

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ATIVIDADES DAS COLINESTERASES EM RATOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR
*Sporothrix schenckii***

TESE DOUTORADO

Verônica Souza Paiva Castro

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**ATIVIDADES DAS COLINESTERASES EM RATOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR
*Sporothrix schenckii***

Verônica Souza Paiva Castro

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cinthia Melazzo de Andrade

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**ATIVIDADES DAS COLINESTERASES EM RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE POR *Sporothrix schenckii***

Elaborada por
Verônica Souza Paiva Castro

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Cinthia Melazzo Andrade, Dra. (UFSM)
(Presidente/orientadora)

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)

Jessie Martins Gutierrez, Dr. (UFSM)

Rafael Rodrigues Ferreira (QUALITTAS)

Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR)

Santa Maria, 19 de agosto de 2015.

Dedico esta tese ao grande amor de minha vida, Jorge.

Meu esposo, amigo, companheiro e maior incentivador!

Seu exemplo me inspira a ser melhor quanto profissional e uma educadora capaz!

Sem você teria sido impossível chegar até aqui! Eu te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus Todo Poderoso, pela força e seu espírito santo.

Aos meus pais, Ernesto e Maria; meus irmãos Carolina, Rômulo, Caroline e Daniel, vocês são meus alicerces, meus tesouros, obrigada pelas palavras de encorajamento e orações em todos os momentos, amo vocês.

À minha orientadora Cinthia, agradeço a acolhida em Santa Maria, desde o primeiro dia. Obrigada por me aceitar e permitir que eu continuasse a estudar o agente infeccioso que é minha paixão.

À minha estagiária Iuli, sua ajuda e paciência foram fundamentais na conclusão dessa tese. Serei eternamente grata por sua dedicação!

Aos amigos e amados irmãos da congregação de Camobi, vocês foram minha família, companheiros dispostos em todos os momentos. Amo a cada um e jamais serão esquecidos. Obrigada por tudo!

A todos os professores das disciplinas que participei, muito obrigada pelo aprendizado, dedicação e apoio. Em especial, aos professores Sydney, Dominguita, Silvia e Fernanda que de uma forma bem especial me ajudaram na realização desse estudo.

Aos colegas veterinários, funcionários do LacVet e do Hospital Veterinário, foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos queridos amigos Márcio, Roberto e Aleksandro. Serei eternamente grata pela ajuda dispensada em todos os momentos. Vocês são minha inspiração de dedicação, perseverança e como educadores atenciosos. Tenho muito orgulho de ter aprendido com vocês.

À secretária da pós-graduação Maria que tanto perturbei, com inúmeros e-mails e telefonemas. Obrigada por todas as orientações e ajudas que prestou ao longo desses anos.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

“É importante fazer o que se gosta.
E melhor ainda gostar do que se faz,
E só se arrepender dos riscos não encarados”

Érico Veríssimo

RESUMO

Tese de Doutorado Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADES DAS COLINESTERASES EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Sporothrix schenckii*

AUTOR: Verônica Souza Paiva Castro

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Cinthia Melazzo Andrade

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de agosto de 2015.

A esporotricose é uma micose de implantação, causada pelo complexo de espécies *Sporothrix* spp., considerada a micose subcutânea com a maior ocorrência e importância nas Américas, esse fungo termodimórfico induz uma resposta inflamatória granulomatosa crônica em seus hospedeiros. As colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) desempenham um papel “chave” na sinalização de processos inflamatórios e imunes, por regular os níveis de ACh, o principal neurotransmissor da “via colinérgica anti-inflamatória”. A atividade das colinesterases tem sido demonstrada em várias condições inflamatórias, contudo, não há evidências de sua participação na esporotricose. O objetivo deste estudo foi relatar um caso de esporotricose felina por infecção natural; avaliar as atividades da AChE em linfócitos e no sangue total; avaliar a atividade da BChE; citocinas (IL1, IL6, TNF α , INF γ e IL10) e imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgE) no soro de ratos infectados experimentalmente por *S. schenckii*. Foram utilizados sessenta e três ratos distribuídos em três grupos, grupo controle (GC), grupo por infecção subcutânea (GSC) e grupo por infecção intraperitoneal (GIP). A coleta de sangue para avaliação das atividades das colinesterases, citocinas e imunoglobulinas foram realizadas nos dias 15, 30 e 40 pós-infecção (PI). No GIP, ocorreu um aumento na atividade das AChE no sangue em todos os tempos experimentais, nos linfócitos o aumento ocorreu apenas nos dias 30 e 40 dias PI. O aumento dessa enzima sugere uma diminuição nos níveis de ACh, com consequentemente aumento das IL-1, IL-6, TNF α , INF γ , como observado neste estudo. Na fase aguda da infecção deseja-se uma resposta inflamatória intensa na tentativa de eliminar o agente. Porém, com a cronicidade da infecção, se o estímulo for mantido pode acarretar marcante lesão tecidual. Com relação ao processo crônico observou no GIP, aos 30 e 40 dias PI, que a IL-10 mostrou-se aumentada, porém não sendo suficiente para conter a inflamação, pois as citocinas pró, continuaram com altos níveis. Inversamente o que aconteceu no GIP, o grupo SC obteve níveis reduzidos de IL-

10 em todos os tempos PI, este decréscimo pode levar a danos teciduais pelo não bloqueio da resposta inflamatória. A atividade da AChE, no GSC só se mostrou estatisticamente aumentada nos linfócitos, aos 40 dias PI. Não houve atividade estatística significativa ao avaliar a BChE, em ambos os grupos, exceto no GSC 40 dias PI. A BChE não é eficiente em hidrolisar ACh em baixas concentrações, mas ela pode substituir a AChE na hidrólise da ACh quando a mesma estiver inibida. Os altos níveis evidenciados das imunoglobulinas em ambos os grupos e em todos os tempos, demonstra a indução da resposta imune humoral na esporotricose. Assim, o aumento na atividade da AChE em sangue total e em linfócitos, juntamente com os elevados níveis de citocinas e imunoglobulinas séricas, sugere-se o envolvimento dessa colinesterase, na resposta imune e celular frente a infecção por *S. schenckii*.

Palavras-chave: Esporotricose experimental, Acetilcolinesterase, Butirilcolinesterase, inflamação.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

ACTIVITIES CHOLINESTERASE IN RATS EXPERIMENTALLY INFECTED BY *Sporothrix schenckii*

AUTHOR: Verônica Souza Paiva Castro
ADVISER: Prof^ª. Dr^ª. Cinthia Melazzo Andrade
Place and Date of Defense: Santa Maria, 19th August, 2015.

Sporotrichosis is an implantation mycose, caused by species complex *Sporothrix* spp., considered the subcutaneous mycosis with higher occurrence and importance in the Americas, this thermally dimorphic fungus induces a chronic inflammatory granulomatous response in their hosts. The cholinesterase, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are the "key" enzymes signal in inflammatory and immune processes, for regulating the levels of ACh, the main neurotransmitter "cholinergic antiinflammatory pathway". The cholinesterase activity has been demonstrated in various inflammatory conditions; however, there is no evidence of his participation in sporotrichosis. The objective of this study was to report a case of feline sporotrichosis by natural infection; evaluate the activities of AChE in the lymphocytes and whole blood; evaluate the activity of BChE; cytokines (IL1, IL6, TNF, and IL-10 INF γ) and immunoglobulins (IgA, IgG, IgM, IgE) in serum of rats experimentally infected with *S. schenckii*. Sixty-three rats were divided into three groups, control group (CG), group by subcutaneous infection (GSC) and group by intraperitoneal infection (GIP). Blood collection for activities evaluation of cholinesterase, cytokines and immunoglobulins were held on 15, 30 and 40 post-infection (PI). The GIP, had an increase in the activity of AChE in the blood in all experimental times, the increase in lymphocytes occurred only on 30 and 40 days PI. The increase of the enzyme suggests a decrease in the levels of ACh with consequently increased IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , as observed in this study. In the acute phase of infection wants an intense inflammatory response in an attempt to remove the agent. However, with the chronicity of infection if the stimulus is maintained can lead to remarkable tissue injury. Regarding the chronic process observed in GIP, 30 and 40 days PI, that IL-10 was shown to be increased, but not enough to contain inflammation, as pro cytokines, continued high levels. Conversely, what happened in the GIP, the SC group had reduced levels of IL-10 at all times PI, this decrease can lead to tissue damage by not blocking the inflammatory response. The activity of AChE in the GSC only statistically increased in lymphocytes, at 40 days PI. There was no significant activity when assessing the BChE, in both groups, except in the GSC 40 days PI. The BChE is not efficient in Ach's hydrolysis in low concentrations, but it can replace the AChE when itself is inhibited. High levels of immunoglobulins in all groups and at all times, shows the induction of humoral immune response in sporotrichosis. Thus, the increase in the AChE activity in whole blood and lymphocytes, together with high levels of serum immunoglobulins and cytokines, suggesting the involvement of cholinesterases, and in immune cell response against infection by *S. schenckii*.

Keywords: experimental sporotrichosis, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Sporothrix schenckii</i> . A: Forma micelial, conídios. B: Macrófago fagocitando numerosas estruturas leveduriformes (*) pleomórficas em seu citoplasma.....	14
Figura 2 - Esporotricose humana. Nódulos seguindo a cadeia linfática (seta), braço e antebraço. Lesões ulceradas em ponto de inoculação do fungo por arranhadura (cabeça das setas). Foto: arquivo pessoal.	15
Figura 3 - Esporotricose felina. Felino, macho, não castrado, apresentando lesões ulceradas encimadas por crostas hemáticas, em face e orelhas. Foto: arquivo pessoal.	16
Figura 4 - Lâmina confeccionada a partir de lesão exsudativa, em um felino. A micrografia revela numerosas estruturas leveduriformes pleomórficas (*), dispostas intra e extracelular. Sugestivo de infecção por <i>Sporothrix schenckii</i> (Panótico rápido, 1000x). Fonte: Arquivo pessoal.	18
Figura 5 - Lâmina confeccionada por <i>imprint</i> , a partir de lesão ulcero-exsudativa, em um felino. A micrografia revela escassas estruturas leveduriformes pleomórficas, intracelulares. A – Leveduras impregnadas pela prata, coradas em marrom (seta pequena), corante Grocott. ..	19
Figura 6 – Esporotricose experimental. Infecção intraperitoneal, rato, macho, adulto. A – Macroscopicamente os testículos apresentam com aumento e espessamento nas túnicas, com presença de várias nodulações. Corte transversal superior, mostra que o parênquima testicular intacto. B – microscopia revela parênquima testicular preservado e presença de granulomas em suas túnicas (400x). C – Granulomas em túnica testicular (1000x). D – Visualizam-se numerosas estruturas pleomórficas no interior do granuloma. As leveduras se destacam pela coloração por PAS (1000x).	20
Figura 7 - Sinapse colinérgica. Fonte: Ilustração da autora	23
Figura 8 - Diagrama esquemático ilustra a resposta imunológica pelo sistema colinérgico linfocitário.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
CHT	Transportador de colina
ChAT	Colina-O-Acetil-Transferase
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina
IL 1	Interleucina 1
IL 6	Interleucina 6
IL 10	Interleucina 10
INF γ	Interferon gama
mAChR	Receptores de acetilcolina muscarínicos
nAChR	Receptores de acetilcolina nicotínicos
PI	Pós-infecção
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	26
2.1	Artigo 1	26
2.2	Manuscrito.....	44
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea ou de implantação (QUEIROZ-TELLES et al., 2011), causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*, descrito por mais de um século como o único agente etiológico desta doença zoonótica (RIPPON, 1988). No entanto, com base em aspectos fisiológicos e moleculares, hoje é proposto que esta é causada por um complexo de espécies crípticas: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *S. schenckii sensu strictu*, *Sporothrix luriei* e *Sporothrix albicans* (MARIMON et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014). Essas espécies possuem características morfológicas semelhante, porém quanto aos aspectos genotípicos são distintas, e seu agente etiológico não estão distribuídos uniformemente entre as regiões (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; ROMEO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014).

O primeiro caso de esporotricose diagnosticado foi em 1896, em Baltimore, EUA, quando Benjamin Schenck, a partir de amostras procedentes de um abscesso em um paciente humano, isolou pela primeira vez o fungo, incluindo-o no gênero *Sporothricum*. Em 1900, Henkton e Perkins renomearam o agente para *Sporothrix schenckii*, um ascomiceto termodimórfico (SCHENK, 1898).

No Brasil, essa micose ficou conhecida desde 1907, quando Lutz e Splendore, fizeram o relato da infecção em humanos e em ratos no Estado de São Paulo. Até a década de 1990 a esporotricose foi considerada uma doença ocupacional, por infectar principalmente pessoas que trabalhavam diretamente com terra, como agricultores, jardineiros e floristas (DONADEL et al., 1993), e em alguns locais a transmissão ocorria pelo hábito regional da caça e pesca (ALVES et al., 2010).

O *S. schenckii* está presente naturalmente na natureza, já foi isolado do solo, folhas, plantas, espinhos de arbustos e material orgânico em decomposição (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001). O *S. schenckii*, é um fungo termodimórfico, ou seja, seu crescimento em temperatura ambiente, ocorre na forma micelial (22 a 28 °C) (Figura 1a), e em cultivo a 35 - 37 °C, ou in vivo, se desenvolve na forma leveduriforme (Figura 1b).

A esporotricose possui distribuição mundial, principalmente em países de clima tropical e subtropical, pode acometer o homem e várias espécies de animais, como cães, gatos, cavalos, peixes. É considerada a micose subcutânea de maior ocorrência e importância nas Américas (CONTI-DIAS, 1989).

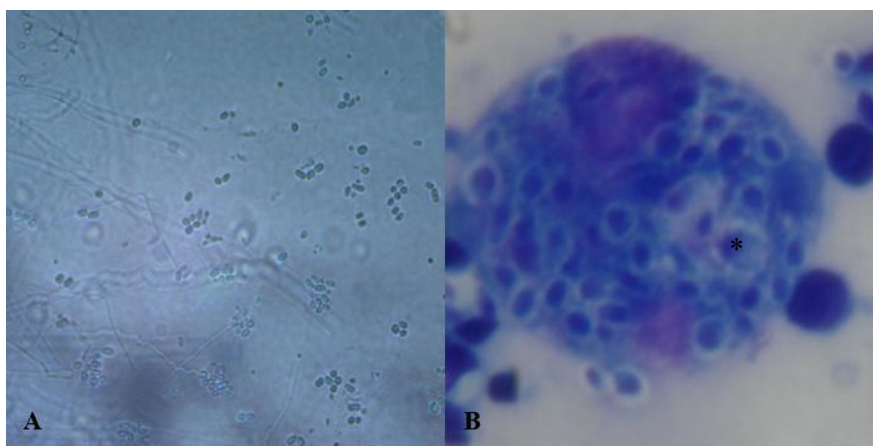


Figura 1 - *Sporothrix schenckii*. A: Forma micelial, conídios. B: Macrófago fagocitando numerosas estruturas leveduriformes (*) pleomórficas em seu citoplasma. Foto: arquivo pessoal.

Pode-se descrevê-la como micose de implantação (QUEIROZ-TELLES et al., 2011), pois sua transmissão ocorrer pela inoculação traumática do fungo na pele, decorrentes a acidentes traumáticos com espinhos, farpas, arranhadura ou mordedura de gatos portadores do fungo, onde este alcança o tecido subcutâneo, e por via ascendente chega até aos vasos linfáticos regionais (MORRIS-JONES, 2002).

