



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**VICTOR MATHEUS DA ROSA**

**Avaliação da crioterapia como tratamento complementar da  
esporotricose felina**

**Evaluation of cryotherapy as an complementary treatment of feline  
sporotrichosis**

**CURITIBA**

**2021**

**VICTOR MATHEUS DA ROSA**

**Avaliação da crioterapia como tratamento complementar da  
esporotricose felina**

**Evaluation of cryotherapy as an complementary treatment of feline  
sporotrichosis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Clínica e Cirurgia Veterinária, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

**CURITIBA**

**2021**

## TERMO DE APROVAÇÃO



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
**Escola de Ciências da Vida**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

### **ATA Nº 0157 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DO ALUNO VICTOR MATHEUS DA ROSA**

Aos quinze dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e um, às 8:30 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de defesa da dissertação do mestrando Victor Matheus da Rosa, intitulada: **“AVALIAÇÃO DA CRIOTERAPIA COMO TRATAMENTO COMPLEMENTAR DA ESPOROTRICOSE FELINA”**. O mestrando concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde, Tecnologia e Produção Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Luiz Henrique de Araújo Machado (UNESP) e Sandra de Moraes Gimenes Bosco (UNESP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que foi considerada APROVADA.

**Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias (Presidente)**

Assinatura \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado (UNESP)**

Assinatura \_\_\_\_\_

**Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco (UNESP)**

Assinatura \_\_\_\_\_

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 15 de setembro de 2021.

**Caroline Nocera Bertton**  
**Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Profa. Dra. Renata Ernund Freitas de Macedo**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Escola de Ciências da Vida – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Rua Imaculada Conceição, 1155 – Bairro Prado Velho – CEP: 80215-901 – Curitiba, PR – Brasil  
Tel (41) 3271-2615  
Email: [ppgca@pucpr.br](mailto:ppgca@pucpr.br) [www.pucpr.br/ppgca](http://www.pucpr.br/ppgca)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, saúde, vocação e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Agradeço aos meus pais Higino Jerônimo Rosa e Maria Goreti Costa Rosa (*in memoriam*), por todo o suporte, pela minha educação, por todos sacrifícios que fizeram ao longo de suas vidas para garantir uma boa formação e educação, por me ensinarem os valores da vida, a ter honra e caráter.

Agradeço a minha namorada e companheira Mônica Yurico Kimura, pela paciência, apoio e suporte nesses anos de viagens, dificuldades, ansiedade e ausências.

Agradeço a minha família, meus irmãos Higino Jeronimo da Rosa Junior e Angelica Marcelly da Rosa, minha equipe de trabalho (Vale-Vet Centro Médico Veterinário), em especial ao amigo Agnaldo Angélico Baldissera.

Agradeço a toda equipe de mestrandos e doutorandos do PPGCA-PUCPR, aos profissionais da Clínica Veterinária Escola PUC-PR; aos professores que contribuíram para meu crescimento acadêmico e científico.

Agradeço a todos os profissionais que trabalham na logística e no suporte aos alunos e professores: secretaria, recepção, limpeza, organização, seguranças, enfermeiros, auxiliares e técnicos.

Agradeço aos amigos: Larissa Condas que contribuiu enormemente com as análises estatísticas; Lucas Ludwig pela parceria nesses anos de mestrado e pelo auxílio na formatação deste artigo.

Agradeço aos professores José Waldemar Vilanova Junior e Claudia Turra Pimpão por engrandecer ainda mais o nosso trabalho com suas correções na qualificação.

Agradeço ao meu Co-orientador Jorge Luiz Costa Castro, pelas orientações ao longo desse período.

Agradeço aos professores Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado e Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, por aceitarem compor a banca para defesa final desta dissertação. Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço a toda equipe de alunos e pesquisadores que participaram diretamente na rotina de atendimento do projeto esporotricose em especial às professoras Fabiana dos Santos Monti e Kung Darh Chi, que sempre conduziram com maestria, humanidade e dedicação os atendimentos do projeto.

Agradeço especialmente a meu Orientador Dr. Marconi Rodrigues de Farias, que além de um pesquisador e professor de excelência é um grande ser humano, contribuiu não só na minha formação acadêmica e profissional, mas foi também um grande exemplo como pessoa. Obrigado por sua confiança, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe maravilhosa, o senhor não forma apenas médicos veterinários, mestres e doutores, o senhor forma pessoas melhores.

A todos muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>10</b>
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 ESPOROTRICOSE FELINA.....	12
3 DIAGNÓSTICO .....	15
4 ASPECTOS TERAPÊUTICOS .....	18
<b>4.1 Terapias tópicas</b> .....	<b>19</b>
5 CRIOCIRURGIA .....	21
<b>5.1 Equipamento e técnicas</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2 Mecanismo de ação</b> .....	<b>24</b>
<b>5.3 Ciclo de congelamento e descongelamento</b> .....	<b>27</b>
<b>5.4 Indicações</b> .....	<b>28</b>
<b>5.5 Vantagens da técnica</b> .....	<b>29</b>
REFERÊNCIAS .....	30
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>35</b>
ARTIGO CIENTÍFICO .....	35
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>60</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
<b>ANEXOS</b> .....	<b>61</b>
ANEXO A - NORMAS DO PERIÓDICO ESCOLHIDO .....	61
ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA .....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Gato apresentando múltiplas úlceras cutâneas, disseminada em cabeça. .....	14
<b>Figura 1.3</b> - Coleta de material para exame citopatológico.....	16
<b>Figura 1.4</b> - Exame citopatológico: lâmina obtida por esfregaço de lesão cutânea em felino infectado por <i>S. brasiliensis</i> corada utilizando corada com Giemsa, evidenciando a presença infiltrado piogranulomatoso com estruturas leveduriformes em grande número no interior de macrófago e extracelular em aumento de 1000 vezes. ....	17
<b>Figura 1.5</b> - Cry-ogun® de 500ml, aparelho utilizado para aplicação do nitrogênio líquido na criocirurgia .....	22
<b>Figura 1.6</b> - Imagem ilustrativa das formas de aplicação do nitrogênio sobre a lesão, diretamente de forma contínua, em movimentos de pincel e em espiral.....	23
<b>Figura 1.7</b> - Imagem representando exemplos de ponteiros abertas e fechadas. ....	23
<b>Figura 1.8</b> - Imagem esquemática de uma lesão congelada, representando as diferentes temperaturas alcançadas na área congelada, a maior temperatura negativa é encontrada no centro da lesão, mais próximo ao ponto de aplicação do nitrogênio .....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escore lesional, com base na característica de cada lesão e evolução. ...	43
Tabela 2. Escala de cores com base no escore individual. ....	44
Tabela 3. Dados demográficos dos grupos de estudo com a somatória total sobre o número de gatos.....	46
Tabela 4. Distribuição lesional com base em sua localização anatômica, divididas por grupo de estudo e com a somatória total para cada região.....	47
Tabela 5. Média de sessões por região anatômica com base na distribuição anatômica das lesões. ....	48
Tabela 6. Média de sessões com base na classificação lesional e estágio da infecção.. ..	48
Tabela 7. Evolução lesional com base no escore individual ao longo do tratamento*pacientes que apresentaram recidiva lesional após cura clínica. ....	49
Tabela 8. Descrição dos efeitos colaterais sistêmicos e tópicos, transitórios e permanentes observados nos gatos durante o estudo.....	53

## FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é formada por capítulos. O capítulo 1 trata de uma revisão de literatura sobre a esporotricose e criocirurgia. O capítulo 2 trata de artigo científico completo, com referências, e nas normas do periódico o qual será submetido (*Journal of Feline Medicine and Surgery*). O capítulo 3 finaliza com conclusões gerais sobre o trabalho. As referências encontram-se ao final de cada capítulo.

## RESUMO GERAL

Esporotricose é uma infecção de implantação, crônica, granulomatosa, que no Brasil geralmente ocorre como epizootias urbanas causadas por *Sporothrix brasiliensis*, afetando principalmente gatos e humanos via transmissão dermatozoonótica. Seu tratamento é realizado com o uso de itraconazol como monoterapia ou associado ao iodeto de potássio, porém sua eficácia é moderada, a terapia é longa, onerosa e associada à efeitos colaterais sistêmicos. O presente estudo teve por objetivo avaliar a crioterapia como tratamento complementar da esporotricose felina, quanto ao tempo de resposta terapêutica, eficácia e segurança da técnica. Para tal, 28 gatos com esporotricose atendidos na Clínica Veterinária Escola PUCPR, foram divididos em dois grupos de estudo, sendo o Grupo 1 composto por 14 gatos tratados com crioterapia associada ao itraconazol e iodeto de potássio e o Grupo 2, composto por 14 gatos tratados com itraconazol associado ao iodeto de potássio. As lesões dos gatos incluídos se concentravam na face, membros e tronco e tinham até três centímetros de diâmetro. Os tempos de tratamento foram de 73 dias no Grupo 1 e de 104 dias no Grupo 2. Entre os gatos do grupo 1, 12 (86%) dos gatos obtiveram cura, dois (14%) abandonaram o tratamento, sendo que dois (14%) dos gatos apresentaram recidiva durante os 12 meses do estudo, e a média de sessões de crioterapia foi de duas. Entre os gatos do grupo 2, 11(79%) obtiveram cura ao final do tratamento, dois (14%) abandonaram o tratamento, um (7%) caso houve ineficácia e em dois (14%) casos houve recidiva lesional durante os 12 meses de acompanhamento. Os efeitos colaterais transitórios associados à crioterapia foram edema, eritema e escara, e as alterações permanentes foram leucodermia e alopecia cicatriciais. Em conclusão, a crioterapia foi eficaz e segura como tratamento complementar da esporotricose felina, reduzindo seu tempo de tratamento sistêmico, mormente em casos cutâneos localizados ou disseminados de menores diâmetros, o que exige diagnóstico precoce da doença.

**Palavras-chave:** Micose. *Sporothrix spp*. Fungos. Zoonoses. Saúde Pública, Saúde única.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a chronic and granulomatous traumatic infection, which in Brazil usually occurs as urban epizootics caused by *Sporothrix brasiliensis*, affecting mainly cats and humans by dermatozootic transmission. The treatment is carried out with a long term usage of itraconazole as monotherapy or associated to potassium iodate, which corresponds to an expensive therapy, with side effects and moderate efficacy. The aim of the study was to evaluate the cryotherapy as a complementary treatment in feline sporotrichosis, the time for outcome and safety. For that, 28 cats with sporotrichosis admitted at the Teaching Veterinary Clinic of PUCPR were divided in two groups, which group number 1 composed by 14 cats treated with cryotherapy and itraconazole associated to potassium iodate, and group 2 composed by 14 cats treated with itraconazole associated to potassium iodate. The lesions were concentrated on the face, limbs and trunk with a diameter up to 3cm. The duration of treatments were 73 days in group 1 and 104 days in group 2. Among the cats of group 1, 12 (86%) showed complete remission, 2 (14%) left the treatment and two (14%) showed relapse during the 12 months of the study. The median of the cryotherapy sessions was two. Among the cats of group 2, 11 (79%) showed complete remission, two (14%) left the treatment, one (7%) did not responded to the treatment and in two (14%) the lesions relapsed during the 12 months of the study. Transitional side effects associated to cryotherapy were edema, erythema and eschars, and the permanent effects were leukoderma and cicatricial alopecia. In conclusion, the cryotherapy was effective and safe as complementary treatment of feline sporotrichosis, reducing the time of systemic treatments, mainly in localized cutaneous cases or when generalized with smaller diameters, which demand a premature diagnosis of the disease.

**Key-words:** Mycosis. *Sporothrix* spp. Fungi. Zoonosis. Public Health. One Health

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação de distribuição mundial, que acomete humanos, felinos, equinos, caninos, roedores entre outros mamíferos, causada por diferentes espécies fúngicas pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*. A infecção pode ocorrer pela via sapronótica ou pela via zoonótica, a partir inoculação traumática percutânea ou pelo contato e inalação de propágulos fúngicos presentes em exsudatos e secreções de lesões contaminadas (Marimon *et al.*, 2007; Schubach *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013a; Lloret *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Almeida-Paes *et al.*, 2016; Falcão *et al.*, 2019).

A doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América por Benjamin Schenckii em 1898 e, no Brasil, os primeiros casos de esporotricose em ratos foram descritos por Lutz e Esplendore no ano 1907 (Barros *et al.*, 2010). Em gatos a esporotricose foi descrita no Brasil nos anos 1950 e sua ocorrência se manteve de forma esporádica até os anos 1990 (Gremião *et al.*, 2020). A esporotricose é a infecção micótica em humanos mais comum na América Latina, sendo o Brasil o país com maior número de casos humanos e animais registrados, com crescente aumento no número de casos de alta complexidade nas últimas décadas, e maior concentração desses nas regiões sudeste e sul (Schubach *et al.*, 2012; Lloret *et al.*, 2013; Sanchotene *et al.*, 2015). É difícil estimar a real magnitude da epidemia do Brasil, pois trata-se de uma zoonose negligenciada, no entanto, casos de esporotricose já ocorrem em 25 dos 26 estados brasileiros (Rodrigues *et al.*, 2020) e, nos últimos anos, um crescente aumento de novos casos têm ocorrido nos estados da região Sul (Sanchotene *et al.*, 2015). Na Clínica Veterinária Escola da PUCPR, na cidade de Curitiba-PR foram atendidos 295 casos confirmados de esporotricose felina, causada por *S. brasiliensis* entre os anos de 2016 a 2019 (Kung *et al.*, 2020).

A doença apresenta alto índice de hospitalizações em pessoas de determinados grupos sociais, com baixa renda, pouca escolaridade e pouco acesso aos serviços básicos de saúde, que vivem em regiões socialmente negligenciadas (Gremião *et al.*, 2015; Falcão *et al.*, 2019). Uma mudança no perfil de transmissão da doença também foi observada no final do século passado, a partir de uma expressiva série de casos no estado do Rio de Janeiro, envolvendo gatos domésticos e humanos,

observando que boa parte das pessoas contaminadas tiveram contato com gatos doentes. Este surto foi caracterizado como o primeiro e maior surto com transmissão pela via zoonótica em todo o mundo, onde o gato doméstico assume um importante papel na epidemiologia da doença por ser a espécie mais suscetível a infecção (Brandolt *et al.*, 2019). Assim, a infecção que ocorria antes pela via clássica proveniente de implantes traumáticos a partir de plantas, madeiras, propágulos fúngicos presentes matéria orgânica, solo e vegetação comuns em áreas rurais, passou a ocorrer pela via zoonótica (Sanhotene *et al.*, 2015), mormente em áreas urbanas densamente habitadas (Montenegro *et al.*, 2014; Conceição-Silva e Morgado, 2018).

A etiologia da esporotricose por mais de um século foi atribuída a um único agente etiológico: *Sporothrix schenckii* (Rodrigues *et al.*, 2014). Contudo, recentemente estudos moleculares demonstraram que *S. schenckii* é um complexo com pelo menos seis espécies, com características distintas: *S. mexicana*, *S. brasiliensis*, *S. chilensis*, *S. globosa*, *S. pallida* e *S. schenckii stricto sensu* (Marimom *et al.*, 2007), sendo *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii stricto sensu* com maior importância clínica (Gremião *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020).

O *S. brasiliensis* é descrito por diferentes autores ao longo dos últimos anos como sendo a espécie de maior importância clínica no Brasil. Este apresenta maior virulência e maior potencial patogênico dentre todas as espécies do complexo *Sporothrix*, e está relacionado a manifestações clínicas com maior carga parasitária, quadros clínicos mais graves com infecção disseminada e duradoura, promovendo dano tecidual mais extenso (Marimom *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2012; Gremião *et al.*, 2015; Batista-Duarte *et al.*, 2018; Queiroz-Telles *et al.*, 2019).

