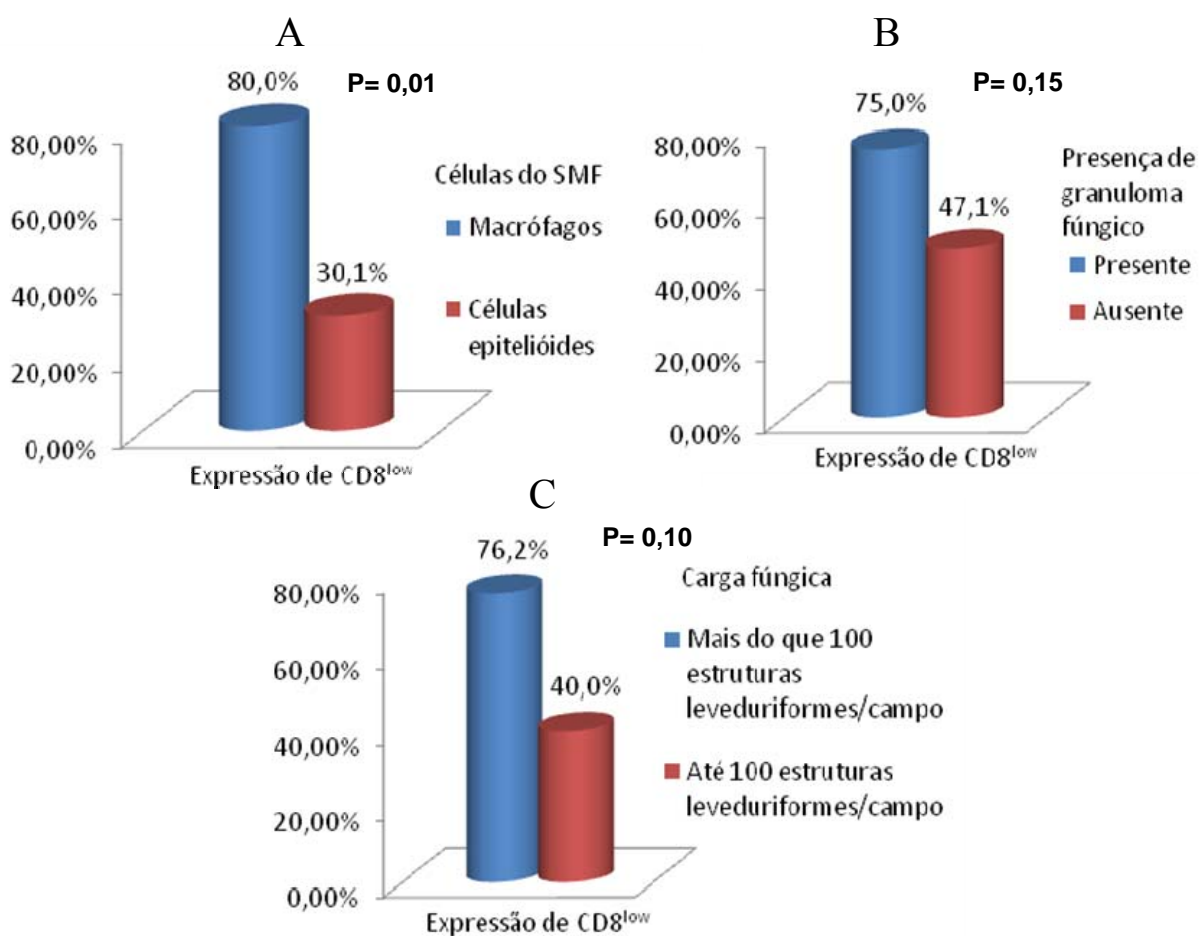


Gráfico 3. Presença da subpopulação CD8^{low} no sangue periférico de gatos com esporotricose, de acordo com as células do Sistema Mononuclear Fagocitário predominantes no granuloma (A); com a presença de granuloma fúngico (B) e com a carga fúngica (C). P-valor < 0,05. Teste Exato de Fischer.

6. DISCUSSÃO

A esporotricose felina comumente se manifesta com lesões cutâneas múltiplas, levando, muitas vezes, a ocorrência de sinais de comprometimento sistêmico (Barros et al., 2001; Schubach et al. 2003b; Schubach et al., 2004a), nos quais as lesões cutâneas tendem a disseminar-se a partir do local de inoculação primária (Dunstan et al., 1986).

No presente estudo, houve um predomínio de animais apresentando lesões em três ou mais locais. Em estudos anteriores com gatos com esporotricose no Rio de Janeiro (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010), a diferença percentual entre os três grupos foi menor, sendo o menor percentual de animais verificado no grupo L2. Embora a apresentação clínica com lesões em vários locais tenha sido predominante neste estudo, a maioria dos animais (52,5%) apresentava bom estado geral. Esta observação também foi descrita por Schubach et al. (2003b) e Pereira et al. (2010). Nenhum dos animais incluídos no grupo L1 e L2 apresentavam estado geral ruim neste estudo. Contudo, ressalta-se que o acometimento sistêmico de gatos infectados por *Sporothrix* sp. sem a presença sinais clínicos é frequente (Schubach et al., 2003b).

As características microscópicas de lesões cutâneas de esporotricose em gatos ainda são pouco descritas e, geralmente, trazem relatos de casos isolados (Gonzalez Cabo et al., 1989; Marques et al., 1993; Nakamura et al., 1996) ou breves descrições em análises mais abrangentes (Dunstan et al., 1986; Schubach et al., 2002, 2004a). No presente estudo, foi realizada uma análise histopatológica sistemática e detalhada de lesões de esporotricose de um grande número de gatos, com base no previamente descrito para esporotricose humana (Quintella et al., 2011, 2012) e canina (Miranda et al., 2009).

As lesões de esporotricose felina observadas neste estudo foram predominantemente granulomatosas supurativas, sendo, na maioria dos casos, caracterizadas pela presença de granulomas mal formados. Outros autores também descreveram lesões de esporotricose felina caracterizadas por granulomas supurativos (Dunstan et al., 1986; Gonzalez Cabo et al., 1989). Em estudos anteriores realizados no Rio de Janeiro, a presença de granulomas não foi frequente nas lesões de esporotricose felina estudadas (Schubach et al., 2002; Schubach et al., 2004a). Em

2004 (Schubach et al., 2004a), 90 lesões foram analisadas, com a formação de granulomas descrita em apenas 11 (12,2%). Esses resultados apresentam-se antagônicos em relação aos aqui descritos, embora ambos os estudos tenham sido realizados em momentos diferentes da mesma epidemia. É possível que a diferença entre as frequências de granulomas possa ser atribuída a diferentes critérios para a definição de granuloma. Desta forma, é importante que os critérios utilizados dentro de cada metodologia sejam bem estabelecidos.

Na esporotricose humana, na análise microscópica das lesões, descreve-se geralmente a presença de processo inflamatório granulomatoso supurativo (De Beurmann & Gougerot, 1907; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Quintella et al., 2011). Estes granulomas podem se apresentar com uma zona central supurativa, uma zona intermediária de células do SMF ativadas e uma zona externa linfo-plasmocitária, sendo referidos por alguns autores como granulomas esporotricóticos (De Beurmann & Gougerot, 1907; Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963). Em cães, as lesões de esporotricose também são caracterizadas por processo inflamatório granulomatoso supurativo e o infiltrado de plasmócitos ao redor dos granulomas encontra-se presente na maioria dos casos (Miranda et al., 2009).

Semelhante ao descrito no presente estudo, na esporotricose canina, os granulomas observados foram predominantemente mal formados (Miranda et al., 2009). Quintella et al. (2011), em estudo histopatológico da esporotricose humana no Rio de Janeiro, também descreveram maior frequência de granulomas mal formados em 119 lesões estudadas. Quintella et al. (2011) e Miranda et al. (2009) observaram granulomas bem formados em 37,8% e 38,2% dos casos de esporotricose humana e canina, respectivamente, valores superiores aos descritos neste estudo (12,1%). Adicionalmente, em cães e seres humanos, na maioria dos casos estudados, os granulomas mal formados exibem predomínio de células epitelióides (Miranda et al., 2009; Quintella et al., 2011). Entretanto, nas lesões de esporotricose descritas no presente estudo, os granulomas mal formados foram observados com predomínio de macrófagos na maioria dos casos. A presença de células gigantes multinucleadas, considerada comum por muitos autores no granuloma da esporotricose humana (Moore & Ackerman, 1946; Lurie, 1963; Quintella et al., 2012), não se mostrou frequente na esporotricose canina (Miranda et al., 2009) e não foi observada nas lesões analisadas neste estudo.

No presente estudo, os granulomas constituídos por macrófagos repletos de estruturas leveduriformes e associados a pouca reação inflamatória adjacente foram denominados granulomas fúngicos. Estes granulomas foram observados em um grande número de casos aqui descritos. Marques et al. (1993) descreveram achados semelhantes para a esporotricose felina:

infiltrado granulomatoso composto basicamente por macrófagos, repletos de estruturas fúngicas, e mínima reação linfo-plasmocitária. A pouca reação inflamatória, a ausência de células epitelióides e a presença de numerosas leveduras íntegras no interior de macrófagos nesses granulomas pode estar associada a não ativação de linfócitos e macrófagos, necessária para o desencadeamento da resposta imune celular eficiente.

