

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



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

MARCELLE DE FIGUEIREDO MOUCHALOUAT

CROMOBLASTOMICOSE.
ESTUDO DE UMA SÉRIE DE 14 CASOS
ATENDIDOS NO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA
EVANDRO CHAGAS - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ,
RIO DE JANEIRO, DE 1994 A 2005.

Rio de Janeiro

2008

Cromoblastomicose.

Estudo de uma série de 14 casos atendidos no Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, de 1994 a 2005.

MARCELLE DE FIGUEIREDO MOUCHALOUAT

Dissertação apresentada ao Curso de
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
para a obtenção do grau de mestre em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos
Francesconi do Valle.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Clara
Gutierrez Galhardo.

Rio de Janeiro

2008

“A Deus por todas as coisas”.

AGRADECIMENTOS

À toda equipe do Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas por sua atenção e paciência.

Às minhas colegas do Curso de Pós-Graduação pela amizade e momentos únicos vividos juntos.

Aos meus professores e orientadores Dr. Antonio Carlos Francesconi do Valle e Dr^a. Maria Clara Gutierrez Galhardo pelo incentivo, carinho e apoio que me levaram à execução e conclusão deste trabalho. O meu muito obrigada.

Ao Dr. Bodo Wanke, revisor desta dissertação, pela atenção dada a mim e ao meu trabalho.

Ao Dr. Paulo Cezar Monteiro Fialho e Mônica dos Santos Elias (Setor de Diagnóstico Micológico), Dr^a. Janice Mery C. de Oliveira Coelho e Dr. Leonardo Quintela (Laboratório de Anatomia Patológica) e Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira e Patrícia Morais S. Tavares (Setor de Imunodiagnóstico) por colaborarem através de apoio e ensinamentos nas diferentes etapas deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil e à Regina Paiva Daumas pela orientação no preparo e análise dos dados.

Ao Serviço de Documentação e Estatística pela contribuição no fornecimento de prontuários e dados estatísticos essenciais para a execução deste trabalho.

À minha família, amigos e Marcelo pela compreensão, paciência e sobretudo amor.

“A sorte privilegia as mentes
brilhantes” (Isaac Newton).

Mouchalouat, M.F **Cromoblastomicose. Estudo de uma série de 14 casos atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, de 1994 a 2005.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

RESUMO

Este estudo de série de casos englobou 14 casos de Cromoblastomicose (CBM), micose crônica de longa evolução, atendidos no Serviço de Dermatologia no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) - Fiocruz, no período de 1994 a 2005, e teve o objetivo de avaliar os aspectos epidemiológico, clínico, diagnóstico e terapêutico da micose. A presença de células muriformes no exame histopatológico ou micológico foi o critério de inclusão dos pacientes no estudo. Os resultados foram apresentados sob forma de dois artigos. O sexo masculino foi predominante em 71,4% dos casos (10/14), a idade variou de 39 a 77 anos (média 61). Contato com o solo foi relatado por 11 pacientes, sendo 8 deles por motivos profissionais e 3 por atividades de lazer. Destes 11, apenas 3 referiam trauma com planta e madeira. Hipertensão arterial sistêmica (HAS) em seis pacientes (42,9%), Diabetes mellitus (DM) em quatro pacientes (28,6%), neurocisticercose em um paciente (7,1%) e imunossupressão induzida por drogas (tacrolimus, micofenolato mofetil e prednisona) em um paciente (7,1%) foram as comorbidades apresentadas. O tempo de doença variou de 8 meses a 32 anos, sendo em metade dos pacientes maior que 10 anos. O tipo clínico verrucoso (seis casos) e a forma grave (sete casos) (lesões disseminadas segundo a classificação proposta por Queiroz-Telles e cols., 1992a) foram os mais encontrados, assim como a localização em membros inferiores em metade dos pacientes. As formas graves estiveram relacionadas ao longo tempo de evolução. O exame micológico isolou *Fonsecaea pedrosoi* em 71,4% (10 casos) e *Cladophialophora carrionii* em um caso (7,1%), não havendo o isolamento em dois casos e um dos isolados não pôde ser classificado. Confirmação das espécies pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em dez isolados de cultura. Tratamento no IPEC foi realizado em 11 pacientes, 2 foram transferidos para outros estados e um morreu de outra causa não relacionada à CBM. A terapia clínica foi realizada com itraconazol em monoterapia para três pacientes (21,4%) e combinada ao fluconazol para cinco (35,7%) pacientes. Esta associação demonstrou eficácia nas formas moderada, grave e naqueles com história de tratamento prévio sem sucesso. Cirurgia instituída em três pacientes (21,4%) mostrou-se uma excelente opção terapêutica para as formas leve e moderada com lesões únicas, e quando o uso de antifúngicos era contra-indicado. Sucesso terapêutico foi obtido em 81,8% (9/11) sem recorrência em dois anos de acompanhamento. Estes resultados favoráveis deveriam-se ao diagnóstico com isolamento do agente e tratamento precoces; visto que as espécies apresentam sensibilidade variável aos antifúngicos e acrescenta-se a estes fatores, a estrutura diferenciada do IPEC com laboratórios especializados para diagnosticar as diferentes micoses e um serviço de farmácia capaz de disponibilizar medicamento suficiente para o tratamento completo do paciente.

Palavras-chave: 1. Cromoblastomicose, 2. *Fonsecaea pedrosoi*, 3. *Cladophialophora carrionii*, 4. Rio de Janeiro, 5. Brasil.

Mouchalouat, M.F **Chromoblastomycosis. Study of series of 14 cases attended in Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, de 1994 a 2005.** Rio de Janeiro, 2008. Master [Science Dissertation in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

ABSTRACT

This study of series included 14 cases of chromoblastomycosis (CBM), chronic mycosis with long course, attended in the dermatology outpatient clinic of Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) - Fiocruz, between 1994 to 2005, and aims at knowing its epidemiologic, clinical, diagnostic and treatment characteristics. Patients were included if presented muriform cells in histological or mycological examinations. Results were presented in two papers. Male sex was the most common in 71.4% (10/14), age ranged from 32 to 77 years (mean: 61). Patients that reported contact with soil were 11 (78.6%); 8 in professional activities and 3 in recreational activities. Only three of these reported injury caused by plant or wood before the disease. Hypertensive disease was present in six patients (42.9%), Diabetes mellitus in four (28.6%), cerebral cysticercosis in one (7.1%) and drug induced immunodepression by tacrolimus, mycophenolate mofetil and prednisone in one (7.1%) were the co-morbidities reported. The duration of disease ranged from 8 months to 32 years, with 50% of them more than 10 years. The clinical verrucous aspect (six patients) and severe form (seven patients) (disseminated lesions classified according Queiroz-Telles *et al.* proposed, 1992a) were the most found, as well as localization in lower limbs (seven patients) in half of them. Severe form was reported in those presenting long course of disease. *Fonsecaea pedrosoi* was isolated in 71.4% (10 cases) and *Cladophialophora carrionii* in one case (7.1%). It was not possible identify one strain and in two, culture was negative. Identification of species by polymerase chain reaction (PCR) was performed in ten strains of culture. Treatment at IPEC was performed in 11 patients, 2 were transferred for others states and one died due to another disease. Clinical regimens were: monotherapy with oral itraconazole 200-400mg/d in three cases (21.4%) and combined with fluconazole 200mg/d in five cases (35.7%). This association showed good results for moderate, severe form and previous history unsuccessful of therapy. Surgery was performed in three cases (21.4%) being an excellent option for patients presenting mild and moderate forms with single lesion and antifungal not indicated. Successful therapy was seen in 81.8% (9/11) without relapse in two years of follow-up. These good results could be explained by diagnosis with isolation of agent and early treatment, since species present variable sensibility to antifungals. Further on, an excellent service (IPEC) with specialized laboratories to diagnose uncommon mycosis and pharmacy able to provide drugs to the patient complete treatment.