O surgimento do recente surto de *S. brasiliensis* pode ser devido a eventos multifatoriais, como: (1) a evolução do *Sporothrix* ao longo do tempo (mutabilidade e seleção natural); (2) a alta virulência em vertebrados de sangue quente; (3) a recente introdução de *S. brasiliensis* em uma população hospedeira ingênua (por falta de resistência natural); (4) aspectos comportamentais e sociais dos gatos; (5) práticas humanas (crescimento populacional, migração da população rural para áreas urbanas, pobreza, exploração e ocupação do solo, aumento do número de gatos como animais de estimação, abandono de animais saudáveis e doentes, descarte de forma errada de cadáveres de animais doentes); (6) diagnóstico tardio e (7) ausência de políticas públicas de contenção da doença. A somatória desses fatores permitiu que

o surto ganhasse as proporções atuais, abrangendo todo território nacional e países vizinhos (Rodrigues *et al.*, 2020).

## 2 ESPOROTRICOSE FELINA

Os gatos são os animais mais suscetíveis a doença, desempenhando importante papel na transmissão zoonótica para os humanos, já que a proximidade entre essas espécies facilita o contágio por meio de arranhaduras, mordeduras e/ou contato com exsudato rico em leveduras (Larsson, 2011; Gremião *et al.*, 2015; Chakrabarti *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2020). A espécie felina é vulnerável a adquirir à infecção pelo seu comportamento de caça, por esfregarem-se no solo e em cascas de árvores, enterrarem seus dejetos, afiarem as unhas em árvores, e por sofrerem arranhões e mordidas decorrentes de brigas territoriais, durante o coito e hierárquicas inerentes à espécie (Barros *et al.*, 2010; Madrid *et al.*, 2012; Montenegro *et al.*, 2014). Os gatos machos, adultos, não castrados, com acesso irrestrito à rua estão mais propensos a contrair doença e disseminá-la para outros gatos e conseqüentemente para pessoas (Gremião *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2013; Montenegro *et al.*, 2014).

Após a infecção, o período de incubação é variável, de dias a meses, com tempo médio de 14 dias (Gremião *et al.*, 2020). Nos gatos, diferente do que é observado em pessoas com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou imunocomprometidos, a infecção não apresenta diferença significativa com relação a frequência e gravidade com co-infecção por vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou vírus da leucemia felina (FELV), quando comparados a gatos negativos para estas doenças (Barros *et al.*, 2011; Gremião *et al.*, 2015). No ciclo zoonótico as garras dos felinos podem ser o primeiro local a adquirir propágulos de *Sporothrix spp.*, através de seus hábitos sociais, posteriormente esses propágulos podem ser levados a cavidade oral durante o seu comportamento de se lambar, e as infecções por *S. brasiliensis* geralmente se estabelecem através de arranhões e mordeduras (Rodrigues *et al.*, 2014).

Um dos fatores que justifica o sucesso da infecção por *S. brasiliensis* nos gatos é sua alta resistência térmica corpórea (nos gatos em torno de 39°C), o que o torna adaptado ao parasitismo em felinos (Rodrigues *et al.*, 2020) e faz com que desenvolva

lesões com grande quantidade de leveduras (Madrid *et al.*, 2012; Queiroz-Telles *et al.*, 2019), favorecendo a disseminação da infecção de forma intra e interespecífica.

Em relação as formas clínicas, existem diferentes proposituras classificatórias (Larsson, 2011). Nos humanos diferentes manifestações clínicas são descritas: cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada e extracutânea (Gremião *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2019). Nos gatos, a maioria das lesões encontram-se na face, extremidade de membros e na cauda (Pereira *et al.*, 2009; Gremião *et al.*, 2015). Nota-se nos felinos maior disseminação das lesões e envolvimento sistêmico em relação aos humanos, presença de inflamação granulomatosa mal formada e alta carga fúngica nas lesões (Souza *et al.*, 2018).

Em gatos, a forma cutânea disseminada (Figura1.1) é a forma clínica observada com maior frequência, caracterizada por múltiplas lesões cutâneas de aspecto variável, como úlceras disseminadas, exsudativas e encimadas por crostas; a presença de nódulos ou lesões nodulares que sofrem necrose de liquefação e ulceração central (Madrid *et al.*, 2012; Gremião *et al.*, 2015), que podem evoluir para exposição muscular e óssea (Pereira *et al.*, 2009). A segunda forma mais prevalente é a cutânea fixa, geralmente caracterizada por lesões nodulares ou úlcero-gomos localizadas no ponto de inoculação fúngica. Disseminação fúngica via linfática, conduzindo a linfangite e linfadenite regional podem também ser observadas, normalmente associada à lesões cutâneo- disseminadas. Manifestações extracutâneas são muito comuns, mormente associados à quadros respiratórios, com lesões ulcerosas ou nódulo-tumorais em espelho e ponte nasal, causando necrose tecidual, estenose nasal, estrídulos respiratórios, espirros frequentes e epífora (Figura1.2). Quadros oftálmicos caracterizados por blefaroconjuntivite granulomatosa podem ser observados (Silva *et al.*, 2008).



**Figura 1.1** - Gato apresentando múltiplas úlceras cutâneas, disseminada em cabeça.  
Fonte: Gremião (2012)



**Figura 1.2** - Gato com lesões cutâneas e extra cutâneas caracterizadas por tumoração, úlceras e deformidade nasal, ocasionando estenose das narinas, com intensa exsudação sanguinolenta e recobertas por crostas hemáticas no espelho e ponte nasal e periorbital.  
Fonte: O autor (2019)

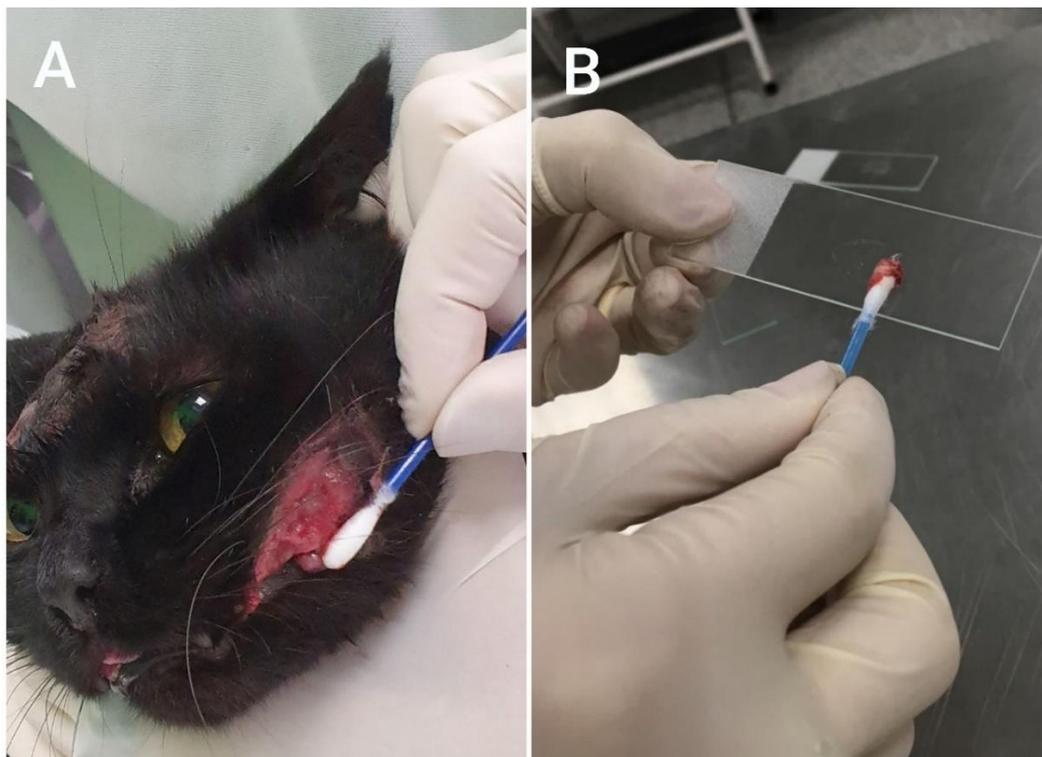
### 3 DIAGNÓSTICO

Devido a ampla variação nas manifestações clínicas de esporotricose, há também um vasto conjunto de diagnósticos diferenciais que, em humanos, incluem a leishmaniose, nocardiose, cromoblastomicose, rosácea, granulomas não infecciosos, psoríase (Lopez-Bezerra *et al.*, 2006) e, em felinos, inclui-se o carcinoma espinocelular, granuloma eosinofílico, prototecose, criptococose, feohifomicose, histoplasmose, piodermite bacteriana e leishmaniose, dentre outros (Gremião *et al.*, 2020).

O diagnóstico de esporotricose é classicamente realizado pela correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, incluindo cultura e análise de características fenotípicas (Barros *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015). A partir do exame físico é possível realizar a tipificação lesional, identificar a distribuição topográfica das lesões e por vezes a identificação de sinal patognomônico da doença “rosário

esporotricótico” (Larsson, 2011). Os exames podem ser realizados a partir de amostras de exsudato lesional, fragmentos lesionais submetidos a biópsia em casos de infecção disseminada ou sistêmica, amostras de sangue, urina, líquido sinovial, líquor, secreções obtidas de expectoração e outras secreções que variam conforme o órgão afetado e que podem ser utilizadas para a realização dos exames diagnósticos (Barros *et al.*, 2011).

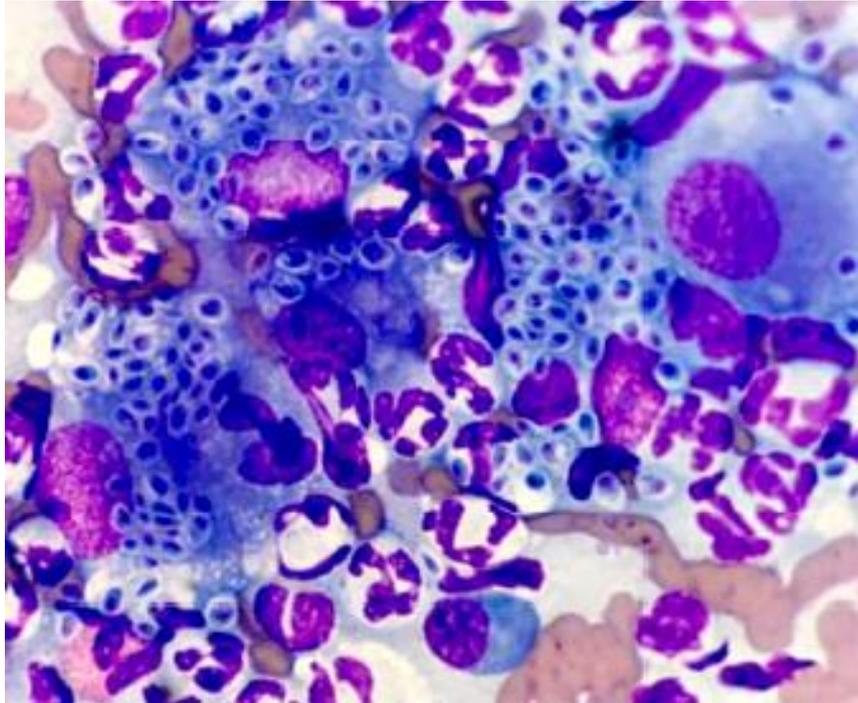
O diagnóstico citopatológico rotineiramente é realizado em gatos a partir amostras coletadas por técnicas como impressão lesional em lâmina, tapetamento com auxílio de hastes de algodão a partir de exsudato lesional (Figura 1.3), aspiração com agulhas finas de lesões nodulares ou decalque de fragmento biopsiado (Larsson, 2011; Gremião *et al.*, 2015). As principais colorações utilizadas na rotina são Diff Quik e Giemsa, e permite a observação de estruturas leveduriformes (Figura 1.4), pleomórficas, intra e extracelulares (Barros *et al.*, 2011).



**Figura 1.2** - Coleta de material para exame citopatológico

Nota: A: Colheita de exsudato com haste de algodão a partir de uma úlcera . B: Tapetamento para distribuição do material em lâmina de vidro para microscopia

Fonte: O autor (2019)



**Figura 1.3** - Exame citopatológico: lâmina obtida por esfregaço de lesão cutânea em felino infectado por *S. brasiliensis* corada com Giemsa, evidenciando a presença infiltrado piogranulomatoso com estruturas leveduriformes em grande número no interior de macrófago e extracelular em aumento de 1000 vezes.

Fonte: Queiroz-Tellez et al., (2019)

O padrão ouro para o diagnóstico definitivo de esporotricose é o isolamento fúngico a partir do cultivo de tecidos e secreções de lesões (Larsson, 2011); Lopez-Romero *et al.*, 2011; Lloret *et al.*, 2013; Gremião *et al.*, 2015). Porém este pode demorar entre sete a trinta dias para se obter o resultado positivo e este método não permite a diferenciação entre as espécies (Gonsales *et al.*, 2018).

A utilização de técnicas moleculares para diferenciar as espécies de *Sporothrix* spp se mostrou efetiva, porém estudos estão sendo desenvolvidos para tornar a técnica aplicável a rotina clínica (Boechat *et al.*, 2018), tal como a avaliação imuno-histoquímica, o que poderia ser empregada para reduzir o tempo do diagnóstico (Gonsalves *et al.*, 2018).

As diferentes manifestações clínicas podem influenciar o prognóstico e que para os gatos está diretamente relacionado com: número, extensão e localização das lesões, ocorrência de sinais respiratórios e condição geral de saúde do animal. Quanto a localização, a maioria das lesões encontram-se na cabeça, extremidade de membros e na cauda (Pereira *et al.*, 2009; Gremião *et al.*, 2015).

#### 4 ASPECTOS TERAPÊUTICOS

A escolha do tratamento depende essencialmente da forma clínica apresentada, do estado imunológico do paciente, das espécies envolvidas (Orofino-Costa *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020), estado geral do gato, ocorrência de sinais respiratórios, número e extensão das lesões (Gremião *et al.*, 2020). É preciso levar em conta informações da suscetibilidade dos antifúngicos e conhecer as características desses fármacos, pois existem fatores limitantes para a escolha dos medicamentos como o custo, a resistência antifúngica, a necessidade de terapias longas e desenvolvimento de para- efeitos, mormente hepatotoxicose (Malik *et al.*, 2009). Casos refratários de felinos infectados por *S. brasiliensis* resistentes ao itraconazol têm sido observados, alertando para a necessidade de avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos para escolha do tratamento (Nakazu *et al.*, 2020).

O tratamento da esporotricose em gatos é longo e difícil, tornando-se um grande desafio para os Médicos Veterinários, já que as medicações disponíveis comercialmente para os gatos são limitadas, produzem importantes efeitos colaterais (Barros *et al.*, 2004), requerem cuidados diários e a resposta ao tratamento nem sempre é satisfatória (Gremião *et al.*, 2020).

Em gatos, o itraconazol é o fármaco de escolha, tal como ocorre nos humanos, devido a sua segurança e efetividade podendo ser utilizado como monoterapia. (Pereira *et al.*, 2010; Gremião *et al.*, 2020; Orofino-Costa *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020). Gremião *et al.* (2011) relataram que mesmo com uma média de 32 semanas de tratamento com itraconazol, fornecido diariamente por via oral em alta dosagem, muitos gatos apresentaram-se refratários à medicação, sendo necessário associar a outros princípios ativos ou mesmo terapias complementares para otimizar o tratamento.