No Brasil, as regiões Sudeste e Sul possui a maior número de relatos da esporotricose humana e animal (esporotricose felina). Estudos epidemiológicos revelam que no Estado do Rio de Janeiro possui a ocorrência de um surto epidêmico, o ciclo urbano da esporotricose nessa região está veiculada ao gato. Felinos infectados com a forma leveduriforme, potencialmente infectantes, disseminam de maneira mais rápida o fungo a humanos e a outros animais, como outros gatos e cães (BARROS et al., 2010, RODRIGUES et al., 2013).

Na região central do Rio Grande do Sul e no Uruguai, existem relatos da transmissão ao homem envolvendo o tatu (*Dasypus hybridus*), pelo hábito regional da caça desse animal (CONTI-DIAS, 1989; LOPES et al., 1999; ALVES et al., 2010). Nessas regiões ainda se encontra a infecção humana por exposição ocupacional de agricultores, apicultores, carpinteiros, jardineiros, pescadores (DA ROSA et al., 2005). Porém, segundo Madrid e colaboradores (2010; 2012), o cenário está mudando, após um estudo epidemiológico realizado demonstra-se que a esporotricose humana em ambientes urbanos estão aumentando na região Sul, com a participação zoonótica do felino, principalmente na cidade de Pelotas.

Habitualmente em humanos, os sítios de infecção são os membros inferiores e superiores, e a forma linfocutânea a manifestação clínica mais observada (Figura 2). Após a inoculação traumática, o fungo segue um trajeto ascendente nos membros, formando uma cadeia de nódulos, ao longo dos vasos linfáticos, podendo ulcerar ou não (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). Em crianças as lesões são mais comumente observadas na face (LOPES-BEZERRA et al., 2006; SONG et al. 2011; WILLIAMS et al., 2013).



Figura 2 - Esporotricose humana. Nódulos seguindo a cadeia linfática (seta), braço e antebraço. Lesões ulceradas em ponto de inoculação do fungo por arranhadura (cabeça das setas). Foto: arquivo pessoal.

A forma cutânea disseminada e extracutânea são consideradas raras, e estão relacionadas a pacientes imunocomprometidos, principalmente portadores do vírus HIV, diabetes tipo 1, tabagistas e indivíduos com hábito etílico, ocasionando nos casos mais graves, evolução para o óbito (RAMOS-E-SILVA et al., 2012; AGUINAGA et al., 2014; ESPINOZA-HERNANDEZ et al., 2014).

No felino doméstico, as lesões subcutâneas mais comumente observadas são as fixas ou cutâneo disseminadas, caracterizadas por nódulos e gomas que geralmente ulceram e drenam um exsudato purulento, que podem ressecar e resultar em crostas hemáticas, que encimam lesões ulceradas (FARIAS et al., 1997).

Os locais mais afetados são à região da cabeça (Figura 3), a parte distal dos membros e a base da cauda (MIRANDA et al., 2013). Os exsudatos provenientes de lesões nesta espécie apresentam uma riqueza parasitária, a qual confere ao gato um elevado potencial zoonótico (WELSH, 2003; SCHUBACH et al., 2004). Assim, o contato direto com secreções de lesões, mordeduras ou arranhaduras de felinos doentes, são as formas mais comumente conhecidas da transmissão desta micose (SCHUBACH et al., 2000; BARROS et al., 2004). Assim, na tentativa de diminuir os riscos na transmissão, procedimentos de biossegurança, são essenciais para quem irá manipular pacientes infectados (DA SILVA et al., 2012).



Figura 3 - Esporotricose felina. Felino, macho, não castrado, apresentando lesões ulceradas encimadas por crostas hemáticas, em face e orelhas. Foto: arquivo pessoal.

A esporotricose em cães se manifesta em sua grande maioria similarmente à infecção no homem. Relatos mostram que a forma cutânea fixa, linfocutânea e extracutânea prevalecem nesta espécie. Suas lesões apresentam raras ou pequena quantidade de estruturas fúngicas, que se concentram no interior dos granulomas, dificultando um diagnóstico rápido pelo exame citopatológico. Assim, como no homem, existe a necessidade do diagnóstico histopatológico e imunocitoquímico para marcar as leveduras causadoras da infecção (GOAD 1986; BERNSTEIN et al., 2007; MIRANDA et al., 2011).

Na esporotricose experimental o camundongo é considerado por muitos pesquisadores o animal de laboratório mais suscetível, e a inoculação intraperitoneal desses animais é reconhecida como o melhor teste biológico para a replicação do fungo (HACHISUKA, 1981). Porém, pesquisadores brasileiros utilizam ao longo dos anos o rato (*Rattus norvegicus*), como modelo experimental para esporotricose cutânea e disseminada.

A infecção experimental em ratos pode ser reproduzida na sua forma cutânea, através da inoculação do fungo no coxim plantar, metodologia já descrita (ANTUNES et al., 2009; MADRID et al., 2010). Para a reprodução da infecção disseminada da esporotricose é realizada a inoculação por via intraperitoneal onde o inóculo previamente preparado é introduzido na cavidade abdominal (MEINERZ a, MEINERZ b, 2008).

Os sinais clínicos evidentes da infecção intraperitoneal são edema e eritema em bolsa testicular, após aproximadamente 10 dias da inoculação. Estudos já demonstraram que o aumento testicular observado é decorrente ao espessamento das túnicas por infiltrado granulomatoso, onde o parênquima testicular não é afetado (CASTRO et al., 2012). Trinta dias pós-inoculação observa-se lesões em fígado, baço, lesões nodulares cutâneas e pode ocorrer efusão articular.

O diagnóstico definitivo da esporotricose é realizado pelo isolamento microbiológico do *Sporothrix* spp., porém, nem sempre é viável, devido à baixa quantidade do fungo. As amostras poderão ser obtidas através de raspados cutâneos, *swabs* das lesões ulceradas e fragmentos de biópsia. Em humanos também pode-se realizar a coleta através de escarro, líquido cefalorraquidiano, sinovial e amostras de sangue (KAUFFMAN, 1999).

Outro método de diagnóstico considerado sensível, eficaz, rápido e utilizado rotineiramente como triagem das lesões em gatos, é o exame citopatológico. Na maioria dos gatos que apresentam lesões ulcero-gomosas, cancros e lesões exsudativas há uma grande quantidade de elementos fúngicos, o que facilita a identificação do agente (PEREIRA et al., 2011).

Ao microscópio óptico observa-se um infiltrado inflamatório piogranulomatoso, com predomínio de neutrófilos, macrófagos e alguns linfócitos. As leveduras possuem padrão pleomórfico, variando entre as formas arredondadas, ovaladas e a forma clássica, em naveta ou “charutos” (Figura 4) (CAGNINI et al., 2012).

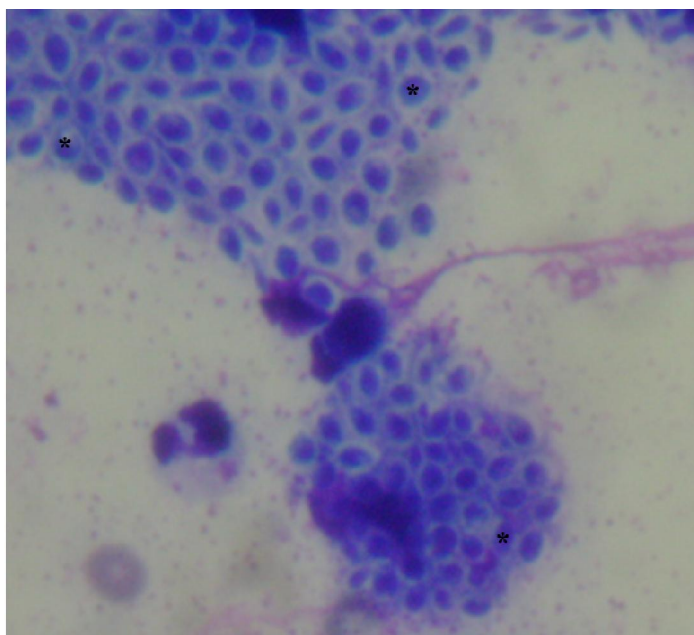


Figura 4 - Lâmina confeccionada a partir de lesão exsudativa, em um felino. A micrografia revela numerosas estruturas leveduriformes pleomórficas (*), dispostas intra e extracelular. Sugestivo de infecção por *Sporothrix schenckii* (Panótico rápido, 1000x). Fonte: Arquivo pessoal.

Em casos onde a presença de leveduras é diminuta pode-se utilizar colorações específicas, na tentativa de identificar o agente, tais como o ácido periódico de schiff (PAS) e o método de Grocott (impregnação pela prata) (Figura 5).

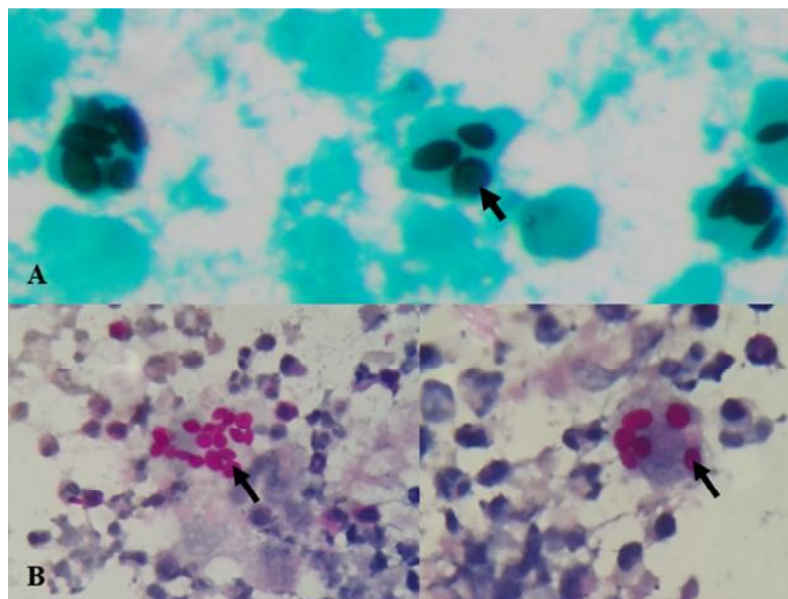


Figura 5 - Lâmina confeccionada por *imprint*, a partir de lesão ulcero-exsudativa, em um felino. A micrografia revela escassas estruturas leveduriformes pleomórficas, intracelulares. A - Leveduras impregnadas pela prata, coradas em marrom (seta pequena), corante Grocott. B - Leveduras coradas em rosa pink (seta), coradas pelo PAS (1000x). Foto: arquivo pessoal.

O exame histopatológico das lesões fornece um excelente recurso diagnóstico na identificação dessa micose crônica. No entanto, é preciso um patologista perito, ou um dermatohistopatologista, para suspeitar que a lesão em questão, apresenta padrões comuns de granuloma infeccioso, especialmente em algumas regiões endêmicas para um agente específico (SOUZA et al., 2009). Com isso, na tentativa de se encontrar o agente, é necessário que se faça múltiplos cortes nos tecidos a serem analisados, e se use corantes especiais (Figura 6) (CARDOSO et al., 2013).

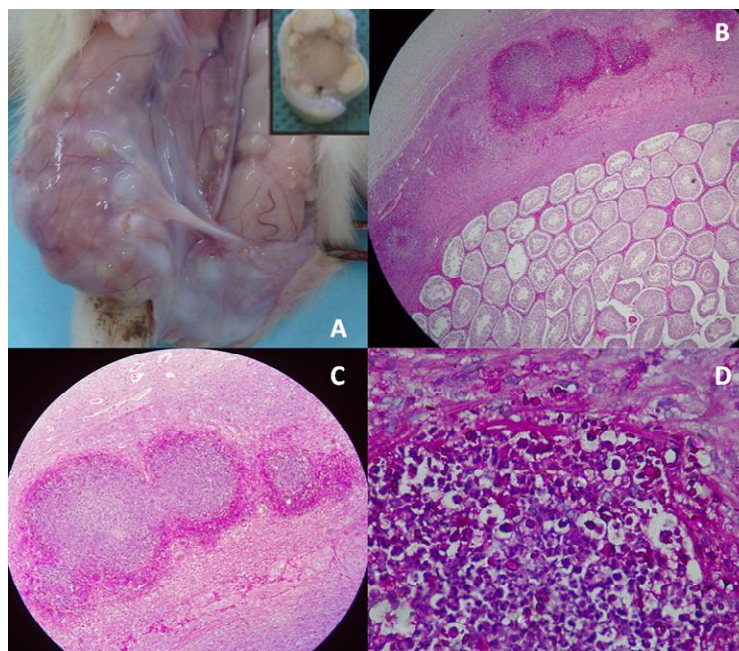


Figura 6 – Esporotricose experimental. Infecção intraperitoneal, rato, macho, adulto. A – Macroscopicamente os testículos apresentam com aumento e espessamento nas túbicas, com presença de várias nodulações. Corte transversal superior, mostra que o parênquima testicular intacto. B – microscopia revela parênquima testicular preservado e presença de granulomas em suas túbicas (400x). C – Granulomas em túnica testicular (1000x). D – Visualizam-se numerosas estruturas pleomórficas no interior do granuloma. As leveduras se destacam pela coloração por PAS (1000x).

O objetivo principal da resposta inflamatória granulomatosa é desativar ou destruir os microrganismos invasores (MICHEL e FERON, 1997). Diariamente, a população de uma forma geral, está exposta a vários tipos de agentes infecciosos, mas apenas uma minoria a desenvolve. Isso revela que a maioria dos indivíduos possui condições imunológicas satisfatórias de combater os microrganismos, a que são desafiados, impedindo a proliferação da doença (MACHADO et al., 2004), o que demonstra o papel fundamental da resposta imune na defesa do organismo contra patógenos.

A resposta imune pode ser inata ou adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo. Consiste nas barreiras físicas e químicas, como por exemplo, os queratinócitos (Q) e as células de Langerhans (CL) encontradas na epiderme. A pele é a principal barreira contra diversos microrganismos, uma vez lesionada, as células epiteliais secretam citocinas pró-inflamatórias atraindo células inflamatórias para o tecido. Outra defesa são os fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e as células natural Killer (NK) (TIZARD, 2002).

Às citocinas liberadas por fagócitos na resposta imune à infecção fúngica possui uma função regulatória específica. Como por exemplo, o fator de estimulação de macrófago (M-CSF), responsável pela modulação de fagócitos com consequente produção de peróxido de hidrogênio, e aumento de IL-1, IFN γ e TNF- α . (WUTHRICH et al., 2012).

Após a fagocitose do fungo as células dendríticas encaminham-se ao linfonodo regional para apresentação antigênica aos linfócitos, dando início a imunidade adquirida. Essa apresentação ocorre através do Complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II aos linfócitos T CD4+. Após a ativação dessas células ocorre uma diferenciação, ou dicotomia dos linfócitos T CD4+ em células Th1, Th2, Th17, capazes de produzir várias citocinas responsáveis na formação do granuloma (UENOTSUCHI et al., 2006).

A resposta inicial Th1 secreta IFN- γ , que consequentemente ativa os macrófagos, que aumenta a formação de óxido nítrico (ON), na tentativa de destruir o agente invasor. Estimulada pela IL-1 as células Th2 secretam interleucinas, por exemplo a IL-10. Através da estimulação da IL-6 as células Th 17 secretam IL-17 responsáveis pela atração de mais neutrófilos ao foco inflamatório (MAIA et al., 2006).