De acordo com trabalhos experimentais em camundongos, nas lesões de esporotricose, a chegada de células do SMF, sua ativação e posterior diferenciação em células epitelióides, acompanha a redução da carga fúngica e o aumento das quantidades de linfócitos e de plasmócitos (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Pen-Cheng et al., 1993). Desta forma, o predomínio de macrófagos nos granulomas de lesões de esporotricose felina e a escassez de reação linfo-plasmocitária podem ser um dos reflexos da suscetibilidade destes animais à doença e estar relacionado à alta carga fúngica observada na maioria dos casos estudados, uma vez que a ativação de macrófagos e a diferenciação epitelióide parecem ter importante papel na resposta ao fungo (Miyaji & Nishimura, 1982; Dickerson et al., 1983; Shiraishi et al., 1992).

A presença de granulomas bem formados e de granulomas com células epitelióides em animais com idade a partir de cinco anos foi significativa. Também foi observada relação entre a intensidade de linfócitos e a faixa etária, sendo a intensidade acentuada predominante em animais acima de cinco anos. A presença de granulomas mal formados foi associada a animais do grupo L3 e a intensidade elevada de linfócitos associada a animais em bom estado geral. Em conjunto, estes achados sugerem que os animais com idade a partir de cinco anos podem apresentar-se menos suscetíveis a doença em relação aos animais de outras faixas etárias. Heaton et al. (2002) e Campbell et al. (2004) descreveram redução de linfócitos associada ao aumento da idade. Heaton et al. (2002) atribuíram esta redução à subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e observaram que o percentual de linfócitos T CD8⁺ elevou-se com o aumento da idade. O aumento do percentual de células CD8⁺ pode estar associado ao maior número de células de memória nos animais mais velhos (Heaton et al., 2002). Em relação aos monócitos, a atividade de citocinas pró-inflamatórias parece elevada nos gatos mais jovens e nos mais velhos, com redução nos gatos com meia-idade. A citocina IL-10 apresenta-se reduzida nos animais mais velhos (Kipar et al., 2005). Neste contexto, Kipar et al. (2005) sugerem a ocorrência em gatos de um estado pró-inflamatório crescente em monócitos com a idade, paralelo a redução da produção de IL-10. Segundo Heaton et al. (2002), a imunidade inata também não se mostra alterada em animais mais velhos e, em alguns casos, seus parâmetros mostram-se mais elevados nestes animais. É possível que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias por

monócitos, com redução do percentual de IL-10 e a presença de resposta inata eficiente possam contribuir para a menor suscetibilidade de gatos acima de cinco anos a esporotricose. Contudo, existem poucos estudos acerca das mudanças na resposta imune associadas à idade em felinos e a utilização de faixas etárias diferentes por diferentes autores dificulta a comparação entre os resultados.

Assim como os linfócitos, os neutrófilos, em intensidade acentuada, também predominaram em animais em bom estado geral. Na esporotricose humana, a maior concentração de neutrófilos em lesões está associada a pacientes com maior número de lesões e maior tempo de tratamento (Morgado et al., 2011). A carga fúngica também é diretamente associada a intensidade de neutrófilos na esporotricose humana (Quintella et al., 2011; Morgado et al., 2011) e experimental (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Pen-Cheng et al., 1993). Contudo, no presente estudo, observou-se grande número de casos com carga fúngica elevada e intensidade de neutrófilos leve a moderada, sugerindo papel dos neutrófilos no controle da carga fúngica. Observações semelhantes foram descritas por Hachisuka & Sasai (1981) em estudo experimental, onde camundongos imunossuprimidos exibiam lesões ricas em fungo e com escassez de neutrófilos e linfócitos. Kajiwara et al. (2004) também atribuíram aos neutrófilos participação na resposta ao fungo em camundongos. Estes resultados, aparentemente conflitantes, podem estar refletindo momentos diferentes da reação inflamatória: nos animais imunocompetentes, um maior influxo de células inflamatórias como resposta a uma alta carga fúngica. Nos imunossuprimidos, a maior concentração de elementos fúngicos pode aumentar ao longo da evolução da doença, devido à deficiência de resposta de controle com consequente diminuição do afluxo de células inflamatórias. Para verificar estas hipóteses, estudos experimentais de seguimento longitudinal da infecção devem ser realizados em modelos animais.

A detecção de *Sporothrix* sp. em cortes histológicos é difícil na esporotricose humana e canina devido à escassez de estruturas leveduriformes em suas lesões (Moraes & Miranda, 1964; Schwarz, 1982; Barros et al., 2005; Schubach et al., 2006; Santos et al., 2007a; Quintella et al., 2011) e as técnicas especiais de coloração, como a IPG, frequentemente não evidenciam estruturas fúngicas. Contudo, conforme mencionado, as lesões de esporotricose em gatos geralmente exibem grande quantidade de estruturas leveduriformes (Dunstan et al., 1986; Gonzalez Cabo et al., 1989). No presente estudo, a detecção de fungos foi possível em 95 (94,1%, n=101) casos com a utilização da técnica de IPG e em 94 casos com a IHQ (94,0%, n=100). Ao contrário do descrito para a esporotricose humana e canina (Marques et al., 1992; Miranda et al., 2011), não houve diferença estatística entre as sensibilidades das duas técnicas

para a detecção de estruturas leveduriformes em lesões de esporotricose felina, o que provavelmente se deve a alta carga fúngica destas lesões.

O encontro de corpos asteroides de *Sporothrix* sp. é considerado comum por alguns autores (Moore & Ackerman, 1946; Pinkus & Grekin, 1950; Lurie, 1963; Moraes & Miranda, 1964). No presente estudo, assim como em estudos prévios realizados no Rio de Janeiro em seres humanos (Quintella et al., 2011, 2012) e cães (Schubach et al., 2004a; Miranda et al., 2009), esta estrutura não foi observada. Segundo Pinkus & Grekin (1942), devido às dimensões do corpo asteroide, é improvável que passe despercebida às análises, mesmo na coloração pela HE.

Neste estudo, o maior percentual de casos positivos foi observado em lesões de animais do grupo L3. No grupo L3, observou-se ainda maior percentual de casos com carga fúngica de mais de 400 estruturas leveduriformes por campo (400x), indicando relação entre a carga fúngica e a apresentação clínica do animal. Dentre animais em estado geral ruim, 81,3% apresentaram carga fúngica maior do que 100 estruturas leveduriformes/campo. A menor carga fúngica se apresentou associada a presença de granulomas com predomínio de células epitelióides e bem formados, sugerindo o controle da infecção pela resposta imune bem formada levando a uma melhor evolução da lesão nesses animais, com diminuição da carga fúngica, conforme sugerem estudos experimentais citados anteriormente (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Pen-Cheng et al., 1993).

Estudos realizados durante a epidemia no Rio de Janeiro também descreveram relação inversa entre carga fúngica e formação de granulomas nas lesões de esporotricose felina (Schubach et al., 2004a). Entretanto, a sensibilidade do método histológico para detecção de fungos (62,2%) foi menor do que a encontrada no presente estudo. Embora o percentual de animais do grupo L1 descrito por Schubach et al. (2004a) tenha sido maior (26,7%) do que o apresentado neste estudo (19,8%), esta diferença de percentual é pequena quando comparada a diferença de sensibilidade dos dois estudos. As diferenças de sensibilidade em períodos diferentes da mesma epidemia podem sugerir modificação no perfil da doença. Contudo, diferenças de metodologia, como critérios de inclusão de casos e amostras coletadas devem ser consideradas.

Em seres humanos e cães, a ocorrência de lesões cutâneas com carga fúngica elevada está geralmente associada a formas graves da doença e parece relacionada a fatores imunossupressores, como desnutrição, uso de corticosteróides e a presença de doenças concomitantes, especialmente as que causam imunodeficiência, como a AIDS (Rocha et al., 2001; Carvalho et al., 2002; Schubach et al., 2006; Bernstein et al., 2007; Cafarchia et al., 2007). Em gatos, não foi observada ainda associação entre a infecção por FIV e/ou FeLV e a gravidade

da esporotricose ou a carga fúngica de lesões (Schubach et al., 2003b, 2004a, 2004b; Pereira et al., 2010). Neste estudo, houve predomínio de animais positivos para FeLV, em relação aos animais positivos para FIV, em contraste com estudos anteriores de Schubach et al. (2003b) e Pereira et al. (2010), onde não foram descritos animais positivos para FeLV. Contudo, o número reduzido de animais com teste positivo para estas infecções, isoladamente ou em associação, dificultou a verificação de uma correlação entre sua ocorrência e a gravidade da esporotricose.

Alguns estudos experimentais revelam que apresentações clínicas com maior gravidade podem estar associadas a cepas mais virulentas do fungo (Kong et al., 2006; Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). O tipo de resposta imune e a expressão histopatológica da doença também podem variar de acordo com a cepa infectante do fungo. Cepas mais virulentas de *S. schenckii* parecem induzir fraca resposta inflamatória, facilitando o crescimento do fungo na lesão (Uenotsuchi et al., 2006). De acordo com Brito et al. (2007), cepas isoladas de pacientes apresentando a forma disseminada da esporotricose causam doença grave em camundongos, com alta carga fúngica e resposta linfoproliferativa reduzida, quando comparadas com cepas isoladas de pacientes com a forma cutâneo-linfática. Adicionalmente, cepas virulentas são referidas causando formas graves da esporotricose, mesmo em pacientes imunocompetentes (Brito et al., 2007).

Na epidemia de caráter zoonótico descrita no Rio de Janeiro, estudos moleculares revelam que amostras de seres humanos e gatos com esporotricose apresentam isolados idênticos de *Sporothrix* sp. (Reis et al., 2009). Contudo, formas graves da esporotricose, caracterizadas por alta carga fúngica e pouca reação inflamatória, são frequentes em gatos, mas pouco comuns em seres humanos, nos quais estão, geralmente, associadas a fator imunossupressor ou doença concomitante. Isto sugere que, além da virulência do fungo, outros fatores possibilitam a ocorrência de doença grave em gatos, mesmo na ausência de fatores imunossupressores.