Em gatos as medicações são fornecidas por via oral e as dosagens do itraconazol variam desde aquelas sugeridas pela literatura 5-10mg/kg a cada 24 horas até estudos utilizando dosagens superiores entre 8,3 a 27,7 mg/kg a cada 24 horas (Gremião *et al.*, 2015;Gremião *et al.*, 2020).

Os efeitos colaterais mais frequentemente observados quando utilizados os triazólicos no tratamento da esporotricose felina estão relacionados a alterações gastrintestinais e hepatotoxicidade. O itraconazol é mais seguro em relação ao cetoconazol para os gatos apresentando menos efeitos adversos, porém os efeitos

colaterais mais frequentemente observados em decorrência de seu uso são: anorexia, vômitos, diarreia e aumento de enzimas hepáticas (Pereira *et al.*, 2010).

A associação entre itraconazol e iodeto de potássio é mais efetiva, é indicada para casos refratários a monoterapia com itraconazol, quadros respiratórios e cutâneos disseminados graves e casos de recorrência. Sua dose varia entre 2,5 a 20 mg/kg/vo/24h e a associação dos dois fármacos aumenta os índices de cura, reduz a carga fúngica nas lesões e conseqüente o potencial de transmissão da doença (Gremião *et al.*, 2020).

Outro medicamento indicado para utilização em casos refratários é a anfotericina B. Ela tem sido aventada como sendo a primeira opção para o tratamento de outras infecções fúngicas sistêmicas em humanos (Venazi *et al.*, 2019). Em humanos a anfotericina B é utilizada principalmente por via intravenosa no tratamento de esporotricose, em casos graves da doença, quando existe risco de óbito ou quando não houve boa resposta a terapia convencional (Almeida-Paes *et al.*, 2016; Orofino-Costa *et al.*, 2017). Em gatos, estudos utilizando anfotericina B são escassos e seu uso pela via intravenosa na espécie é limitado devido a ocorrência de graves efeitos adversos, sendo preferencialmente usada pela via intralesional (IL). Outra via de administração já relatada é a subcutânea, porém os resultados observados não foram bons, com baixa taxa de cura, alto índice de recorrência, falha terapêutica e efeitos adversos como abscessos e dor no local da aplicação entre outros (Pereira *et al.*, 2010; Gremião *et al.*, 2015).

Estudos recentes apontam para novas perspectivas de tratamento, com avanços no desenvolvimento de vacinas contra *Sporothrix* spp. Apesar dos resultados indicarem a possibilidade de uso, tanto na prevenção como no tratamento, estes ainda estão em fases iniciais e novas pesquisas são necessárias para validar essa opção terapêutica em todos os hospedeiros (Gremião *et al.*, 2017; Téllez-Martínez *et al.*, 2019).

#### 4.1 Terapias tópicas

As terapias tópicas constituem diferentes alternativas no tratamento da esporotricose, em humanos, é comumente utilizada em lesões cutâneas fixas de pacientes cujo uso de fármacos antifúngicos é limitado, ou em casos refratários com a finalidade de otimizar o tratamento (Malik *et al.*, 2009; Gremião *et al.*, 2011).

Em humanos opções de microemulsões contendo derivados azólicos para uso transdermal estão sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas (Ferreira *et al.*, 2019). O emprego de hipertermia ou termoterapia local já é utilizado na medicina há muitos anos no tratamento de lesões cutâneas localizadas e linfo-cutâneas, sendo uma opção eficaz e segura também indicada para gestantes e crianças (Himura *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2012). Apesar de pouco estudada nos felinos, é um tratamento menos oneroso e seguro, porém os limitantes dessa técnica para os gatos são: a localização e distribuição das lesões, a determinação do momento exato para descontinuação da terapia, disseminação sistêmica do fungo no organismo, utilização de temperaturas inadequadas, os pacientes precisam ser extremamente colaborativos e que apresentem somente lesões cutâneas fixas (Honse *et al.*, 2010).

Outra alternativa é a anfotericina B aplicada por via tópica, usada no tratamento de diferentes infecções micóticas em pessoas e animais (Malik *et al.*, 2009; Gremião *et al.*, 2009). Em um estudo, a anfotericina B deoxicolato aplicada IL associada ao fornecimento diário de itraconazol foi testado em 26 animais, apresentou uma taxa de cura em torno de 72,5%, após uma a cinco sessões. A aplicação foi realizada mediante anestesia geral e analgesia prévia e, após sua reconstituição, o fármaco é aplicado com auxílio de agulha fina nas lesões. Efeitos adversos locais e sistêmicos foram observados como a formação de abscesso estéril, edema, dor durante a aplicação e ocorrência de hepatotoxicidade (Gremião *et al.*, 2011).

Dentre as opções de terapias alternativas disponíveis, destaca-se a crioterapia que já é empregada com segurança no tratamento de diferentes enfermidades cutâneas, amplamente utilizada na dermatologia (Lucas e Larsson, 2007).

Na medicina ela vem sendo usada ao longo dos anos no tratamento de diferentes dermatoses infecciosas, bem como no tratamento de lesões cutâneas na esporotricose (Moraes *et al.*, 2008). A técnica é capaz de promover a completa recuperação em lesões cutâneas residuais e refratárias a terapia convencional (Galhardo *et al.*, 2010), sendo descrita como de fácil realização, bem tolerada e segura inclusive para gestantes, pacientes portadores de doenças cardiovasculares dentre outros. O protocolo utilizado é baseado na realização de sessões mensais até a cura clínica, utilizando a técnica de spray aberto (Flichman *et al.*, 2019). Na medicina veterinária esta técnica ainda foi pouco explorada no tratamento da esporotricose felina, havendo apenas um artigo publicado com uma série de 13 gatos tratados com

criocirurgia, apresentando resultados promissores quando utilizada em associação ao itraconazol (Souza *et al.*, 2016).

## 5 CRIOCIRURGIA

Criocirurgia ou crioablação referem-se aos métodos que utilizam o congelamento para promover morte celular e induzir a formação de necrose tecidual respectivamente, por meio de diferentes mecanismos de ação (Erinjeri *et al.*, 2010), através da aplicação de nitrogênio líquido diretamente sobre o tecido ou indiretamente, através da circulação do nitrogênio em um determinado modelo de sonda (Yuan *et al.*, 2017). No Brasil os termos crioterapia e criocirurgia são utilizados como sinônimos, porém crioterapia é designado para procedimentos menos invasivos e que não promovem a destruição tecidual (Moraes *et al.*, 2008).

### 5.1 Equipamento e técnicas

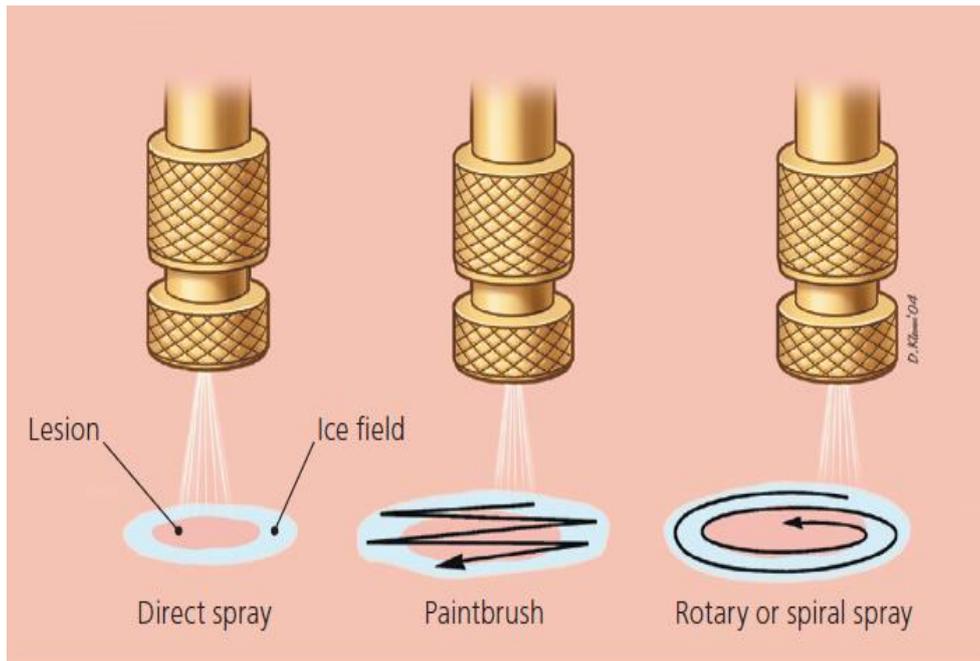
Diversos agentes criogênicos já foram utilizados ao longo do tempo, mas caíram em desuso devido a suas desvantagens (Yiu *et al.*, 2007). O agente criogênico de escolha para prática criocirúrgica é o nitrogênio líquido, a cerca de  $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Malburg *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2017), pois é incolor, inodoro, inerte, atóxico e seguro a manipulação desde que algumas precauções sejam tomadas. Este é o mais barato quando comparado a outros agentes criogênicos, é capaz de promover um rápido congelamento tecidual e deve ser armazenado em botijões apropriados, que tolerem vazamento e evaporação (Castro *et al.*, 2013).

O equipamento utilizado para crioterapia e ou criocirurgia é uma garrafa cilíndrica de aço inoxidável, com capacidades para 300mL e 500mL (Figura 5), com tampa associada a uma válvula de segurança e um gatilho externo que controla a quantidade e velocidade de saída do nitrogênio através de uma cânula acoplada as ponteiros (Castro *et al.*, 2013).

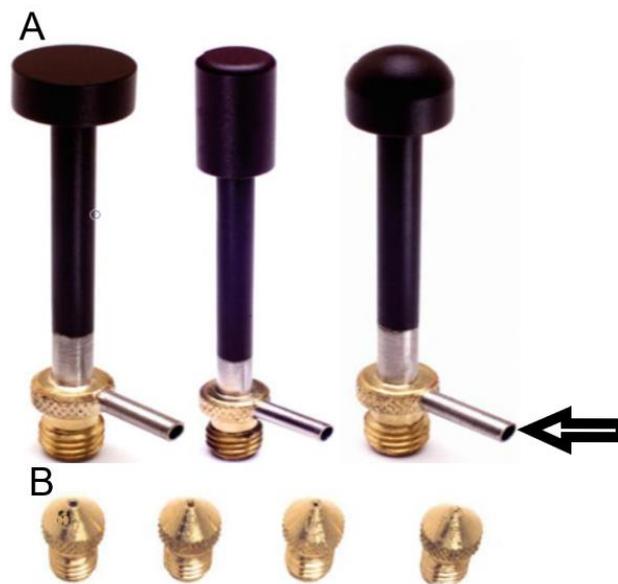


**Figura 1.4** - Cry-ogun® de 500ml, aparelho utilizado para aplicação do nitrogênio líquido na criocirurgia  
Fonte: Brymill (2021)

Existem três técnicas utilizadas para o congelamento de lesões cutâneas: 1- swab (cotonete); 2- spray aberto (ponteiros abertos ou spray/cone confinado) e 3- sondas/ponteiros fechadas (contato). Quando utilizado o spray aberto o nitrogênio é pulverizado diretamente sobre a lesão onde deseja-se obter o congelamento. Nesta técnica o nitrogênio pode ser aplicado de três formas (Figura 1.6): a- contínua no centro da lesão; b- em espiral do centro para a periferia lesional e c- com movimentos em pincel. O equipamento geralmente é posicionado em um ângulo de 90°, com uma distância entre 1 a 2 cm da lesão (Ziemmerman e Crawford 2012). Nas técnicas onde são utilizadas sondas fechadas, o nitrogênio circula internamente na sonda sendo eliminado e leva ao seu congelamento e, a mesma, entra em contato com o tecido a ser congelado. As ponteiros abertos estão disponíveis em diferentes tamanhos onde o diâmetro e volume do spray variam e as ponteiros fechadas apresentam ampla variação de formatos e tamanhos (Figura 1.7) (Malburg *et al.*, 2017).



**Figura 1.5** - Imagem ilustrativa das formas de aplicação do nitrogênio sobre a lesão, diretamente de forma contínua, em movimentos de pincel e em espiral  
 Fonte: Zimmerman e Crawford (2012)



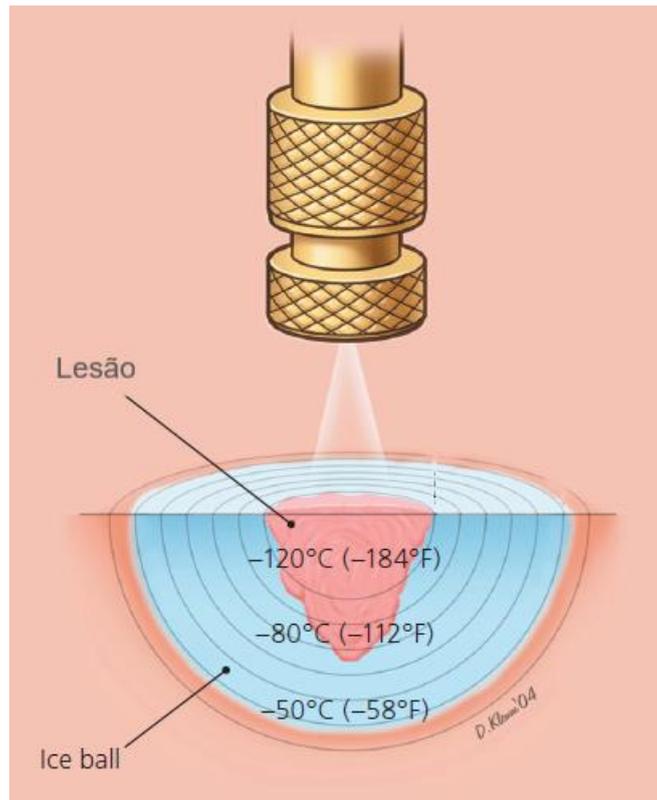
**Figura 1.6** - Imagem representando exemplos de ponteiros abertas e fechadas.  
 Nota: A: ponteiros fechadas, com diferentes formas. Seta indicando o orifício de saída do nitrogênio. B: ponteiros abertas para aplicação do nitrogênio com a técnica de spray aberto.  
 Fonte: Adaptado de Brymill (2021)

## 5.2 Mecanismo de ação

A partir do surgimento da criocirurgia moderna nos anos 60, com o desenvolvimento de novas tecnologias e equipamentos automatizados, Cooper (1960), descreveu que submetendo um tecido a  $-20^{\circ}\text{C}$  e mantendo essa temperatura durante 60 segundos é possível induzir a necrose tecidual. Nessa época surgiram os princípios básicos para a utilização da criocirurgia de maneira eficiente, baseando-se no congelamento rápido, descongelamento lento dos tecidos e a repetição do ciclo de congelamento (Gage e Baust, 1998).

O objetivo do tratamento criocirúrgico é na maioria dos casos promover destruição tecidual, sendo fundamental ter controle e precisão da técnica, para evitar destruição de tecidos saudáveis próximos as lesões por motivos estéticos e funcionais (Gage e Baust, 1998). A natureza da resposta tecidual varia com a intensidade da lesão criocirúrgica produzida, de modo que, a uma pequena exposição criogênica irá produzir apenas uma resposta inflamatória, e uma maior exposição irá induzir maior dano criogênico, destruição e conseqüentemente necrose tecidual.

Os mecanismos de morte tecidual são complexos e deve se levar em conta o fato da criocirurgia alcançar diferentes temperaturas nas diferentes áreas do tecido congelado (Figura 8) (Gage e Baust, 1998).