Keywords: 1. Chromoblastomycosis, 2. *Fonsecaea pedrosoi*, 3. *Cladophialophora carrionii*, 4. Rio de Janeiro, 5. Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBM	cromoblastomicose
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ITZ	itraconazol
FLC	fluconazol
PAF	fator de ativação plaquetária
DHN	dihidroinaftaleno
IFN- γ	interferon- γ
iNOS	enzima NO sintetase
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , teste imunoenzimático
EGTA	etileno glicol-bis
Ig	imunoglobulina
APC	célula apresentadora de antígeno
IL	interleucina
HLA-DR	human leukocyte antigen-DR, antígeno leucocitário humano-DR
TNF- α	<i>tumoral necrosis factor-α</i> , fator de necrose tumoral do tipo α
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
HE	hematoxilina e eosina
PMN	células polimorfonucleares
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia de polimerase
ITS	região intergênica
rDNA	DNA ribossomal
5 FU	5 fluoracil

LASER	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i> , amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
CEP	comitê de ética em pesquisa
SED	serviço de estatística e documentação
PAS	ácido periódico de Schiff
EDTA	etileno diaminotetracetato
CTAB	<i>cetyl trimethylammonium bromide</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 HISTÓRICO.....	03
2.2 SINONÍMIA.....	04
2.3 CONCEITO.....	05
2.4 ETIOLOGIA.....	05
2.4.1 Classificação Taxonômica.....	05
2.4.2 Descrição.....	06
2.5 ECO-EPIDEMIOLOGIA.....	07
2.6 PATOGENIA.....	10
2.7 IMUNOLOGIA.....	13
2.8 QUADRO CLÍNICO.....	15
2.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	17
2.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	17
2.10.1 Diagnóstico Micológico.....	17
2.10.2 Diagnóstico Histopatológico.....	19
2.10.3 Diagnóstico Sorológico.....	20
2.10.4 Diagnóstico Molecular.....	21
2.11 TRATAMENTO.....	22
3 OBJETIVOS	26
3.1 GERAL.....	26
3.2 ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	27

4.2 CASUÍSTICA.....	27
4.3 PROCEDIMENTOS DIAGNÓSTICOS.....	28
4.4 ANÁLISE DE DADOS.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 ARTIGO 1.....	31
5.2 ARTIGO 2.....	42
6 CONCLUSÕES.....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO A – Ficha de protocolo.....	75

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea causada por fungos da família *Dematiaceae*, que possuem melanina na parede celular. Apresenta distribuição mundial com maior incidência na população rural de zonas tropicais e subtropicais do planeta. Os principais agentes etiológicos são *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e *Cladophialophora carrionii*, encontrados na natureza em vegetais, solo e água. Quando agentes de CBM, apresentam-se caracteristicamente como elementos ou células muriformes nas lesões.

A CBM é doença crônica, decorrente da implantação do fungo na pele através de traumatismos, acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino, em idade produtiva, que exercem atividades laborativas relacionadas ao campo. Clinicamente pode apresentar-se com lesões de aspectos diversos: em placa, nodular, tumoral, verrucosa e cicatricial, sendo o membro inferior o local mais acometido.

O diagnóstico é feito através de exame micológico direto e exame histopatológico, nos quais podem ser visualizados os elementos muriformes e identificada a espécie pela observação das características macro e micromorfológicas dos isolados.

A CBM é doença de difícil tratamento, com recorrências frequentes. As diversas modalidades terapêuticas incluem antifúngicos sistêmicos, com resposta variada, cirurgia, crioterapia e outras drogas. A interrupção do tratamento deve ser guiada pelos aspectos clínicos, histopatológicos e micológicos.

Pelo fato da CBM ser uma micose de evolução crônica, com conseqüente fibrose e linfedema em muitos casos, pode incapacitar os pacientes para o trabalho, representando prejuízo econômico e isolamento social. Além disso, é doença negligenciada, de longo tratamento, com graus variados de resposta terapêutica, constituindo tratamento dispendioso tanto para os pacientes quanto para os serviços públicos. Os diversos agentes apresentam perfis de sensibilidade a antifúngicos diferentes e os diferentes tipos clínicos e graus de gravidade despertam curiosidade quanto aos mecanismos de interação e resposta do hospedeiro ao parasita.

Não há, na literatura, dados referentes ao perfil epidemiológico, clínico, diagnóstico e terapêutico desta micose no estado do Rio de Janeiro. Sendo o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) – Fiocruz uma unidade de referência em micoses no estado do Rio de Janeiro, este estudo tipo série de casos, inédito, objetivou contribuir para o conhecimento da CBM no estado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A primeira referência à cromoblastomicose para a maioria dos autores foi feita por Alexandrino Pedroso em 1911 em São Paulo. Tratava-se de um paciente procedente de Goiás que apresentava lesões sugestivas de lepra. Pedroso encontrou ao exame histopatológico os elementos arredondados acastanhados denominando assim a doença de blastomicose negra. Entregou a Brumpt o material a ser estudado (Silva, 1955; Bopp, 1959). Entretanto, para Hoffman a primeira descrição da doença foi feita em 1904 por Guiterras, denominando-a de “chappa” (Silva, 1955).

Em 1914, Max Rudolf descreveu em Minas Gerais seis casos com lesões verrucosas onde a doença era chamada de figueira e isolou de quatro casos o agente que designou de *blastomices* (Bopp, 1959).

Em 1915, Maciel apresentou na Sociedade de Medicina de São Paulo um paciente com lesões nodulares que chamou de “pé de madura”. O agente causador da referida doença se apresentava com elementos arredondados no pus e coloração negra à cultura (Bopp, 1959).

A descrição oficial da doença cabe a Lane e Medlar. Nos Estados Unidos, em 1915, Lane descreveu o caso de um paciente italiano que apresentava quadro dermatológico sugestivo de tuberculose verrucosa. Medlar e Thaxter estudaram o material e concluíram tratar-se de uma doença do grupo das blastomicoses, identificando o agente como *Phialophora verrucosa* (Silva, 1955).

Em 1920, após cinco anos da primeira publicação oficial da doença, Pedroso, juntamente com José Maria Gomes, apresentou na Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo o seu caso referido em 1911, com mais três casos procedentes de São Paulo (Silva, 1955).

Em 1922, na Europa, Brumpt identificou como *Hormodendrum pedrosoi* o material entregue em 1911 por Pedroso para ser estudado. A demora deveu-se à Primeira Guerra Mundial (Bopp, 1959).

Em 1930, Almeida confirma a presença das células escleróticas no exame histopatológico do material extraído do paciente de Maciel em 1915. Esta foi a primeira publicação da CBM em nosso país (Bopp, 1959).

2.2 SINONÍMIA

Durante muitos anos discutiu-se qual a melhor denominação da doença. O termo dermatite verrucosa, usado por Pedroso e Gomes em 1920 (Silva, 1955), caiu em desuso, pois não havia apenas essa alteração morfológica na doença e também outras dermatoses podiam apresentar essa alteração (Bopp, 1959). A palavra cromoblastomicose foi proposta em 1922 por Terra, Torres, Fonseca e Leão pois visualizaram estruturas semelhantes a leveduras ou blastomicetos nos exames histopatológicos feitos na ocasião (Silva, 1955).

O termo cromomicose sugerido por Moore e Almeida em 1935 foi criticado, pois não se tratava de uma “micose corada” e sim de uma micose causada por um fungo de coloração escura. Além disso, outras dermatoses que apresentam alteração da coloração da pele poderiam se encaixar no grupo erroneamente, como a pitíriase versicolor, o eritasma e a *tinea nigra* (Silva, 1955). Já a denominação micose ou doença de Lane e Pedroso foi uma homenagem feita em 1950 no Rio de Janeiro aos pioneiros no estudo da micose (Bopp, 1959).

A CBM recebeu inúmeras denominações no meio científico além das já citadas: blastomicose negra, doença de Fonseca, doença de Pedroso, doença de Gomes, doença de Pedroso e Carrión, doença de Guiterras, demaciomicose, doença de Pedroso e Gomes, dermatomicose cromoparasitária, phialophoromycose, granulomatose cromomicótica. Dentre as designações populares podemos citar: figueira, formigueiro, pé musgoso, susna, sunda, sundo, espúndia, chapa (Silva, 1955).

Atualmente se aceita universalmente cromoblastomicose como a melhor denominação.

2.3 CONCEITO

CBM é micose subcutânea crônica localizada predominantemente em áreas expostas causada pela implantação de vários tipos de fungos demáceos através de trauma (de Brito, 2005).