É importante ressaltar, entretanto, que a mesma cepa do fungo pode apresentar virulência variável, de acordo com o a forma do fungo e com o tempo de cultivo de seus conídios, sendo mais virulentos os conídios em cultura por sete dias e as leveduras em relação aos conídios que permaneceram em cultura por doze dias (Fernandes et al. 1999; Fernandes et al., 2000).

Adicionalmente, segundo Dickerson et al. (1983), a imunização ativa prévia do hospedeiro aumenta de forma significativa a resistência ao fungo em infecções posteriores. Resultados semelhantes foram descritos por Shiraishi et al. (1992) e Tachibana et al. (1999) com a imunização passiva com linfócitos CD4⁺. Tachibana et al. (1999) sugerem que a imunização ativa prévia com *S. schenckii* induz a uma resposta do tipo Th1 específica e que a consequente ativação de macrófagos neste contexto é crucial para a proteção frente ao fungo.

Em áreas endêmicas, a diferença de suscetibilidade entre os gatos com esporotricose com status imunológico aparentemente semelhante pode ser explicada por exposições prévias ao agente etiológico. Na esporotricose humana, a forma cutânea fixa ocorre principalmente em áreas endêmicas e o fungo fica geralmente limitado ao local de inoculação, o que reflete a imunidade preservada do hospedeiro (Carlos et al., 2009; Morgado et al., 2011).

A resposta inflamatória organizada em alguns animais neste estudo pode estar associada a exposição prévia ao fungo, uma vez que a doença é considerada endêmica no Rio de Janeiro. Os animais com a resposta inflamatória organizada exibem carga fúngica mais baixa, de modo que o potencial de transmissão do fungo por estes animais também tende a diminuir, reduzindo, desta forma, a transmissão ao homem e a outros animais.

A obtenção de dados referentes à resposta imune na esporotricose pode trazer mais subsídios para a compreensão da suscetibilidade dos felinos a esporotricose. A aplicação do método citofluorimétrico permitiu a detecção dos percentuais de leucócitos no sangue periférico dos animais incluídos neste estudo.

O percentual de células $CD4^+$ foi maior em gatos do grupo L1, em relação aos demais grupos e ao grupo controle. Além disso, este percentual também foi superior nos animais em bom estado geral, sendo a diferença significativa quando relacionado aos animais em estado geral ruim. Estes achados sugerem que o aumento das células $CD4^+$ faz parte da resposta destes animais a esporotricose, uma vez que seu percentual foi superior ao observado no grupo controle. Adicionalmente, ressalta-se a sua correlação positiva com o controle da doença, pois seu aumento não foi evidenciado nos demais grupos e nem nos animais em estado geral ruim. Destaca-se ainda que não foi observada diferença entre os percentuais de células $CD4^+$ dos grupos L2 e L3 em relação ao grupo controle.

Os percentuais de células $CD8^+$ apresentaram-se maiores em animais com esporotricose em relação aos animais do grupo controle, não infectados. Esse percentual foi significativo apenas quando associado aos grupos L2 e L3 e não aos animais do grupo L1, com lesões localizadas.

Em estudo experimental com camundongos, Tachibana et al. (1999) demonstraram que a inibição do crescimento de *S. schenckii* apresenta-se associada a presença de linfócitos $CD4^+$, mas não de linfócitos $CD8^+$. No mesmo estudo, além dos linfócitos $CD4^+$, os macrófagos ativados apresentaram papel importante na resistência a esporotricose. Na resposta a criptococose pulmonar em camundongos, o percentual de células $CD8^+$ com atividade anti-fúngica e a produção de interferon- γ aumentam independentemente da presença de linfócitos $CD4^+$. Adicionalmente, a deficiência concomitante de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ resulta em carga

fúngica maior do que a observada na deficiência apenas de linfócitos CD4⁺ (Lindell et al., 2005).

A inversão da relação CD4/CD8, observada em 17 animais, foi prevalente nos grupos L2 e L3 e ocorreu em apenas um caso do grupo L1. Esses valores podem estar associados a maiores percentuais de células CD8⁺ nos grupos L2 e L3, sobretudo a células CD8^{low}. Nos animais dos grupos L2 e L3, um alto percentual de células CD8^{low} (50,0% e 86,7%, respectivamente) foi observado. Esta expressão ocorreu em 25,0% dos animais do grupo L1 e esteve ausente nos animais do grupo controle. Em conjunto, estes achados podem refletir relação inversa entre células CD8^{low} e o controle da doença.

A expressão CD8^{low} já foi descrita em gatos com infecção por FIV e pelo vírus da doença de Borna (Willett et al., 1993; Berg et al., 1999; Shimojima et al., 2004; Paillot et al., 2005). A expressão CD8^{low} observada neste estudo é compatível com o descrito em felinos infectados por FIV e pelo vírus da doença de Borna, mas os anticorpos monoclonais aqui utilizados não permitem a distinção entre cadeia α e β , de modo que a identificação específica do fenótipo do receptor de células expressando CD8^{low} não foi realizada. Além disso, a análise com dupla marcação dos receptores CD3 e CD8 não foi realizada para verificar se as células expressando CD8^{low} poderiam ser compatíveis com o fenótipo de células NK (CD3⁻ CD8⁺), com a baixa expressão associada, neste caso, a cadeia α .

Um aumento acentuado de linfócitos CD8⁺, sobretudo de células expressando CD8^{low}, é observado logo após a infecção de gatos por FIV, com manutenção do percentual de linfócitos CD4⁺ (Willett et al., 1993). A população de células expressando CD8^{low} no início da infecção por FIV pode atingir cerca de 80,0% de total de células CD8⁺ e se mantém em gatos infectados por anos (Paillot et al., 2005; Bucci et al., 1998). Embora tenha sido observado neste estudo um aumento da população de linfócitos CD8^{low} com manutenção da população de linfócitos CD4⁺, não é possível determinar em que momento da infecção estas alterações ocorreram.

Ao contrário do exposto anteriormente, alguns estudos relatam a manutenção ou diminuição do percentual de linfócitos CD8⁺ em gatos infectados por FIV (Tompkins et al., 1991; Walker et al., 1994). Esta variação entre os diferentes estudos pode ser atribuída a escolha da janela de células a ser considerada para a análise citofluorimétrica. Uma vez que diversos autores observaram o aumento de linfócitos CD8⁺ devido as células expressando CD8^{low}, é possível ainda que esta subpopulação tenha sido demonstrada diferentemente em alguns estudos, de acordo com o uso de anticorpos específicos para a cadeia α ou para a cadeia β . Deve-se ressaltar ainda que é descrita uma grande variabilidade entre a expressão dos diferentes marcadores em

gatos, mesmo que hípidos (Willett et al., 1993; Walker et al., 1995), o que pode dificultar a análise de padrões de resposta nestes animais.

De acordo com Ribba et al. (2012), quanto maior a dose infectante de FIV em felinos, maior será a expansão de células expressando CD8^{low}. Adicionalmente, foi observada uma correlação positiva linear entre o aumento da subpopulação de linfócitos T CD8^{low} e a carga viral. Isso sugere duas hipóteses antagônicas: o percentual de células expressando CD8^{low} pode ser um importante marcador para a progressão da infecção pelo FIV ou a alta carga viral pode estimular uma resposta com o aumento de células CD8⁺, que possuem atividade antiviral.

Estudos sugerem que o aumento do percentual de linfócitos CD8⁺ frente a infecção pelo FIV, expressando ou não a cadeia β , pode ter um papel importante na atividade antiviral, sobretudo na fase crônica (Jeng et al., 1996; Gebhard et al., 1999; Shimojima et al., 2004). De acordo com Willett et al. (1993) e Bucci et al. (1998), a elevada co-expressão CD8^{low}/MHC classe II indica que estas células sejam células em atividade. Bucci et al. (1998) e Gebhard et al. (1999) evidenciaram atividade antiviral nas células expressando CD8^{low} e atribuíram esta atividade a cadeia β . A infecção pelo vírus Epstein-Barr em humanos também gera um aumento na subpopulação de linfócitos T CD8⁺ com baixa expressão e com forte atividade citotóxica. Estas células parecem ter importante papel no controle de infecções virais persistentes (Trautmann et al., 2003).

Ressalta-se que todos os animais utilizados neste estudo para a análise citofluorimétrica eram soronegativos para FIV e apenas quatro soropositivos para FeLV, o que sugere que a ocorrência do padrão CD8^{low} não esteja associada especificamente a infecção por FIV ou por outros vírus, mas provavelmente à ativação destas células. Berg et al. (1999) descreveram a expressão CD8^{low} também em animais hípidos e atribuíram esse padrão à exposição antigênica a agentes infecciosos. Neste estudo, não foi observada a expressão CD8^{low} nos gatos do grupo controle. Embora o número de animais hípidos utilizado (n=5) seja pequeno, o número de animais infectados dos grupos L1, L2 e L3 (n= 8, 10 e 15, respectivamente) também foi reduzido.

Em camundongos infectados por *T. cruzi* na fase crônica da doença (Grisotto et al., 2001), as células com expressão de CD8^{low} parecem estar em estado de repouso. Quando estimuladas por macrófagos parasitados por *T. cruzi*, essas células respondem rapidamente de forma específica, o que sugere que sejam células de memória. Konno et al. (2002) também consideraram as células CD8^{low} como células de memória efetoras que permanecem no indivíduo sob estimulação antigênica.