**Figura 1.7** - Imagem esquemática de uma lesão congelada, representando as diferentes temperaturas alcançadas na área congelada, a maior temperatura negativa é encontrada no centro da lesão, mais próximo ao ponto de aplicação do nitrogênio

Fonte: Adaptado de Zimmermann e Crawford (2012)

Em seu estudo Erinjeri *et al.* (2010), descreveram que a morte celular pode ocorrer por diferentes mecanismos, divididos em lesão celular direta e indireta.

Durante o congelamento tecidual ocorre a formação de cristais de gelo primeiramente no meio extracelular, tornando-o hiperosmótico, extraíndo água das células e conduzindo a desidratação celular. Dessa forma ocorre aumento na concentração de eletrólitos no interior da célula, levando a prejuízos para enzimas citoplasmáticas e danos às membranas celulares. Nesse processo ocorre um desarranjo na conformação tridimensional das proteínas e sua desnaturação, porém as ligações peptídicas não são desfeitas permitindo que as proteínas possam se reorganizar com a elevação da temperatura, podendo ocorrer a reidratação celular. Porém, quando o congelamento tecidual ocorre de maneira rápida, há formação de cristais de gelo dentro das células, que são mais efetivos por impedirem que a água escape para o meio extracelular. Em adição, ocorrem danos físicos às organelas e membranas celulares gerados pela formação de cristais de gelo dentro das células e, durante a fase de descongelamento, quando as temperaturas se elevam, ocorre a recristalização, quando os pequenos cristais de gelo no interior das células se fundem

e dão origem a grandes cristais que induzem importante dano celular. Alterações nos gradientes osmóticos tornam o meio extracelular hipotônico e com o dano na parede celular, a água entra na célula e ocasiona um aumento no seu volume, edema e rupturas das paredes celulares (Gage e Baust, 1998; Erinjeri *et al.*, 2010).

A formação de cristais de gelo causam necrose celular, e isso acontece quando a temperatura necessária para congelamento tecidual é alcançada o mais rápido possível. Algumas células podem apresentar a formação de cristais de gelo em seu interior quando atinge temperaturas entre  $-7^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ , entretanto a formação de cristais de gelo intracelular em todo tecido ocorre quando as temperaturas atingem  $-40^{\circ}\text{C}$ . Muitos eventos podem ser aventados como possibilidades de mecanismos de lesão celular direta durante o congelamento e descongelamento como por exemplo: formação de cristais de gelo extra e intracelular, desidratação, ruptura da parede celular, ruptura das organelas celulares, encolhimento e expansão celulares em respostas a diferentes concentrações de solutos. Porém ainda são necessários novos estudos para o completo entendimento do mecanismo de lesão celular direta causados pela criocirurgia (Erinjeri e Clark, 2010).

A lesão celular indireta é o resultado das mudanças teciduais induzidas pelo congelamento, tornando o microambiente desfavorável para a sobrevivência celular (Erinjeri *et al.*, 2010). A resposta circulatória inicial diante do resfriamento é a vasoconstrição e a estagnação circulatória e estase vascular frequentemente são consideradas a principal causa de morte celular no tratamento criocirúrgico. Quando o tecido congela a circulação cessa e, após o descongelamento, a temperatura se elevando em torno de  $0^{\circ}\text{C}$ , a circulação retorna, seguida pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Com o aumento da vasodilatação em poucas horas após o descongelamento ocorre a formação de edema local. Nessa etapa a lesão nas células endoteliais evolui para defeitos nas junções entre as células endoteliais e dano a parede capilar, o que resulta em aumento da permeabilidade vascular, edema local, agregação plaquetária e formação de microtrombos que são os responsáveis pela estagnação vascular e isquemia tecidual adicional. A diminuição drástica no aporte sanguíneo para as células priva qualquer possibilidade de sobrevivência das células expostas ao congelamento, originando desse modo uma necrose tecidual uniforme, exceto na periferia da área congelada (Gage e Baust, 1998). Em resposta ao edema e isquemia tecidual tem início a liberação de mediadores inflamatórios e substâncias vasoativas promovem hiperemia local, influxo de células inflamatórias como

neutrófilos e macrófagos e limpeza de detritos celulares, resultando em necrose de coagulação na área congelada (Erinjeri e Clark, 2010).

Esses eventos podem ser divididos em três fases: imediata, retardada e tardia (Lucas e Larsson, 2007; Castro *et al.*, 2013). A fase imediata ocorre ainda durante o período de congelamento e descongelamento dos tecidos, as células são destruídas instantaneamente em decorrência de eventos que ocorrem simultaneamente: desidratação e concentração de solutos, formação de cristais de gelo, recristalização, desnaturação de proteínas e o choque térmico (Lucas e Larsson *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2013). A fase retardada tem seu início algumas horas após o fim dos ciclos de congelamento e é caracterizada pela estase vascular (Lucas e Larsson, 2007). A morte celular é decorrente de alterações vasculares oriundas da aderência de células sanguíneas como hemácias e plaquetas na parede dos vasos, formação de trombos, hipóxia, anóxia, morte celular e necrose tecidual (Castro *et al.*, 2017).

A fase tardia, ou também chamada de fase imunológica, ocorre dias ou semanas após o congelamento tecidual. Ela é caracterizada por infiltração de células inflamatórias, atividade fagocítica e produção de anticorpos contra componentes das células do tecido destruído, o que pode ser interessante no tratamento de neoplasias malignas, já que alguns trabalhos apontam a diminuição no número de metástases após a criocirurgia (Lucas e Larsson, 2007; Castro *et al.*, 2013).

### 5.3 Ciclo de congelamento e descongelamento

Para melhor compreensão dos mecanismos de lesão celular presentes na criocirurgia é preciso analisar criteriosamente o ciclo de congelamento e descongelamento tecidual. Essas são etapas críticas na criocirurgia e podem significar o sucesso ou insucesso da técnica. Existem variações nas temperaturas alcançadas tanto durante o resfriamento quanto durante o aquecimento dos diferentes volumes teciduais congelados. O tecido mais próximo ao ponto de aplicação do nitrogênio ou do contato com a sonda, resfria mais rápido, enquanto, o tecido da periferia resfria de maneira mais lenta, denotando que o tempo de congelamento e de manutenção da temperatura mais fria alcançada exercem influência no grau de lesão celular (Gage e Baust, 1998). Tanto a lesão celular direta quanto a indireta são influenciadas por quatro fatores: a- taxa de congelamento, b- temperatura no tecido alvo, c- tempo de

manutenção da temperatura no tecido alvo e d- a taxa de descongelamento (Erinjeri e Clark, 2010).

O congelamento rápido é mais destrutivo, e a taxa de congelamento deve ser a mais rápida possível para que ocorra a formação de cristais de gelo intracelular letais para as células, pois existe uma importante correlação entre as altas taxas de congelamento e a formação de cristais de gelo intracelular (Gage e Baust, 1998; Erinjeri e Clark, 2010). A temperatura é mais baixa próxima ao ponto de contato com o nitrogênio ou com a probe (ponteiras fechadas) e, mais alta na periferia da área congelada, mais distante do ponto de contato. Baseado nisso o aumento no tempo de manutenção da temperatura letal no tecido alvo, pode permitir as células da periferia alcancem a temperatura letal para a formação de cristais de gelo intracelular. No entanto existe uma ampla faixa de variação na taxa de congelamento necessária para formação de gelo intracelular em diferentes tecidos congelados (Erinjeri e Clark, 2010).

No tratamento de neoplasias, o sucesso da criocirurgia requer que a temperatura letal seja alcançada em todo o tumor. De todas as variáveis avaliadas nos ciclos de congelamento e descongelamento, a temperatura tecidual é facilmente usada para monitorar a terapia, sendo que a temperatura crítica para que todas as células neoplásicas sejam expostas a temperatura letal é em torno de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-50^{\circ}\text{C}$ , minimizando a chance de sobrevivência celular (Gage e Baust, 1998).

A taxa de descongelamento pode também influenciar no grau de lesão celular e o descongelamento rápido pode aumentar a chance de sobrevivência das células, limitando o tamanho dos cristais de gelo intracelular. Portanto, quanto mais rápido for o congelamento, mais intenso será o dano celular e, quanto mais lento for o descongelamento, maior será a morte celular (Malburg *et al.*, 2017). Estudos sugerem que a repetição dos ciclos de congelamento e descongelamento, promovem maior destruição tecidual, por expor as células a condições extremas repetidas vezes, aumentando desse modo a eficiência da crionecrose (Gage e Baust, 1998; Castro *et al.*, 2013).

#### 5.4 Indicações

A criocirurgia e a crioterapia é amplamente utilizada na Medicina e na Medicina Veterinária nas áreas de dermatologia (Lucas e Larsson, 1996), sendo empregada no

tratamento de granulomas infecciosos, granulomas estéreis, piodermites profundas, cistos, hiperplasias, fístulas, entre outros (Lucas e Larsson, 2007); na oncologia, no tratamento de neoplasias tegumentares malignas e benignas (Castro *et al.*, 2013) e na oftalmologia para tratamento de enfermidades intraoculares, da superfície ocular, na conjuntiva e pálpebras (Tehrani e Fraunfelder, 2013). Na Medicina, esta também tem sido empregada com segurança e bons resultados no tratamento de tumores renais, hepáticos, na próstata, pulmonares, de tecidos moles e ósseos (Boas *et al.*, 2018) bem como no tratamento de dermatoses de origem infecciosa (De Moraes *et al.*, 2008).

No tratamento de esporotricose em humanos ela é empregada como uma terapia alternativa em casos refratários ao tratamento convencional, ou casos que as medicações são contraindicadas como por exemplo em gestantes (Ferreira *et al.*, 2011; Fichman *et al.*, 2018). Na esporotricose felina são raros os trabalhos desenvolvidos e, até o momento, apenas um artigo foi encontrado com uma série de 13 casos tratados, demonstrando que a técnica foi capaz de promover a remissão de lesões persistentes refratárias a terapia com itraconazol (Souza *et al.*, 2016).

## 5.5 Vantagens da técnica

O resfriamento dos tecidos e estruturas do sistema nervoso promove um efeito analgésico, portanto a criocirurgia tende a produzir menos dor quando comparada a outras técnicas de ablação tecidual. Esse fator permite em determinados casos que o procedimento criocirúrgico seja realizado apenas com anestesia local ou sedação leve para contenção de movimentos. Os aparelhos modernos permitem que as ponteiros sejam desconectadas após o congelamento e crio-adesão, o que permite que atuem de maneira independente, permitindo o congelamento de múltiplas lesões simultaneamente, otimizando o tempo cirúrgico (Erinjeri e Clark, 2010; Boas *et al.*, 2018). Quando comparada a técnicas de termoablação (micro-ondas ou radiofrequência), além de promover menos dor, a criocirurgia ocasiona menor dano ao tecido sadio adjacente a lesão tratada, além de permitir uma melhor monitoração do procedimento através da visualização da “ice-ball” (alo de congelamento) (Boas *et al.*, 2018).

Assim, a criocirurgia é considerada uma técnica minimamente invasiva, por requerer menores cuidados pós operatórios, menor tempo de recuperação e menor

custo quando comparada com outras técnicas cirúrgicas (Yuan *et al.*, 2017), além de ser segura, pouco cruenta, com raros relatos de infecções secundárias, e permitir a utilização em áreas de difícil acesso como a boca, períneo, reto, região interdigital e também ser associada a outras modalidades terapêuticas para otimizar os resultados dos tratamentos (Castro *et al.*, 2013). Alguns sinais interpretados como efeitos colaterais da crioterapia, são esperados e considerados normais, pois representam a evolução do processo fisiológico tecidual após o congelamento e podem ser influenciadas por diversos fatores como: paciente, tipo de doença, tamanho e localização das lesões, escolha da técnica, equipamento e cuidados pós operatórios. Alguns efeitos imediatos são: dor, hemorragia, insuflação pelo gás e edema; efeitos a curto prazo: formação de bolhas, infecção, granuloma piogênico e reações sistêmicas como febre; efeitos a longo prazo: hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperpigmentação, leucodermia, danos a nervos, alopecia, estenose de orifícios naturais devido a retração cicatricial decorrente da necrose tecidual (Malburg *et al.*, 2017).

As reações teciduais mais observados em humanos são listados abaixo (Quadro 1).

Quadro 1.1 - Efeitos adversos da criocirurgia em humanos

<b>Tipo de complicação</b>	<b>Efeito adverso</b>
Imediata	Hemorragia, formação de bolhas, edema, enfisema, dor, síncope vaso vago, cefaleia vascular
Tardia	Hemorragia, granulação tecidual excessiva, infecção, ruptura de tendão, ulceração
Temporária	Alteração de sensação, hiperpigmentação, queiloide, granuloma piogênico
Permanente	Alopecia, atrofia, necrose de cartilagem, hipopigmentação

Fonte: Adaptado de Zimmerman e Crawford (2012)

## REFERÊNCIAS

Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. *Med Mycol.* 2016;1(3):1-11.

Barros MB, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam salud pública.* 2010;27(6):455–60.

Batista-Duarte A, Téllez-Martínez D, De Andrade CR, Portuondo DL, Jellmayer JA, Polesi MC, Carlos IZ. *Sporothrix brasiliensis* induces a more severe disease associated with sustained Th17 and regulatory T cells responses than *Sporothrix schenckii sensu stricto* in mice. *Fungal Biology*. 2018;122(12):1163-70.

Boas FE, Srimathveeravalli G, Durack CJ, Kaye EA, Erinjeri JP, Ziv E, Maybody M, *et al.* Development of a searchable database of cryoablation simulations for use in treatment planning. *Cardiovasc Interv Radiol*. 2018;40(5):761-8.

Brymill. Brymill cryogenic sistens [internet]. 2020 [citado em 25 jan 2021]. Disponível em: <https://www.brymill.com/>

Castro JC, Castro VSP, Ramos SD, Huppes R, Nardi AB, Raiser AG, *et al.* Criocirurgia no tratamento de carcinoma de células escamosas em cão. *Rev Colombiana Cienc Anim*. 2013; 5: 213-21.

Castro JLC, Silveira AMM, Castro VSP, Santalucia S, Ferreira AP, Huppes RR, Raiser AG. Criocirurgia: revisão de literatura. *Medvep Dermatol*. 2013;3(6):11-25.

Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. *J Fung*. 2018;4(3):89.

Cooper IS. Criogenic surgery: a new method of destruction or extirpation of benign and malignant tissue. *New Engl J Med*. 1963;268:743-9.

De Souza CP, Lucas R, Ramadina, Pires TB. Criosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg*. 2016;18(2):137-43.

Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;21(8):187-19.

Falção EMM, De Lima Filho JB, Campos DP, Do Vale ACF, Bastos FI, Gutierrez-Galhardo MC, *et al.* Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). *Cadernos de Saúde Pública*. 2019;35(4):e00109218.

Ferreira CP, Gutierrez-Galhardo MC, Do Vale ACF. Criosurgery as adjuvant therapy in cutaneous sporotrichosis. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):181-3.

Ferreira CP, Valle ACF, Freitas DFS, Reis R, Galhardo MCG. Pregnancy during a sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Obst*. 2012;177(3):294-5.

Ferreira P, Noronha L, Teixeira R, Vieira I, Borba-Santos L, Viçosa A, *et al.* Investigation of a microemulsion containing clotrimazole and itraconazole for transdermal delivery for the treatment of sporotrichosis. *J Pharm Sci*. 2019;109(2):1026-34.