Na esporotricose granulomatosa, alguns fungos patogênicos do complexo de espécies *Sporothrix* apresentam melanina, que está relacionada a virulência do agente. Entretanto, estudos sugerem que esta melanina parece proteger os conídios de danos oxidativos por radicais livres e luz ultravioleta, além de conferir alta resistência à fagocitose pelos macrófagos (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

Assim, muitos macrófagos não conseguem desempenhar seu papel de fagocitose e hidrólise do agente, o que leva há um desequilíbrio no controle da resposta imune-inflamatória, onde mais fagócitos são recrutados, na tentativa de eliminar o agente. Conseqüentemente, a resposta crônica exacerbada produz efeitos deletérios ao tecido adjacente, devido a excessiva liberação de espécies de oxigênio e enzimas líticas (NATHAN et al., 1980).

A resposta imune humoral na esporotricose é estudada há décadas, sendo demonstrado que a participação de anticorpos específicos configura um importante mecanismo de neutralização do antígeno (FRANCO et al., 2012). Nascimento e colaboradores (2005), demonstrou a importância da resposta imune humoral, e determinou um componente antigênico importante na esporotricose experimental.

Na tentativa de melhor compreender a resposta imune humoral na esporotricose humana, Rodrigues e colaboradores (2015), usando uma abordagem imunoproteômica, identificou uma proteína de 70-kDa (gp70), como potencial alvo da resposta imune a esta micose. Esta proteína reagiu fortemente com anticorpos em reatividade cruzada por *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, e *Sporothrix globosa*, independente da manifestação clínica. Destaca-se em resumo que a resposta humoral à gp70, pode auxiliar no diagnóstico sorológico, e ser um importante alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra agentes da esporotricose.

Um estudo pioneiro sobre a participação das imunoglobulinas em pacientes humanos com esporotricose antes do tratamento, revelou a participação das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM em cerca de 85 a 95% dos pacientes, o que pode ser útil como parâmetro razoável na detecção sorológica da esporotricose (ALMEIDA et al., 2007).

A modulação da resposta inflamatória e imune pode ser avaliada por outras vias de sinalização, como por exemplo, a via colinérgica anti-inflamatória. O sistema colinérgico é um dos mais importantes caminhos modulatórios do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo fundamental em várias funções vitais relacionadas com o aprendizado, a memória, a organização cortical do movimento, bem como a regulação do fluxo sanguíneo cerebral, o que faz deste sistema um importante alvo de pesquisa (MESULAM, 2002).

Porém, o sistema colinérgico não está restrito apenas aos neurônios e sinapses, já está descrito a participação em sistemas como o urinário, e o respiratório (SALES, 2013). Esse sistema desempenha um importante papel no eixo neuro-endócrino-imune, modulando processos correspondentes (KAWASHIMA e FUJII, 2000; NANCE et al., 2007).

Estudos recentes demonstraram a participação do sistema nervoso parassimpático, através do nervo vago, na modulação da resposta imune e no controle da inflamação (ULLOA et al. 2005; BONAZ et al., 2013). Esse mecanismo vagal denomina-se “via colinérgica anti-inflamatória”, e a acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor dessa via (PAVLOV et al. 2005; DAS, 2007).

A molécula ACh é sintetizada no citosol de neurônios a partir da colina e da acetil coenzima-A (acetil-CoA) catalisada através da enzima *colina acetil transferase* (ChAT). A colina é proveniente da fenda sináptica, e atravessa a membrana do terminal do axônio por transporte ativo específico, enquanto a acetil-CoA, tem origem mitocondrial. Após sua síntese a ACh é armazenada em vesículas sinápticas através do *transportador vesicular de ACh* (vAChT). As moléculas de ACh ficam armazenadas nas vesículas pré-sinápticas, no terminal axonal. Por meio de um potencial de ação desencadeado, faz com que ocorra a liberação da ACh na fenda sináptica, e a sua ligação pode ocorrer aos receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR). A ACh que permanece na fenda sináptica é hidrolisada por colinesterases específicas (MESULAM et al., 2002; RANG et al., 2004) (Figura 7).

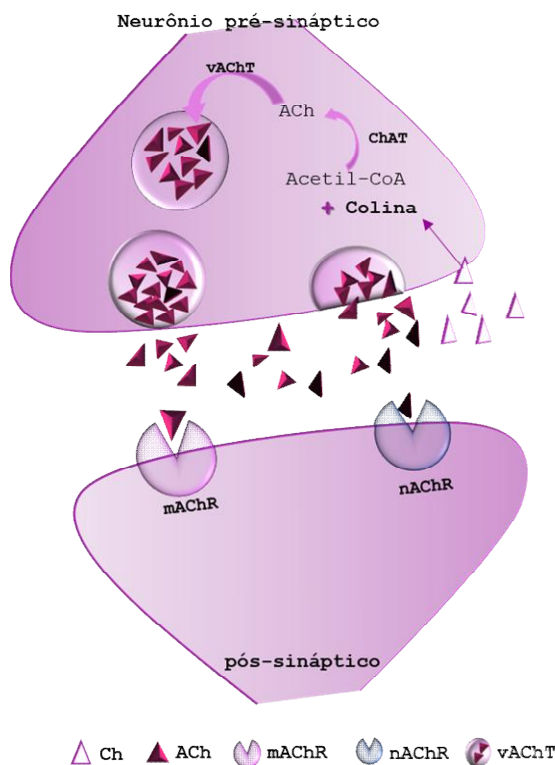


Figura 7 - Sinapse colinérgica.
Fonte: Ilustração da autora

Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) ou colinesterase verdadeira, que hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a ACh), e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) ou pseudocolinesterase, hidrolisa outros ésteres como a butirilcolina (TAYLOR e BROWN, 1999; DARVESH et al., 2003).

A BChE é uma enzima sérica produzida no fígado, sendo principalmente encontrada no plasma, rins, intestino, massa branca do cérebro, pulmão e em algumas glândulas endócrinas e exócrinas (KUTTY, 1980; MESULAM et al., 2002). A BChE não é eficiente em hidrolisar ACh em baixas concentrações, mas ela pode substituir a AChE na degradação da ACh quando a mesma estiver inibida, demonstrando que ela atua quando há uma maior disponibilidade de neurotransmissor (substrato) (SOREQ e SEIDMAN, 2001)

A ACh é considerada uma molécula anti-inflamatória, por modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), sem afetar a produção de interleucina 10 (IL-10), uma citocina também anti-inflamatória. (PAVLOV e TRACEY et al., 2005). Essa modulação é possível através da subunidade $\alpha 7$ do receptor de acetilcolina nicotínico expresso em macrófagos ativados e nos linfócitos T. Esse mecanismo ocorre de forma dose-dependente, ao se ligar aos receptores $\alpha 7$ nicotínicos, a ACh inibe a liberação das citocinas pró, como já mencionado. Conseqüentemente, se houver uma diminuição dessa molécula, as citocinas pró serão liberadas de forma mais acelerada. Esse mecanismo é conhecido como “caminho anti-inflamatório nicotínico” (ULLOA, 2005; DAS, 2007).

A modulação da resposta imune envolvendo a acetilcolina (ACh) depende inicialmente das células T, por participar da resposta imune inata, promovendo a proliferação e maturação dessas células. A síntese de citocinas, é regulada pela interação de receptores $\alpha 7nAChR$ e seus agonistas, como a ACh. Assim, a AChE desempenha um papel importante na sinalização imune, regulando a disponibilidade de ACh. Como demonstrado por Kawashima e Fujii (2000) a ACh sanguínea é originada de linfócitos T quando necessário e, em seguida, liberada sem necessidade de ser armazenada (Figura 8).

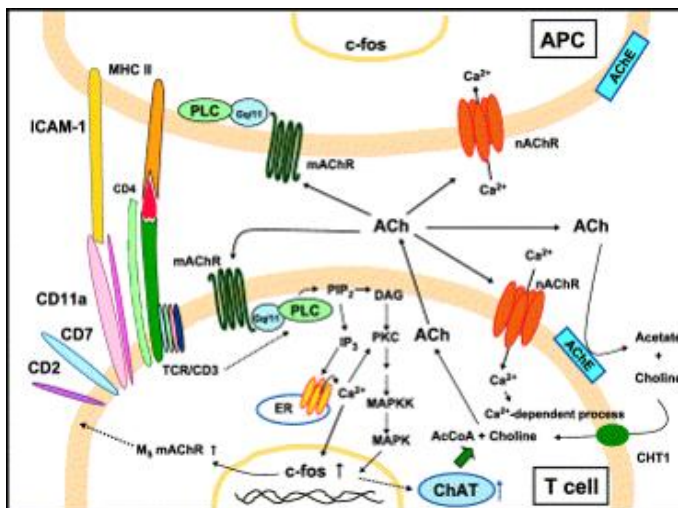


Figura 8 - Diagrama esquemático ilustra a resposta imunológica pelo sistema colinérgico linfocitário.
Fonte: Kawashima K., Fujii T., 2003.

Embora seja fácil diagnosticar clinicamente a inflamação aguda através de seus sinais cardinais, caracterizados por calor, rubor, dor, tumor e perda da função, existem enfermidades que, mesmo em estágios agudos, apresentam baixo grau de inflamação tornando difícil seu diagnóstico e controle, como em casos de pacientes com Alzheimer, diabetes melito, síndrome metabólica X e na obesidade humana e animal (PAVLOV et al., 2005; TVARIJONAVICIUTE et al., 2013).

Inovadores estudos evidenciam o grande interesse em se conhecer o sistema colinérgico anti-inflamatório, estes pesquisadores demonstram que as citocinas pró-inflamatórias reguladas por este sistema são importantes alvos farmacológicos para o tratamento de diversas doenças imune e inflamatórias (VAN ASSCHE, 2000; FELDMANN, 2002; ULLOA, 2005).

Em medicina veterinária estudos recentes demonstram a participação desta via em diversas infecções, como na leptospirose (DA SILVA et al., 2012), e na tripanossomose experimental (DA SILVA et al., 2010; WOLKMER et al., 2012; COSTA et al., 2012).

Assim, o objetivo deste estudo foi relatar o primeiro caso de esporotricose por infecção natural em um felino na região central do Rio Grande do Sul. E avaliar as atividades das colinesterases na esporotricose experimental.

2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Descreve-se a seguir os dados referentes a esta tese. O primeiro artigo refere -se ao relato de um caso de esporotricose felina, naturalmente infectado na região de Santa Maria, RS. E na forma de manuscrito, encontra-se os materiais e métodos, resultados, discussão do estudo inédito sobre esporotricose experimental e atividades das colinesterases.

2.1 Artigo 1

Esporotricose em um gato na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Verônica S. P. Castro, Camila B. Cartana, Sérgio Santalucia, Heloisa E. Palma,
Jorge L. C. Castro, Sonia T. A. L. Cinthia M. Mazzanti

Artigo publicado na revista Medvep Dermato

Esporotricose em um gato na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Verônica S. P. Castro, Camila B. Cartana, Sérgio Santalucia, Heloisa E. Palma, Jorge L. C. Castro, Sonia T. A. L. Cinthia M. Mazzanti

Verônica Souza Paiva Castro – Mestranda em Patologia Clínica pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM – Rio Grande do Sul.

Camila Basso Cartana - Médica Veterinária Autônoma, Pelotas, RS.

Sérgio Santalucia Ramos da Silva - Médico Veterinário Autônomo, Rio de Janeiro, RJ.

Heloisa Einloft Palma- Mestranda em Patologia Clínica do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM – RS.

Jorge Luiz Costa Castro - Doutorando em Cirurgia Experimental do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM – RS.

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes – Prof^ª. Dr^ª. Departamento de Clínica de Pequenos Animais do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – RS.

Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti - Prof^ª. Dr^ª. Departamento de Clínica de Pequenos Animais do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – RS.

E-mail: castrove@gmail.com

Resumo: A esporotricose é uma infecção subcutânea de evolução subaguda ou crônica, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Possui distribuição mundial, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. O gato é um importante transmissor desta enfermidade por apresentar em suas lesões numerosas leveduras, conferindo a esta espécie um elevado potencial zoonótico. A ocorrência da esporotricose felina na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, ainda não havia sido descrita na literatura, porém em humanos já é bem relatada, tendo como principais fontes de contaminação fragmentos de vegetais e o tatu, como o principal transmissor nesta região. Assim, este trabalho tem por objetivo relatar um caso de esporotricose felina naturalmente adquirida na cidade de Santa Maria, região central do estado do Rio Grande do Sul, fornecendo ao clínico melhor conhecimento sobre esta doença e seus métodos de diagnóstico para melhor identificação e tratamento desta dermatozoonose.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*, zoonose, citologia.

Abstract: Sporotrichosis is a subcutaneous infection with subacute or chronic evolution, caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. It has a worldwide distribution, mainly in regions with tropical and subtropical climates. The cat is an important spreader of this disease, once it has many yeast forms in its lesions, what confers to this species a high zoonotic potential. The occurrence of feline sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul State, Brazil, has not been described in literature yet, but in humans, this disease is well mentioned; the main sources of infection are vegetable fragments and the armadillo, the most important spreader in this region. Thus, the aim of this work is to report a case of feline sporotrichosis naturally acquired in Santa Maria city, central region of Rio Grande do Sul State, providing to the clinician a better knowledge about this disease and its methods of diagnosis, to a better identification and treatment of this dermatozoonoses.

Key words: *Sporothrix schenckii*, zoonosis, cytology.

Introdução e revisão da literatura

A esporotricose é uma micose subcutânea subaguda ou crônica que acomete o homem e diversas espécies de animais, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Esse fungo é classificado como geofílico, sendo considerado saprófita do solo, já tendo sido isolado de numerosos tipos de vegetações, espinhos de arbustos, roseiras e madeira (1). Sua transmissão ocorre através da inoculação traumática, onde o fungo é implantado no tecido subcutâneo do hospedeiro, levando assim manifestações clínicas diferenciadas entre as espécies. Esta enfermidade já foi conhecida como "doença das roseiras" entre jardineiros e floristas, como uma doença ocupacional (2). A distribuição geográfica e a epidemiologia da doença sugerem que o clima, a temperatura e a umidade influenciem no crescimento do fungo, o qual pode acometer o homem e várias espécies de animais, sendo descrito em diversos países (3-8).

Embora haja numerosos relatos da esporotricose humana e animal em caráter mundial, até o momento, em nenhum outro lugar do mundo esta micose assumiu proporções epidêmicas, envolvendo pessoas e gatos, como demonstrados em estudos preliminares, no Estado do Rio de Janeiro (RJ), Brasil (9). A transmissão pelo gato doméstico ao homem ocorre através de arranhadura e mordedura, sendo a incidência maior em adultos com uma faixa etária média de 39 anos (10,11).

O gato doméstico tem um papel importante na cadeia epidemiológica da esporotricose humana e animal (6,7,12-17).

Em contraste com a epidemia emergente observada no RJ, um cenário diferente é descrito na região central do Rio Grande do Sul (RS) e Uruguai. Nestas regiões existem casos esporádicos da esporotricose humana, sendo a forma de transmissão mais descrita relacionada com os hábitos da caça ao tatu.

As espécies, mais comumente encontradas nessas regiões, são *Dasypus hybridus*, *D. septemcinctus* e *D. novemcinctus*, estes animais vivem em tocas e são prováveis portadores do fungo em suas unhas (5).