Por outro lado, a expressão de CD8^{low} não foi observada em animais previamente imunizados para FIV (Willett et al, 1993), o que sugere que sua associação com a presença de células de memória deva ser discutida. Conforme mencionado anteriormente, a imunização prévia com *S. schenckii* parece aumentar a resistência a exposições posteriores ao fungo, de modo que o aumento de linfócitos CD8^{low} pode estar associado à resposta em animais com maior suscetibilidade ao agente. Entretanto, novos estudos são necessários para esta afirmação, uma vez que a subpopulação de linfócitos CD8^{low} não havia sido descrita anteriormente em gatos com esporotricose e, desta forma, seu papel na resposta imune frente a esta doença ainda não foi determinado.

Embora os linfócitos T CD8⁺ sejam importantes nas respostas frente a infecções virais e diversos autores citados anteriormente relatem a atividade antiviral da expressão CD8^{low}, é importante salientar que subpopulações de linfócitos T CD8^{low} são descritas por outros estudos como envolvidas em prováveis mecanismos inibidores ou de evasão de micro-organismos. A determinação do papel das células T CD8⁺ depende da expressão combinada de diferentes marcadores de superfície (Gebhard et al., 1999). Kundu & Merigan (1991) observaram que, em seres humanos infectados pelo HIV, a progressão da doença pode ser paralela a um aumento no perfil de linfócitos T CD8⁺ expressando fenótipo de células supressoras, que inibem a atividade citotóxica de outras células, podendo ser um indicador de prognóstico para o paciente, uma vez que o aumento dessa população de células CD8⁺ com fenótipo supressor está associado a redução de linfócitos CD4⁺ e ao aparecimento de sinais clínicos nesses pacientes. Na resposta ao vírus Epstein-Barr, é descrita a liberação de grande quantidade das citocinas regulatórias IL-4 e IL-10 pelas células com expressão de CD8^{low} (Trautmann et al., 2003), indicando que estas células podem ainda desempenhar algum papel na modulação da resposta imune.

Estudos *in vitro* descrevem que o estímulo com IL-4 a linfócitos CD8⁺ *naive* murinos leva a geração de uma subpopulação de linfócitos com expressão CD8^{low}, com concomitante redução da atividade citolítica e produção de IL-4 (Kienzle et al., 2002; Kienzle et al., 2005). Esta subpopulação não-citolítica estimula um aumento significativo na produção de imunoglobulinas quando colocadas em cultura com linfócitos B, o que sugere que podem atuar em cooperação com estas células (Kienzle et al., 2002). O papel desta subpopulação de linfócitos T CD8⁺ *in vivo* ainda precisa ser investigado. Kienzle et al. (2002) sugerem que este caminho possa ser um importante mecanismo de evasão de alguns patógenos.

A imunidade celular (Resposta Th1) é a principal ferramenta da resposta a esporotricose, de modo que a liberação de IL-4, com o desencadeamento de resposta do tipo humoral (Resposta

Th2), poderia acarretar na redução da imunidade celular e da formação de granulomas eficientes frente à infecção fúngica. De fato, Carlos et al. (1994) descreveram piora no quadro clínico de camundongos infectados por *S. schenckii* paralela à redução de citocinas do tipo Th1 (IL-1 e TNF) e ao aumento de citocinas do tipo Th2 (IL-10 e IL-4). Adicionalmente, Tachibana et al. (1999) também observaram que a transferência de anticorpos anti-*S. schenckii* não confere imunidade ao receptor. Deve-se ressaltar ainda que, segundo Tachibana et al. (1999), a imunização ativa prévia de camundongos com *S. schenckii* induz imunidade protetora nestes animais após novo estímulo com o fungo, representada por resposta do tipo Th1 específica. Em contrapartida, a principal citocina da resposta Th2, IL-4, não se expressa nestes animais. Em estudo *in vitro* com células dendríticas humanas, Uenotsuchi et al (2006) observaram que diferentes cepas de *S. schenckii* levam a diferentes apresentações clínicas, com base na indução de resposta Th1 ou Th2. Cepas de origem cutânea induzem resposta do tipo Th1, com ativação adequada de células dendríticas, enquanto cepas de origem visceral ativam fracamente as células dendríticas, levando a resposta do tipo Th2. A fraca ativação de células dendríticas e a consequente não indução da resposta do tipo Th1 parece estar relacionada a maior virulência da cepa visceral, associada a quadros clínicos mais graves.

No presente estudo, embora não tenha sido realizada análise do perfil de citocinas e determinação do tipo de resposta (Th1 ou Th2), é possível que a subpopulação CD8^{low}, frequente em animais com pior estado geral, esteja associada a resposta Th2, conforme observado por outros autores mencionados nos parágrafos anteriores. O perfil histopatológico da esporotricose felina descrito é consistente com o quadro de resposta celular comprometida: grande quantidade de leveduras íntegras no interior de macrófagos que não se diferenciam em células epitelióides, associada a escassa reação neutrofilica e linfo-plasmocitária, acarretando na formação de granulomas aparentemente ineficientes frente a infecção por *Sporothrix* sp..

Contudo, estudos mais profundos são necessários para avaliar se o aumento de células CD8⁺ e da expressão CD8^{low} contribui para disseminação da esporotricose ou se é consequência observada em formas mais graves da doença. Adicionalmente, uma vez que o presente estudo é seccional e apresenta dados referentes a um único momento, diversas questões permanecem indeterminadas em relação ao perfil imunológico dos gatos antes e ao longo da infecção por *Sporothrix* sp.. O acompanhamento do perfil imunológico nestes animais permitiria a identificação do tempo de evolução da doença, a sua correlação com o tipo de resposta desencadeada e a consequente determinação de possíveis fatores de prognóstico. Em paralelo, a análise de fatores relacionados à virulência do fungo, à carga infectante e à exposição prévia ao

fungo também é necessária, a fim de investigar a influência destas variáveis no desenvolvimento da doença e no perfil da resposta imune.

7. CONCLUSÕES

1. As lesões cutâneas de esporotricose caracterizaram-se por processo inflamatório granulomatoso supurativo. Os granulomas apresentaram-se mal formados na maioria dos casos e com predomínio de macrófagos. A presença de granulomas fúngicos foi observada em um grande número de casos.
2. A técnica de IHQ foi padronizada para a detecção de estruturas leveduriformes em cortes histológicos de lesões cutâneas de esporotricose felina e apresentou alta sensibilidade, semelhante à obtida pela IPG. As duas técnicas associadas elevaram a sensibilidade do método histológico para 98,0%.
3. A padronização da técnica de CF foi realizada no sangue periférico dos gatos com esporotricose, com a utilização do gradiente Ficoll-hypaque, permitindo a obtenção de células mononucleares e granulócitos. Os anticorpos monoclonais utilizados permitiram a identificação do perfil de leucócitos nestes animais, incluindo a presença de linfócitos T com expressão $CD8^{low}$.
4. O controle da esporotricose felina, com manutenção de bom estado geral, lesões localizadas, resposta bem organizada e menor carga fúngica, esteve associado ao aumento de células $CD4^{+}$. Por outro lado, o estado geral ruim, lesões disseminadas e alta carga fúngica, estiveram relacionados a existência de um padrão de resposta com aumento de células $CD8^{+}$ e aumento da expressão de $CD8^{low}$.
5. As formas graves da esporotricose felina foram frequentes neste estudo, independentemente da co-infecção por FIV e/ou FeLV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PCF, Peralta JM, Nosanchuk JD et al. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14: 244-49.

Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(7):651-5.

Barbee WC, Ewert A, Davidson EM. Animal model of human disease: sporotrichosis. *Am J Pathol.* 1977; 86: 281-84.

Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(4): 633-54.

Barros MBL, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica.* 2010; 227 (6): 455-60.

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

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

Barros MBL, Schubach TMP, Galhardo MCG, Schubach AO, Fialho-Monteiro PC, Reis RS et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 777-79.

Baume DM, Caligiuri MA, Manley TJ, Daley JF, Ritz J. Differential expression of CD8 alpha and CD8 beta associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells. *Cell Immunol.* 1990; 131(2): 352-65.

- Berg AL, Johannisson A, Johansson M, Hein A, Berg M, Dörries R. Peripheral and intracerebral T cell immune response in cats naturally infected with Borna disease virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 68(2-4): 241-53.
- Bernardes-Engemann AR, Costa RC, Miguens BR, Penha CV, Neves E, Pereira BA et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2005; 43(6): 487-93.
- Bernstein JA, Cook HE, Gill AF, Ryan KA, Sirninger J. Cytologic diagnosis of generalized cutaneous sporotrichosis in a hunting hound. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(1): 94-6.
- Bishop SA, Williams NA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Stokes CR. Impaired T-cell priming and proliferation in cats infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS.* 1992; 6(3):287-93.
- Brito MMS, Conceição-Silva F, Morgado FN, Raibolt PS, Schubach A, Schubach TP et al. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Med Mycol.* 2007; 45:721-29.
- Brown R, Weintraub D, Simpson M. Timber as a source of sporotrichosis infection. In: Sporotrichosis infection on the mines of the Witwatersrand. A symposium. The Transvaal Chamber of Mines, Johannesburg. 1947; 5-33.
- Bucci JG, Gebhard DH, Childers TA, English RV, Tompkins MB, Tompkins WA. The CD8⁺ cell phenotype mediating antiviral activity in feline immunodeficiency virus-infected cats is characterized by reduced surface expression of the CD8 beta chain. *J Infect Dis.* 1998; 178(4): 968-77.
- Bustamante B, Campos PE. Endemic Sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14: 145-9.
- Byrne KM, Reinhart GA, Hayek MG. Standardized flow cytometry gating in veterinary medicine. *Methods Cell Sci.* 2000; 22:191-98.
- Campos P, Arenas R, Coronado H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol.* 1994; 33(1): 38-41.
- Cafarchia C, Sasanelli MT, Lia RP, Caprariis D, Guillot J, Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case report. *Mycopathologia.* 2007; 163: 75-79.
- Campbell DJ, Rawlings JM, Koelsch S, Wallace J, Strain JJ, Hannigan BM. Age-related differences in parameters of feline immune status. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 100 (1-2): 73-80.
- Carlos IZ, Sassá MF, da Graça Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009; 168(1): 1-10.
- Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Placeres MC. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand J Immunol.* 2003; 57(3): 214-20.
- Carlos IZ, Sgarbi DB, Placeres MC. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 1999; 144: 9-14.