Fichman V, Do Valle ACF, De Macedo PM, Freitas DFS, Oliveira MME, Almeida-Paes R, *et al.* Cryosurgery for the treatment of cutaneous sporotrichosis in four pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(4): e0006434.

Gage A, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Criobiol.* 1998;37:171-86.

Gonsales FF, Fernandes NCCA, Mansho W, Montenegro H, Guerras JM, Araújo LJT, *et al.* Feline *Sporothrix* spp. detection using cell blocks from brushings and fine-needle aspirates: Performance and comparisons with culture and histopathology. *Vet Clin Pathol.* 2019;48(1):143-7.

Gremião IDF, Da Rocha EMS, Montenegro H, Carneiro AGB, Xavier MO, De Farias MR, *et al.* Diretriz para o manejo da esporotricose felina causada por *Sporothrix brasiliensis* e revisão da literatura. *Braz J Microbiol.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00365-3>

Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, Figueiredo ABF, Cavalcanti MCH, Pereira SA. Feline sporothricosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol.* 2015;53:15-21.

Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira AS. Epidemia zoonótica de esporotricose: transmissão de gato para humano. *PLoS Pathog.* 2017; 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>.

Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, Rodrigues MA, Chaves AR, Barros MBL. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *J Feline Med Surg.* 2009;11(8):720-3.

Gremião IDF, Schubach T, Pereira S, Rodrigues A, Honse C, Barros M. Treatment of feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Austr Vet J.* 2011;(89):346-51.

Hiruma M, Kawada A, Noguchi H, Ishibashi A, Conti Dias IA. Hyperthermic treatment of sporotrichosis: experimental use of infrared and far infrared rays. *Mycosis.* 1992; 35(11): 293-299.

Honse CO, Rodrigues AM, Gremião IDF, Pereira SA, Schubach TMP. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in cat. *Vet Record.* 2010;166(7):208-9.

Josan S, Bouley DM, Bosch MVD, Daniel BL, Pauly KB. MRI-Guided cryoablation: in vivo assessment of focal canine prostate cryolesions. *J Magn Reson Imaging.* 2009;30(1):169-76.

Kung DC, Monti F, Ballardín L, Ribeiro S, Condas LA, Boba-Santos E, *et al.* Antifungal susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolated from feline sporotrichosis. *Vet Dermatol.* 2020;1(31):6-109.

Larsson CE. Esporotricose (sporotrichosis). *Braz J Vet Res and Anim Sci.* 2011;8(3):250-9.

Lloret A, Hartmann K, Penissi GM *et al.* Sporotrichosis in cats ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2013;(15):619–23.

Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Ciênc.* 2006;78(2):293-306.

Lucas R, Larsson CE. Crioterapia na clínica veterinária: avaliação da praticidade, e efetividade em carcinoma espinocelular em felinos. *Braz J Vet Res Anim.* 2006;43:33-42.

Lucas R, Larsson CE. O uso da criocirurgia na dermatologia Veterinária. *Clín Vet Pequenos Anim.* 2007;69:74-84.

Malburg C, Albernaz VGP, Castro JLC. Criocirurgia: Efeitos e complicações pós - tratamento. *Vet Zootec.* 2017;24(1):35-48.

Malik R, Krockenberger MB, O'Brien CR. Intra-lesional amphotericin B--worth a try, maybe for lots of things, but we need more data! *J Feline Med Surg.* 2009;11(13):621-23.

Marimon R, Cano J, Gené J., *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* Species of clinical interest. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3198–206.

Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, Da Silva EA, Bernanrdi F, Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res.* 2014;19(10):269.

Moraes AM, Velho PENF, Magalhães RF. Criocirurgia com nitrogênio líquido e as dermatoses infecciosas. *An Bras Dermatol.* 2008;83(40):285-98.

Nakasu CCT, Waller SB, Ripoll MK, Ferreira MRA, Conceição FR, Gomes AR, *et al.* Esporotricose felina: uma série de casos de infecção por *Sporothrix brasiliensis* resistente ao itraconazol . *Braz J Microbiol.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00290-5>

Oliveira MME, Franco-Duarte R, Romeo O, Pais C, Criseo G, Sampaio P, *et al.* Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362(6):1-7.

Orofino-Costa R, Rodrigues AM, De Macedo PM, Bernardes-Ergmann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol.* 2017;92(5):606-20.

Pereira AS, Schubach TMP, Gremião IDF, Silva DT, Figueiredo FB, Assis NV, Passos SRL. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Sci Vet.* 2009;37(4):311-21.

Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Tropical.* 2014;47(3):392-3.

Pereira SA, Passos SRL, Silva JN, Gremião IDF, Figueiredo FB, Monteiro PCF, *et al.* Response to azole antifungal for treating feline sporotrichoses. *Vet Record.* 2010;166(10):290-4.

Queiroz-Telles F, Buccheri R, Bernard G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. *J Fung.* 2019;5(1):1-23

Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião IDF, Pereira SA, Orofino-Costa R, Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathol.* 2020: <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00425-0>

Rodrigues AM, Hoog GS, Zhang Y, De Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect.* 2014; 3(5):1-10.

Rossi CM, Odaquiri J, Larsson CE. Caracterização clínica e epidemiológica da esporotricose em cães e gato (São Paulo – Brasil). *Semina – Cienc Agrarias.* 2013;34(6):3889-996.

Sanchotene KO, Madrid IM, Klafk GB, Bergamashi M, Terra PPD, Rodrigues AM, Camargo ZP, Xavier MO. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence feline sporotrichosis. *Mycoses.* 2015;58(11):652-8.

Schubach, TM, Menezes, RC, Wanke B. Sporotrichosis. In CE, Grene. *Infectious Diseases of the Dog and the Cat.* 4.ed. St. Louis, Missouri: Elsevier;. 2012.

Silva DT, Pereira SA, Gremião IDF, Chaves AR, Cavalcanti MCH, Silva JN, *et al.* Esporotricose conjuntival felina. *Acta Sci Vet.* 2008;36(2):181-4.

Souza EW, Borba CM, Pereira AS, Gremião IDF, Langohr IM, Oliveira MME, *et al.* Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Sci Rep.* 2018;8(1):9074.

Venanzi E, Martín-Dávila P, López J., Maiz L, Gómez-García LPE, Gioia F, Escudero R., *et al.* Aerosolized lipid amphotericin B for complementary therapy and/or secondary prophylaxis in patients with invasive pulmonary aspergillosis: a single-center experience. *Mycopathol.* 2019;11046(1):1-12.

Yuan F, Zhao G, Panwhar F. Enhanced killing of HepG2 during cryosurgery with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- nanoparticle improved intracellular ice formation and cell dehydration. *Oncotarget.* 2017;8(54):92561-77.

Zimmerman EE, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. *Am Fam Physician.* 2012; 86(12):1118-24.

## CAPÍTULO 2

### ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico *Journal of Feline Medicine and Surgery*

#### **Avaliação da crioterapia no tratamento complementar da esporotricose felina**

##### **Autores:**

Victor M. da Rosa\*, Fabiana dos S. Monti\*, Lucas A. Ludwig\*, Jorge L. C. Castro\*, Luana Ballardin\*, Clara M. Rossoni\*, Marconi R. de Farias\* ‡,

\* Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, PR 80215-901, Brasil

‡ Clínica Veterinária Dermatovet, Rua Carmelo Rangel 85, Curitiba, PR CEP, Brasil

**Correspondência:** Victor M. da Rosa, Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, PR 80215-901, Brasil. E-mail: victor.medvet@gmail.com

**Fonte financiadora:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [Código de Financiamento 001].

Conflitos de interesse: não existem conflitos de interesse

## RESUMO

**Objetivos:** o objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia com base na resolução clínica (cura, ineficácia, óbito e recidivas), tempo de tratamento e a segurança da crioterapia a partir da ocorrência de efeitos adversos; como tratamento complementar da esporotricose felina.

**Métodos:** foram avaliados 28 gatos, apresentando lesões cutâneas fixas ou disseminadas com até 3cm de extensão, sem envolvimento sistêmico da doença. Divididos em dois grupos de estudo, sendo o grupo 1 composto por 14 gatos tratados com sessões de crioterapia em intervalos de 21 a 30 dias entre elas, em associação ao itraconazol por via oral, na dose de 100mg/gato/24h para animais com mais de 3kg e 25mg/kg/24h para animais entre 1 e 3kg, e ao iodeto de potássio na dose de 2,5mg/kg/24h. O grupo 2 composto por 14 gatos que receberam somente a terapia antifúngica nas mesmas dosagens e período do grupo 1. As medicações foram fornecidas por até 30 dias após completa remissão lesional para os gatos de ambos os grupos.

**Resultados:** as lesões dos gatos se concentravam na face, membros e tronco. Os tempos de tratamento foram de 73 dias no Grupo 1 e de 104 dias no Grupo 2. Entre os gatos do grupo 1, 12 (86%) obtiveram cura, dois (14%) abandonaram o tratamento e dois (14%) apresentaram recidiva durante os 12 meses o estudo, e a média de sessões de crioterapia foi de duas sessões. Entre os gatos do grupo 2, 11 (79%) obtiveram cura ao final do tratamento, dois (14%) abandonaram o tratamento, um (7%) caso houve ineficácia e em dois (14%) casos houve recidiva lesional. Os efeitos colaterais transitórios associados à crioterapia foram edema, eritema e escara, e os permanentes foram leucodermia e alopecia cicatriciais.

**Conclusões:** a crioterapia foi eficaz e segura como tratamento complementar da esporotricose felina, reduzindo seu tempo de tratamento sistêmico, mormente em casos cutâneos localizados ou disseminados de menores diâmetros, o que exige diagnóstico precoce da doença.

## INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação, com transmissão zoonótica, subaguda a crônica, que acomete diferentes espécies de mamíferos, em especial humanos e gatos domésticos (Rodrigues *et al.*, 2020; Gremião *et al.*, 2020). Apresenta distribuição ubiqüitária com maior concentração de casos em áreas de clima tropical e subtropical (Rodrigues *et al.*, 2014; Telles *et al.*, 2019), sendo o Brasil o país que registra o maior número de casos e de transmissão zoonótica da doença, com ampla expansão geográfica nas últimas décadas (Pereira *et al.*, 2014; Gremião *et al.*, 2015; Sanchotene *et al.*, 2015; Rossow *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020).

O principal agente etiológico da esporotricose felina no Brasil é o *S. brasiliensis*, considerada a espécie mais patogênica do complexo *Sporothrix* spp, sendo os gatos altamente suscetíveis a doença, desenvolvendo geralmente lesões cutâneo disseminadas, necrotizantes e com tendência à ulceração, com alta carga de elementos fúngicos, o que desempenha um importante papel na epidemiologia da doença e em sua transmissão (Sanchotene *et al.*, 2015; Gremião *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020). Considerando que *S. brasiliensis* pode ser transmitido de animais para pessoas, a vigilância e cuidados deve incluir também o meio ambiente além de animais e pessoas conforme preconizado na Saúde Única (Gremião *et al.*, 2020).

Lesões respiratórias são caracterizadas por lesões nódulo tumorais no espelho e ponte nasal, que sofre necrose de liquefação e ulceração, levando à estenose nasal, dispneia, estrímulos respiratórios e espirros paraxísticos (Gremião *et al.*, 2015; Gremião *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020).

A terapia convencional da esporotricose é baseada no uso sistêmico de antifúngicos por longos períodos, sendo o itraconazol o mais utilizado como monoterapia, ou associado ao iodeto de potássio, mormente em casos cutâneo-disseminados graves, respiratórios, refratários ou recorrentes (Gremião *et al.*, 2020). O tratamento da esporotricose felina pode durar meses e torna-se um desafio diante do limitado número de antifúngicos orais disponíveis para os gatos, pelos efeitos colaterais inerentes à terapia, alto custo das medicações (Gremião *et al.*, 2015; Gremião *et al.*, 2020), além da dificuldade em fornecer diariamente as medicações por via oral e os riscos de transmissão zoonótica durante as administrações (Chaves *et al.*, 2013).

Terapias alternativas são estudadas e empregadas com objetivo de otimizar e reduzir o tempo total de tratamento (Malik *et al.*, 2009), minimizando custos, para-efeitos, riscos de contágio e disseminação da doença. Em humanos, a criocirurgia tem sido empregada no tratamento da esporotricose em lesões isoladas e refratárias a terapia convencional, e em casos onde o uso de imidazólicos é contraindicado (Ferreira *et al.*, 2011; Fichman *et al.*, 2018). Na Medicina Veterinária, a crioterapia é pouco explorada para o tratamento da esporotricose felina, havendo apenas um estudo desenvolvido em uma série de casos refratários ao tratamento convencional (De Souza *et al.*, 2016).

No presente estudo se objetivou analisar a eficácia com base na cura clínica, piora lesional ou ineficácia e ocorrência de recidivas, a segurança com a partir da

ocorrência de efeitos adversos e alterações teciduais decorrentes do protocolo terapêutico e o tempo de tratamento da crioterapia como tratamento complementar em gatos domésticos com esporotricose.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Comitê de Ética**

O estudo foi aprovado pela comissão de ética para uso de animais CEUA-PUCPR, sob o número 01205-2019.

### **Objetivo**

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia da criocirurgia como tratamento complementar da esporotricose felina, a ocorrência de efeitos colaterais (gravidade e frequência) inerentes a técnica, tempo de resposta terapêutica e determinar se o protocolo criocirúrgico estudado é seguro e efetivo nos casos do estudo.

### **Avaliação clínica**

Todos os gatos com suspeição de esporotricose foram submetidos a completo exame clínico, as informações clínicas e epidemiológicas foram registradas. Após a triagem, os animais que obedecessem os critérios de inclusão, tiveram suas lesões classificadas em relação ao seu tamanho e distribuição em: cutânea fixa, quando o paciente apresentou apenas uma lesão isolada, com até 3 cm de extensão, e cutânea disseminada, quando o paciente apresentou até três lesões em regiões anatômicas distintas, com até 3 cm de extensão. Também foram classificadas quando a sua localização em: espelho ou plano nasal, periocular-pálpebra, perilabial, pavilhão auricular, cervical, lombo-sacra, membros torácicos, membros pélvicos, dígitos,

abdome e cauda. O estágio da infecção antes do início do estudo foi considerado em: primeira infecção, recidiva lesional e infecção refrataria ao tratamento.

### **Grupos de estudo**

Foram avaliados 28 gatos domésticos com esporotricose atendidos na Clínica Veterinária Escola da PUCPR, que foram divididos em dois grupos. O grupo 1 foi composto por 14 gatos tratados com crioterapia associada ao itraconazol e iodeto de potássio. O grupo 2 foi composto por 14 gatos tratados com a associação de itraconazol com iodeto de potássio. Os grupos foram divididos a partir da triagem prévia e características lesionais de forma aleatória, respeitando os mesmos critérios clínicos de inclusão e exclusão.

### **Critérios inclusão**

- Grupo 1: gatos com esporotricose com lesões cutâneas fixas ou disseminadas, de até 3 cm de extensão, localizadas em até três regiões anatômicas, que não apresentaram sinais sistêmicos da doença como espirros, estríduos respiratórios; gatos com histórico de recidiva lesional ou resistência ao tratamento convencional; gatos aptos a serem submetidos a procedimento anestésico e que os proprietários anuíram com o protocolo proposto.

Grupo 2: gatos com as mesmas características lesionais estabelecidas ao grupo 1, que não puderam ser submetidos a anestesia e que não tiveram anuência cirúrgica pelos proprietários.