Desde a década de 50, estudos vem sendo realizados para investigar as características desta enfermidade nessas regiões, e comparam a mudança significativa entre os humanos afetados. Nos períodos que correspondem aos anos de 1957 a 1997, ocorreu uma diminuição da incidência dos pacientes humanos com a esporotricose nas regiões rurais, em crianças e em mulheres, para um aumento na frequência em adultos e homens, de área urbana que praticam atividades relacionadas à caça e a pesca (18,19).

Recentemente, foram descritos 10 novos casos em humanos, oriundo da região central e oeste do RS, todos pacientes do sexo masculino e cuja à infecção estava relacionada à caça ao tatu (20).

Até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a transmissão envolvendo o gato doméstico, na região central do RS. Diferentemente o que ocorre na cidade de Pelotas, região Sul e na região metropolitana de Porto Alegre, capital do RS, onde há registros da transmissão zoonótica (17,21-23)

Por envolver animais na transmissão desta doença e ser esta considerada um problema para saúde pública, é de grande importância o papel do médico veterinário na investigação desta infecção micótica. É essencial saber identificar as lesões em um felino, ou apenas suspeitar de “feridas que não cicatrizam” e solicitar exames complementares para melhorar sua avaliação diagnóstica e também um confiável prognóstico terapêutico.

A manifestação clínica na espécie felina é observada por lesões cutâneas constituídas por nódulos e gomas que podem sofrer necrose de liquefação e ulcerar, drenando um exsudato purulento, o que leva à formação de crostas.

Os locais mais afetados são a região da cabeça e a parte distal dos membros (24). A riqueza parasitária presente nas lesões confere a esta espécie um elevado potencial zoonótico (25). Devido a esta característica peculiar, um estudo recente avaliou a sensibilidade do exame citopatológico no diagnóstico da esporotricose felina, mostrando ser este um exame rápido, pouco invasivo, de baixo custo, e considerado sensível e confiável na identificação das leveduras (26).

Este estudo ainda mostrou alguns fatores que podem levar a resultados falso-negativos, incluindo as coletas inadequadas, como por exemplo, material muito espesso nas lâminas e a não limpeza adequada das lesões, o que pode dificultar a visualização ao microscópio, devido à sobreposição celular. Também os tratamentos tópicos ou antifúngicos sistêmicos podem mascarar os agentes pela inibição de seu crescimento. Além disso, os profissionais responsáveis pela leitura das lâminas devem ser capacitados para diferenciar as estruturas de outras possivelmente parecidas (26).

Através da microscopia pode-se observar um grande número de estruturas leveduriformes, que possuem pleomorfismo, variando de formas clássicas “charutos” a formas arredondadas e ovaladas (27). Outro exame, considerado de eleição devido à sua alta positividade é a cultura microbiológica dos exsudatos, porém em alguns casos de manifestações clínicas localizadas, pode ocorrer resultado falso negativo, que não exclui o diagnóstico de esporotricose e, por isso, deve-se dar atenção especial ao material coletado.

As amostras submetidas à cultura podem ser provenientes dos exsudatos e de fragmentos do tecido (28). Antes da coleta do material é necessário contato prévio com o laboratório clínico veterinário, para obter informações sobre o acondicionamento das amostras, visando o melhor diagnóstico, conseqüentemente um melhor protocolo terapêutico.

Em casos onde os exames citopatológico, microbiológico e histopatológico não evidenciarem a presença do fungo por apresentar infecção diminuta, existem colorações

específicas como o ácido periódico de Schiff (PAS), corando as estruturas fúngicas em vermelho, e a chamada impregnação pela prata metanamina, utilizando a coloração de Gomori Grocott, é a mais sensível. Os fungos em seu aspecto citopatológico podem ser visualizados pela coloração enegrecida em seus limites, a mucina aparece em tons de castanho a cinza escuro, e a coloração de fundo em tom de verde-claro.

Estes corantes são largamente utilizados na pesquisa dos elementos fúngicos tanto nos cortes de tecido, quanto nos esfregaços provenientes de punções de nódulos, massas e por *imprint* de lesões ulceradas (28,29). Como diagnóstico diferencial, em casos de processos inflamatórios piogranulomatosos de etiologia desconhecida, além dos corantes específicos para fungos deve-se incluir também a coloração por Ziehl-Nielsen, importante coloração para as bactérias ácido-álcool resistentes, tais como, *Mycobacterium spp.* e *Nocardia spp.* (30,31).

Uma vez diagnosticada a esporotricose felina, o tratamento de eleição é o antifúngico itraconazol na dose de 100 mg/kg/SID, administrado por via oral (17). A administração deste fármaco deverá permanecer por mais 30 dias após a cicatrização das lesões. Existem casos em que a doença é refratária ao uso convencional do itraconazol, principalmente as apresentações em mucosa nasal. Para este tipo de lesão estudos demonstraram que tratamentos alternativos tem se mostrado satisfatório, como por exemplo, o uso de anfotericina B por via intralesional (32).

Assim, por ser a esporotricose uma dermatozoonose de grande importância para a saúde pública, e pela escassez de relatos na região Central do Rio Grande do Sul, o objetivo deste trabalho é descrever um caso de esporotricose felina, fornecendo ao clínico melhor esclarecimento sobre as características clínicas desta micose e seus métodos de diagnóstico para melhor identificação, tratamento e prognóstico.

Relato do caso clínico

Um gato macho, sem raça definida (SRD), não castrado, três anos de idade, foi atendido na cidade de Santa Maria, região Central do Rio Grande do Sul, com queixa principal de uma ferida em face que não cicatrizava, com evolução de dois meses.

Ao exame físico foram visualizadas lesões úlcero-crostosa, localizadas nas pálpebras superior e inferior direita, atingindo também a mucosa conjuntival (Figura 1). Segundo o proprietário o gato não apresentava espirros e se alimentava bem.

O exame físico revelou bom estado nutricional, e não foram observadas secreções conjuntival e nasal. O animal tinha livre acesso a rua e em seu habitat doméstico não coabitava com nenhum outro animal, mas tinha contato com terra e uma área rica em material vegetal.

Ao ser atendido já fazia uso de antibiótico, sem melhora clínica satisfatória. Foram solicitados exames para avaliação microbiológica e exame citopatológico das lesões. A fim de se obter material para realização de biópsia, o paciente foi anestesiado com uma associação de 10mg kg⁻¹ de cetamina®, 0,4mg kg⁻¹ de midazolam® e 2mg kg⁻¹ de tramadol®, por via intramuscular.

A biópsia incisional da margem da lesão palpebral foi realizada, sendo os fragmentos acondicionados em solução salina e encaminhados ao laboratório de pesquisas micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).



Figura 1: Felino. Lesão ulcero-necrótica, recoberta por crostas hemáticas, em pálpebra superior direita.

As amostras para a avaliação citopatológica foram coletadas pelo método de impressão das lesões, após ter sido feita previa limpeza com gaze e solução fisiológica para a retirada de crostas e células mortas.

As lâminas confeccionadas foram então encaminhadas ao laboratório de análises clínicas (LacVet-UFSM) e coradas pelo Panóptico® rápido ou Diff-Quick®. A microscopia revelou um infiltrado piogranulomatoso, caracterizado pela presença de neutrófilos degenerados, macrófagos e raras estruturas, ora arredondadas, ora alongadas. Com isso, na tentativa de esclarecer e caracterizar as estruturas visualizadas as lâminas foram coradas pela prata (Gomori-Grocott) e pela técnica de Ziehl-Neelsen.

Resultados e Discussão

Por se tratar de uma lesão crônica com evolução de aproximadamente dois meses, já pensando em um diagnóstico diferencial, quer fúngico quer bacteriano, as amostras foram coletadas e direcionadas respectivamente para os laboratórios específicos, na tentativa de se obter uma melhor avaliação diagnóstica.

A análise citopatológica da lesão revelou um processo piogranulomatoso, com predomínio de neutrófilos degenerados, macrófagos e em alguns campos presença de fibroblastos, indicando uma reparação tecidual (Figura 2). Esta resposta inflamatória é característica nas infecções por agentes infecciosos (26).

Foram também observadas estruturas dispostas isoladamente no meio intra e extracelular e raras sendo fagocitadas, de formato ora arredondado, ora alongado (Figura 3). Embora as estruturas visualizadas sugerissem uma infecção pelo fungo *Sporothrix schenckii*, o comportamento fúngico, neste caso, foi muito semelhante ao descrito nas infecções em cães e no homem (29,33), onde a baixa incidência das leveduras nos granulomas, requer o uso de colorações específicas.

Sendo assim, algumas lâminas foram coradas pela prata (Grocott), e foram observadas estruturas pleomórficas de coloração acastanhada, e o fundo da lâmina juntamente com as demais células apresentam coloração esverdeada (Figura 4). As lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen mostraram-se negativas.

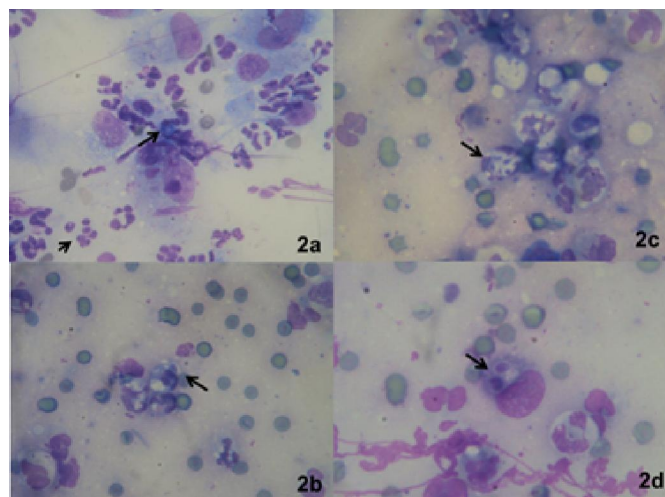


Figura 2: Processo inflamatório piogranulomatoso. Predomínio de neutrófilos degenerados (seta pequena). Presença de estruturas leveduriformes pleomórficas (setas). 2a – forma arredondada, extracelular. 2b – forma ovalada. 2c – várias leveduras fagocitadas por um neutrófilo. 2d – macrófago com duas leveduras intacitoplasmáticas. (Diff-Quik, 1000x).

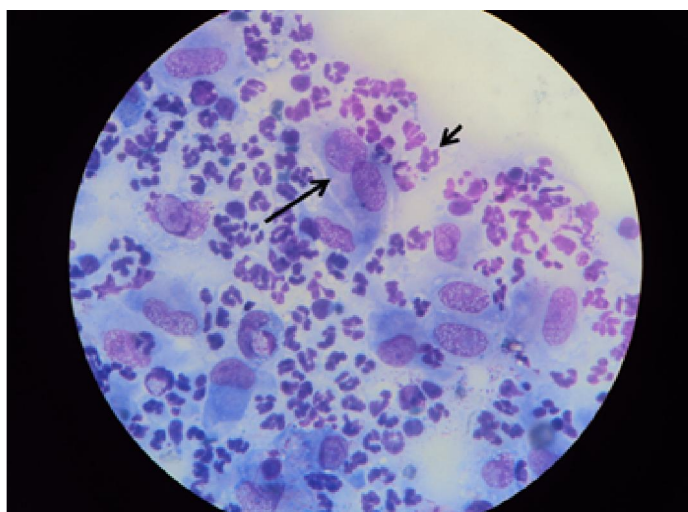


Figura 3: Processo inflamatório piogranulomatoso. Predomínio de neutrófilos degenerados (seta pequena) e macrófagos. Presença de fibroblastos, alguns binucleados (seta) (Diff-Quik, 1000x).

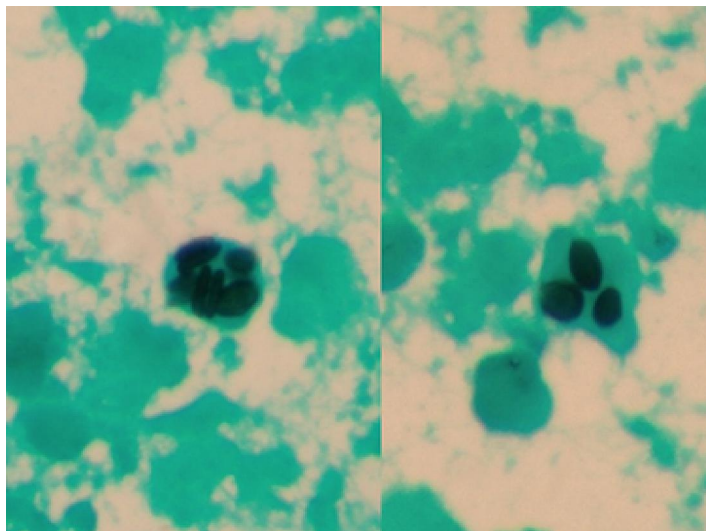


Figura 4: Estruturas fúngicas intracelular, impregnadas pela prata metanamina de coloração acastanhada e o fundo da lâmina e todas as células apresentam tom de verde-pálido (Grocott-Gomori, 1000x).

O diagnóstico através da cultura microbiológica, neste estudo, foi conclusivo, porém é importante ressaltar que a baixa carga parasitária, presente nas lesões desse felino, sugere um baixo potencial zoonótico. Fato este observado durante o período de evolução da lesão onde o animal arranhou acidentalmente seus responsáveis e nenhum deles desenvolveu a doença até o momento.

A escassa presença do agente na lesão é considerada um achado incomum para espécie, visto que os gatos são importantes transmissores da esporotricose principalmente pela riqueza parasitária em suas lesões, conforme descrito na literatura (2,26).

Assim, por ser este o primeiro relato de esporotricose felina descrito na literatura proveniente desta mesorregião do RS, considera-se esta constatação citopatológica de grande importância na investigação desta doença, servindo de alerta para médicos veterinários

clínicos e patologistas melhorarem sua anamnese e recorrerem a exames complementares para melhor avaliação diagnóstica, minimizando o diagnóstico falso-negativo, principalmente na avaliação citopatológica.

O tratamento instituído para este caso foi o itraconazol 10mg/kg/SID, sendo este antifúngico a medicação de escolha, por ter menores efeitos colaterais conforme demonstrado na literatura (17).

Do início da terapia antifúngica até a cicatrização de pele e mucosa com cultura negativa, somaram-se quatro meses, mas a medicação foi ministrada por mais dois meses após a total cicatrização da lesão. O animal foi reavaliado seis meses após o término do tratamento e não apresentou recidiva clínica.

Conclusão

Devido à baixa casuística e ausência de descrições da esporotricose felina na região Central do RS, este relato tem por finalidade alertar aos clínicos veterinários quanto às manifestações clínicas, principalmente em casos de gatos que apresentam feridas de evolução crônica que não cicatrizam. Embora não exista até o momento relatos da transmissão gato-homem nesta região e possivelmente em outras localidades brasileiras, por se tratar de uma zoonose, é essencial o comprometimento do médico veterinário, atuando na prevenção e manutenção da saúde pública. Portanto, através de um melhor conhecimento, diagnósticos diferenciados, ferramentas estas de grande importância que ajudarão a instituir tratamento adequado para os animais doentes, prevenindo assim a propagação da doença a outros animais e aos humanos.

Considerações finais

Estudos recentes estão sendo realizados nesta região em busca de se obter um melhor conhecimento da epidemiologia, manifestações clínicas e formas de tratamentos da esporotricose felina. Acredita-se que um trabalho em conjunto com a população e médicos veterinários, possa ser de grande ajuda no reconhecimento e controle desta enfermidade.