2.4 ETIOLOGIA

2.4.1 Classificação Taxonômica

Reino Fungi

Filo Ascomycota

Classes Eurotiomycetes, Sordariomycetes (*Phialophora*)

Ordem Chaetothyriales

Famílias Herpotrichellaceae, Magnaporthaceae (*Phialophora*)

Gêneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Rhinocladiella*.

2.4.2 DESCRIÇÃO

Os fungos da família Herpotrichellaceae são também chamados de fungos demáceos por possuírem melanina na parede celular.

Os principais agentes causadores da CBM são *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*. Outros agentes: *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala castellani* e *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. Para De Hoog e cols. (2004), *Fonsecaea compacta* é uma variante morfológica de *Fonsecaea pedrosoi*.

Os fungos demáceos podem causar outras micoses subcutâneas como feohifomicose e micetoma, mas somente na CBM se apresentam como elementos muriformes no tecido, caracterizando a doença. Estes elementos, também denominados corpos escleróticos, constituem formas fúngicas arredondadas com parede espessa (esclerótica) que se dividem por septação em mais de um plano (muriforme).

Kwon-Chung & Benett (1992), preferem usar o termo corpos escleróticos pois os conídios de *Alternaria* e *Stemphylium* apresentam esporos multicelulares com septos em dois planos, no entanto, essa característica é constitutiva desses fungos sendo permanente e não transitória como ocorre com os agentes causadores da CBM.

Os agentes de CBM produzem uma variedade ampla de tipos de conídios, dependendo da cepa, substrato usado e das condições físicas sob as quais eles estão incubados (Rippon, 1982).

2.5 ECO-EPIDEMIOLOGIA

Os fungos causadores de CBM vivem como saprófitas e podem ser isolados de uma grande variedade de vegetais, solo e água.

Embora a doença tenha sido diagnosticada em todos os continentes, a maioria dos casos ocorre nas regiões tropicais e subtropicais da América e África (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Os principais focos mundiais são Madagascar e Brasil (Silva e cols., 1999). Em Madagascar, com 1343 casos, *F. pedrosoi* prevaleceu na região com florestas e *C. carrionii* na região desértica, espinhosa, e também *P. verrucosa* e *W. dermatitidis* já foram descritos como agentes causadores da micose (Esterre e cols., 1996a).

Há relato de casos também no Japão (Kondo e cols., 2005; Kikuchi e cols., 2007), Austrália (Currie & Carapetis, 2000), Venezuela (Perez-Blanco e cols., 2006), Nepal (Agarwalla e cols., 2002), México (Bonifaz e cols., 2005), Tailândia (Ungpakorn, 2005), Noruega (Buot e cols., 2005), Índia (Rasul e cols., 2007), Tunísia (Ezzine-Sebai e cols., 2005) e Malta (Ezughah e cols., 2003).

No Brasil, a CBM é relatada em vários estados brasileiros, como o Pará (Silva e cols., 1999), Rio Grande do Sul (Minotto e cols., 2001), Paraná (Telles Filho, 1997), Maranhão (Silva e cols., 1992), Rio de Janeiro (Mapurunga e cols., 1991), Pernambuco (Lacerda, 2005), Mato Grosso (Rezende e cols., 2007), Rondônia (Alves & Camargo, 2007), Ceará (Mapurunga e cols., 1990).

O principal agente causador no mundo é *F. pedrosoi*, seguido por *C. carrionii* e *P. verrucosa*.

No Brasil, onde *P. verrucosa* é o segundo agente mais comum, a região amazônica é considerada a principal área endêmica, sendo o estado do Pará o maior foco nacional da doença e o segundo mundial. Essa região apresenta índice pluviométrico alto (1500-1700 mm/ano), temperatura variando entre 24 e 26°C e elevada umidade relativa do ar, em torno de 83%, parecendo essas características serem adequadas para o desenvolvimento dos fungos isolados nesse estudo (Silva e cols., 1999). Outros agentes já foram descritos mais raramente, como *C. carrionii*, *F. compacta*, *R. aquaspersa*, *E. jeanselmei* e *E. castellanii* (Telles Filho, 1997; Marques e cols., 2004).

Cladophialophora carrionii ocorre principalmente em regiões semi-áridas, com clima seco, como na Venezuela, onde foi isolado de plantas xerófilas, cactáceas, possivelmente reservatórios naturais do fungo (De Hoog e cols., 2000). É o segundo agente mais comum em Madagascar. No Japão, *E. jeanselmei* é o segundo mais comum. (Kikuchi e cols., 2007). No Brasil, onde é raro, já foi descrito um caso em Pernambuco (Lacerda, 2005) e outro no Pará (Salgado e cols., 2005), e mais recentemente no Rio de Janeiro (Mouchalouat, resultados submetidos). Dos 78 isolados identificados da maior casuística do nosso país, *P. verrucosa* esteve presente somente em um caso, sendo o restante *F. pedrosoi* (Silva e cols., 1999).

A CBM acomete principalmente indivíduos em idade produtiva. No entanto, na região endêmica do estado de Falcón, Venezuela, Pérez-Blanco e cols. (2006), descreveram 22 casos causados por *C. carrionii* em crianças e adolescentes com 2 a 19 anos de idade, demonstrando a importância do diagnóstico e intervenção precoces para a obtenção de uma resposta satisfatória.

Com relação ao sexo, o masculino é 10 a 15 vezes mais acometido (Telles Filho, 2005). Para Silva e cols. (1999), é possível que os hormônios sexuais femininos exerçam um papel similar ao que ocorre na paracoccidiodomicose, visto que a baixa porcentagem de casos nas mulheres não deve estar relacionada somente à atividade profissional, desde que nessas áreas elas também estão envolvidas com atividades agrícolas, embora menos intensamente (Silva e cols., 1999).

A maioria dos pacientes exerce profissões relacionadas ao campo como lavradores e jardineiros, mas também donas-de-casa, operários da construção civil, que estão constantemente expostos a múltiplos traumatismos com gravetos vegetais (de Brito, 2005) e geralmente não usam vestimentas apropriadas para sua proteção. Silva e cols. (1995), ao estudarem 30 casos da doença no Maranhão, observaram 2 pacientes com lesões na região glútea que exerciam a profissão de quebradores de côco-babaçu, atividade comum na região, onde o indivíduo sentado no chão ou sobre as cascas do côco extrai as amêndoas do babaçu (*Orbignya phalerata*).

Em 2006, Marques e cols. no Maranhão, coletaram 68 amostras ambientais incluindo casca de côco, haste e folhas de palmeira de babaçu, madeira e casca de árvores em decomposição, fezes de animais e solo, entre outros, de locais próximos às residências dos pacientes, e obtiveram 9 isolados. Destes, *Exophiala* foi o agente mais comum (66,7%), seguido de *Fonsecaea* (22,2%) e *Cladophialophora* (11,1%). Concluíram que a palmeira do babaçu representa importante fonte de fungos demáceos e provavelmente é fator de risco para adquirir a doença na área estudada.

No Paraná, *F. pedrosoi* e *P. verrucosa* foram isolados de madeira em decomposição conhecida como cambará, e do solo onde era encontrada (Vicente e cols., 2001).

Salgado e cols. (2004), no Pará, isolaram *F. pedrosoi* da lesão de uma paciente e da provável planta fonte da infecção. Após trauma com espinhos da planta *Mimosa pudica* L., conhecida no Brasil como maria-dormideira e fecha-a-porta ou *sensitive plant* nos países que falam a língua inglesa, a paciente apresentou placa vegetante exsudativa no joelho com exame direto positivo e cultura com isolamento de *F. pedrosoi*. Esfregação de fragmentos dos espinhos revelou a presença do fungo demáceo em contato próximo à cutícula da planta, havendo isolamento do mesmo agente, confirmando ser essa a fonte do fungo.

2.6 PATOGENIA

Os conídios devem ser os principais elementos infectantes, pois são produzidos em abundância e, assim como os de outros fungos, são extremamente resistentes às modificações físicas do ambiente (Telles Filho, 2005). Eles são inoculados na pele através de traumatismos que podem ser mínimos, como os que ocorrem com as duras fibras das cascas dos côcos-babaçu (Silva e cols., 1995).