Carlos IZ, Zini MM, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*. 1994; 127(3): 189-94.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*. 1992; 117(3): 139-44.

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

Carvalho MTM, Castro AP, Baby C, Werner B, Neto JF, Queiroz-Telles F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(6): 655-59.

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

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

Davies C, Troy GC. Deep mycotic infections in cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1996; 32: 380-91.

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

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

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

Dickerson CL, Taylor RL, Drutz DJ. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. *Infect Immun*. 1983; 40(1): 417-20.

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

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

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

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

- Farias M, Costa P, Franco S, Ferreira H. Esporotricose canina e felina. *Cães e gatos*. 1997; 66: 30-8.
- Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Schubach TM, Dias MA, Pereira SA et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Vet Microbiol*. 2011; 147(3-4): 265-73.
- Fernandes KSS, Coelho ALJ, Lopes-Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology*. 2000; 101: 563-69.
- Fernandes KSS, Mathews HL, Lopes-Bezerra LM. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol*. 1999; 48: 195-203.
- Freitas DC, Moreno G, Saliba AM, Bottino JA, Mós EN. Esporotricose em cães e gatos. *Rev Fac Med Vet S Paulo*. 1965; 7: 381-7.
- Freitas D, Migliano M, Zani Neto L. Esporotricose – Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). *Rev Med Vet São Paulo*. 1956; 5: 601-04.
- Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, Fujita MS, Rosa OS, Weckwerth AC et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cats scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. *Int J Dermatol*. 2001; 40: 318-22.
- Gadelha AR, Talhari S. Demonstração do *Sporothrix schenckii* em cortes histológicos. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1982; 10: 355-60.
- Gebhard DH, Dow JL, Childers TA, Alvelo JI, Tompkins MB, Tompkins WA. Progressive expansion of an L-selectin-negative CD8 cell with anti-feline immunodeficiency virus (FIV) suppressor function in the circulation of FIV-infected cats. *J Infect Dis*. 1999; 180(5): 1503-13.
- Goad DL, Goad MEP. Osteoarticular sporotrichosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1986; 189(10): 1326-8.
- Gonzalez Cabo JF, Heras Guillamon M, Latre Cequiél MV, Garcia de Jalon Ciercoles JA. Feline sporotrichosis: A case report. *Mycopathologia*. 1989; 108:149-54.
- Grisotto MG, D'Império Lima MR, Marinho CR, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA, Alvarez JM. Most parasite-specific CD8⁺ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha-beta and CD8 molecules. *Immunology*. 2001; 102(2): 209-17.
- Hachisuka H, Sasai Y. Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. *Mycopathologia*. 1981; 76: 79-82.
- Hektoen L, Perkins CF. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J Exp Med*. 1900; 55: 77-89.
- Heaton PR, Blount DG, Mann SJ, Devlin P, Koelsch S, Smith BH et al. Assessing age-related changes in peripheral blood leukocyte phenotypes in domestic shorthaired cats using flow cytometry. *J Nutr*. 2002; 132 (6 Suppl 2): 1607S-09S.

- Hirsh BC, Johnson WC. Concepts of granulomatous inflammation. *Int J Dermatol*. 1984; 23: 90-100.
- Hiruma M, Yamaji K, Shimizu H, Ohata H, Kukita A. Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. *Arch Dermatol Res*. 1988; 280(Supl): 94-100.
- Hoffmann-Fezer G, Mortelbauer W, Hartmann K, Mysliwietz J, Thefeld S, Beer B et al. Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. *Res Vet Sci*. 1996;61(3):222-26.
- Hosie MJ, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T et al. Feline immunodeficiency – ABCD guidelines on prevention and management. *J Fel Med Surg*. 2009; 11: 575-84.
- Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, Lu SC, Kuo TT, Hong HS. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(4): 1414-8.
- Hussein MR. Mucocutaneous Splendore-Hoeppli phenomenon. *J Cutan Pathol*. 2008; 979-88.
- Itoh M, Okamoto S, Kariya H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. *Dermatologica*. 1986; 172: 209-13.
- Janols H, Bredbrg A, Thuveesson I, Janciauskiene S, Grip O, Wult M. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. *BMC Infect Dis*. 2010; 10: 205-13.
- Jeng CR, English RV, Childers T, Tompkins MB, Tompkins WAF. Evidence for CD8⁺ antiviral activity in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol*. 1996; 2474-480.
- Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, Yoshida S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infect Immun*. 2004; 72(9): 5073-79.
- Kanbe T, Natsume L, Goto I, Kawasaki M, Mochisuki T, Ishizaki H, Kikuchi A. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. *J Dermatol Sci*. 2005; 38: 99-106.
- Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses*. 2001; 44: 261-5.
- Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 231-36.
- Key M. Immunohistochemistry staining methods. In: Key M, editor. Immunohistochemical staining methods. Dako Education guide. 4. Ed. Carpinteria: DAKO; 2006. 47-54.
- Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Groves P, Janas ML, Baz A, Kelso A. Progressive differentiation and commitment of CD8⁺ T cells to a poorly cytolytic CD8^{low} phenotype in the presence of IL-4. *J Immunol*. 2005; 174(4): 2021-29.

Kienzle N, Buttigieg K, Groves P, Kawula T, Kelso A. A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression. *J Immunol.* 2002; 168(4): 1672-81.

Kipar A, Baptiste K, Meli ML, Barth A, Knietsch M, Reinacher M et al. Age-related dynamics of constitutive cytokine transcription levels of feline monocytes. *Exp Gerontol.* 2005; 40(3): 243-48.

Kizaki T, Kobayashi S, Ogasawara K, Day NK, Good RA, Onoé K. Immune suppression induced by protoscoleces of *Echinococcus multilocularis* in mice. Evidence for the presence of CD8dull suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with *E. multilocularis*. *J immunol.* 1991; 147(5): 1659-66.

Kligman AM, Baldrige GD. Morphology of *Sporotrichum schenckii* and *Histoplasma capsulatum* in tissue. *AMA Arch Pathol.* 1951; 51(6): 567-74.

Koehne G, Powell HS, Hail RI. Sporotrichosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1971; 159(7): 892-4.

Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(11):1077-81.

Konno A, Okada K, Mizuno K, Nishida M, Nagaoki S, Toma T et al. CD8alpha alpha memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8alpha⁺beta high TCRalpha beta T cells in vivo. *Blood.* 2002; 100(12):4090-97.

Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol.* 2008; 46: 53-6.

Kundu SK, Merigan TC. Inverse relationship of CD8⁺CD11⁺ suppressor T cells with human immunodeficiency virus (HIV)-specific cellular cytotoxicity and natural killer cell activity in HIV infection. *Immunology.* 1991; 74: 567-71

Kusuhara M, Hachisuka H, Sasai Yoichiro. Statistical survey of 150 cases with sporotrichosis. *Mycopathologia.* 1988; 102: 129-33.

Kwon-Chung K, Bennett J. *Medical Mycology.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p. 707.

Larsson CE, Gonçalves MA, Araujo VC, Dagli MLZ, Correa B, Fava Neto C. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos (1). *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1989; 31(5): 351-8.

Lima OC, Figueiredo CC, Pereira BA, Coelho MG, Morandi V, Lopes-Bezerra LM. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz J Med Biol Res.* 1999. 32(5): 651-7.

Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Generation of antifungal effector CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J immunol.* 2005; 174(12): 7920-8.

Londero AT, Castro RM, Fischman O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. *Sabouraudia.* 1964; 3(4): 273-4.

- Lopes Alves L, Travassos LR, Previato JO, Mendonça-Previato L. Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology*. 1994; 4(3): 281-88.
- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*. 2006; 78(2): 293-308.
- López-Romero E, Reyes-Montes Mdel R, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol*. 2011; 6(1): 85-102.
- Lurie HI. Histopathology of sporotrichosis – Notes of the nature of the asteroid body. *Arch Pathol*. 1963; 75: 421-37.
- Lutz H, Addie D, Belák S, Boucraut-Balaron C, Egberink H, Frymus T et al. Feline leukaemia - ABCD guidelines on prevention and management. *J Fel Med Surg*. 2009; 11: 565-74.
- Lutz A, Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *Rev Med S Paulo*. 1907; 21:433-50.
- Macotela-Ruiz E, Nochebuena-Ramos E. Esporotricosis en algunas comunidades rurales de la Sierra Norte de Puebla. Informe de 55 casos (Septiembre 1995-Diciembre 2005). *Gac Méd Méx*. 2006; 142(5): 377-80.
- Maia DC, Sassá MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 2006; 161(1):11-9.
- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(10): 3198-206.
- Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L., Dos Santos Lazera M., Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3251-56
- Marques SA, Franco SRVS, Camargo RMP, Dias LDF, Haddad Junior V, Fabris VE. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): Transmissão humana. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35(4): 327-30.
- Marques MEA, Coelho KIR, Sotto MN, Bacchi CE. Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 1089-93.
- Migliano MF, Freitas DC, Moreno G. Esporotricose em cães. *Rev Fac Med Vet S Paulo*. 1963; 7(1): 225-33.
- Miranda LH, Quintella LP, Menezes RC, Dos Santos IB, Oliveira RV, Figueiredo FB et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Vet J*. 2011; 190(3): 408-11.
- Miranda LHM, Quintella LP, Santos IB, Oliveira RVC, Menezes RC, Figueiredo FB et al. Comparative histopathological study of sporotrichosis and american tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro. *J Comp Pathol*. 2010; 143(1): 1-7.