Referência bibliográfica

- 1- Welsh RD. Sporotrichosis. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223:1123-6.
- 2- Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27:427-31.
- 3- Kier AB, Mann PC & Wagner JE. Disseminated sporotrichosis in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175:202-4.
- 4- Dunstan RW, Langham RF, Reimann KA & Wakenell PS. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15:37-45.
- 5- Conti Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* 1989; 108:113-6.
- 6- Reed KD, Moore FM, Geiger GE & Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993; 16:384-7.
- 7- Schubach TM, de Oliveira Schubach A, dos Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TC, Monteiro DF et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 2002; 153:83-6.
- 8- Kovarik CL, Neyra E & Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol* 2008; 46:53-6.
- 9- Barros MBdLS, Tania Pacheco; Coll, Jesana Ornellas; Gremião, Isabella Dib; Wanke, Bodo *Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia.* 2010; 27:455-60.
- 10- Barros MB, Schubach Ade O, do Valle AC, Gutierrez Galhardo MC, Conceicao-Silva F, Schubach TM et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 2004; 38:529-35.

- 11- Barros MB, Schubach AO, Schubach TM, Wanke B & Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect* 2008; 136:1192-6.
- 12- Larsson CE, Goncalves Mde A, Araujo VC, Dagli ML, Correa B & Fava Neto C. [Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989; 31:351-8.
- 13- Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224:1623-9.
- 14- Schubach AO, Schubach TM & Barros MB. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N Engl J Med* 2005; 353:1185-6.
- 15- Schubach A, Schubach TM, Barros MB & Wanke B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1952-4.
- 16- Schubach A, Barros MB & Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:129-33.
- 17- Madrid IM, Mattei A, Martins A, Nobre M & Meireles M. Feline sporotrichosis in the southern region of rio grande do sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses Public Health* 2010; 57:151-4.
- 18- Londero AT. [Sporotrichosis in children. Interior of Rio Grande do Sul]. 1965; 67:1297-300.
- 19- Lopes JO, Alves SH, Mari CR, Brum LM, Westphalen JB, Altermann MJ et al. [Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32:541-5.
- 20- Alves SH, Boettcher CS, Oliveira DC, Tronco-Alves GR, Sgaria MA, Thadeu P et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil:

- epidemiological and antifungal susceptibility profiles. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:523-5.
- 21- de-Oliveira-Nobre M, Potter-de-Castro A, Caetano D, Leonardo-de-Souza L, Araujo-Meireles MC & Ferreira L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18:137-40.
- 22- da Rosa AC, 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.
- 23- Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobon A & Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2011; 49:225-36.
- 24- Werner AH & Werner BE. Sporotrichosis in man and animal. *Int J Dermatol* 1994; 33:692-700.
- 25- Schubach TM, Schubach Ade O, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PC et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec* 2003; 152:172-5.
- 26- Pereira SA, Menezes RC, Gremiao 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; 13:220-3.
- 27- Dunstan RW, Reimann KA & Langham RF. Feline sporotrichosis. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189:880-3.
- 28- Lacaz CS, Porto E, Martins, JEC, Heins-Vaccari EM. *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. SãoPaulo:Sarvier, 2002. 1104p.
- 29- Bernstein JA, Cook HE, Gill AF, Ryan KA & Sirninger J. Cytologic diagnosis of generalized cutaneous sporotrichosis in a hunting hound. *Vet Clin Pathol* 2007; 36:94-6.

- 30- Larsson C. E., Delayte E. H., A.C. B, Michalany N. S., Pinheiro S. R., Otsuka M. et al. Atypical mycobacterial dermatitis in cat: A case report. 2006; 58:1092-98.
- 31- da Silva D.A., Gremião I.D.F, Menezes R. C., Pereira S.A, Figueiredo F.B., Ferreira R.M.C et al. Autochthonous case of feline atypical cutaneous mycobacteriosis in the municipality of Rio de Janeiro-Brazil 2010; 38:327-31.
- 32- Gremiao ID, Schubach TM, Pereira SA, Rodrigues AM, Chaves AR & Barros MB. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. J Feline Med Surg 2009; 11:720-3.
- 33- de Miranda LH, Quintella LP, dos Santos IB, Menezes RC, Figueiredo FB, Gremiao ID et al. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). Mycopathologia 2009; 168:79-87.

2.2 Manuscrito

Cholinergic anti-inflammatory pathway in rats infected by *Sporothrix schenckii*

Veronica Souza Paiva Castro^a, Márcio Machado Costa^b, Francine Chimelo Paim^a, Aleksandro Schafer da Silva^c, Sydney H. Alves^d, Terezinha dos Anjos Lopes^a, Cássia Bagolin da Silva^a, Patricia Wolkmer^e, Jorge Luiz Costa Castro^f, Bianca Santana de Cecco^a, Marta Duarte^g, Maria Rosa Chitolina Schetinger^h, Dominguita Luhers Graça^a, Cinthia Melazzo de Andrade^a

^a Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS, Brazil

^b Department of Small Animals, Universidade de Passo Fundo - RS, Brazil

^c Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

^d Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Brazil

^e Department of Small Animals, Universidade de Cruz Alta – RS, Brazil

^f Department of Small Animals, Pontifical Catholic University, Curitiba -PR, Brazil

^g Department of Health Sciences, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria – RS, Brazil

* Correspondence and reprints. Address: Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil. Faixa de Camobi - Km 9, Campus Universitário, 97105-900, Hospital Veterinário, Sala 103, Santa Maria – RS, Brasil. Phone: +55 55 3220 8814. E-mail address: castrove@gmail.com (Castro, V.S.P); cmelazzoandrade1@gmail.com

Artigo submetido a revista Ciencia Rural

ABSTRACT

Sporotrichosis, zoonotic ringworm deployment, has higher incidence in the America, especially in Brazil. Caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, promotes an inflammatory reaction of chronic granulomatous type, very important disease to public health, especially in immunocompromised patients. The aim of this study was to evaluate the cholinesterase activity in serum, whole blood and lymphocytes, as well as verify their relationship with immune response in rats experimentally infected by *S. schenckii*. For this study were used 63 Wistar rats (*Rattus norvegicus*), male, adult, where they were divided into three groups: negative control group (G_C: n=21), group infected by subcutaneously (G_{SC}: n=21), group infected by intraperitoneal (G_{IP}: n=21). The groups were divided into subgroups (n=7) and were evaluated at 15, 30, and 40 days post-infection (p.i.) the following variables: acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood, butyrylcholinesterase (BChE) activity in serum, cytokines levels (IL-1, IL-6, TNF α , and INF- γ), immunoglobulins levels (IgA, IgG, IgM, and IgE), and protein profile by electrophoresis. In both groups infected by fungus was observed an increase in the levels of Inflammatory parameters (P<0.05) tissue and inflammatory infiltrates. The activities of AChE in lymphocytes and BChE in serum increased (P <0.05) significantly in animals G_{SC} in day 40 p.i. when compared to the G_C. Regarding the G_{IP}, there was a marked increase in the AChE activity in lymphocytes on 30 and 40 p.i. and in whole blood on days 15, 30, and 40 p.i. when compared to G_C. The increase in the cholinesterases activities leads to reduction in acetylcholine levels, an anti-inflammatory molecule. Thus, there may be exacerbated inflammatory process, confirmed by an increase in pro-inflammatory cytokines and inflammatory infiltrates tissue. Furthermore, IL-10, anti-inflammatory cytokine, was also in high levels of infection with chronic systemic infections in animals, suggesting a modulatory failure response, and therefore in defending against the fungus. Therefore it is concluded that cholinesterase has an

important modulatory role in the immune response during granulomatous infection by *S. schenckii*.

Keywords: Sporotrichosis, acetylcholinesterase, anti-inflammatory effect, interleukins.

1. Introduction

Sporotrichosis is a chronic granulomatous mycosis worldwide occurrence (1,2), caused by *Sporothrix schenckii* a dimorphic fungus, recognized now as a complex of cryptic species that contain six phylogenetically species related (3,4). The transmission occurs primarily for traumatic inoculation of the fungus on the subcutaneous tissue (5). In Brazil have being suffer for decades with the increase of sporotrichosis epidemic that is transmitted by felines in many areas of the country (6,7,8). The routine diagnostic and treatment became an emergency mostly because the new species that have being introduced (9,10).

An essential tool that deserves to be elucidated, are the inflammatory and immunological mechanisms involved in this zoonotic mycosis. It is known that the mediated innate immune by lymphocyte T and macrophages response perform an important part of the host protection against to *S. schenckii*. Pro-inflammatory cytokines such as interleukins (IL-1, and IL6), tumor necrosis factor (TNF- α), and IL-10, mediating an anti-inflammatory effect, are involved on the fungal response (11-14).

Another mechanism involved in the immune response against this mycosis is related to antibody production. The humoral immune response in the sporotrichosis is studied for decades, it was demonstrated that the participation of specific antibodies, such as the high level of IgG, constitutes a major antigen neutralization mechanism (15,16).

Studies demonstrate new modulatory pathways for inflammatory and immunological response, as example the cholinergic anti-inflammatory pathway regulate by the vagus nerve, this can modulate the innate immune response and avoid an inflammation by the

physiological mechanism (17-19). This mechanism takes place to the vagus nerve main neurotransmitter liberation the acetylcholine (ACh). This neurotransmitter regulates the cytokines pro-inflammatory liberation over the acetylcholine receptor (20). The enzyme that catalyzes the hydrolysis of ACh is call acetylcholinesterases (AChE), a fundamental process of the cholinergic system. Thereby the AChE activity has being used as an excellent inflammatory process marker. Herewith with this enzyme the butyrylcholinesterase (BChE) have being used as an inflammatory marker (18,21). Therefore, this study aim investigates the cholinergic system enzyme activity and its relationship with the immune response against fungal infection by *S. schenckii*.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Sixty-three adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), average 60 days old and 200 grams in weight; from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM), and were used in this experiment. They animals were allocated in cages in a room with control of temperature, about of 21 °C. Free access to water and standard chow ad libitum. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR/UFSM), N° 002/2011, in accordance with existing legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian laws and ethical principles published by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

2.2. Microorganism

Sporothrix schenckii strains (LAPEMI # 17) isolated from a feline presenting sporotrichosis was here employed. This strain previously identified as *S. schenckii* based on

micromorphology, physiologic and molecular characteristics (22) is maintained in potato dextrtose agar (PDA) in the collection of the Microbiology and Parasitology Department of the Federal University of Santa Maria.

2.3. Inoculum

S. schenckii, was cultured on PDA and incubated at 25°C for ten days. Sterile physiologic solution was added to the colonies and a mixture was obtained by scraping the surface of the colonies. This mixture of conidia and hyphal fragments was withdrawn and transferred to a sterile tube. After heavy particles are allowed to settle for 3 to 5 minutes, the upper homogeneous suspension was transferred to another sterile tube. This supernatant was used for count the conidia on hemocytometer and the inoculum were adjusted to $3,0 \times 10^6$ conidia/ml, with sterile physiologic solution.

2.4. Experimental design

Were used 63 rats, these were separated in three groups, according with the inoculation pathway: control group (G_C), subcutaneous group (G_{SC}), intraperitoneal group (G_{IP}).

2.4.1. The G_C : Corresponding to uninfected rats ($n=21$ health animals). These animals will be the negative control for both pathways.

2.4.2. The G_{sc} : Rats infected by subcutaneous pathway group by *S. schenckii* ($n = 21$). The rats were infected by subcutaneous pathway on the left footpad with a volume of 0.2 mL of the inoculum.

2.4.3. The G_{IP} : Rats infected by the intraperitoneal pathway group by *S. schenckii* ($n = 21$). The rats were infected by the intraperitoneal pathway with a volume of 1.5 mL of the inoculum.

2.4.4. Pre and post-inoculation procedures: The inoculation was made in anesthetized animals with isofluran on the anesthetic chamber. The rats were evaluated daily as the manifestation of clinic signs of the infection and body temperature. The systemic evaluation and a consequent blood and tissue collection were made in three different times 15, 30 and 40 days after the infection. In every period of time was evaluated 21 rats ($G_C = 7$; $G_{SC} = 7$; $G_{IP} = 7$).

2.5. Separation of tissues: Culture and isolation of the agent, cytologic and histopathological evaluation

2.5.1. The G_{SC} : The animals were made blades for cytologic evaluation using the imprint method of the ulcerated wounds on the inoculation point and subsequently coloring with the Diff-Quick dye and silver impregnation (Grocott). Tissue fragments were collected from popliteal regional lymph node, liver and spleen. Also fungal cultures of the tissue were made to confirm the infection.

2.5.2. The G_{IP} : Tissue fragments were collected for histopathologic exams. Testicles, regional popliteal, lymph node, liver, spleen, mesentery lymph node and lung. Fungal cultures were made to confirm the infection.

2.6. Preparation of blood samples

At 15, 30 and 40 days post inoculation (pi) the animals were anesthetized with isoflurane for blood collection by cardiac puncture. Blood samples for hematology were collected in tubes containing EDTA. For determination of the blood AChE activity the whole blood was haemolysed in 0.1 mmol l⁻¹ potassium/sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.03% Triton X-100, 1:100 (v/v). The samples for enzymic assay were frozen at -20 °C until analysis. Samples of blood were stored in tubes with anticoagulant (10% EDTA)

for separation of lymphocytes. The peripheral lymphocytes were isolated using Ficoll Hypaque density gradient as described by Böyum et al. (23). After separation, only samples with at least 95% of lymphocytes, as verified in a Coulter STKS haematology analyser, were used. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells excluding 0.1% Trypan blue and measuring lactate dehydrogenase activity (24). A fraction of whole blood was placed in the tube without anticoagulants; clot retraction after the sample was centrifuged for 8 min at 5000 rpm to separate the serum. Serum samples were then divided into microtubes and assay were frozen at - 20 °C, for further analysis of BChE activity, cytokines and proteins.

2.7. AChE activity in total blood.

The AChE enzymatic assay in whole blood was determined by the method described by Ellman et al. (25) as modified by Worek et al. (26). The incubation system was composed of sodium phosphate buffer 0.063 mM pH 7.4, DTNB 0.316 mM and 0.5 ml of the hemolyzed blood. The increase in absorbance was registered over 2 min at 436 nm. The specific activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin concentration and the results were expressed as mU/l mol Hb.

2.8. AChE activity in lymphocytes

After isolation of the lymphocytes, AChE activity was determined according to the method described by Ellman et al. (25) as modified by Fitzgerald and Costa (27). Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg mL⁻¹, and 0.2 mL of intact cells was added to a solution containing, 1.0 mmol acetylthiocholine (ACh), 0.1 mmol DTNB and 0.1 mmol phosphate buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 min at 27 °C the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. AChE activity was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content and the results were expressed as µmol ACh mg of protein.

2.9. BChE activity in serum

The enzymic activity of BChE in serum was determined by the method of Ellman et al. (25). The system, containing 0.1 mol l⁻¹potassium phosphate buffer, pH 7.4, DTNB 0.30 mmol l⁻¹ and 50 ml plasma, was incubated for 2 min at 30 °C and the reaction was started by the addition of 1 mmol butyrylthiocholine (BcSCh). The reading was performed by spectrophotometer for 2 min at 412 nm. The enzyme activity was expressed as μmol BcSCh consumed h⁻¹ (mg protein)⁻¹.

2.10. Cytokines

Cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits for rat IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6 and IL-10 (eBIO-SCIENCE, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96 well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature (RT) for 30 min and then the sample was added and incubated (37 °C temperature, for 30 min). After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

2.11. Immunoglobulins

Immunoglobulins IgM, IgG, IgA and IgE were determined using ELISA commercial kits (Quantitation Set[®]) according to the manufacturer's instructions. Were processed at a dilution of 1:3600 and were compared with the results obtained in the calibrator curve (R²> 0.93). Each sample was performed in triplicate.