## **Critérios de exclusão**

Gatos com múltiplas e extensas lesões; gatos com sinais sistêmicos da doença; gatos que não tiveram a confirmação diagnóstica; gatos debilitados que não puderem ser submetidos aos protocolos terapêuticos e cirúrgicos, e gatos que os proprietários não anuíram com critérios estabelecidos.

## **Exames diagnósticos**

Após o exame clínico, todos os gatos passaram por exame citopatológico das lesões, realizado pelo método de diferenciação celular a partir do exsudato cutâneo obtido por impressão em lâmina de vidro, ou por biopsia aspirativa com agulha fina, sendo imediatamente após a colheita, coradas com corante hematológico rápido (Panóptico®), sendo consideradas positivas aquelas com leveduras pleomórficas envoltas por halo claro associada a um infiltrado piogranulomatoso (Pereira *et al.*, 2011).

Na sequência, todos os gatos foram submetidos à coletas de amostras lesionais através de *swab* estéril, semeadas em meios de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (0,05 g/L), e incubadas a 25±1 °C por dois a sete dias. O diagnóstico foi estabelecido mediante crescimento filamentosos e visualização morfológica patognomônica de *Sporothrix* spp, em microscopia óptica (40x).

Para identificação molecular rápida das espécies do complexo *Sporothrix schenckii* utilizou-se a reação de PCR com *primers*, do gene calmodulina (CAL), em regiões espécie-específicas, conforme a metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2015). A amplificação do fragmento de 469 pb (0,46 kb) pelos *primers* Sbra-F/Sbra-R afirmaram amostra positiva para o *S. brasiliensis* e a amplificação do fragmento de 331 pb (0,33 kb) pelos *primers* Ssch-F /Ssch-R confirmaram *S. schenckii*.

## **Procedimento crioterápico**

Os gatos receberam preparo prévio com tricotomia e antissepsia local e foram submetidos à anestesia geral e bloqueio regional. A analgesia pós-operatória foi realizada com a utilização de Meloxicam 0,1mg/kg/SID e Tramadol 2 mg/kg/BID por até dois dias após o procedimento.

O equipamento utilizado para a crioterapia, e seus acessórios, foi o Cry-ogun (Cry-Ac<sup>®</sup>). A técnica de aplicação e os acessórios utilizados foram: spray aberto com ponteiros abertas; sondas fechadas ou de contato (Cilindrical probe<sup>®</sup>) e (mini probe<sup>®</sup>). O agente criogênico utilizado foi o nitrogênio líquido a -196°C.

O protocolo experimental contemplou a realização de até três sessões de crioterapia lesional, cada sessão composta por três ciclos de congelamento rápido e descongelamento lento, respectivamente.

O congelamento foi realizado no menor tempo possível, até atingir o alo desejado, limitando-se a extensão lesional e mantido durante 60 segundos. O descongelamento ocorreu de forma natural e lentamente, sendo desejado no mínimo o dobro de tempo utilizado para o congelamento. O intervalo entre as sessões foi de 21 a 30 dias.

## **Tratamento medicamentoso**

O tratamento medicamentoso foi realizado com a administração de itraconazol por via oral, na dose de 100mg/gato/24h para animais com mais de 3kg e 25mg/kg/24h para animais entre 1 e 3kg, associado ao iodeto de potássio na dose de 2,5mg/kg/24h, por até 30 dias após a completa cicatrização das lesões. Os gatos do grupo 1, receberam a terapia medicamentosa associada a crioterapia.

## **Análise da eficácia e segurança**

Para determinar a eficácia do protocolo crioterápico estudado foi utilizado os seguintes critérios: 1. Cura clínica; 2. Ineficácia/piora clínica; 3. Abandono; 4 Óbito. Foi considerado recidiva lesional o aparecimento de lesões nos mesmos locais durante o período de acompanhamento nos animais após a conclusão do tratamento.

Os gatos foram avaliados antes do início, durante e depois do tratamento para acompanhamento clínico e da evolução lesional. Os dados foram registrados em fichas nos dias 0, 21, 45, 65, 95 e 115.

Para monitorar a evolução das lesões tratadas com crioterapia e a resposta clínica individual ao longo do tempo até a cura, foi desenvolvido para o estudo um modelo baseado em escores para cada tipo de lesão apresentada Tabela 1 e a soma desses determinou o escore individual para cada gato nos dias de avaliação. Foram considerados três aspectos para atribuição das notas: lesão ativa (antes do início do tratamento); lesão em remissão (processo de cicatrização) e cura (completa cicatrização), da mesma maneira foi desenvolvida para o estudo uma escala de cores para representação esquemática desses escores com base na Tabela 2.

Tabela 1. Escore lesional, com base na característica de cada lesão e evolução.

<b>Lesões</b>	<b>Escore</b>
<b>Lesão ativa</b>	
Nódulo nasal	2,5
Úlcera (citologia positiva)	2
Nódulo (ulcerado ou não)	2
Exsudação	1,5
Crosta hemática	1,5
Placa	1
Edema	0,5
<b>Lesão em remissão</b>	
Edema	0,5
Eritema	0,5
Úlcera (citologia negativa)	1
Alopecia cicatricial	0,5
Crosta escairitiforme	0,5
Cura	
Cicatriz	0

Tabela 2. Escala de cores com base no escore individual.

Escore	Cor
3 a 4	
2,5	
2	
1,5	
1	
0	

Para avaliar a segurança da crioterapia foram documentadas a ocorrência de alterações teciduais transitórias (sangramento, eritema, exsudação, edema, inflamação e formação de esfacelo relacionada à necrose) e permanentes (retração tecidual, perda funcional decorrente de necrose em planos profundos, afetando tecidos sadios adjacentes, e ocorrência de tecido cicatricial caracterizado principalmente por alopecia e leucodermia).

A ocorrência de efeitos colaterais sistêmicos também foi monitorada como mudança de comportamento, vômitos, apatia, hiporexia e anorexia. Essas informações foram avaliadas em conjunto com exame físico e questionário feito aos proprietários durante o acompanhamento dos pacientes.

### **Análise estatística**

A demografia foi apresentada em variáveis categóricas e numéricas, descritas em porcentagem, ou média, máxima e mínima, e desvio padrão. Os dados incluídos foram raça, idade, sexo, padrão lesional. Em relação ao quadro clínico foram descritos dados referentes as regiões corporais mais acometidas, estado de infecção (primeiro acometimento, infecção recidivante e infecção refrataria).

Dados referentes ao tratamento foram descritos em porcentagem e números absolutos, incluindo quantidade de sessões necessárias no grupo tratamento; tempo

de tratamento de acordo com grupo controle e grupo tratamento (média, mínima e máxima, e desvio padrão); presença de efeitos colaterais; ocorrência de dificuldades na continuidade terapêutica (abandono, piora, ineficácia), bem como, pacientes que obtiveram cura.

Teste de normalidade por meio de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado ao tempo de tratamento em cada grupo do estudo, observando-se dados paramétricos no grupo em tratamento com crioterapia associada ao itraconazol e iodeto de potássio (Simard & L'Ecuyer, 2011). Mediante esta avaliação, fora aplicado Test T para comparação das médias do tempo de tratamento entre os grupos, considerando  $\alpha$  a 5% e  $p < 0,05$  (UCLA, 2021).

As proporções entre animais que tiveram terapia descontinuada por abandono, ineficácia, piora ou obtiveram cura foram comparadas por teste de comparação entre proporções, com intervalo de confiança a 95% % e  $\alpha < 0,05$  (Moore et al., 2012a).

As avaliações das escalas de escores lesionais em cada dia do estudo foram apresentadas isoladamente por participante e total de escore lesional por período. A análise dos escores ao longo dos dias de tratamento dos gatos do grupo 1, foi analisado por meio de Análise de variância de medidas repetidas, observando-se o valor de F, considerando intervalo de confiança a 95% % e  $\alpha < 0,05$  (Moore et al., 2012b).

O Software utilizado para as análises foi o STATA versão 14® (College Station, Texas, USA).

## RESULTADOS

### Características etiológicas, demográficas, epidemiológicas e clínicas

Todos os isolados advindos das amostras dos gatos incluídos no estudo amplificaram com os primers Sbra-F (CCC CCG TTT GAC GCT TGG) e Sbra-R (CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT) e foram visualizados em eletroforese e gel de agarose com um único produto, confirmando que eram *S. brasiliensis*. Em adição, os isolados identificados como *S. brasiliensis* não amplificaram com os primers Ssch-F /Ssch-R de fragmento de 331 pb (0,33 kb), passando pelo controle negativo de *S. schenckii*.

Entre os 28 gatos avaliados no estudo, 23 (82%) eram machos e cinco (18%) fêmeas, em sua totalidade sem raça definida, com idade média de 40 meses (min 3 - max 120), 14 (47%) eram não castrados, 23 (82%) dos gatos possuíam contactantes e desses 16 (53%) também possuíam lesões de esporotricose (tabela 3).

Tabela 3. Dados demográficos dos grupos de estudo com a somatória total sobre o número de gatos

Características	Grupo 1	Grupo 2	Total
Raça SRD	14 (100%)	14 (100%)	28 (100%)
Sexo			
Fêmea	4(28%)	1 (7%)	5 (18%)
Macho	10(72%)	13 (93%)	23 (82%)
Idade (meses)			
Média	48,8	31,9	40
Mediana	42	24	36
Mín-Max	7-120	3-72	3-120
Estado reprodutivo			
Não castrado	5 (36%)	9 (64%)	14 (50%)
Castrado	9 (64%)	5 (36%)	14 (50%)
Coabitantes	11	12	16 (57%)

O número e distribuição topográfica lesional estão organizados individualmente na tabela 4.

Tabela 4. Distribuição lesional com base em sua localização anatômica, divididas por grupo de estudo e com a somatória total para cada região.

Local da lesão	Grupo 1	Grupo 2	Total
<b>Cabeça</b>			
Plano nasal (total)	9	3	12
Perilabial	0	2	2
Periocular	4	4	8
Pina	2	3	5
<b>Tronco</b>			
Abdominal	0	1	1
Cervical	0	1	1
Lombo-sacral	0	1	1
<b>Membros</b>			
Membro torácico	4	4	8
Membro pélvico	0	2	2

### **Estágio da infecção**

Dos 14 gatos do grupo 1, sete (50%) eram recidiva da doença, dois (14%) eram casos refratários ao tratamento convencional e cinco (36%) se tratava de primo-infecção. Em relação ao grupo 2, dos 14 gatos desse grupo, quatro (28%) eram recidivas da doença e 10 (72%) primo-infecção.

### **Resolução clínica**

Dos 14 gatos incluídos no grupo 1, 12 (86%) obtiveram cura ao final do tratamento, dois (14%) abandonaram o tratamento. Durante 12 meses de acompanhamento ocorreu recidiva lesional em dois (14%) gatos. Em relação ao grupo 2, 11 (79%) obtiveram cura ao final do tratamento, dois (14%) abandonaram o tratamento e um (7%) caso de ineficácia. Durante 12 meses de acompanhamento ocorreu recidiva lesional em dois (14%) gatos.

Aplicando o teste de comparação entre proporções, não houve diferença significativa entre os índices de cura ( $p = 0,66$ ) e de ineficácia ( $p = 0,66$ ) entre os grupos.

## Tempo de tratamento

Em relação ao tempo de tratamento, os animais do grupo 1 apresentaram tempo médio de 73 dias (min 31 - max 115, mediana 67 dias), o qual foi inferior aos animais do grupo 2 ( $p = 0,008$ ), os quais apresentaram tempo médio de 104 dias (min 61 - max 155, mediana 91 dias).

## Número de sessões de crioterapia

Os dados em relação ao número total de sessões e ao número de sessões com base no sítio anatômico lesional estão dispostos abaixo. Dos 14 gatos do grupo 1, as sessões de crioterapia variaram de uma a três sessões, com a média de duas sessões. Em relação as necessidades de sessões por sítios anatômicos lesionais, os dados encontram-se expostos na Tabela 5. O número de sessões em relação ao estágio da infecção e classificação lesional os dados estão expostos na Tabela 6.

Tabela 5. Média de sessões por região anatômica com base na distribuição anatômica das lesões.

Região anatômica	Média de sessões	Mín-máx	Total de gatos
Plano nasal	2,2	1 – 3	9
Plano nasal isolado	2,6	2 - 3	7
Plano nasal + periocular	1,8	1 - 2	4
Pina	1,7	1 – 2	3
Membro torácico	1,7	1 – 3	3
Interdigital	2	.	1

Tabela 6. Média de sessões com base na classificação lesional e estágio da infecção.

Classificação lesional	Média de sessões	Mín-máx	Total de gatos
Cutâneo Disseminada	1,8	1 -3	6
Primeira infecção	2	1-2	3

Recidiva	1,7	1-3	3
Cutâneo fixa	2,3	1-3	8
Primeira infecção	2,0	2	2
Recidiva	2,6	1-3	6

### Evolução lesional

Com base no escore lesional e escala de cores pré determinados, os escores individuais dos gatos do grupo 1 estão dispostos a seguir Tabela 7. O número e as lesões observadas ao longo tratamento na Figura 1.

Tabela 7. Evolução lesional com base no escore individual ao longo do tratamento

Gatos	Dia 0	Dia 21	Dia 45	Dia 65	Dia 95	Dia 115
1*	6	3	3	1,5	0	0
2	6	1	0	0	0	0
3	5,5	3	1,5	1,5	0	0
4	4	3	1,5	1,5	0	0
5	4	3	2	0	0	0
6	4	2	0	0	0	0
7	4	3,5	1,5	0	0	0
8	3,5	3	1,5	1,5	0	0
9	3,5	3,5	0	0	0	0
10	3,5	3	0	0	0	0
11	3,5	0,5	1,5	0,5	0	0
12	3,5	1	.	.	.	.
13*	2	1,5	1	0	0	0
14	2	1	.	.	.	.
Escore Total	55	32	13,5	6,5	0	0

. \* pacientes que apresentaram recidiva lesional após cura clínica.

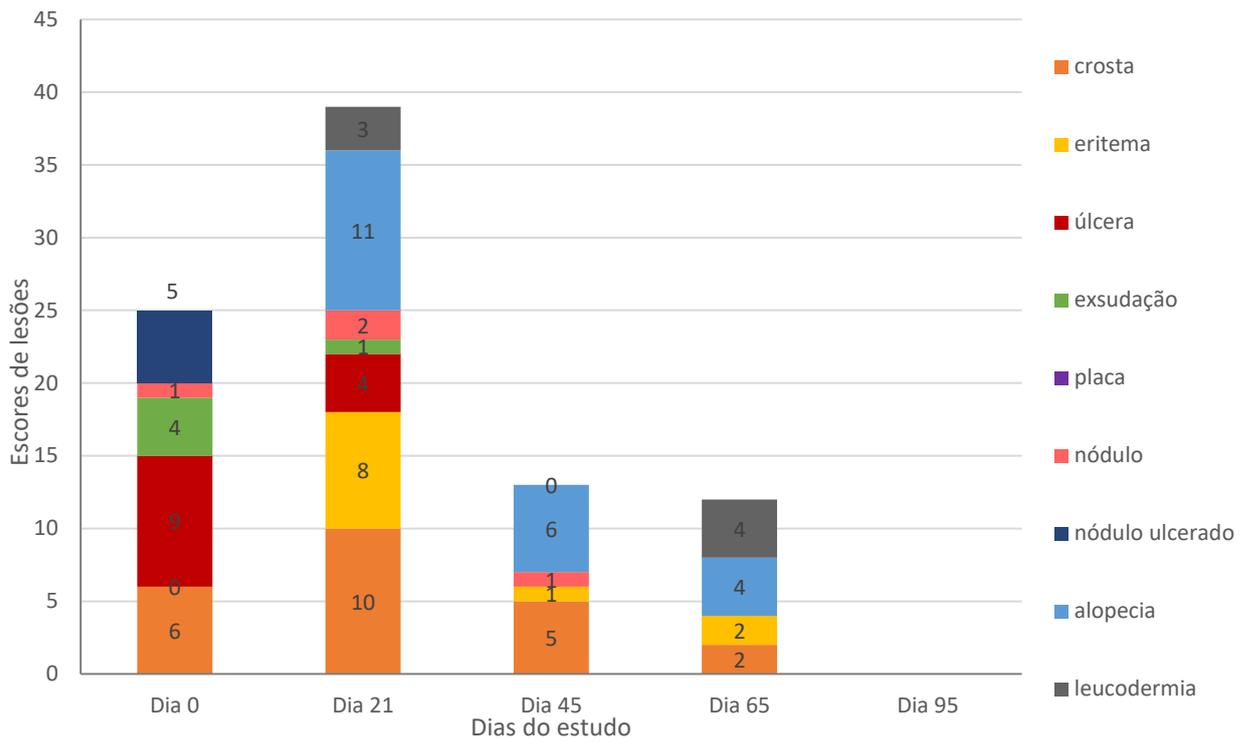


Figura 1. Representação gráfica do número e tipo de lesões ao longo do tratamento.