A disseminação hematogênica, algumas vezes proposta, não está totalmente convincente e parece mais bem relacionada à feohifomicose (Esterre & Queiroz-Telles, 2006).

Em parasitismo, os agentes apresentam-se caracteristicamente como elementos ou células muriformes nas lesões (Telles Filho, 2005), que se assemelham à castanha com divisão transversa e longitudinal. Também são chamados de corpos ou elementos escleróticos, fumagóides, de Medlar (Rosen & Overholt, 1996). Constituem estruturas arredondadas acastanhadas com parede espessa, que possui melanina como um de seus constituintes, podendo ser vistas isoladas ou agrupadas. Parecem não só representar uma forma adaptativa ao hospedeiro, o que dificulta a cura completa e reflete a cronicidade da doença, mas também uma bem sucedida adaptação fúngica ao parasitismo.

Foi demonstrada a semelhança entre as células escleróticas obtidas *in vivo* e *in vitro* através da microscopia e estudadas as etapas iniciais da conversão *in vitro* das hifas em células escleróticas. Há semelhança ultraestrutural entre as células obtidas *in vivo* e *in vitro*. As células escleróticas normalmente surgem da extremidade da hifa num processo que envolve tumefação e subsequente clivagem, dividindo-se por septação ou por brotamento (da Silva e cols., 2002).

Parece que um dos mecanismos indutores das células escleróticas é o cálcio, porém, em altas concentrações promove a manutenção da hifa, revertendo a transformação. O tratamento das formas micelianas com fator de ativação plaquetária (PAF) também induz à formação de células escleróticas, conforme descrito anteriormente com propranolol (Mendoza e cols., 1993, da Silva e cols., 2002).

Melaninas são insolúveis em solventes aquosos e orgânicos e, conseqüentemente, são difíceis de serem estudadas pelas técnicas biofísicas e bioquímicas convencionais (Gómez & Nosanchuk, 2003). A principal melanina encontrada no reino dos fungos é a DHN-melanina que deriva da 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN). Ela está associada com a virulência dos fungos, embora seu exato papel na patogenicidade das micoses permaneça obscuro. Estudos sugerem que a melanização de *Cryptococcus neoformans* e de *F. pedrosoi* inibe a fagocitose dos macrófagos (Farbiarz e cols., 1992; Rosen & Overholt, 1996; Gómez & Nosanchuk, 2003). Entretanto, Sá e cols. (2007), observaram que neutrófilos fagocitam de forma aumentada na presença de melanina, de diferentes formas de *F. pedrosoi*, sugerindo que o pigmento possa atrair as células fagocíticas e induzir às respostas celular e humoral.

Durante a fagocitose, partículas de melanina são liberadas pelos fungos, podendo então serem vistas nos vacúolos fagocíticos que contêm o fungo ingerido e também em outros vacúolos citoplasmáticos.

Farbiarz e cols. (1992), analisaram a interação dos conídios pigmentados e não-pigmentados de *F. pedrosoi* com a linhagem de células epiteliais não-fagocíticas, assim como com macrófagos do peritônio de ratos previamente incubados na presença de citocalasinas B e D que bloqueiam a atividade fagocítica destes e a influência da melanina na interação dos fungos com os macrófagos. Estes englobam tanto conídios pigmentados como não-pigmentados, sendo a endocitose maior naqueles sem melanina e a ingestão dos fungos pelos macrófagos com atividade inibida cai em 50% e em 90% nos pigmentados e não-pigmentados, respectivamente, sugerindo que a melanina exerça um efeito inibitório na fagocitose clássica e provável papel importante na interação do fungo com a célula hospedeira. A presença de conídios no interior das células tratadas e nas de linhagem não-fagocítica sugere a existência de outro mecanismo que não a fagocitose com emissão de pseudópodes para penetrar no interior das células de vertebrados.

Bocca e cols. (2006), estudaram a atividade de macrófagos *in vitro* após exposição ao *F. pedrosoi* e, durante o curso da doença em modelo experimental, demonstraram que eles apresentam crescente capacidade de fagocitose, porém são incapazes de produzir óxido nítrico, um poderoso fator capaz de destruir fungos, como já foi demonstrado em outros estudos, apesar do tratamento com interferon gama (IFN γ) e fatores lipopolissacarídeos, indutores conhecidos da enzima NO-sintetase (iNOS). Esta incapacidade também foi observada com macrófagos “normais” incubados com células fúngicas ou com melanina extraída de *F. pedrosoi*. Assim, sugere-se que a melanização do fungo atue como mecanismo de evasão à resposta imune do hospedeiro.

Ao mesmo tempo em que a melanina representa um fator de virulência, induz à produção de anticorpos conforme avaliado através do método imunoenzimático (ELISA), que mostrou maior reatividade à melanina no soro de pacientes com CBM que no soro de indivíduos saudáveis (Sá e cols., 2007).

Palmeira e cols. (2006) avaliaram a atividade proteolítica das formas micelianas de *F. pedrosoi in vitro* através da medida da atividade de suas aspartil-peptidases durante 15 dias usando soro com albumina bovina, observando que a pepstatina A inibe totalmente a atividade enzimática o que não foi observado com outros inibidores proteolíticos. A aspartil-peptidase destrói substratos protéicos como albumina humana, fibrinogênio, fibronectina, laminina e colágeno tipo I. Os autores sugerem que aspartil-peptidases são essenciais para o fungo destruindo componentes protéicos do sistema imune do hospedeiro (Palmeira e cols., 2006a).

Atividade proteolítica como resultado de peptidases extracelulares produzidas por *F. pedrosoi* foi observada em dois meios diferentes. No meio de Czapeck Dox, foi identificada atividade aspartil-peptidase, sendo sensível à ação de pepstatina A, um inibidor específico conhecido. No meio de Kauffman houve atividade de metalopeptidase que foi inibida por etileno glicol-bis (EGTA) e 1,10 fenantrolina que afeta a atividade mitocondrial, interferindo com a respiração celular e foi capaz de bloquear a diferenciação do conídio em micélio. As peptidases foram capazes de clivar uma variedade de substratos, incluindo componentes proteicos presentes na matriz extracelular (laminina e fibronectina humanas) e proteínas séricas (imunoglobulina G (IgG) e albumina), constituindo fatores de virulência e não porque facilitadores da invasão do agente dando a este capacidade de alcançar tecidos profundos e a corrente sanguínea (Palmeira e cols, 2006b).

Glicosilceramidas são componentes lipídicos imunologicamente ativos de uma grande variedade de fungos induzindo à produção de anticorpos. Células jovens em divisão de *F. pedrosoi* reconhecem anticorpos monoclonais contra essas ceramidas e a ligação deles com esses componentes da parede celular interfere com a replicação, resultando em diminuição do crescimento fúngico. Macrófagos tratados com esses anticorpos têm a fagocitose aumentada ajudando as células hospedeiras a eliminar o fungo (Nimrichter e cols., 2004).

Uma alta resistência dos corpúsculos escleróticos ao meio externo foi observada por Rosen e Overholt (1996). Os autores incubaram separadamente amostras obtidas por raspado de três pacientes que apresentavam CBM por *F. pedrosoi* em placas estéreis a temperatura ambiente (32°C) sem adição de água, açúcar ou minerais (sob condições adversas). Após um mês de incubação, pequena amostra mensal de cada placa foi coletada e incubada no meio Mycosel à temperatura ambiente. Culturas positivas foram obtidas até o 18º mês, indicando que os corpúsculos ainda se encontravam viáveis nos raspados, evidenciando a marcante capacidade de sobrevivência dos corpos de Medlar, o que reflete para os autores o longo tempo de incubação entre a implantação do fungo e o desenvolvimento da doença, assim como a dificuldade em se obter a cura completa.

2.7 IMUNOLOGIA

Alguns estudos imunogenéticos foram realizados para tentar encontrar marcadores de susceptibilidade e gravidade na CBM.

Tsuneto e cols. (1989), avaliaram a distribuição de antígenos de histocompatibilidade (HLA) em 32 pacientes não-consanguíneos com CBM e em 77 indivíduos saudáveis encontrando diferença significativa somente no HLA-A29 que esteve presente em 28% dos pacientes e em apenas 4% dos não-doentes, sugerindo que a susceptibilidade à CBM possa ser influenciada geneticamente. Indivíduos com HLA-A29 apresentariam risco maior de desenvolver a doença.