Miranda LHM, Quintella LP, Santos IB, Menezes RC, Figueiredo FB, Gremião IDF et al. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). *Mycopathologia*. 2009; 168(2): 19-87.

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

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

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

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

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

Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Conceição-Silva F. The *in situ* inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. *Med Micol*. 2011; 49(6): 612-20.

Nakamura Y, Sato H, Watanabe S, Takahashi H, Koide K, Hasegawa A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. *Mycoses*. 1996; 39(3-4): 125-8.

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

Nobre MO, Castro AP, Caetano D, Souza LL, Meireles MCA, Ferreiro L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18: 137-40.

Novotney C, English RV, Housman J, Davidson MG, Nasisse MP, Jeng CR et al. Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS*. 1990; 4(12): 1213-18.

Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*. 2011; 172(4):257-67.

Paillot R, Richard S, Bloas F, Piras F, Poulet H, Brunet S. Toward a detailed characterization of feline immunodeficiency virus-specific T cell immune responses and mediated immune disorders. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 106(1-2): 1-14.

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

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

- Pereira SA, Menezes RC, Gremião ID, Silva JN, Honse Cde O, Figueiredo FB et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg*. 2011; 13(4): 220-3.
- Pereira SA, Passos SRL, Silva JN, Gremião IDF, Figueiredo FB, Teixeira JL et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Rec*. 2010; 166(10): 290-94.
- Pinkus H, Grekin JN. Sporotrichosis with asteroid tissue forms – Report of a case. *Arch Dermatol Syph*. 1950; 61: 813-9.
- Quintella LP, Passos SR, de Miranda LH, Cuzzi T, Barros MB, Francesconi-do-Vale AC et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol*. 2012; 167(4): 837-46.
- Quintella LP, Passos SR, do Vale AC, Galhardo MC, Barros MB, Cuzzi T, Reis Rdos S et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011; 38 (1): 25-32.
- Quintella LP, Cuzzi T, Madeira MF, Okamoto T, Schubach AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009; 51(2): 83-6.
- Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005; 42: 405-26.
- Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis – Transmission to man. *Arch Dermatol*. 1982; 118: 429-31.
- Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993; 16: 384-7.
- Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz Mde M, Tavares PM, Monteiro PC, Schubach TM. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(5): 769-74.
- Ribba B, El Garch H, Brunet S, Grenier E, Castiglione F, Poulet H et al. Time-course analysis of main markers of primary infection in cats with the feline immunodeficiency virus. *Comput Math Methods Med*. 2012; *in press*.
- Rippon J. Sporotrichosis. *J Vet Inter Med*. 1988; 7: 44-5.
- Rocha MM, Dassin T, Lira R, Lima EL, Severo LC, Londero AT. Sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18: 133-36.
- Rodriguez G, Sarmiento L. The asteroid bodies of sporotrichosis. *Am J Dermatopathol*. 1998; 20: 246-49.
- Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia*. 2011; 172(3): 179-86.
- Santos IB, Schubach TMP, Leme LRP, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA et al.

Sporotrichosis-The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2007a; 143: 1-6.

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

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

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

Schmitz JE, Forman MA, Lifton MA, Concepción O, Reimann KA Jr, Crumpacker CS et al. Expression of the CD8alpha beta-heterodimer on CD8(+) T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes of human immunodeficiency virus- and human immunodeficiency virus+ individuals. *Blood*. 1998; 92(1): 198-206.

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

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

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 2004a; 224: 1623-29.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Leme LRP et al. *Sporothrix schenckii* isolation from blood clot of naturally infected cats. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004b; 41(6): 404-08.

Schubach TMP, Schubach AO, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PCF et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec*. 2003a; 152: 172-75.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Pellon IV, Monteiro PCF, Reis RS et al. Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. *J Small Anim Pract*. 2003b; 44: 395-98.

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

Schubach TMP, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol*. 2001; 39: 147-49.

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

Sgarbi DB, da Silva AJ, Carlos IZ, Silva CL, Angluster J, Alviano CS. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1997; 139(1): 9-14.

Shimajima M, Nishimura Y, Miyazawa T, Tohya Y, Akashi H. T cell subpopulations mediating inhibition of feline immunodeficiency virus replication in mucosally infected cats. *Microbes Infect*. 2004; 6: 265-71.

Shimajima M, Miyazawa T, Kohmoto M, Ikeda Y, Nishimura Y, Maeda K et al. Expansion of CD8 α^+ beta $^-$ cells in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol*. 1998; 79(Pt1): 91-4.

Shiraishi A, Nakagaki K, Arai T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia*. 1992; 120: 15-21.

Silva MB, Costa MM, Torres CC, Galhardo MC, Valle AC, Magalhães MA et al. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2012; 28(10): 1867-80.

Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4 $^+$ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol*. 1999; 37: 397-404.

Tarrant MJ. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet J*. 2005; 170: 278-88.

Tompkins MB, Nelson PD, English RV, Novotney C. Early events in the immunopathogenesis of feline retrovirus infections. *J Am Vet Med Assoc*. 1991; 199(10):1311-15.

Trautmann A, Rückert B, Schmid-Grendelmeier P, Niederer E, Bröcker EB, Blaser K et al. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. *Immunology*. 2003; 108(3):305-12.

Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol*. 2006;18(12):1637-46.

Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med Microbiol Immunol*. 2011; 200(4): 255-61.

Walker C, Malik R, Canfield PJ. Analysis of leucocytes and lymphocytes subsets in cats with naturally-occurring cryptococcosis but differing feline immunodeficiency status. *Aust Vet J*. 1995; 72(3): 93-7.

Walker C, Canfield PJ, Love DN. Analysis of leukocytes and lymphocyte subsets for different clinical stages of naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994; 44: 1-12.

Weiss DJ. Application of flow cytometry techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol*. 2002; 31(2): 72-82.

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

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

Willett BJ, Hosie MJ, Callanan JJ, Neil JC, Jarrett O. Infection with feline immunodeficiency virus is followed by the rapid expansion of a CD8⁺ lymphocyte subset. *Immunology.* 1993; 78(1): 1-6.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela 1. Esporotricose Felina: Frequências de cada variável clínico-epidemiológica em relação a apresentação clínica.

Variável	Apresentação clínica			Total	P-valor ¹	
	L1 (N=20) 19,8%	L2 (N=22) 21,8%	L3 (N=59) 58,4%			
Estado Geral (101)	Bom	16	16	21	53	<0,01*
	Regular	4	6	22	32	
	Ruim	0	0	16	16	
Idade (93)	>0<2 anos	4	8	16	28	<0,50
	≥2 <5 anos	11	8	33	52	
	≥5 anos	4	3	6	13	
Sexo (101)	Masculino	9	14	49	72	<0,01*
	Feminino	11	8	10	29	
Antígenos de FeLV (99)	Positivo	2	3	10	15	0,70
	Negativo	18	19	47	84	
Anticorpos anti-FIV (99)	Positivo	0	2	1	3	0,16
	Negativo	20	20	56	96	

L1: Animais com lesões em um local; L2: Animais com lesões em dois locais; L3: Animais com lesões em três ou mais locais.

¹Teste de independência qui-quadrado de Pearson

*P-valor<0,05

APÊNDICE B – Tabela 2. Esporotricose Felina: Frequências de cada achado histopatológico nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo nos três grupos estudados.

Achado Histopatológico		Apresentação Clínica						TOTAL	P-valor ¹
		L1 (N=19)		L2 (N=21)		L3 (N=59)			
		%	n	%	n	%	n		
Organização do granuloma	Mal formado	78,9	15	76,2	16	94,9	56	87	0,03*
	Bem formado	21,1	4	23,8	5	5,1	3	12	
Diferenciação predominante das células do SMF ativadas	Macrófagos	63,2	12	57,1	12	86,4	51	75	0,01*
	Células epitelióides	36,8	7	42,9	9	13,6	8	24	
Granuloma Fúngico	Presente	5,3	1	28,6	6	49,2	29	36	<0,01*
	Ausente	94,7	18	71,4	15	50,8	30	63	
Distribuição do granuloma	Difusa	84,2	16	71,4	15	88,1	52	83	0,44
	Nodular	10,5	2	23,8	5	8,47	5	12	
	Intersticial	5,3	1	4,8	1	3,4	2	4	
Intensidade do infiltrado de neutrófilos	Leve a Moderada	21,1	4	47,6	10	39	23	37	0,20
	Acentuada	78,9	15	52,4	11	61	36	62	
Intensidade do infiltrado de linfócitos	Leve a Moderada	47,4	9	52,4	11	66,1	39	59	0,26
	Acentuada	52,6	10	47,6	10	33,9	20	40	
Intensidade do infiltrado de plasmócitos	Ausente	0	0	4,8	1	0	0	1	0,34
	Leve a Moderada	47,4	9	57,1	12	49,2	29	50	
	Acentuada	52,6	10	38,1	8	50,8	30	48	

L1: Animais com lesões em um local; L2: Animais com lesões em dois locais; L3: Animais com lesões em três ou mais locais.

¹ Teste de independência qui-quadrado de Pearson

*P-valor<0,05

APÊNDICE C – Tabela 3. Esporotricose felina: Avaliação da carga fúngica nos cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott em cada um dos grupos estudados nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo.