Ao final dos 115 dias de acompanhamento, todos os 12 gatos que concluíram o tratamento com crioterapia, apresentaram alopecia e leucodermia cicatriciais nos locais tratados (Figura 2) e (Figura 3).

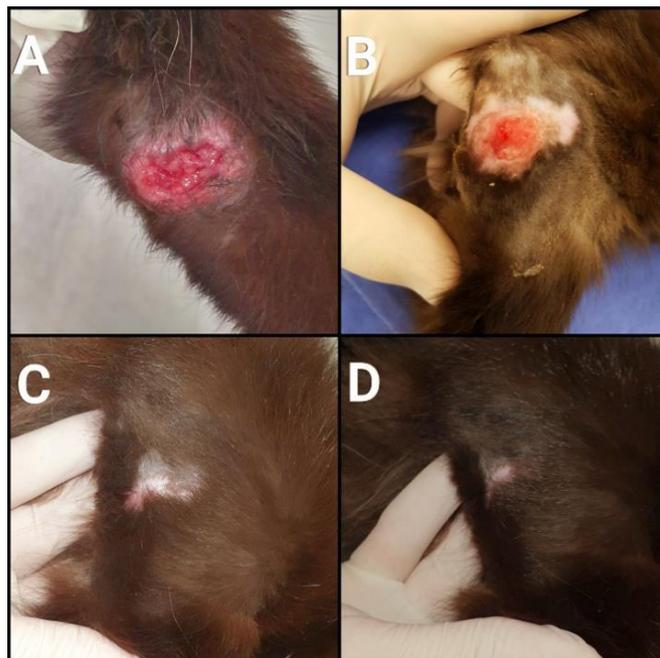


Figura 2. Imagem da evolução lesional

Notas: A. lesão inicial antes da criocirurgia caracterizada por nódulo ulcerado, com exsudação sanguinolenta; B. a mesma lesão após 21 dias, caracterizada por alopecia, leucodermia, úlcera no centro da lesão e eritema; C. a mesma lesão 21 dias após a segunda sessão de criocirurgia, caracterizada por alopecia, leucodermia; D. a lesão após completa cicatrização, reepitelização da periferia lesional aos 65 dias.

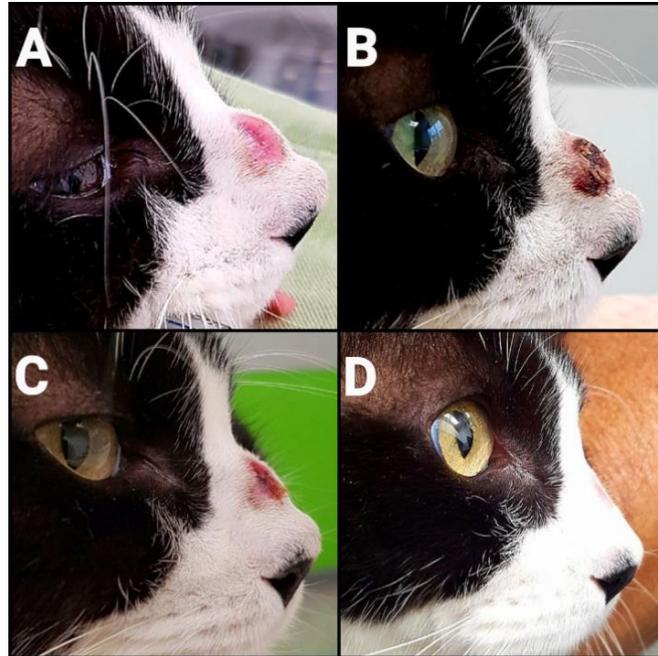


Figura 3. Imagem da evolução lesional

Notas: A. lesão inicial antes da criocirurgia caracterizada por nódulo localizado em plano nasal com a presença de alopecia e eritema; B. a mesma lesão após 15 dias após a criocirurgia, com presença de alopecia, eritema, recoberta por crosta escaritifforme; C. a lesão 21 dias após a segunda sessão de criocirurgia, caracterizada por alopecia, leucodermia, úlcera no centro da lesão após a remoção da crosta que recobria a lesão; D. a lesão após completa cicatrização, reepitelização da periferia lesional aos 115 dias.

A análise de variância de mensurações repetidas foi aplicada a 12 pacientes que concluíram o tratamento para determinar se houve diferença no escore lesional ao longo do tratamento com crioterapia associado ao itraconazol. Os resultados mostraram que o tratamento reduziu significativamente as médias do escore lesional proposto, ao longo dos dias 21, 45, 65 e 95 em relação ao início do estudo,  $F(4,44) = 52,23$ ,  $p < 0,005$ ; dos dias 45, 65 e 95 em relação ao dia 21, e de 95 dias de observação em relação a 45 dias ( $p < 0,05$ ) e tendência a diferença dos 65 dias de tratamento ( $p < 0,1$ ), de acordo com as margens preditivas (Figura 4). O escore se manteve em zero no dia 115 para todos os gatos e os mesmos se mantiveram sem lesões ao longo

dos meses seguintes de acompanhamento, exceto nos casos de recidiva lesional pontuados anteriormente.

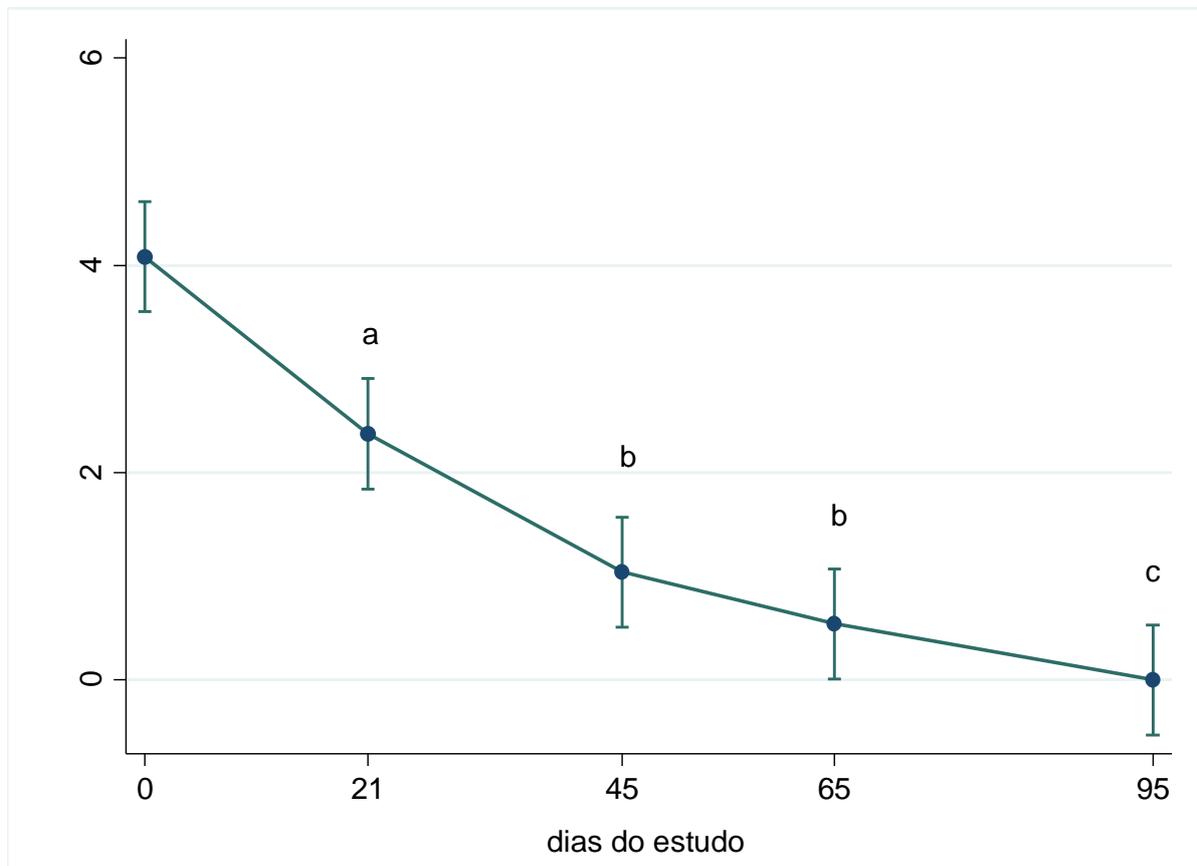


Figura 4. Representação gráfica demonstrando evolução lesional ao longo do tratamento.

Notas: <sup>a</sup> diferença significativa em relação ao início do estudo; <sup>b</sup> diferença significativa em relação ao dia 0 e dia 21 e <sup>c</sup> diferença significativa em relação a todos os dias anteriores do estudo.5.

### Efeitos adversos

Os efeitos colaterais observados durante o protocolo terapêutico em ambos os grupos estão listados a seguir Tabela 7. Entre os gatos do grupo 1, 12 (86%) apresentaram alterações estéticas cicatriciais como alopecia e leucodermia, sem a ocorrência efeitos colaterais sistêmicos. Entre os animais do grupo 2, 10 (72%) apresentaram efeitos colaterais sistêmicos com destaque para anorexia/hiporexia, vômitos e emaciação e 10 (72%).

Tabela 8. Descrição dos efeitos colaterais sistêmicos e tópicos, transitórios e permanentes observados nos gatos durante o estudo.

<b>Efeitos Colaterais</b>	<b>Grupo 1 (n= 14 / 100%)</b>	<b>Grupo2 (n= 14 / 100%)</b>	<b>Total</b>
Transitórios Sistêmicos			
Hiporexia/ Anorexia	.	5 (35%)	
Vômito	.	2 (14%)	
Emaciação	.	3 (21%)	
Apatia	.	.	
Transitórios dermatológicos			
Crostras	11 (79%)	.	
Edema	11 (79%)	.	
Eritema	4 (28%)	.	
Úlcera	1 (7%)	.	
Sangramento	1 (7%)	.	
Permanente			
Alopecia	12 (86%)	9 (64%)	
Leucodermia	12 (86%)	8 (56%)	
Cicatriz	12 (86%)	10 (72%)	

## DISCUSSÃO

No presente estudo, os gatos machos, mestiços, castrados, com acesso à rua e que viviam em ambientes com múltiplos animais foram os mais acometidos, geralmente oriundos de bairros periféricos de Curitiba-PR. Isso se deve a alta mobilidade desses animais ao redor de seus domicílios, envolvimento em brigas e disputas territoriais, aos hábitos inerentes à espécie como afiar as garras em árvores, entre outros fatores comportamentais que favorecem a disseminação da doença entre esses indivíduos e o estabelecimento de microepidemias domésticas (Gremião *et al.*, 2020).

As lesões predominantes foram: nódulo, nódulo ulcerado, úlceras, crostras, alopecia, exsudação, eritema e placa, localizadas na face, principalmente na ponte e espelho nasal e pavilhões auriculares, região cervical e membros torácicos, semelhante a outros estudos (Gremião *et al.*, 2020). Como a esporotricose geralmente se estabelece por implantação, o desenvolvimento de inflamações dermo-

subcutâneas e celulite justifica o aspecto nodular lesional; e a necrose de liquefação a formação de úlceras, exsudação e crostas. A topografia lesional observada nos gatos do estudo pode estar associada as áreas suscetíveis à agressões e implantes traumáticos após brigas.

Em relação ao tempo de tratamento, os gatos do grupo 1 que receberam sessões de crioterapia associada a terapia antifúngica sistêmica apresentou tempo médio significativamente inferior aos gatos do grupo 2 que receberam apenas a terapia antifúngica sistêmica. Isso pode ser devido a ação direta pelo congelamento dos tecidos e morte celular associado à crioterapia, ou ainda pela resposta imunológica sistêmica que ocorre como resposta ao procedimento criocirúrgico (Kazuya *et al.*, 2018), promovendo uma rápida recuperação lesional, o que pode ser um fator determinante na escolha dessa técnica como tratamento complementar no controle da doença.

Analisando os dados inerentes a resolução clínica entre os grupos 1 e 2, não houve diferença estatística significativa entre eles em relação a cura clínica, abandono, recidivas e houve ineficácia em apenas um caso no grupo 2, o que demonstra que a terapia com itraconazol e o iodeto de potássio, associada ou não à crioterapia, foram eficazes no controle da esporotricose. Os quatro casos de recidivas ocorreram após alta clínica ao longos dos meses seguintes de acompanhamento. Outra observação importante é que a maioria dos gatos do grupo 1 apresentaram lesões em região nasal. As lesões nasais geralmente estão associadas com pior prognóstico e difícil controle da doença, maior tempo de tratamento e casos refratários a terapia convencional, possivelmente pela baixa circulação periférica nos seios nasais, o que compromete as concentrações teciduais dos antifúngicos (Gremião *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020; Rossow *et al.*, 2020). Nestes casos, a crioterapia

associada ao itraconazol e iodeto de potássio se mostrou eficaz no controle da doença e diminuiu o tempo de tratamento, podendo ser indicado como terapia integrativa nestes casos.

O fornecimento diário de medicamentos, a dificuldade em manter os gatos confinados por longos períodos de tratamento e a aquisição da doença por membros da família são fatores que contribuem para o abandono terapêutico e até mesmo por pedidos de eutanásia pelos tutores. As taxas de abandono terapêutico aumentam a partir do segundo e sexto mês após o início do tratamento e também de forma prematura quando ocorre melhora clínica sem que se tenha conseguido a cura clínica (Chaves *et al.*, 2013). A recrudescência lesional e falhas terapêuticas são mais comuns em gatos com lesões nasais, com sinais respiratórios e a persistência lesional é frequente em gatos com múltiplas lesões cutâneas (Rossow *et al.*, 2020). Portanto a redução no tempo de tratamento nos gatos que receberam tratamento crioterápico em relação aos gatos que utilizaram somente terapia antifúngica sistêmica, pode contribuir para reduzir o abandono terapêutico, otimizar os índices de cura e reduzir as chances de recrudescência lesional.