Naranjo e cols. (2004), demonstraram a presença de alterações citogenéticas (quebra de cromátides, perdas cromossômicas, ganhos cromossômicos) em todos os 11 pacientes

consangüíneos estudados com CBM. Os autores ressaltaram que deve ser estudado se é a condição genética que permite maior suscetibilidade à doença.

Em relação à imunidade, macrófagos *in vitro* apresentam apenas atividade fungistática com inibição da formação de hifas e tubo germinativo, não havendo destruição do fungo apesar da evidência de atividade oxidase NADPH que é responsável pela produção de derivados intermediários do oxigênio durante a fagocitose (Rozental e cols., 1994).

Sotto e cols. (2004), estudaram a distribuição de antígenos de *F. pedrosoi* e células apresentadoras de antígenos (APCs) em biópsias humanas de pacientes com CBM e observaram que os antígenos estavam presentes principalmente no interior de macrófagos mas também no citoplasma de células dendríticas.

Gimenes e cols. (2005), ao estudarem 19 pacientes com CBM, demonstraram predominância da produção de interleucina 10 (IL 10) e diminuição de IFN γ em pacientes com doença grave (10 pacientes), segundo a classificação proposta por Queiroz-Telles e cols. (1992), assim como uma proliferação induzida de célula T ineficiente. Já os pacientes com a forma leve (seis pacientes) apresentaram predomínio de IFN γ , diminuição de IL 10 e proliferação de célula T eficiente, sugerindo que a imunidade celular mediada pela resposta Th1 é mais crucial para a defesa do hospedeiro que a resposta humoral.

Analisando a resposta proliferativa ao antígeno de *F. pedrosoi* através das células mononucleares do sangue periférico e produção de citocinas (IL 4, IL 10, IFN γ e TNF α) em 12 pacientes com CBM, observou-se resposta Th 2 com diminuição de IFN γ e aumento de IL 10 apesar do tratamento, o que pode refletir no caráter recidivante e na pobre resposta apresentada por muitos pacientes (Gimenes e cols., 2006).

Esterre e cols. (2000), dosaram Igs (G, A e M) de pacientes com CBM antes e durante o tratamento com terbinafina (4, 8 e 12 meses) através do método ELISA. Os níveis de Igs caíram gradualmente durante os oito primeiros meses e se mantiveram estáveis até o fim, diferindo ainda dos controles não-doentes. Pacientes com múltiplas lesões, no mínimo três, apresentaram títulos mais altos que aqueles com doença localizada.

Semelhanças antigênicas entre células escleróticas obtidas *in vivo* e *in vitro* através dos métodos ELISA e Imunofluorescência no soro dos pacientes não-tratados foram estudadas. Através dos métodos, observou-se que os pacientes apresentaram maior reatividade aos antígenos

que os indivíduos saudáveis, não havendo no entanto diferença entre os soros incubados com células escleróticas *in vivo* e *in vitro* (Vidal e cols, 2003).

Analisando a reação intradérmica ao antígeno EP-1 obtido através de filtrado de cultura de *F. pedrosoi*, seis pacientes com diagnóstico de CBM por *F. pedrosoi* apresentaram reação positiva, sendo que um deles com lesão cicatricial, demonstrando que a hipersensibilidade do tipo tardio persiste mesmo após a cura clínica e micológica (Lacaz e cols, 1982).

2.8 QUADRO CLÍNICO

A CBM geralmente limita-se à pele, podendo ocorrer disseminação por contigüidade ou auto-inoculação, pois as lesões em geral são pruriginosas, tendo a micose evolução crônica, lenta. Dor local e infecção secundária podem ocorrer. Acometimento por contigüidade pode ocorrer, como o envolvimento da conjuntiva ocular e sinusite (Hofmann e cols., 2005). Recentemente, foi descrito lesão osteolítica por contigüidade num paciente com CBM no pé (Sharma e cols., 2007). Em menor frequência, ocorre disseminação por via linfática, podendo ocorrer num padrão esporotricóide com lesões satélite (Muhammed e cols., 2006) e por via hematogênica como num paciente imunocompetente com CBM cerebral que referia ferimento por objeto contuso há 16 anos na região inguinal (Azulay & Serruya 1967; Nóbrega e cols., 2003; Telles Filho, 2005). Após inoculação traumática, nem sempre relatada pelo paciente, há o desenvolvimento de lesões, dificultando o estabelecimento de um período de incubação. Não há transmissão homem a homem (Mapurunga e cols., 1991). O surgimento da micose após picada de inseto foi relatado (Sauerteig e cols., 1998; Marques e cols., 2004).

A associação de CBM foi relatada com esporotricose, paracoccidioidomicose pulmonar crônica, actinomicose e doença de Jorge Lobo (Londero & Ramos, 1989).

Uma característica comum a todos os tipos clínicos é a presença de pontos negros na superfície das lesões, que correspondem à eliminação transepidermica do agente etiológico (Telles Filho, 2005).

Para Carrión (1950), as lesões iniciais de CBM podem evoluir para cinco tipos clínicos distintos: nodular, tumoral, verrucoso, em placa e cicatricial, e para ele os três primeiros são os

mais comuns. Importante salientar que mais de um tipo clínico pode co-existir em um mesmo paciente (Telles Filho, 2005). Dos 212 casos estudados no Japão, 82% apresentavam lesão em placa eritematosa (Kondo e cols., 2005). Entretanto, no Brasil, lesões tumorais verruciformes e papilomatosas foram as mais observadas no Rio Grande do Sul (Minotto e cols., 2001). No Maranhão, lesões verrucosas são as mais freqüentes (Silva e cols., 1992). Através da revisão literária, concluímos que o tipo clínico verrucoso foi o mais relatado no mundo e no Brasil. Melanoníquia estriada constitui apresentação rara da doença (Ko e cols., 2005).

O local mais freqüentemente acometido é o membro inferior, seguido do superior, região glútea, tronco e face (Queiroz-Telles e cols., 1992a, Silva e cols., 1999, Minotto e cols., 2001; Telles Filho, 2005). Curiosamente, na Austrália, no Japão e na Venezuela é o membro superior o local mais acometido (Currie & Carapetis, 2000; Kondo e cols., 2005; Pérez-Blanco e cols., 2006). No Japão existe uma distinção de localização: seguido da região glútea e membro inferior no sexo masculino; e cabeça e pescoço no sexo feminino.

A gravidade da doença é classificada de acordo com o número, extensão e disseminação das lesões. Segundo a classificação proposta por Queiroz-Telles e cols., 1992, a forma leve representa uma placa ou nódulo solitário menor que cinco cm de diâmetro. A forma moderada abrange lesões do tipo nodular, verrucosa ou em placa únicas ou múltiplas, (sozinhas ou associadas), acometendo uma ou duas regiões cutâneas adjacentes sendo menor que 15 cm de diâmetro, e a forma grave apresenta lesões extensas acometendo regiões cutâneas adjacentes ou não, incluindo também os tipos tumoral e cicatricial (Queiroz-Telles e cols., 1992a).

Apesar de os indivíduos acometidos aparentemente serem hígidos e usualmente não apresentarem outras doenças ou condições predisponentes, imunossupressão pode ser fator predisponente, assim como ocorre com outras doenças infecciosas. São condições de risco mais associadas: uso crônico de corticosteróide em paciente com DPOC (Okan & Rendon, 2001), lupus eritematoso sistêmico (Neiva e cols., 2002), câncer (Sauerteig e cols., 1998) e transplantado renal em uso de outras drogas imunossupressoras. Peña-Penabad e cols. (2003) relataram um caso de CBM apresentando o paciente lesão única, verrucosa na mão após seis meses de realizado o transplante renal. Na ocasião, fazia uso de tacrolimus, prednisona e micofenolato mofetil evoluindo para a cura após tratamento com itraconazol por um mês seguido de resecção cirúrgica, não apresentando recidiva com um ano de seguimento. As lesões de longa evolução e com infecção secundária de repetição podem causar fibrose e conseqüente linfedema crônico, este,

fator de incapacitação permanente ao trabalho físico (Silva e cols., 1992; de Brito, 2005; Telles Filho, 2005).