2.12. Statistical analysis

The statistical analyzes aimed to compare groups: G_c versus G_{sc} , and G_c versus G_{IP} . The data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) for means comparison with subsequent application of the Student's t-test to verify the accuracy of results. The analyses were performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) with a significance level of 5% ($P < 0.05$). The values were represented as mean \pm standard deviation. All samples were processed in triplicate.

3. Results

3.1. Disease Course

Rats from G_{sc} showed swelling and nodules at the inoculation site after 12 days post-infection (p.i.). The ulcerated lesions at the inoculation point and back paws were viewed from 15 days p.i. In rats of G_{sc} , a significant increase in the popliteal regional lymph node near to the inoculation site was observed. The animals from G_{IP} revealed increased testicular pronounced with 9 days p.i. Necropsy findings observed the gross changes in liver, spleen, and testicles. The large increase in testicular evidenced from nine days remained throughout the experiment, but through longitudinal sections, it can be seen that the increase was due to thickening of the capsule. Nodules of varying sizes are present only in the capsule; the testis was normal appearance. The natural surface of the liver was shown with numerous small dots of shiny color, white, having variable sizes. The animals from G_{IP} , at 40 days p.i have visibly anasarca and edema in the joints (Figure 1).

3.2. Acetylcholinesterase activity in lymphocytes

On the 30 and 40 days in the group G_{IP} , the AChE activity in the lymphocyte had a meaning increase ($P < 0.01$), compared with group G_c . However, on the 15 days had no

statistic activity between G_{IP} and G_c (Figure 2a). It was also observed a significant increase in AChE activity in lymphocytes of rats the group G_{sc} at 40 days p.i. compared to G_c .

3.3. Acetylcholinesterase activity in total blood

AChE activity in the group G_{IP} accorded a meaning increase on the 15 days ($P < 0.01$), 30 ($P < 0.05$) and 40 ($P < 0.01$) compared with the group G_c . In the subcutaneous pathway do not have any significant activity compared with the group G_c (Figure 2b).

3.4. Butyrylcholinesterase activity in serum

Between both studied pathways, only the subcutaneous pathway (G_{sc}) on the 40 days had a significant increase ($P < 0.05$) in BChE activity in serum when compared with the G_c (Figure 3).

3.5. Cytokines

The cytokines level had a substance increase ($P < 0.01$) on infected animals in both pathways when compared with control group (Figure 4 and 5). Was observed an increase of IFN- γ serum level on group G_{IP} on 30 and 40 days p.i and the animals of group G_{sc} had the IFN- γ increase on 15, 30, and 40 days p.i. The pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1, and IL-6, shows high in both pathways during 15, 30, and 40 days p.i. The anti-inflammatory cytokine IL-10 on the rats of group G_{sc} had a decrease ($P < 0.01$) when related with the group G_c . And on animals of group G_{IP} had an increase ($P < 0.05$) on 30 and 40 days p.i, when compared with group G_c .

3.6. Immunoglobulins.

There was an increase ($P < 0.01$) of immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, and IgM) on both pathways on 15, 30 and 40 days p.i. (Figure 6). With the evolution of the disease was

possible to verify that the IgM and IGA levels reduced, that is, the highest levels were observed in day 15 p.i. when compared to day 40 p.i. The contrary was also observed, i.e., IgG and IgE levels increased with progression of the disease, which constitutes a classic inflammatory response to infectious agents.

3.7. Culture and isolation of the agent, cytology and histopathological evaluation.

3.7.1. Culture

Was checked the fungal growth in all organs in two pathways, except the group G_{IP} that in lung did not present any fungal growth.

3.7.2. Histopathological

In animals were not found any fungal structures in the lung on the histopathological exam by a special dye. The animals of G_{IP} relative to testicles, the histology shows a testicular increase that was observed macroscopically is due the growth of testicular tunics caused by a piogranulomatous infiltrate and presence of pleomorphic yeast structures inside (Figure 7). Being preserved the testicular parenchyma that did not have any signal of agent. The G_{sc} presented evidence of piogranulomatous infiltrate inoculation point, left foot pad, and especially in regional popliteal lymph node.

3.7.3. Cytology

Were just made in G_{sc} animal's ulcerative injuries revealing intense piogranulomatous with fungal structures present. For a better viewing of the tissue that were stained with fungal specific dye.

4. Discussion

In the present study, we reproduce sporotrichosis in Wistar rats, an effective experimental model in the reproducibility of infection (29-31). The isolated *S. schenckii*, was inoculated in duplicate, without objective comparison between these since the infectious dose was different, but find what effect the disease on cholinesterases and its relationship to immune response. Subcutaneous infection was used to better represent the natural infection of this mycosis, being held in the left footpad. Similar experiment found alterations in leukocyte count, being checked leukocytosis by increase of neutrophil. The number of lymphocytes presented oscillations according of inoculation route, i.e., in some times occurs increased and reduced others (31). Therefore, the current study was possible to verify clinical signs resulting from sporotrichosis, as well as increased activity of inflammatory mediators and cholinesterases. These alterations may be directly or indirectly related to the pathogenesis of the disease, as discussed below.

Immunological mechanisms involved in sporotrichosis are well defined regarding the cellular response (11, 14). One can clearly observe the involvement of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ . In this study, IFN- γ levels proved to be high, especially related to group G_{SC} in three analysis periods. This significant increase indicates the involvement of this cytokine in the activation of macrophages produced by CD4 + T lymphocytes, described by Tachibana et al. (1999). The same does not occur in rats G_{IP} 15 days pi, probably as described by Uenotsuchi et al. (2006), the adaptive response against infection in extracutaneous sporotrichosis, is better related to Th2 differentiation in its acute, early stage. In an attempt to form granulome, essential and critical component in the defense against *Sporothrix*, activated macrophages by IFN- γ , other release pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1, increase the levels of these cytokines may be viewed in the present study, in both routes of infection. Thus demonstrating the involvement of these cytokines front of the fungal

infection, as described by other authors, where the activation of CD4 + T cells macrophages, plays a key role in the defense mechanism against sporotrichosis (32-35). Interleukin-6 (IL-6) also showed high levels in both ways infection, and this increase to be expected since this cytokine secreted primarily by macrophages and their inducers are larger TNF- α and IL-1 cytokines already described effective participation against *Sporothrix* (16). In the acute phase IL-6 is the main stimulator of the production of positive acute phase proteins, among them fibrinogen, C-reactive protein, haptoglobin, which may explain the increase of the alpha fraction and betaglobulina in rats with fungal disease in this study. However, with the increase of the cytokines, TNF- α , IL-1 and IL-6 in hepatocytes where it is modulated synthesis of proteins can cause a decrease in the serum albumin. Albumin is a negative acute phase protein, that suffer a decrease in plasma or serum concentration before an inflammatory process. It was observed in animals G_{IP} a decrease of albumin at all times of infection, probably related to those formed in the liver granulomas, which release pro-inflammatory cytokines, and inhibiting the synthesis of this protein. In rats G_{SC} occurred decreased albumin at 15 days p.i., which can be explained because it is a local infection, unlike the systemic infection of rats G_{IP}.

According to this study, interleukin 10 (IL-10) may show a different behavior according to route of infection, and this Interleukin is known as a factor inhibiting cytokine synthesis (CSIF), because it is an anti-inflammatory cytokine. It downregulates the expression of Th1 cytokines, MHC class II antigens and costimulatory molecules on macrophages. It also enhances the survival of B cells, proliferation and antibody production, so IL-10 may block the NF- κ B activity, inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines (36). In this study, we observed a significant decrease in IL-10 levels in the group G_{SC} when compared to the group G_c at all times of infection, this decrease can cause exacerbated tissue damage because there is no blocking the inflammatory response, as described by Sassá et al. (2009). In animals

GIP on 30 and 40 p. i., there was a significant increase in levels of IL-10, high levels of this cytokine has been described in chronic yeast infections, as in the case of *Candida* (37) mainly by inhibiting INF- γ , this increase is expected in an attempt to modulate/inhibit proinflammatory cytokines (14).

The role that antibodies play in sporotrichosis are not entirely clear. Recent studies demonstrate the involvement of IgG, and the IgG1 isotype listed in opsonization and subsequent phagocytosis increasing the effectiveness of antigen (15). Our results show a significant increase in immunoglobulin M, G, A, and E in both infection route. As the main IgM antibody in the acute phase, followed by IgG, the primary antibody of the adaptive immune response already acknowledged their involvement in complement activation, and chemotaxis neutrophil. The increase in IgM and IgG were described in experimental infection by *C. neoformans* (38), as in the present study. Immunoglobulins are part of the gamma-globulin fraction of protein concentrations reported in the current study, which fraction is increased only in some periods, despite the high immunoglobulins are screened in all times, which would not know explain.

In this study we found that increase in AChE activity in whole blood and lymphocytes mainly in systemic infection. New studies indicate via the cholinergic anti-inflammatory, capable of modulating the immune response and inflammation by stimulating efferent vagus nerve, and acetylcholine (ACh) as their main neurotransmitter (20). ACh is considered an anti-inflammatory molecule, because through nicotinic receptors ($\alpha 7nAChR$) in tissue macrophages and T lymphocytes, regulating the synthesis and secretion of pro-inflammatory cytokines (17, 18, 39). It is worth noting, ACh is hydrolyzed by the enzymes AChE e BChE, which are used by various researchers and clinical routine as inflammation markers (17,18). Therefore, the cholinergic system may be related to pathogenesis of disease.

AChE activity was increased only in animals G_{IP} (systemic infection) on days 15, 30 and 40 pi, this infection route that causes a slight reduction of the variable erythrogram (31). According of literature, to examine the role of AChE in hematopoietic cell proliferation and differentiation, researchers (40) administered a 15-mer phosphorothioate oligonucleotide, antisense to the corresponding ACHE gene (AS-ACHE), to primary mouse marrow bone cultures. The researchers suggest that the hematopoietic role of AChE, anticipated to be inverse to the observed antisense effects, is to reduce proliferation of the multipotent stem cells committed to erythropoiesis, megakaryocytopoiesis, and macrophage production and to promote apoptosis in their progeny. Moreover, this finding may explain the tumorigenic association of perturbations in AChE gene expression with leukemia. Based on these data, one can suspect that the increase AChE activity in rats may be intended to offset the low anemia observed during the sporotrichosis, reported by Castro et al. (31).

In lymphocytes was observed high AChE activity in rats G_{IP} on days 30 and 40 p.i., even occurring reduction and increase in the number of lymphocytes, respectively, as previously described by Castro et al. (31). Already in animals of group G_{SC}, only in day 40 was observed a significant increase in AChE activity, but no difference in the number of lymphocytes compared to G_c. Note that the lymphocytes have essential components of non-neuronal cholinergic system independent, so the synthesized and released ACh from lymphocytes acts as an immunomodulator (17). Therefore, the increase of AChE in lymphocytes may be related to increased enzyme expression on the cell surface as an anti-inflammatory effect (17, 18,41, 42), aiming to hydrolyze the free ACh even in lymphocytosis or lymphopenia situation already described in rats experimentally infected by *S. schenckii*.

In this study, it was observed only in the G_{SC} on day 40 pi an increase BChE activity in serum enzyme also involved in the regulation of the cholinergic system (43-45). This increase was probably due to the late pro-inflammatory response, in order to reduce the

concentration of ACh, a molecule that has anti-inflammatory properties as already described above. Generally, BChE increases when AChE is not activated, as we see in whole blood, where AChE did not change throughout the experiment. Importantly, the systemic infection (GIP) did not affect the liver in order to interfere with the production of BChE, enzyme synthesized in this organ, despite the histological lesions described.

Thus, we can conclude that rats infected by *S. schenckii* develop clinical disease, as well as present pathological lesions with cell changes and inflammatory infiltrates, cellular sized taxa as well systemic inflammatory response and exacerbated humoral verified by the increase of cytokines, immunoglobulins and globulins. Furthermore, the significant increase of acetylcholinesterase activity in the systemic infection, associated with elevated levels of pro-inflammatory cytokines suggests the decrease of ACh molecule with evident exacerbated inflammation. Thus, with evaluating the activities of these enzymes, it is believed that the anti-inflammatory cholinergic system have a participation as immunomodulatory in the experimental sporotrichosis.

References

- 1- Bustamante B, Campos P.E. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p. 145-149, 2001.
- 2- Queiroz-Telles, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n.3, pp. 225-236, 2011.
- 3- Romeo, O. Criseo G. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex? New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii* sensu stricto isolates. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 203-206, 2013.
- 4- Fernandes, G.F. et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, n.4, v.3, p. 241-249, 2013.
- 5- Welsh, R.D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, n.8, p. 1123-1126, 2003.
- 6- Barros, M.B.L. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.27, n.6, p.455-60, 2010.
- 7- Madrid, I.M. et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: A description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v.173, p. 265-273, 2012.
- 8- Da Silva, M.B.T. Urban sporotrichosis: A neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, n.28, v.10, p. 1867-1880, 2012.
- 9- López-Romero, et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, v.6, n.1, p. 85-102, 2011.
- 10- Rodrigues, A.M. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant sporothrixspecies. **Emerging Microbes and Infections**. v.3, art. no. e32, 2014.

- 11- Carlos IZ, et al. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. **Mycopathologia**, v.117, n.139, 1992.
- 12- Tachibana T, et al. Involvement of CD4+T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Medical Mycology**, v. 37, n. 397, 1999.
- 13- Uenotsuchi T, 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. **International Immunology**, v. 18, n.12, pp. 1637-1646, 2006.
- 14- Sassa, M.F. et al. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a sporothrix schenckii lipid extract during experimental sporotrichosis. **Immunology**, v.128, n.2, p. 301-309, 2009.
- 15- Nascimento, RC & Almeida, SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.241-247, 2005.
- 16- Franco, DL et al. Antibodies against *Sporothrix schenckii* enhance TNF- α production and killing by macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.75, n.2, pp. 142–146, 2012.
- 17- Kawashima K and Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v.74, p. 675-696, 2003.
- 18- Das, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of lowgrade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, Polônia, v. 13, n. 12, p. 214-221, dez. 2007.

- 19-Bonaz, et al. Vagus nerve stimulation: From epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 3, p. 208-221, 2013.
- 20-Nizri E., Brenner T. Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic system. **Amino Acids**, v. 45, n. 1, pp. 73-85, 2013.
- 21-Pavlov VA and Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain Behavior Immunity**, v.19, p. 493-499, 2005.
- 22-Marimon, R.J. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3251-3256, 2006.
- 23-Böyum, A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes From Human Blood. **Scandinavian journal of clinical and laboratory Investigation**, v. 97, p. 77-89, 1968.
- 24-Strober W. **Trypan blue exclusion test of cell viability**. In Current Protocols in Immunology, A.3B.1–A.3B.2. Edited by J. Coligan, A. Kruisbeek, D. Marguiles, E. Shevach & W. Strober, 2001.
- 25-Ellman, G.L et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-95, 1961.
- 26-Worek F, et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 288, p.73-90, 1999
- 27-Fitzgerald BB & Costa LG. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. **Fundam Appl Toxicol**, v. 20, p. 210–216, 1993.
- 28- Naoum, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnóstico**. 2, São Paulo: Santos, 1999. 154 p.