Carga fúngica – Impregnação pela prata de Grocott ¹	Apresentação clínica						Total
	L1		L2		L3		
	%	n	%	n	%	n	
Ausente	10,5	2	14,3	3	1,7	1	6
1 ≤ 20	42,1	8	28,6	6	20,3	12	26
> 20 ≤ 100	5,3	1	19	4	10,7	6	11
> 100 ≤ 400	15,8	3	0	0	8,5	5	8
> 400	26,3	5	38,1	8	59,3	35	48
Total	100	19	100	21	100	59	99

¹ por campo microscópico de 400x.

L1: Animais com lesões em um local; L2: Animais com lesões em dois locais; L3: Animais com lesões em três ou mais locais.

Apêndice D – Tabela 4. Esporotricose felina: Avaliação da carga fúngica nos cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott em relação aos achados clínico-epidemiológicos.

Variável (n)	Carga fúngica na IPG ¹				p-valor ³	
	Ausente	≤100 estruturas leveduriformes/ca mpo ²	>100 estruturas leveduriformes/campo ²			
Estado Geral	Bom (N=51)	%	9,8	41,2	49	0,16
		n	5	21	25	
	Regular (N=32)	%	3,1	40,6	56,3	
		n	1	13	18	
	Ruim (N=16)	%	0	18,8	81,3	
		n	0	3	13	
Idade	>0<2 anos (N=28)	%	0	46,4	53,6	0,27
		n	0	13	15	
	≥ 2 <5 anos (N=51)	%	3,9	29,4	66,7	
		n	2	15	34	
	≥5 anos (N=12)	%	16,7	41,7	41,7	
		n	2	5	5	
Sexo	Masculino (N=70)	%	7,1	34,3	58,6	0,50
		n	5	24	41	
	Feminino (N=29)	%	3,4	44,8	51,7	
		n	1	13	15	

¹IPG: Impregnação pela prata de Grocott.

²Campo microscópico de 400x

³Teste de independência qui-quadrado de Pearson

APÊNDICE E – Tabela 5. Avaliação da carga fúngica nos cortes histológicos pela técnica de impregnação pela prata de Grocott em relação aos achados histopatológicos.

Achado Histopatológico			Carga fúngica na IPG ¹			P-valor ³
			Ausente	≤ 100 estruturas leveduriformes/Campo ²	> 100 estruturas leveduriformes/Campo ²	
Organização do granuloma	Bem formado (N=12)	%	25,0	75,0	0	<0,01*
		n	3	9	0	
	Mal formado (N=87)	%	3,4	32,2	64,4	
		n	3	28	56	
Célula do SMF⁴ predominante	Células epitelióides (N=24)	%	20,8	66,7	12,5	<0,01*
		n	5	16	3	
	Macrófagos (N=75)	%	1,3	28,0	70,7	
		n	1	21	53	
Intensidade de neutrófilos	Leve a moderada (N=37)	%	5,4	29,7	64,9	0,28
		n	2	11	24	
	Acentuada (N=62)	%	6,5	41,9	51,6	
		n	4	26	32	
Intensidade de linfócitos	Leve a moderada (N=59)	%	5,1	32,3	62,7	0,20
		n	3	19	37	
	Acentuada (N=40)	%	7,5	45,0	47,5	
		n	3	18	19	
Intensidade de plasmócitos	Ausente (N=1)	%	0	100,0	0	0,43
		n	0	1	0	
	Leve a moderada (N=50)	%	8,0	38,0	54,0	
		n	4	19	27	
Acentuada (N=48)	%	4,2	35,4	60,4		
	n	2	17	29		

¹IPG: Impregnação pela prata de Grocott.

²Campo microscópico de 400x

³ Teste de independência qui-quadrado de Pearson

⁴Sistema Mononuclear Fagocitário

* P-valor <0,05

APÊNDICE F – Tabela 6. Esporotricose felina: comparação entre as técnicas de impregnação pela prata de Grocott e de imuno-histoquímica em relação aos resultados de carga fúngica nos casos caracterizados por processo inflamatório granulomatoso supurativo.

Carga fúngica ³	Técnica utilizada			
	IPG ¹ (N=99)		IHQ ² (N=98)	
	%	N	%	N
Ausente	6,1	6	5,2	6
1 ≤ 20	26,2	26	27,8	27
> 20 ≤ 100	11,1	11	10,3	10
> 100 ≤ 400	8,1	8	7,2	7
> 400	48,5	48	49,5	48
Total	100	99	100	98

¹IPG: Impregnação pela prata de Grocott

²IHQ: Imuno-histoquímica

³Por campo microscópico de 400x

APÊNDICE G - Tabela 7. Mediana de cada marcador celular estudado nos animais com esporotricose e no grupo controle, pela técnica de citometria de fluxo.

Grupo	%CD4 ⁺		%CD8 ⁺		%CD21 ⁺		%CD14 ⁺		%Granulócitos ⁺	
	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	N
Esporotricose (N=33)	26,7 (11,5-54,9)	33	23,1 (6,9-69,6)	33	11,7 (2,8-60,6)	33	13,2 (1,6-52,7)	33	31,7 (1,9-68,5)	32
Controle (N=5)	25,6 (15,4-26,4)	5	11,3 (4,2-22,5)	5	25,0 (1,8-38,8)	5	5,4 (2,2-5,7)	4	35,5 (23,7-50,0)	4
P-valor¹	0,27		0,01*		0,61		0,04*		0,65	

Nota: Min= Mínimo, Max=Máximo.

*p-valor<0,05

¹ Teste de Mann-Whitney

APÊNDICE H – Tabela 8. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado na amostra total e em cada grupo, pela técnica de citometria de fluxo.

Marcador	Mediana dos percentuais de células positivas nos diferentes grupos								p-valor ¹
	L1		L2		L3		Controle		
	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	
%CD4⁺	35,9 (23,0-54,9)	8	25,1 (11,5-41,2)	10	25,4 (13,7-43,4)	15	25,6 (15,4-26,4)	5	0,04*
%CD8⁺	17,6 (8,2-38,7)	8	25,7 (12,7-69,6)	10	28,6 (6,9-64,8)	15	11,3 (4,2-22,5)	5	0,04*
%CD8^{+low}	6,6 (1,7-11,4)	2	16,9 (12,0-33,3)	5	22,2 (1,8-54,9)	13	0 0	0 0	0,26
%CD8^{+high}	9,1 (1,9-16,3)	2	19,4 (4,8-36,8)	5	7,4 (2,2-20,0)	13	0 0	0 0	0,14
%CD21⁺	15,9 (7,7-23,3)	8	9,9 (2,8-22,3)	10	10,6 (2,9-60,6)	15	25,0 (1,8-38,8)	5	0,51
%CD14⁺	10,0 (1,6-20,0)	8	7,6 (3,8-43,9)	10	20,2 (5,5-52,7)	15	5,4 (2,2-5,7)	4	0,02*
%Granulócitos⁺	9,4 (1,9-48,5)	8	37,2 (4,9-66,9)	10	34,9 (7,8-68,5)	14	35,5 23,7-50,0	4	0,16

L1: Animais com lesões em um local; L2: Animais com lesões em dois locais; L3: Animais com lesões em três ou mais locais.

¹Teste de Kruskal Wallis

*p-valor<0,05

Nota: Min=Mínimo, Max=Máximo.

APÊNDICE I – Tabela 9. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado em diferentes variáveis, pela técnica de citometria de fluxo.

Variável		Percentual de células positivas							
		%CD4	%CD8	%CD8 ^{low}	%CD8 ^{high}	%CD21	%CD14	%Granulócitos	
Estado Geral	Bom (N=20)	Mediana	32,5	19,1	14,7	8,9	11,9	11,9	28,5
		(Min-Max)	(11,5-54,9)	(8,2-64,8)	(6,1-54,9)	(1,9-22,2)	(5,2-23,3)	(1,6-52,7)	(1,9-66,9)
		n	20	20	10	10	20	20	20
	Regular (N=8)	Mediana	28,6	33,7	31,8	9,7	9,9	20,6	39,4
		(Min-Max)	(11,6-43,4)	(11,7-69,6)	(1,7-45,3)	(2,2-36,8)	(2,8-26,6)	(4,6-43,9)	(4,1-55,2)
		n	8	8	7	7	8	8	7
	Ruim (N=5)	Mediana	16,9	27,7	4,4	6,8	27,4	5,8	29,3
		(Min-Max)	(13,7-29,5)	(6,9-29,0)	(1,8-22,2)	(2,6-12,1)	(10,3-60,6)	(5,5-28,4)	(8,0-68,5)
		n	5	5	3	3	5	5	5
p-valor ¹		0,08	0,40	0,35	0,77	0,05*	0,23	0,83	
Idade	<2 anos (N=7)	Mediana	25,0	28,6	16,9	10,4	13,5	13,2	38,2
		(Min-Max)	(13,7-41,2)	(12,7-64,8)	(1,8-54,9)	(4,8-19,4)	(7,5-27,4)	(3,8-52,7)	(8,0-62,6)
		n	7	7	5	5	7	7	7
	≥2 <5 anos (N=19)	Mediana	30,5	23,1	22,2	7,4	11,1	15,7	27,3
		(Min-Max)	(13,3-54,9)	(6,9-69,6)	(1,7-45,3)	(1,9-36,8)	(2,8-60,6)	(1,6-39,3)	(1,9-68,5)
		n	19	19	13	13	19	19	19
	≥5 anos (N=3)	Mediana	11,6	24,0	12,0	11,6	5,2	11,4	42,6
		(Min-Max)	(11,5-40,9)	(19,7-27,4)	0	0	(4,3-16,8)	(5,7-43,9)	(15,4-45,3)
		n	3	3	1	1	3	3	3
p-valor ¹		0,40	0,95	0,80	0,89	0,35	0,98	0,43	
Sexo	Masculino (N=22)	Mediana	25,8	23,6	19,1	9,1	12,5	17,0	23,6
		(Min-Max)	(11,6-43,4)	(6,9-69,6)	(1,7-54,9)	(2,6-36,8)	(2,8-30,8)	(3,8-52,7)	(4,1-66,9)
		n	22	22	14	14	22	22	22
	Feminino (N=11)	Mediana	32,8	23,1	14,5	7,2	11,7	8,6	13,9
		(Min-Max)	(11,5-54,9)	(11,6-63,3)	(11,1-45,3)	(1,9-20,0)	(2,9-60,6)	(1,6-38,3)	(1,9-68,5)
		n	11	11	6	6	11	11	10
p-valor ²		0,49	0,56	0,66	0,55	0,61	0,36	0,16	

¹Teste de Kruskal Wallis

²Teste de Mann-Whitney

*p-valor<0,05

Nota: Min= Mínimo, Max=Máximo.