Ocorrência de câncer de pele nas lesões crônicas de CBM é rara. Já foram descritos alguns casos de carcinoma epidermóide e um único caso de melanoma do tipo acral lentiginoso. O processo inflamatório crônico e a fibrose cicatricial induzem à transformação maligna similar ao que ocorre nas úlceras crônicas e cicatrizes de queimadura (Gon & Minelli, 2006).

2.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Devido ao polimorfismo das lesões de CBM e do tipo clínico encontrado, a doença faz diagnóstico diferencial com inúmeras outras, principalmente com leishmaniose, tuberculose verrucosa, esporotricose, feohifomicose, hanseníase, sífilis, micobacteriose atípica, micetoma, verrugas, prototecose, paracoccidioidomicose, histoplasmoze, coccidioidomicose, carcinoma espinocelular, psoríase, neurodermite circunscrita, lupus cutâneo, sarcoidose, granuloma anular.

2.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.10.1 Diagnóstico micológico

É o exame mais importante a ser realizado visando à identificação dos elementos parasitários nas lesões, ao isolamento do fungo causador em cultivo e subsequente identificação da espécie.

De preferência deverá ser feita análise do material de biópsia coletado junto à área lesional rica em pontos negros (Telles Filho, 2005).

Através do exame micológico direto a fresco com hidróxido de potássio a 10 ou 20% poderá ser demonstrada a presença de elementos muriformes, o que confirma o diagnóstico da

CBM. Na camada córnea, ocasionalmente podem ser visualizadas hifas demáceas septadas (Telles Filho, 2005).

Em cultivo, os fungos demáceos causadores da CBM apresentam crescimento lento, exceto *R. aquaspersa*, em média de três a quatro semanas, à temperatura ambiente (25°C), no meio *Sabouraud* a 2%. As colônias apresentam aspecto filamentososo com coloração que varia do verde-oliva ao negro, com o reverso sempre negro, não apresentando características peculiares a cada espécie, cuja identificação é feita através do estudo da cultura em lâmina ao microscópio. A seguir, os aspectos morfológicos dos principais agentes relacionados (Rippon, 1982; Kow-Chung & Bennett, 1992; Shell, 1998):

1) *F. pedrosoi* (Brumpt) Negróni, 1936:

Apresenta comumente conidiogênese tipo cladospório onde são encontradas cadeias de esporos bem curtas formadas por sucessivos brotamentos, sendo os conídios elípticos, ovais ou em formato de escudo. Conidióforos simpodiais com conídios na porção superior que dão origem a outros secundários restritos ao ápice (tipo *rhinocladiella*) e fiálides pouco numerosas, principalmente no meio ágar-fubá (tipo fialófora) podem ocorrer.

2) *F. compacta* (Carrión, 1940):

Alguns autores consideram ser esta espécie uma variante estável de *F. pedrosoi* (Kow-Chung & Bennett, 1992). Produz conídios em geral ovais diferentemente de *F. pedrosoi* onde o conídio é elíptico e maior, cadeias mais compactas e não facilmente dissociadas. Fiálides também podem ocorrer.

3) *C. carrionii* (Trejos, 1954):

De Hoog e cols (1997), propuseram a denominação *Cladophialophora* ao encontrarem fiálides e fialoconídios na cultura de *Cladosporium* crescido num meio nutricionalmente deficiente (Kow-Chung & Bennett, 1992). As cadeias são ramificadas e longas com conidióforos bem definidos, na ponta da hifa, sendo os conídios ovais, em formato de limão, uniformes em tamanho quando saem da mesma cadeia.

4) *P. verrucosa* (Medlar, 1915):

As fiálides surgem lateralmente ou na ponta da hifa, sozinhas ou em grupo, com formato de cesta ou vaso, apresentando no seu ápice colarete em forma de vaso que tende a se tornar

escuro com o amadurecimento da fiálide. Na base do colarete ocorre a esporulação com a liberação de conídios de parede fina e elíptica que se aglomeram na ponta das fiálides ligados entre si por um material adesivo formando massas globosas.

5) *R. aquaspersa* (Shell, McGinnis et Borelli, 1983):

Produz conidióforos com parede espessa bem definida, cor marrom escuro, eretos. Conídios são elípticos, cor marrom claro, surgem ao redor da ponta do conidióforo e ao longo, geralmente únicos e não formam cadeias.

6) *E. spinifera* (Nielsen et Conant) McGinnis, 1977:

Os conídios pequenos surgem de protuberâncias do micélio (apículas) e de conidióforos semelhantes a espinhos com colarete no ápice.

7) *E. jeanselmei* (McGinnis et Padhye, 1977):

Conídios têm tamanho variado, podem ser vistos aglomerados no ápice do anelóforo longo que vai afinando na ponta.

2.10.2 Diagnóstico histopatológico

O exame histopatológico constitui, assim como o exame micológico, elemento importante no diagnóstico da doença, visto que através dele também podemos visualizar os elementos muriformes patognomônicos da doença.

A biópsia deverá ser realizada em áreas ricas em pontos negros que constituem produtos da resposta inflamatória e hemorragia, e preferencialmente na margem das lesões ativas (Telles Filho, 2005). A eliminação transepitelial de células e fungos é característica da patologia da doença (da Silva e cols., 2002). A coloração mais utilizada é a hematoxilina-eosina (HE), suficiente para firmar o diagnóstico. Lokuhetty e cols, 2007 sugerem a utilização das colorações Zeil Neelson e Wade-Fite quando os fungos não são observados nos cortes rotineiramente corados com HE, ficando as células inflamatórias e o fundo corados uniformemente com azul claro, aumentando a chance de visualização dos elementos.

O aspecto do fungo nos cortes varia segundo as camadas da pele examinadas, hifas septadas comumente encontradas na camada córnea ao lado das formas arredondadas da qual

derivam. Os elementos muriformes são encontrados isolados ou agrupados entre si por uma substância amorfa da mesma coloração ou rósea, principalmente dentro dos microabscessos e de células gigantes multinucleadas, mas também livres na epiderme ou derme, apresentando diminuição em número ou desaparecimento com o estabelecimento do infiltrado tuberculóide (de Brito, 2005). Hanza e cols. (2003), relataram o primeiro caso com a presença de hifas e corpos escleróticos na derme e tecido celular subcutâneo e propuseram o uso do termo feomicose para descrever este achado incomum.

Na epiderme as principais características histopatológicas observadas são a acantose ou a hiperplasia pseudoepiteliomatosa, esta evidenciada em 88,46% de 29 casos estudados. Ressalta-se o importante papel do epitélio na eliminação transepidérmica do fungo que é eliminado em associação principalmente com PMN sendo encontrado na grande maioria no interior de microabscessos na camada córnea (Uribe-J e cols., 1989). Hiperkeratose e parakeratose focal ocasionalmente podem ocorrer (Telles Filho, 2005; de Brito, 2005). Disceratose é achado excepcional (Silva, 1955).

Na derme, granuloma micótico misto, supurativo com neutrófilos, que ocorre também na paracoccidioomicose e na esporotricose é comumente encontrado (Uribe-J e cols., 1989). Histiócitos, linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e às vezes eosinófilos, células epitelióides, células gigante tipo Langhans e corpo estranho são facilmente encontrados (de Brito, 2005).

O estudo de 15 lesões verrucosas e 4 lesões atróficas mostrou reação granulomatosa supurativa com muitas células fúngicas nas primeiras e granuloma tuberculóide com alguns fungos nas últimas (d'Ávila & Duarte, 2002).

Fibrose cicatricial predominou na derme reticular ou hipoderme, ascendendo para as camadas superiores e substituindo a reação granulomatosa (Uribe e cols., 1989). Proliferação vascular também pode ser encontrada (Saeb & Arenas, 1999).