- 29- Madrid IM et al. Feline sporotrichosis in the southern region of rio grande do sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p 151-4, 2010.
- 30- Meinerz A.R.M. et al. Efficacy of terbinafine and itraconazole on an experimental model of systemic sporotrichosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, pp. 734-737, 2008.
- 31- Castro, V.S.P. et al. Adenosine Deaminase Activity in Serum and Lymphocytes of Rats Infected with *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.174, n.1, p. 31-39, 2012.
- 32- Miyaji M., Nishimura K. Defensive role of granuloma against *Sporothrix schenckii* infection. **Mycopathologia**, n.80, v.2, pp. 117-124, 1982.
- 33- Fujimura, T. et al. Local expression of migration inhibitory factor and Th1 type cytokine mRNA in sporotrichosis lesions. *Acta DermatoVenereol*, 76:321, 1996.
- 34- Koga T DUAN H, FURUE M. Immunohistochemical detection of interferon- γ -producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v.40, p.111-114, 2002.
- 35- Carlos I.Z., et al. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n.1, pp. 1-10, 2009.
- 36- Tizard, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**.6, São Paulo: Roca, 2002.532 p.
- 37- Romani L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.4, pp. 275-288, 2011.
- 38- Azevedo M.I.D. et al. E-NTPDase and E-ADA activities in rats experimental infected by *Cryptococcus neoformans*. **Veterinary Microbiology**, n. 174, v.1-2, pp. 206-213, 2014.

- 39- Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, pp. 673-684, 2005.
- 40- Soreq H. et al. Antisense oligonucleotide induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 91, pp. 7907-7911, 1994.
- 41- Mesulam, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, n. 110, pp. 627 – 639, 2002.
- 42- Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, n.18 (SUPPL. 1), 2003.
- 43- Duysen E.G. et al. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. **Toxicology**, n. 233 (1-3 SPEC. ISS.), pp. 60-69, 2007.
- 44- Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 8, pp. 673-684, 2005.
- 45- Nizri E et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, p, 540– 547, 2006.

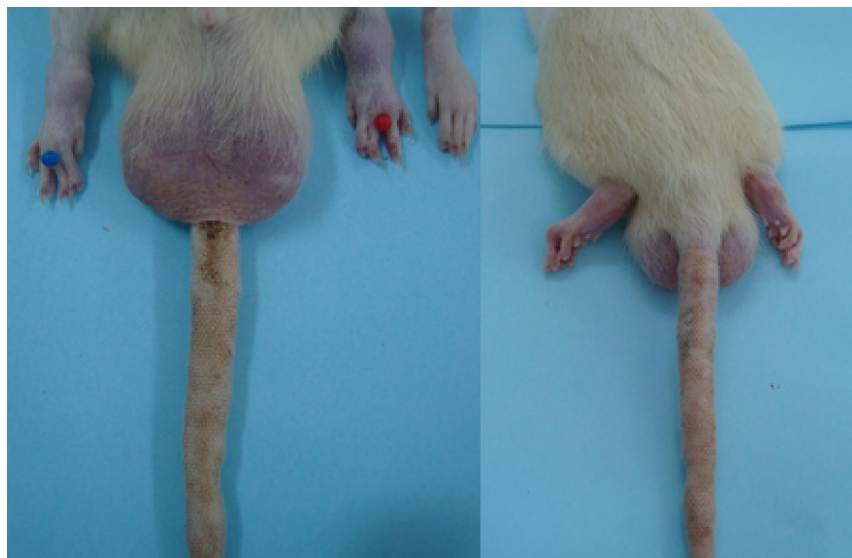


Figure 1. Clinical signs from rats infected with *Sporothrix scheinkii*.
The animals from G_{IP}, at 40 days p.i have visibly anasarcous and edema in the joints.

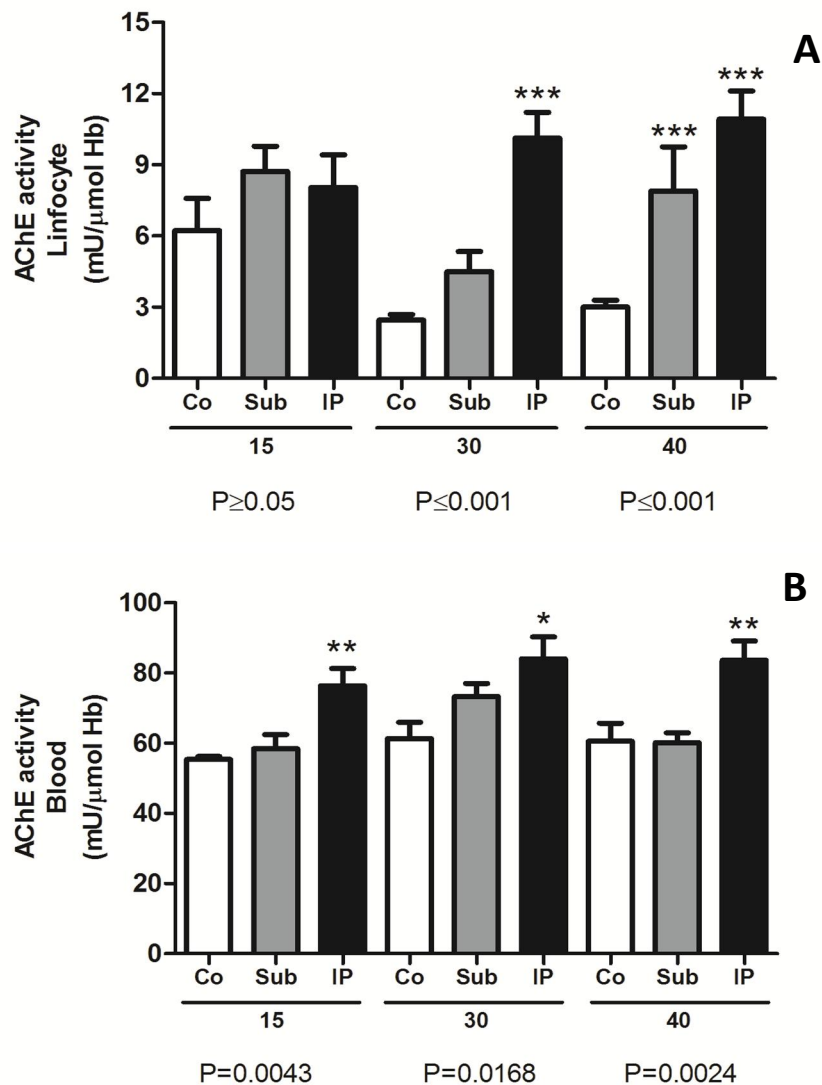


Figure 2. Acetylcholinesterase activity from rats infected with *Sporothrix scheinkii*. **A.** AChE activity in lymphocytes the IP pathway on the 30 and 40 days had a meaning increase ($P < 0,01$), compared with control group. However, on the 15 days had no statistic activity **B.** AChE activity in total blood the IP pathway accored a meaning increase on the 15 days, ($P < 0,01$), 30 ($P < 0,05$) e 40 ($P < 0,01$) compared with the control group. In the subcutaneous pathway do not have any significant activity compared with the control group.

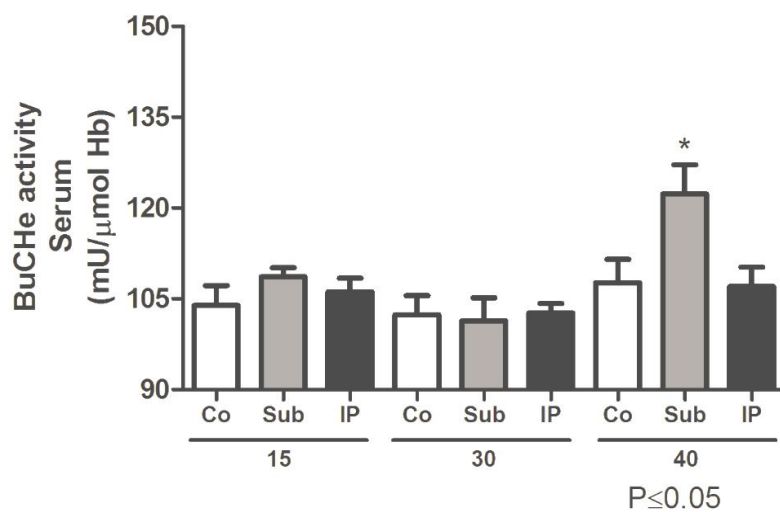


Figure 3. Butyrylcholinesterase activity in serum from rats infected with *Sporothrix scheinkii*. Between both studied pathways just the subcutaneous pathway on the 40 days had a significant increase ($P < 0,05$) when compared with the control group.

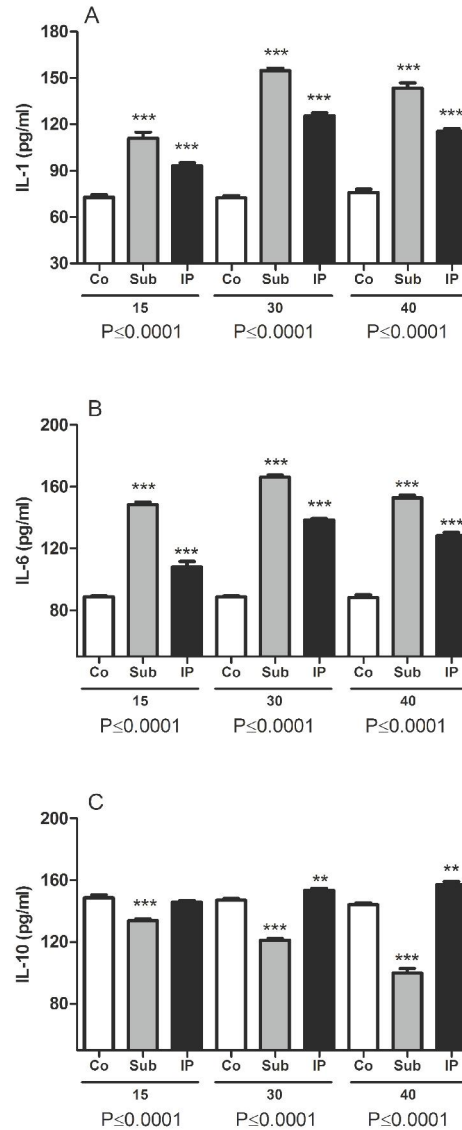


Figure 4: Levels of cytokines in serum of rats infected with *Sporothrix scheinkii*. At days 15, 30 and 40 post-infection compared with uninfected controls and pathway infection: subcutaneous (SC), peritoneal (IP). A. interleukin 1, B. interleukin 6 and C. interleukin 10. *Represents statistical difference between infected and control group (***) $P < 0.01$

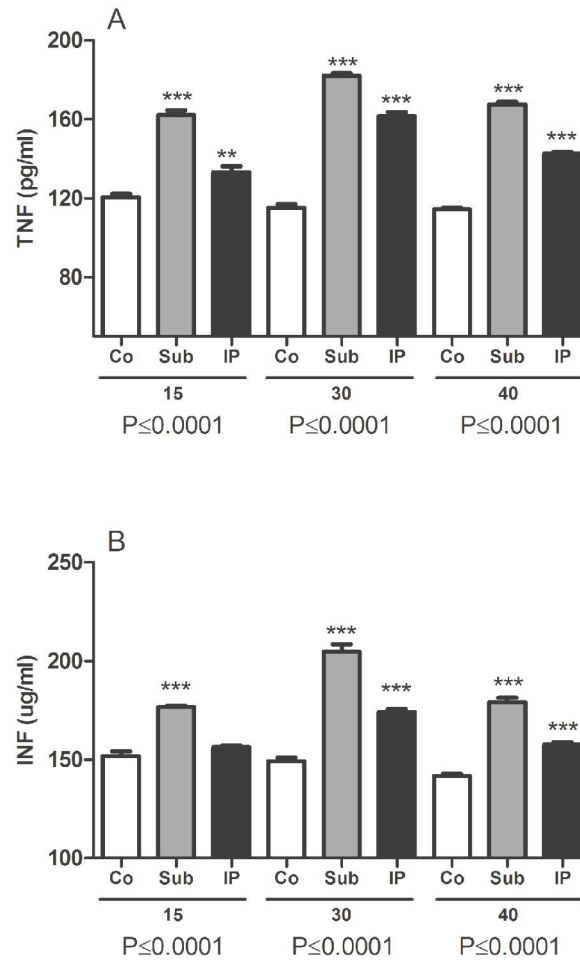


Figure 5. Levels of cytokines in serum of rats infected with *Sporothrix scheinkii*. At days 15, 30 and 40 post-infection compared with uninfected controls and pathway infection: subcutaneous (SC), peritoneal (IP). A. TNF α - tumor necrosis factor alphanterleukin. B. INF γ - interferon- *Represents statistical difference between infected and control group

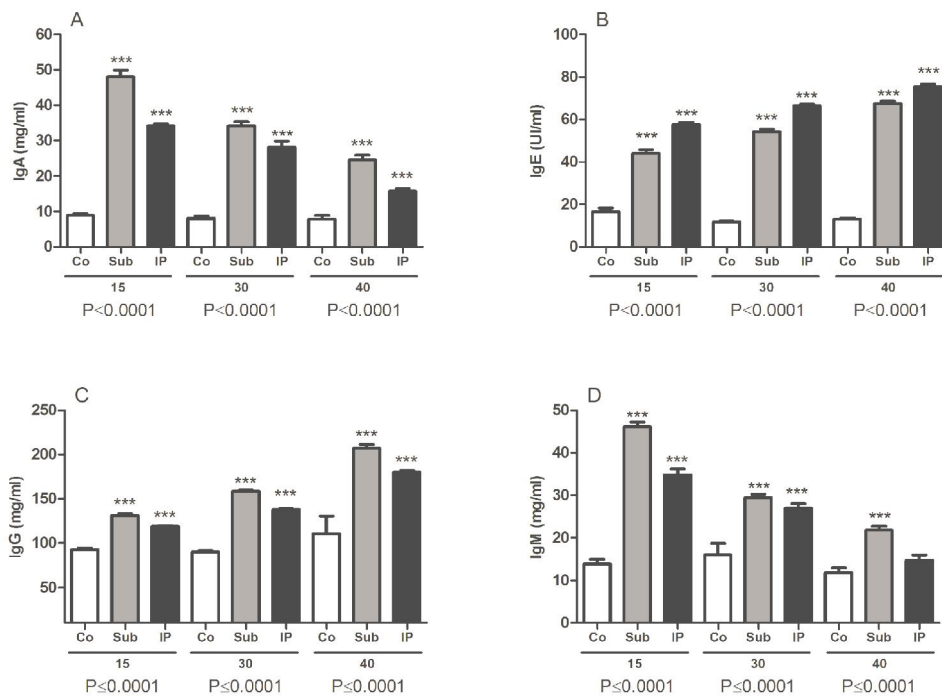


Figure 6. Levels of immunoglobulins in serum of rats infected with *Sporothrix schenckii*. At days 15, 30 and 40 post-infection compared with uninfected controls and pathway infection: subcutaneous (SC), peritoneal (IP). Only on IP pathway had tendency to increase, but without statistical meaning *Represents statistical difference between infected and control group (***) $P < 0.01$.