Em gatos, há apenas um trabalho que avaliou o uso da crioterapia associada ao itraconazol no tratamento da esporotricose, e demonstrou cura em 84.6% dos gatos tratados, com tempo médio de 32 semanas (De Souza *et al.*, 2016). Apesar de corroborar com nossos achados em relação a taxa de cura, existe uma discrepância em relação ao tempo médio de tratamento, que pode estar ligado aos diferentes critérios clínicos utilizados. No presente estudo, o tempo médio de terapia dos dois grupos tratados foi inferior ao tempo descrito, entretanto, os gatos estudados apresentavam a doença em sua forma inicial, caracterizada por lesões cutâneas fixas ou disseminadas de menor gravidade e sem envolvimento sistêmico, ou o início de

recidivas lesionais, o que sugere que a criocirurgia poderia ser usada com maior ênfase e segurança nessas fases da doença.

O presente estudo demonstrou que ao longo do tratamento com o protocolo crioterápico ocorreu redução significativa no escore lesional já com 21 dias de estudo, e melhora significativa foi vista no dia 95 que se manteve mesmo após o dia 115 de acompanhamento e meses seguintes. O escore lesional apresentou diminuição em seus valores à medida que as lesões regrediam e cicatrizavam. Isso pode estar ligado com a resposta individual frente ao congelamento que pode variar desde uma resposta inflamatória até uma necrose tecidual extensa (Gauge, Baust, 1998). Alguns gatos tiveram melhora rápida e necessitaram apenas de uma única sessão de congelamento, enquanto outros foram necessárias até três sessões de congelamento para a completa cicatrização e cura, sendo que as lesões em plano nasal e gatos com mais de uma lesão foram os que necessitaram de maior tempo de tratamento, corroborando outros estudos (Gremião *et al.*, 2020).

Após a crionecrose foi comum a formação de edema local, eritema e formação de esfacelos. Alopecia e leucodermia foram os efeitos colaterais permanentes mais observados, limitados ao local de tratamento, e sem comprometimento funcional ou de estruturas saudáveis adjacentes a lesão tratada. Destacamos que consideramos como efeitos colaterais inerentes ao procedimento crioterápico, com base em dados publicados em humanos (Zimmerman e Crawford, 2012). Tais alterações são esperadas, frente ao processo tecidual após o congelamento.

Os gatos do grupo 2 apresentaram alterações gastrintestinais inerentes a terapia com itraconazol e iodeto de potássio por longos períodos. O que pode ser um fator limitante e colaborar para o abandono do tratamento (Gremião *et al.*, 2020).

Podemos observar que o protocolo crioterápico estudado se mostrou efetivo e promoveu remissão lesional em sete (50%) casos de recidivas lesionais e em dois (14%) de casos refratários ao tratamento convencional, sem a ocorrência de óbitos. Após 12 meses de estudo, recorrência lesional ocorreu em apenas dois gatos (14%), o que denota que a crioterapia pode minimizar a ocorrência de recidivas, na medida que promove a crionecrose (Erinjeri *et al.*, 2010) e ablação tecidual, além de ser capaz de ativar a resposta humoral e desencadear respostas imunológicas sistêmicas (Kazuya *et al.*, 2019), o que diminui de forma significativa a quantidade de células fúngicas e permitiu a completa cicatrização tecidual.

## **CONCLUSÃO**

A crioterapia em associação ao itraconazol e iodeto de potássio é uma terapia eficaz e segura no tratamento das fases iniciais da esporotricose felina cutânea e nasal, reduziu o tempo de terapia sistêmica, sendo associada alopecia e cicatriz residual.

## **REFERÊNCIAS**

1. Rodrigues AM, Hoog GS, Zhang Y, De Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect.* 2014; 3(5):1-10
2. Teles FQ, Buccheri R, Bernard G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. *J Fung.* 2019;5(1):1-23
3. Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Tropical.* 2014;47(3):392-3
4. Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, Figueiredo ABF, Cavalcanti MCH, Pereira SA. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol.* 2015;53:15-21
5. Sanhotene KO, Madrid IM, Klafk GB, Bergamashi M, Terra PPD, Rodrigues AM,

Camargo ZP, Xavier MO. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence feline sporotrichosis. *Mycoses*. 2015;58(11):652-8

6. Rossow JA, Queiroz-Telles F, Cáceres DH, Cerveja KD, Jackson BR, Pereira SA. One health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative review of an emergent zoonotic fungal pathogen in South America, *J Fung*. 2020; 6 (4):247.

7. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira AS. Epidemia zoonótica de esporotricose: transmissão de gato para humano. *PLoS Pathog* . 2017; 13 (1): <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>.

8. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira AS. Epidemia zoonótica de esporotricose: transmissão de gato para humano. *PLoS Pathog*. 2017; 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>.

9. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião IDF, Pereira SA, Orofino-Costa R, Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathol*. 2020: <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00425-0>

10. Chaves AR, De Campos MP, Barros MBL, Do Carmo CN, Gremião IDF, Pereira SA, Schunach TMP. Treatment abandonment in feline sporotrichosis – Study of 147 cases. *Zoonoses public health*. 2013;60(2): 49-53.

11. Malik R, Krockenberger MB, O'Brien CR. Intra-lesional amphotericin B--worth a try, maybe for lots of things, but we need more data! *J Feline Med Surg*. 2009;11(13):621-23

12. Ferreira CP, Gutierrez-Galhardo MC, Do Vale ACF. Cryosurgery as adjuvant therapy in cutaneous sporotrichosis. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):181-3

13. De Souza CP, Lucas R, Ramadinha, Pires TB. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg*. 2016;18(2):137-43.

14. Simard R, L'Ecuyer P . Computing the Two-Sided Kolmogorov–Smirnov Distribution". *Journal of Statistical Software*.2011; 39 (11): 1–18. [doi:10.18637/jss.v039.i11](https://doi.org/10.18637/jss.v039.i11)

15. UCLA Institute for digital research and education – Statistical Consulting: T-test. <https://stats.idre.ucla.edu/stata/output/t-test/a>. Acessado em 27 de julho, 2021.

16. Moore D. S.; McCabe, G.P.; Craig, B. A. Chapter 8: Inference for Proportion. In: *Introduction to the Practice of Statistics*.2012a; (7): 473-510.

17. Moore D. S.; McCabe, G.P.; Craig, B. A. Chapter 12: One-Way Analysis of Variance. In: *Introduction to the Practice of Statistics*.2012b: (7): 473-510.

18. Brandolt TM, Madrid IM, Poester VR, Sanchotene KO, Basso RP, Klafke GB, *et al*. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil 2012-2017. *Med Mycol*. 2019; 57(5):527-33.

19. Poester VR, Mattei SA, Madrid IM, Pereira JTB, Klafke GB, Sanchotene KO, *et*

a). Sporotrichosis in Southern Brazil towards an epidemic?. Zoonoses Public Health. 2018;65(7):815-21.

20. Gremiao, IDF, Schubach T, Pereira S, Rodrigues A, Honse C, Barros M. Treatment of feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. Austr Vet J. 2011;(89):346-51

21. De Miranda LHM, Silva JN, Gremião IDF, Menezes RC, Almeida-Paes R, Dos Reis ER, *et al.* Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. In skin lesion of cats for predicting antifungal treatment response. J Fungi. 2018;4(3):92. DOI: 10.3390/jo4030092

22. Nakasu CCT, Waller SB, Ripoll MK, Ferreira MRA, Conceição FR, Gomes AR, *et al.* Esporotricose felina: uma série de casos de infecção por *Sporothrix brasiliensis* resistente ao itraconazol. Braz J Microbiol. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00290-5>

23. Fichman V, Do Valle ACF, De Macedo PM, Freitas DFS, Oliveira MME, Almeida-Paes R, *et al.* Cryosurgery for the treatment of cutaneous sporotrichosis in four pregnant women. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(4): e0006434.

24. Pereira AS, Menezes RC, Gremião IS, Silva JN, Honse CO, Figueiredo FB, Da Silva DT, *et al.* Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. Jf Feline. 2011;(13):220-3.

25. Bargman H. Successful treatment of cutaneous sporotrichosis with liquid nitrogen: report of three cases. Mycoses. 1995;38(7-8) 28287.

26. Ferreira CP, Guttierrez-Galhardo MC, Do Vale ACF. Cryosurgery as adjuvant therapy in cutaneous sporotrichosis. Braz J Infect Dis. 2011;15(2):181-3.

27. Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. J Vasc Interv Radiol. 2010;21(8):187-19.

28. Zimmerman EE, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. Am Fam Physician. 2012; 86(12):1118-24.

29. Kasuya A, Ohta I., Tokura Y. Structural and immunological effects of skin cryoablation in a mouse model. Plos One. 2015;10(3).

## CAPÍTULO 3

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esporotricose é uma doença ainda negligenciada em franca expansão, os gatos domésticos são os animais mais susceptíveis à infecção pelo fungo *S. brasiliensis* e são a principal fonte de contaminação para humanos. O tratamento desta enfermidade é desafiador. A terapia antifúngica sistêmica é hoje a base do tratamento dessa doença, o itraconazol é o medicamento de escolha tanto em humanos como nos gatos, sendo associado ao iodeto de potássio em casos graves ou refratários. Nos felinos, a ocorrência de efeitos colaterais sistêmicos, alto custo das medicações e a dificuldade no fornecimento diário desses medicamentos por via oral, contribuem para o abandono ao tratamento. Esses fatos associados ao perfil socioeconômico da maioria das famílias que possuem gatos nas regiões periféricas, comumente negligenciadas e a ausência de políticas públicas efetivas para o controle da doença, contribuem para o rápido avanço da doença no Brasil. A infecção pelo *S. brasiliensis* afeta tanto pessoas como animais, sendo necessário também a vigilância e cuidados a partir do meio ambiente, além de animais e pessoas, conforme preconizado na Saúde Única.

Este estudo demonstrou que a crioterapia utilizando nitrogênio líquido é uma ferramenta útil e segura, desde que seja utilizada com critérios, por uma equipe qualificada e treinada, ela pode ser empregada no tratamento da esporotricose felina. Observamos que mesmo em lesões nasais, que geralmente são de difícil tratamento, o protocolo proposto foi capaz de promover completa remissão lesional, também reduziu o tempo de tratamento em relação aos gatos que receberam apenas a terapia convencional. A ocorrência de efeitos colaterais limitou-se a alterações teciduais transitórias como: edema, eritema formação de esfacelo e alterações teciduais definitivas inerentes ao processo cicatricial.

É importante levar em conta o risco anestésico envolvido, a necessidade de profissionais treinados e qualificados, bem como, uma estrutura com equipamentos adequados para a execução da técnica e para isso uma avaliação criteriosa é necessária, além de cuidados rigorosos acerca da biossegurança dos pacientes e dos membros da equipe executora. o levantamento dos custos que podem variar em diferentes regiões, também podem ser considerados para a escolha da crioterapia.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A - NORMAS DO PERIÓDICO ESCOLHIDO**

A Norma da revista Journal of Feline Medicine and Surgery encontra-se disponível em: <https://journals.sagepub.com/author-instructions/JFM>

## ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA

TÍTULO DA PESQUISA	AVALIAÇÃO DA CRIOCIRURGIA NO TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL	MARCONI RODRIGUES DE FARIAS		
Nº DO PARECER / VERSÃO	01205 / 2ª Versão		
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Felis catus</i> / Gatos	Nº DE ANIMAIS	30
SEXO / IDADE / PESO	Variados	Nº SISBIO <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Variados	ATIVIDADES <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
LOCAL (IS) <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica	ESPECIE -- GP TAXONÔMICOS <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
APRESENTAÇÃO DO PROJETO	Devido ao pequeno número de estudos publicados acerca da efetividade da crioterapia no tratamento de granulomas infecciosos, o presente estudo trará informações importantes principalmente no que tange a efetividade da técnica, padronização de protocolos terapêuticos e colateralidades da técnica. O impacto social do estudo será direto no controle da doença de forma mais rápida e com menos riscos a população. Pois, se comprovada a efetividade da técnica e sua aplicabilidade na rotina clínica, teremos uma redução nos custos ligados aos longos tratamentos e os riscos à saúde das pessoas que moram nas áreas com maior número de casos. Tendo em vista que a doença apresenta maior ocorrência em famílias de baixa renda.		
OBJETIVO DA PESQUISA	A pesquisa tem como objetivo geral avaliar a eficácia da criocirurgia no tratamento da esporotricose felina. E como objetivos específicos: Avaliar a eficácia da criocirurgia no tratamento das lesões cutâneas fixas relacionadas à esporotricose felina, avaliar a eficácia da criocirurgia no tratamento da esporotricose nasal felina, avaliar a melhor técnica de criocirurgia e o melhor protocolo terapêutico para ser indicada no tratamento da esporotricose em gatos, avaliar a ocorrência de efeitos colaterais pelo uso da criocirurgia para o tratamento da esporotricose felina, avaliar o tempo de resposta terapêutica, avaliar a taxa de recorrência da doença nos animais previamente tratados com criocirurgia.		
AVALIAÇÃO DOS RISCOS E BENEFÍCIOS	Como todos os pacientes serão submetidos a um procedimento anestésico existe o risco anestésico, pois sabe-se que mesmo um paciente hígido está sujeito a intercorrências durante o procedimento, por isso a equipe anestésica acompanhará os procedimentos e os exames sanguíneos serão realizados associados a avaliações clínicas, para minimizar os riscos inerentes a técnica.		
CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA	Não há.		
TERMOS OBRIGATORIOS	Apresentados.		
RECOMENDAÇÕES	Não há.		
CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS	Não há.		
CONSIDERAÇÕES FINAIS	O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi <b>APROVADO</b> pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar uma emenda à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta a parte do protocolo a ser		

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

	modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.
<b>SITUAÇÃO DO PARECER</b>	<b>APROVADO</b>

CURITIBA, 15 de agosto de 2019

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha  
Coordenador CEUA-PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 11 de abril de 2019

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

REGISTRO DO PROJETO: **01205 – EMENDA** (Inclusão de pesquisadores / Exclusão de pesquisadores / Prorrogação de cronograma e prazo / Modificação do número amostral)

TÍTULO DO PROJETO: **AVALIAÇÃO DA CRIOCIRURGIA NO TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

MARCONI RODRIGUES DE FARIAS

**EQUIPE DE PESQUISA**

CLARA MARIA ROSSONI, VICTOR MATHEUS DA ROSA, JORGE LUIZ COSTA CASTRO, GUSTAVO ALESSIO TREVISSAN

**INSTITUIÇÃO**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA E/OU CURSO**

Escola de Ciências da Vida – Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	Não Informa	QUANTIDADE DE ANIMAIS	Não informa
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Felis catus</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Variável	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Variável	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	CVE PUCPR – CV particulares – CCZ	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado CEUA–PUCPR – em consonância com a legislação (*lei 11.794 8/10/2008*), que regulamenta os procedimentos para o uso científico e acadêmico dos animais, visando à promoção do seu bem-estar, bem como contribuindo a redução no número de animais e para o refinamento dos procedimentos decide que para dar continuidade ao processo de avaliação deste projeto, necessita que sejam sanadas as seguintes **pendências**:

- **O colegiado da CEUA-PUCPR solicita alguns esclarecimentos sobre qual seria a extensão do cronograma solicitado;**
- **Qual o número de animais necessários para continuidade da pesquisa;**
- **E quais foram os problemas logísticos que surgiram no decorrer da pesquisa;**

O pesquisador tem 60 dias, após a ciência do parecer com pendência para responder aos quesitos formulados pelo CEUA-PUCPR em seu parecer, as quais podem ser respondidas no formato de errata que será anexada no projeto original. Após este prazo o projeto será considerado "Retirado". (RESOLUÇÃO N.º 036/2016- CONSUN)

Profa. Dra. Kelly Mazutti  
Coordenadora Adjunta– CEUA PUCPR



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br