2.10.3 Diagnóstico sorológico

Reações sorológicas não são rotineiramente utilizadas para o diagnóstico de CBM visto que o exame micológico e a histopatologia apresentam eficácia comprovada em todos os casos,

porém, elas podem ser úteis para uma melhor compreensão da resposta imune do hospedeiro e identificação de antígenos específicos de fungos causadores da micose. O teste ELISA mostrou-se útil no diagnóstico da micose como também no estabelecimento da eficácia da terapia utilizada. O grande problema está no fato que métodos de preparação de antígenos e padronização de diferentes reações têm variado amplamente, tornando difícil a comparação de resultados (Vidal e cols., 2003; Vidal e cols., 2004; Oberto-Perdigón e cols., 2005).

2.10.4 Diagnóstico molecular

Métodos baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR) têm sido realizados para identificação de fungos demáceos, incluindo-se o desenvolvimento de *primers* específicos dos principais agentes causadores no mundo, *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Representam uma opção no diagnóstico especialmente nos casos onde é difícil identificar o fungo pelos métodos morfológicos (baixa ou nenhuma conidiogênese) (Ablitz e cols., 2004; Andrade e cols., 2007). A unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear consiste de uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS) (Fig. 1).

A região ITS, localizada entre o 18S e 28S, seqüências de rDNA nuclear, inclui dois espaços (ITS1 e ITS2) separados por uma região conservada, a 5.8S. Diferenças interespecies na seqüência do ITS1 e ITS2 têm sido utilizadas para detectar e identificar espécies de fungos (Ablitz e cols., 2003). O valor desta metodologia está na sua rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, efetuando análise em vários níveis de classificação, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações.



Figura 1: Unidade de DNA ribossomal.

2.11 TRATAMENTO

Cicatrização espontânea da doença não é conhecida, sendo a terapia sempre indicada (Hoffmann e cols., 2005).

O sucesso terapêutico poderá estar relacionado ao agente etiológico e à gravidade da doença. *C. carrionii* é mais sensível aos antifúngicos que *F. pedrosoi*. Edema e fibrose dérmica podem diminuir os níveis de antifúngicos no tecido (Queiroz-Telles e cols., 2003). As formas graves com lesões extensas respondem mal à terapia. A recidiva representa um grande problema na cura da doença, podendo chegar a 43% dos pacientes curados (Minotto e cols., 2001).

Dentre as drogas já utilizadas de forma isolada ou associadas no tratamento da CBM podemos citar os antifúngicos tópicos, iodeto de potássio, anfotericina B intravenosa ou intralesional (Silva e cols., 1999b), tiabendazol, vitamina D₃ (Hussain e cols., 2002), 5-flucitocina, cetoconazol, terbinafina (Ezzine-Sebai e cols., 2005), itraconazol, fluconazol, ajoene, 5-fluouracil (5-FU) (Oberto-Perdigón e cols., 2005) com graus variados de sucesso.

Atualmente itraconazol é a droga mais efetiva, usada continuamente ou como pulsoterapia (Kumarasinghe e cols., 2000; Ungpakorn & Reangchainam, 2006). Queiroz-Telles e cols. (1992), observaram que itraconazol foi altamente efetivo nas formas leve e moderada da CBM, tendendo à cura clínica no curso do tratamento a longo prazo (Queiroz-Telles e cols., 1992a). A concentração do medicamento é maior nos tecidos acometidos pela micose e no centro da lesão conforme observado nas formas leve e moderada da doença. Explicações para essa observação são: elevada afinidade da droga pela ceratina que é uma proteína; sua ligação às células inflamatórias que estão presentes em maior número nas lesões e penetração ativada através dos capilares. A manutenção da alta concentração da droga nas lesões parece ser crítica para a eficácia do itraconazol (Seishima e cols., 2004). A droga mostrou-se atóxica e a aceitação do paciente foi excelente em 19 pacientes tratados (Ezughan e cols., 2003). Itraconazol não causa dano à função endócrina sendo seguro para o longo tratamento de determinadas micoses (Queiroz-Telles e cols., 1997).

Terbinafina representa uma boa opção terapêutica no tratamento da CBM (Sevigny & Ramos-Caro, 2000; Nagao e cols., 2001; Bonifaz e cols., 2005)

O ajoene é um composto isolado do alho (*Allium sativum*) com atividade antioxidante, antitrombótica e antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica). No estado de Falcón, Venezuela, área endêmica de CBM causada por *C. carrionii*, ele tem sido utilizado na forma tópica para lesão única menor que cinco cm, pápula ou placa escamo-crostosa com bons resultados terapêuticos (Oberto-Perdigón e cols., 2005). Em outro estudo, ajoene e 5-FU tópicos foram utilizados isoladamente em crianças e adolescentes obtendo-se 85% de cura clínica e micológica (Pérez-Blanco e cols., 2006).

Tiabendazol apresentou mínima eficácia e hepatotoxicidade ocasional (Esterre e cols., 1996b).

Na criocirurgia com nitrogênio líquido não é o frio o fator responsável direto pela destruição dos fungos, visto que estes permanecem viáveis à baixa temperatura *in vitro*. Acredita-se que o fator responsável seja a necrose decorrente da falta de nutrientes e do meio ácido (Castro, 1989).

A técnica é recomendada para o tratamento de lesões pequenas (Bonifaz e cols., 1997) e previamente ao tratamento com itraconazol nas lesões grandes para uma diminuição prévia das mesmas, sendo utilizada com número variado de sessões, 2 ciclos em média de 30s a 4 min (Castro e cols., 2003) e também de forma adjuvante naquelas com fibrose intensa após término do tratamento no intuito de prevenir recorrência da doença (Kullavanijaya & Rojanavanich, 1995).

Lesões pequenas respondem bem à terapêutica cirúrgica que também pode ser uma alternativa nos pacientes que não apresentam resposta ao antifúngico ou naqueles onde seu uso está contra-indicado como pacientes transplantados renais em uso de imunossupressores que contra-indicam o uso de antifúngicos orais pelas interações medicamentosas (Wackym e cols., 1985; Vijaya & Kumar, 2005; Kondo e cols., 2005).

Aplicação de calor local (40-45°C) nas lesões permite diminuição do tamanho e pode ser usada como terapia adjuvante (Bonifaz e cols., 2001). O uso de LASER de CO2 combinado pode ser uma alternativa (Hira e cols., 2002).

A combinação de itraconazol até a máxima involução das lesões e subsequente criocirurgia pode representar uma alternativa nos pacientes com lesões extensas, especialmente por *F. pedrosoi* sendo utilizada por diversos autores (Kullavanijaya & Rojanavanich, 1995; Castro e cols., 2003).

Terapia com itraconazol e terbinafina de forma combinada e alternada semanalmente, tem sido efetiva para alguns casos de CBM onde pacientes demonstraram mínima resposta à monoterapia com um dos medicamentos. Os regimes têm sido bem tolerados (Gupta e cols., 2002).

Hussain e cols. (2002), obtiveram êxito com uso de terbinafina e vitamina D₃ num paciente tratado anteriormente com itraconazol e anfotericina B sem sucesso. Os autores não explicaram o porquê da escolha da vitamina. Sabe-se que a vitamina D₃ promove a absorção de cálcio.

Anfotericina B associada com 5-flucitocina não se mostrou eficaz, tendo em vista os efeitos colaterais apresentados pelos pacientes (Mello e cols., 1992).

A 5-flucitocina combinada à anfotericina B ou itraconazol foi utilizada como tratamento de escolha num caso raro de CBM recalcitrante por *P. verrucosa* e devendo a eficácia ser confirmada em outros estudos (Park e cols., 2005).

Itraconazol e fluconazol foram utilizados com êxito em pacientes com outras micoses que não responderam ao tratamento instituído com outros antifúngicos (Queiroz-Telles e cols., 1992b; Takemoto, 1995; Valle e cols., 2001).