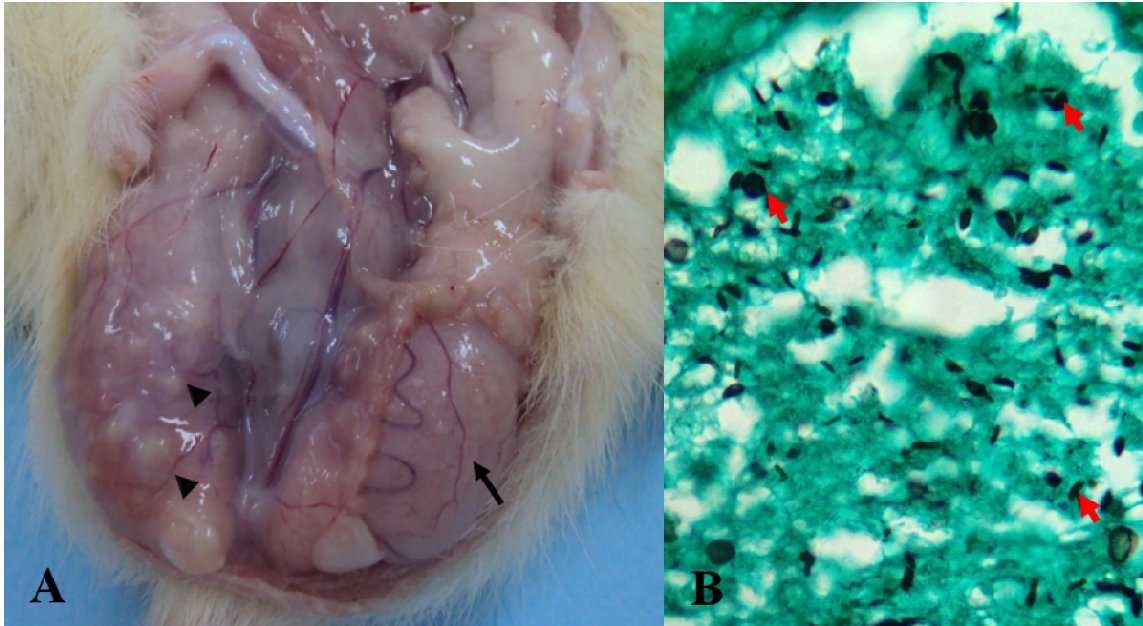


Figure 7 - Lesions of rats experimentally infected with the fungus *Sporothrix schenckii* by intraperitoneal pathway. A – Gross lesion in testis with a very thickened capsule within which several nodules 1-3 mm of diameter are detected (arrowhead). While the contralateral testis normal is observed (arrows). B – The histopathologic, examination showed numerous pleomorphic forms (arrows) stained with silver, inside a granuloma (Grocott staining, 1000x).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O caso publicado de um felino com esporotricose naturalmente infectado na região central do Rio Grande do Sul, foi o primeiro relato encontrado na literatura, mas possivelmente não tenha sido o primeiro gato doente nessa região.

Visto os animais se contaminarem diretamente com a forma micelial do fungo através do solo, arbustos e espinhos, a ocorrência em Santa Maria e em algumas cidades vizinhas, é rara. Não se tem conhecimento da transmissão zoonótica envolvendo o gato nessa região, provavelmente, pela baixa quantidade do fungo inoculado, e sua forma não infectante, favorecer ao sistema imunológico uma melhor resposta celular e imune na relação agente x hospedeiro.

A esporotricose não é uma doença de notificação obrigatória, com isso é muito importante saber que ela existe, conhecê-la, identificar suas manifestações clínicas e formas de transmissão, porque isso envolve a saúde do coletivo. Médicos veterinários entre outros agentes da saúde precisam estar alertas, ao aparecimento de novos casos dessa micose em uma população. A prevenção é o melhor tratamento.

Assim, por reconhecer a importância da notificação dessa micose, achou-se relevante a inclusão desse caso juntamente com o estudo experimental. Relata-se a esporotricose por infecção natural em um gato semi-domiciliado, apresentando lesão ulcerada, encimada por costas em região palpebral. A ausência de lesões entre os contactantes, não diminuiu a vigilância quanto as manobras ao se manipular o felino durante o tratamento. Que apresentou rápida involução das lesões com o antifúngico itraconazol na dose de 10 mg/kg/SID.

Contudo, a ocorrência de surtos epidêmicos em áreas urbanas, veicula o gato na transmissão da doença ao homem (RODRIGUES et al., 2014). Estratégias terapêuticas e diversos estudos são realizados para melhor compreender a participação do sistema imune em resposta ao fungo.

Foi demonstrado recentemente a participação do nervo vago eferente, através de seu principal neurotransmissor, ACh por inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias promovendo assim um controle mais eficiente de processos inflamatórios através da via colinérgica anti-inflamatória (PAVLOV, 2005; DAS, 2007; NANCE, 2007).

Este estudo buscou avaliar as colinesterases enzima que hidrolisa a ACh, e verificou um aumento na atividade da AChE no sangue em todos os tempos experimentais, e nos linfócitos o aumento ocorreu apenas nos dias 30 e 40 dias PI. O aumento dessa enzima sugere

uma diminuição nos níveis de ACh, com consequentemente aumento das IL-1, IL-6, TNF α , INF γ , esse aumento foi evidenciado nesse estudo.

A resposta inflamatória granulomatosa, tem por objetivo desativar ou destruir os microrganismos invasores, assim a infecção crônica requer um estímulo inflamatório contínuo para a geração do granuloma, que está diretamente relacionada a linfocitose. A ACh também é sintetizada no interior de linfócitos (KAWASHIMA & FUJII, 2003), ou seja, uma linfocitose pode representar maiores níveis de ACh liberada, gerando a necessidade de um aumento na atividade da AChE em linfócitos na tentativa de modular a inflamação. Tonin e colaboradores (2013) também observaram um aumento da AChE em linfócitos, com a cronicidade da infecção na toxoplasmose experimental.

Este estudo mostrou um aumento na atividade da AChE, e comprovou que a resposta pró-inflamatória foi estabelecida, ao observar os altos níveis dessas citocinas, fortalecendo a hipótese da existência de um mecanismo modulatório desse sistema na resposta imune e inflamatória na esporotricose experimental. Portanto, acredita-se que estes resultados possam contribuir para futuras pesquisas envolvendo a participação do sistema colinérgico não-neural no controle da inflamação crônica granulomatosa ocasionada por esta micose.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K. et al. **Cellular and Molecular Immunology**. 7^a ed., Elsevier, 2012. 545p.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.*, v.105, p.121-126, 1984. ARENAS, R. Esporotricose. In: **Micologia Médica Ilustrada**. 1^oed. México: Nueva editorial interamericana, 1993, v.1, cap.13, p.145-160.

AGUINAGA, F.D.C. et al. Sporotrichosis with bone involvement: An alert to an occupational disease. **Case Reports in Dermatology**, v.6, n.1, pp. 114-118, 2014.

ALVES, S. H. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p.523-525, 2010.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.350, n.1, pp. 103-108, 1996.

ANTUNES, T.D.A. Experimental cutaneous sporotrichosis: In vivo evaluation of itraconazole and terbinafine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n. 6, pp. 706-710, 2009.

BARROS, M.B. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.4, p.529-535, 2004.

BERNSTEIN, J.A. Cytologic diagnosis of generalized cutaneous sporotrichosis in a hunting hound. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 1, p. 94-96, 2007.

BÖYUM, A. Isolation Of Mononuclear Cells And Granulocytes From Human Blood. **Scandinavian Journal Of Clinical And Laboratory Investigation**, V.97, P. 77-89, 1968.

BUSTAMANTE B & CAMPOS PE. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p.145-9, 2001.

CARDOSO J.C., CALONJE E. Cutaneous infections presenting with granulomatous infiltrates: A review of histopathological patterns. **Diagnostic Histopathology**, n.19, v.2, pp. 54-61, 2013.

CASTRO, V.S.P. et al. Adenosine Deaminase Activity in Serum and Lymphocytes of Rats Infected with *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.174, n.1, p. 31-39, 2012.

CONTI-DIAS, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in latin america. **Mycopathologia**, v. 108, p. 113-116, 1989.

COTRAN, R. S, KUMAR, V., COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

DA ROSA, A.C.M. et al. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, p. 451-459, 2005.

DA SILVA A. S., et al. Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 281-284, 2010.

DA SILVA M.B.T. Urban sporotrichosis: A neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, n.28, p. 1867-1880, 2012.

DA SILVA, C. B., et al. Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 278-284, 2012.

DARVESH, S., HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 131-138, Feb. 2003.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of lowgrade systemic inflammation. **Medical ScienceMonitor**, Polônia, v. 13, n. 12, p. 214-221, dez. 2007.

DONADEL, K.W. et al. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 68, n. 1, p. 45-51, 1993.

ECKERSALL, P.D., 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias, In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, pp. 117-148.

ELLMAN, G.L et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p. 88-95, 1961.

ESPINOZA-HERNANDEZ C.J. et al. Disseminated sporotrichosis with cutaneous and testicular involvement. **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v. 105, n.2, p. 204-206, 2014.

FARIAS, M.R, et al. Esporotricose canina e felina. **Cães & Gatos**, v.66, p.30-38, 1997.

FELDMAN, B. V. et al. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1344 p. 2000.

FELDMANN, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Rev. Immunol.* V. 2, p. 364–371, 2002.

GOAD, D.L., GOAD M.E. Osteoarticular sporotrichosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 189, n. 10, p. 1326-1328, 1986.

GUARRO, J., GENE J., STCHIGEL A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, n.3, p. 454-500, 1999.

HACHISUKA H., SASAI Y. Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. **Mycopathologia**, n.76, pp. 79–82, 1981.

HAMAD M. Innate and adaptive antifungal immune responses: Partners on an equal footing. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 205-217, 2012.

KAWASHIMA K. e FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & therapeutics**, v.86, p.29-48, 2000.

KOGA T DUAN H, FURUE M. Immunohistochemical detection of interferon-c-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v.40, p.111-114, 2002.

KOVARIK CL, NEYRA E & BUSTAMANTE B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. **Medical Mycology**. v. 46, p. 53-56, 2008.

KUTTY K. M. Review: Biological function of cholinesterase. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.13, n.3, p.239-243, 1980.

LACAZ, C.S. et.al. **Tratado de Micologia Médica**, Ed: Savier, São Paulo, 9ª ed., 2002, p.479-497.

LOPES, J.O. et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 541-545, 1999.

LOPES-BEZERRA, L. et al. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, June, 2006.

LÓPEZ-ROMERO, et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, v. 6, n.1, p. 85–102, 2011.

MADRID, I.M. et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: A description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v.173, p. 265-273, 2012.

MADRID, I.M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 2, p. 151-154, 2010.

MAIA, D. C. et al. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, v. 161, n. 1, pp 11 – 19, 2006.

MARIMON, R.J. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3251-3256, 2006.

MEINERZ A.R.M. et al. Efficacy of terbinafine and itraconazole on an experimental model of systemic sporotrichosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, pp. 734-737, 2008a.

MEINERZ A.R.M. et al. Systemic experimental sporotrichosis in Wistar rats: Hematological evaluation and hepatic profile. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, n. 40 pp. 1026-1028, 2008b.

MESULAM, M.M, et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. *Neuroscience*, v.110, p.627-639, 2002.

MIRANDA, L.H.M. et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.36, n.4,p. 425-432, 2013.

MORRIS-JONES R. Sporotrichosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.27, n.6, p. 427-431, 2002.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clin Exp Dermatol**, v.27 p. 427-31, 2002.

NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnóstico**.2, São Paulo: Santos, 1999. 154 p.

NEGRINI, T.D.C., et al. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. **Immunological Investigations**, v. 42, n.1, p. 36-48, 2013.

NELSON, D.P. e KIESOW, L.A. Entalpy of the composition of hidrogen peroxide by catalase at 25°C. **Analytical Biochemistry**, v.49, p.474-479, 1972.

OLIVEIRA M.M.E., et al. Molecular identification of the *sporothrix schenckii* complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n.1, p. 2-6, 2014.

PAVLOV, V.A. and Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammtory pathway. **Brain Behav Immunology**, v. 19, pp. 493-499, 2005.

PEREIRA, S.A. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of feline medicine and surgery**, v.13, n.4, p. 220-223, 2011.

PRADO, M.A.M. et al. Regulation of acethylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 4, p. 291-299, 2002.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225-236, 2011.

RAMOS-E-SILVA M. Systemic mycoses in immune depressed patients (AIDS) **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 616-627, 2012.

RAMOS-E-SILVA, M. Sporotrichosis. **Clinics Dermatology**, v. 25, p. 181-187, 2007.

RANG, H.P. et al. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H.P. et al. (Ed.). *Farmacologia*. Elsevier, São Paulo: Brasil, 2004. p. 676-695.

RIPPON, J.W. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes*, 3 ed., Philadelphia: WB Saunders Company, 1988, p. 325– 352.

RODRIGUES, A.M. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes and Infections**, v.3, art. no. e32, 2014.

RODRIGUES, A.M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n. 6, art. e2281, 2013.

ROMEO, O.; CRISEO G. What lies beyond genetic diversity in *sporothrix schenckii* species complex? New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii* sensu stricto isolates. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 203-206, 2013.

SALES M.E. Cholinergic drugs as therapeutic tools in inflammatory diseases: Participation of neuronal and non-neuronal cholinergic systems. **Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.12, n.2, p. 109-116, 2013.

SASSA, M.F. et al. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. **Immunology**, v.128, n.2, p. 301-309, 2009.

SCHENK, B.R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possible related to the sporotricha. **Bull Johns Hopkins Hospital**, p. 286-290, 1898.

SCHUBACH, T. et al. Clinical evolution of feline and canine sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal Veterinary Science**, v.7, suppl.38, 2000.

SCHUBACH, T. M. et al. Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da esporotricose felina na região metropolitana do Rio de Janeiro [Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2004.

SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1998. 1314p.

SONG, Y. et al. Infant sporotrichosis in northeast china: a report of 15 cases. **International journal of dermatology**, v. 50, n. 5, p. 522-529, 2011.

SOREQ, H., SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for and old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, Londres, v. 2, n. 4, p.294–302, apr. 2001.

SOUZA T.M. Histological aspects of canine and feline skin as a tool for dermatopathology **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 2, pp. 177-190, 2009.

TAYLOR, P. e BROWN, J. H. Acetylcholine. In: SIEGEL, G.J., et al. (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 214-242.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6, São Paulo: Roca, 2002.532 p.

TVARIJONAVICIUTE, A., CERON J.J., TECLES F. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in obese Beagle dogs before and after weight loss. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42 n. 2, p. 207-211, 2012.

UENOTSUCHI T, 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. **International Immunology**, v. 18, n.12, pp. 1637-1646, 2006

VAN ASSCHE, G. & RUTGEERTS, P. Anti-TNF agents in Crohn's disease. **Expert Opin. Investig. Drugs** v.9, p.103–111, 2000.

WELSH, R. D., Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 223, n.8, p. 1123-1126, 2003.

WILLIAMS, B. A. et al. Sporotrichosis on the face of a 7-year-old boy following a bicycle accident. **Pediatric Dermatology**, v.30, n.6, 2013.

WOLKMER, P., et al. Biochemistry detection of acetylcholinesterase activity in *Trypanosoma evansi* and possible functional correlations. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 546-549, 2012.

WOLKMER, P., et al. Pre-treatment with curcumin modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology International**, v.62, n.2, p.144-149, 2012.

WOREK F, et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 288, p.73-90, 1999.

WUTHRICH M., DEEPE JR. G.S., KLEIN B. Adaptive immunity to fungi. **Annual Review of Immunology**, 30, pp. 115-148, 2012.