APÊNDICE J - Tabela 10. Esporotricose felina: Mediana de células positivas para cada marcador celular estudado em relação a pesquisa de antígenos de FeLV, pela técnica de citometria de fluxo.

Pesquisa de antígenos de FeLV	Percentuais de células positivas													
	%CD4		%CD8		%CD8 ^{low}		%CD8 ^{high}		%CD21		%CD14		%Granulócitos	
	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n	Mediana (Min-Max)	n
Positivo (N=4)	21,2		16,2		4,4		10,4		20,7		14,6		24,4	
	(13,7-32,1)	4	(6,9-34,8)	4	(1,8-54,9)	1	(2,6-12,1)	1	(10,3-27,4)	4	(3,8-52,7)	4	(4,9-38,1)	4
Negativo (N=28)	30,0		23,6		16,9		8,5		11,3		12,8		31,8	
	(11,5-54,9)	28	(8,2-69,6)	28	(1,71-45,30)	11	(1,85-36,8)	11	(2,8-30,8)	28	(1,6-43,9)	28	(1,9-66,9)	27

Nota: Min= Mínimo, Max=Máximo.

APÊNDICE L – Tabela 11. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado pela técnica de citometria de fluxo, em relação a organização do granuloma e as células do sistema mononuclear fagocitário predominantes.

Variável			Percentual de células positivas						
			%CD4	%CD8	%CD8 ^{low}	%CD8 ^{high}	%CD21	%CD14	%Granulócitos
Organização do granuloma	Bem formado (N=4)	Mediana	32,7	17,9	31,8	36,8	10,9	4,2	16,9
		(Min-Max)	(25,2-54,9)	(8,2-69,6)	0	0	(2,8-21,9)	(1,7-15,6)	(4,9-31,5)
	n	4	4	1	1	4	4	4	
	Mal formado (N=29)	Mediana	26,2	24,0	15,9	8,5	11,7	13,2	34,9
	(Min-Max)	(11,5-43,4)	(6,9-64,8)	(1,7-54,9)	(1,9-22,2)	(2,9-60,6)	(1,6-52,7)	(1,9-68,5)	
	n	29	29	19	19	29	29	28	
	p-valor¹		0,25	0,65	0,80	0,10	0,54	0,05*	0,19
Células do SMF² preodminantes	Macrófagos (N=20)	Mediana	25,2	28,2	16,4	8,3	12,5	15,8	31,8
		(Min-Max)	(13,3-43,4)	(6,8-64,8)	(1,7-54,9)	(1,9-22,2)	(2,9-60,6)	(1,6-52,7)	(1,94-68,5)
	n	20	20	16	16	20	20	19	
	Células epitelióides (N=13)	Mediana	32,1	19,7	21,9	10,1	11,7	11,4	31,5
	(Min-Max)	(11,5-54,9)	(8,2-69,6)	(6,1-33,2)	(7,4-36,8)	(2,8-22,3)	(1,7-43,9)	(4,9-59,6)	
	n	13	13	4	4	13	13	13	
	p-valor¹		0,27	0,55	0,89	0,39	0,35	0,35	0,62

¹Teste de Mann-Whitney

²Sistema mononuclear fagocitário

*p-valor<0,05

Nota: Min= Mínimo, Max=Máximo.

APÊNDICE M – Tabela 12. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado pela técnica de citometria de fluxo, em relação a intensidade dos tipos celulares presentes.

			Percentual de células positivas						
Variável			%CD4	%CD8	%CD8 ^{low}	%CD8 ^{high}	%CD21	%CD14	%Granulócitos
Intensidade de neutrófilos	Leve a moderada (N=15)	Mediana	26,7	23,1	31,8	12,1	12,1	18,4	30,4
		(Min-Max)	(11,6-54,9)	(6,9-69,6)	(1,7-54,9)	(2,2-36,8)	(2,8-60,6)	(1,7-52,7)	(4,1-68,5)
	n	15	15	7	7	15	15	14	
	Acentuada (N=18)	Mediana	27,9	21,9	15,9	7,4	11,0	11,9	31,8
(Min-Max)		(11,5-43,4)	(8,2-63,3)	(1,9-44,0)	(1,9-20,0)	(5,2-30,8)	(1,6-38,3)	(1,9-66,9)	
p-valor ¹			0,90	0,68	1,00	0,39	0,76	0,36	0,67
Intensidade de linfócitos	Leve a moderada (N=20)	Mediana	26,5	22,8	22,2	10,4	11,6	19,3	31,5
		(Min-Max)	(13,3-54,9)	(6,9-69,6)	(1,7-54,9)	(2,2-36,8)	(2,8-60,6)	(1,6-52,7)	(1,9-68,5)
	n	20	20	13	13	20	20	19	
	Acentuada (N=13)	Mediana	30,5	23,1	15,9	5,9	11,7	8,6	31,8
(Min-Max)		(11,5-43,4)	(13,3-44,9)	(11,4-39,5)	(1,9-19,4)	(4,3-23,3)	(1,6-43,9)	(4,9-62,6)	
p-valor ¹			0,84	0,76	0,88	0,28	0,99	0,09*	0,68
Intensidade de plasmócitos	Leve a moderada (N=20)	Mediana	25,8	25,7	31,8	10,4	10,9	16,6	31,8
		(Min-Max)	(11,5-54,9)	(6,9-69,6)	(1,8-54,9)	(2,2-36,8)	(2,8-27,4)	(1,6-52,7)	(1,9-66,9)
	n	20	20	11	11	20	20	19	
	Acentuada (N=13)	Mediana	33,3	18,8	15,9	6,8	12,1	12,3	25,2
(Min-Max)		(16,5-43,4)	(8,2-63,3)	(1,7-44,0)	(1,9-20,0)	(5,8-60,6)	(1,6-38,3)	(4,1-68,5)	
p-valor ¹			0,24	0,48	0,66	0,46	0,43	0,68	0,82

¹Teste de Mann-Whitney

*p-valor<0,05

Nota: Min= Mínimo, Max=Máximo.

APÊNDICE N – Tabela 13. Esporotricose felina: Mediana de cada marcador celular estudado pela técnica de citometria de fluxo, em relação a presença de granuloma fúngico e a carga fúngica.

Variável			Percentual de células positivas						
			%CD4	%CD8	%CD8 ^{low}	%CD8 ^{high}	%CD21	%CD14	%Granulócitos
Granuloma fúngico	Presente (N=16)	Mediana	26,1	28,2	16,4	10,1	12,8	20,2	38,2
		(Min-Max)	(13,3-42,4)	(6,9-64,8)	(1,7-54,9)	(2,2-22,2)	(2,9-60,6)	(5,5-52,7)	(4,1-62,5)
		n	16	16	12	12	16	16	15
	Ausente (N=17)	Mediana	30,5	19,7	22,2	7,9	10,6	8,6	21,4
	(Min-Max)	(11,5-54,9)	(8,2-69,6)	(6,1-44,0)	(1,9-36,8)	(2,8-23,3)	(1,6-43,9)	(1,9-62,6)	
	n	17	17	8	8	17	17	17	
	p-valor¹		0,68	0,68	0,62	1,00	0,22	0,05*	0,14
Carga fúngica	Ausente (N=2)	Mediana	31,9	29,2	0	0	15,9	15,7	46,9
		(Min-Max)	(23,0-40,9)	(19,7-38,7)	0	0	(15,1-16,8)	(11,4-20,0)	(45,3-48,5)
		n	2	2	0	0	2	2	2
	>1<100 EL³ (N=10)	Mediana	29,2	20,8	21,9	9,5	9,7	7,9	18,4
		(Min-Max)	(11,5-54,9)	(8,2-69,6)	(6,1-39,5)	(5,9-36,8)	(2,8-22,3)	(1,7-43,9)	(4,9-62,6)
		n	10	10	4	4	10	10	10
>100 EL³ (N=21)	Mediana	26,7	27,7	16,4	9,1	12,1	18,4	34,8	
	(Min-Max)	(13,3-43,4)	(6,9-64,8)	(1,7-54,9)	(1,9-22,2)	(2,9-60,6)	(1,6-52,7)	(1,9-68,5)	
	n	21	21	16	16	21	21	20	
	p-valor²		0,84	0,82	0,93	0,51	0,30	0,42	0,29

¹Teste de Mann-Whitney

²Teste de Kruskal Wallis

³EL=Estruturas leveduriformes

*p-valor<0,05

Nota: Min= Mínimo, Max=Máximo.