Voriconazol, ravuconazol e posaconazol, os triazólicos de segunda geração, têm boa eficácia *in vitro* contra os fungos demáceos. Seu potencial no tratamento da CBM pode ser uma realidade (Radford e cols., 1997; Telles Filho, 2005). Posaconazol pode representar opção terapêutica nos pacientes com doença refratária a outras drogas como itraconazol, terbinafina e 5-flucitocina sendo bem tolerado quando administrado por um longo período (Negroni e cols., 2005). Bedout e cols. (1997), ao avaliarem o perfil de sensibilidade de *F. pedrosoi* aos diferentes antifúngicos, encontraram sensibilidade somente ao itraconazol e alto grau de resistência à anfotericina B, fluconazol e 5-FU. Os estudos de susceptibilidade *in vitro* de alguns antifúngicos ao *F. pedrosoi* mostraram respostas variadas ao itraconazol como também à anfotericina B, 5-FU, cetoconazol, fluconazol e terbinafina (Mattêde e cols., 1990; Bedout e cols., 1997; Poirriez e cols., 2000; Andrade e cols., 2004). Parece que a susceptibilidade à droga depende da cepa estudada, sendo importante este estudo prévio ao tratamento, diminuindo custo e duração do mesmo. Após teste de sensibilidade *in vitro* feito com *R. aquaspersa* sugere-se também o uso de terbinafina, anfotericina B e 5-flucitosina no tratamento da CBM (Marques e cols., 2004).

Não há estudos sobre a interação *in vitro* dos antifúngicos contra os agentes causadores da CBM. Esta interação já foi estudada com terbinafina e os azóis (fluconazol e itraconazol) com isolados de *Aspergillus* sp e *Candida albicans*, tendo ocorrido efeito sinérgico. Sabe-se que as duas classes de drogas atuam em etapas diferentes da síntese de ergosterol e adicionalmente a terbinafina causa destruição das membranas celulares (Barchiesi e cols., 1997; Mosquera e cols., 2002).

Os inibidores das peptidases através de suas ações fungicidas indiretas podem constituir uma nova perspectiva de tratamento (Palmeira e cols., 2006b).

Imunoterapia, estimulando o sistema imune, associada ao tratamento antifúngico, pode representar uma boa opção e levar à cura mais rapidamente (Gimenes e cols., 2006).

É importante ressaltar que não há tratamento de escolha para a CBM. O tratamento é longo e que os resultados dos tratamentos instituídos variam em função de uma série de condições. Embora o tamanho das lesões seja particularmente importante, o agente etiológico, o estado do paciente e a localização clínica também interferem nos resultados (Bonifaz e cols., 2001).

Não há consenso sobre o critério de cura. A maioria considera a cura quando há cicatrização total da lesão e outros também acrescentam os exames micológico e histopatológico pós-tratamento com ausência de elementos muriformes.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos dos pacientes com cromoblastomicose atendidos no IPEC – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, no período de janeiro de 1994 a dezembro de 2005.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever o perfil epidemiológico da doença.
- ✓ Descrever os aspectos clínicos à época do primeiro atendimento.
- ✓ Descrever os achados histopatológicos com os agentes isolados.
- ✓ Descrever os principais agentes etiológicos implicados em nível de genótipo.
- ✓ Descrever a resposta à terapêutica utilizada.
- ✓ Correlacionar o tempo de doença, o agente etiológico e a resposta terapêutica.
- ✓ Descrever a frequência dos pacientes com CBM em relação aos pacientes com outras micoses subcutâneas matriculados e atendidos pelo Serviço de Dermatologia do IPEC no período a ser estudado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de série de casos, descrevendo os pacientes com o diagnóstico de CBM atendidos no ambulatório de micologia do Serviço de Dermatologia, IPEC, unidade de referência em micoses humanas da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no período de janeiro de 1994 a dezembro de 2005. Adicionalmente, foi realizada a caracterização de espécie em nível molecular de dez isolados de cultura estocados no Laboratório de Diagnóstico Micológico provenientes de oito pacientes. O projeto foi protocolado no CEP com o nº 024 e aprovado em 16 de maio de 2007.

4.2 CASUÍSTICA

Utilizou-se como fonte de consulta os prontuários dos pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia e os registros dos livros do Laboratório de Micologia, totalizando 14 casos. Como critério de inclusão, a presença de elementos muriformes no exame micológico direto e/ou no exame histopatológico, e de exclusão, pacientes com diagnósticos de outras micoses que não a cromoblastomicose. A cura foi considerada naqueles com evolução para cicatrização total e ausência do surgimento de novas lesões cutâneas durante o seguimento, com ou sem exames micológico e /ou histopatológico pós-tratamento que quando realizados, demonstraram ausência de visualização de estruturas fúngicas e de crescimento na cultura.

Para análise da frequência da doença foi realizada busca no Serviço de Estatística e Documentação (SED) de todos os casos de micoses subcutâneas matriculados no IPEC e atendidos pelo serviço de Dermatologia no mesmo período.

Foi adotada a classificação segundo Carrión (1950), para os tipos clínicos de lesões (nodular, tumoral, verrucoso, em placa, cicatricial) e segundo Queiroz-Telles e cols, 1992, para a gravidade (leve, moderada, grave).

4.3 PROCEDIMENTOS DIAGNÓSTICOS

➤ Obtenção do material de pele: biópsias com *punch* (cinco mm) ou com bisturi foram obtidas de pele clinicamente acometida pela micose. A amostra foi cortada em dois fragmentos e processada para estudos micológico e histopatológico.

➤ Técnica de isolamento e identificação dos cultivos: foram realizados exames microscópicos direto com KOH a 10% e cultivo em meios Sabouraud 2% (glicose 2% ágar com cloranfenicol e cicloheximida) e Mycosel ágar dos fragmentos de pele. Uma vez obtido o isolamento em cultivo foram realizadas descrição macromorfológica e cultura em lâmina para as descrições micromorfológicas.

➤ Exame histopatológico: fragmentos de pele obtidos através de biópsia foram fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em parafina e corados pela HE com o objetivo de descrever as alterações teciduais e evidenciar a etiologia fúngica. Adicionalmente foram realizadas colorações *Grocott* e PAS.

➤ Caracterização de espécie a nível molecular: foram utilizados dez isolados de culturas de oito pacientes da série estocados no Laboratório de Micologia. O DNA genômico das amostras coletadas foi extraído usando o protocolo segundo Andrade e cols. (2007). Inicialmente, os isolados foram crescidos em meio extrato de malte líquido a 2% por 14 dias a 30°C em plataforma de agitação a 150 rpm. Após centrifugação, 500 mg de massa celular e 500 mg de pérolas de vidro 0,5 mm foram transferidas para tubos de ensaio (1,5mL) e adicionados 500 µL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0], 1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 100 µg/mL proteinase K). As amostras foram misturadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 37°C por uma hora. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de NaCl a 5.0M.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C durante dez minutos e adicionados 100 µL de solução de NaCl 4,1% adicionados de 10% CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide). As soluções foram misturadas e incubadas em banho-maria 65°C durante 20 minutos. Após adição de RNase (10 mg/mL), as mesmas foram incubadas em banho-maria a 37°C por duas horas. As amostras de DNA foram extraídas com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, [v/v]). O DNA foi precipitado com isopropanol gelado durante 30 minutos, lavados duas vezes com etanol a 70% gelado, deixados secar a temperatura ambiente e reconstituídos em 50 µL de água destilada estéril. A reação de PCR foi constituída de 10 mM de tampão Tris-HCl contendo 50 mM de KCl, pH 8.0 (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 mM deoxinucleosídio trifosfato (dNTP) (Invitrogen) e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os *primers* ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram adicionados na concentração de 0,2 mM cada. O DNA foi adicionado na concentração de 20 ng num volume final de 100 µl de reação. Desnaturação inicial do DNA foi obtida com aquecimento a 95°C por 5 minutos. A seguir, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 58°C e 1 minuto a 72°C. Uma etapa final de extensão foi conduzida por 10 minutos a 72°C. O sucesso da amplificação do PCR foi confirmado pela visualização do produto do PCR no gel de agarose 2% após eletroforese. A eletroforese foi conduzida a 80 V por 60 min. O gel foi corado com brometo de etídeo por 30 min e lavado com água destilada por mais 30 minutos e visualizado no transiluminador de UV.

Para o sequenciamento utilizou-se o mesmo protocolo descrito acima para amplificação do rDNA incluindo ITS1, o gene 5,8 S do DNA ribossomal e ITS2 através da reação de cadeia de polimerase (PCR). Após a amplificação, os produtos do PCR foram purificados usando QIAquick Spin Columns (Qiagen Corp., Chatsworth, Calif.) e foram reconstituídos com 30 µl de água destilada. O sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde se utilizou Big Dye reagente (Applied Biosystem, Foster City CA, USA) e o sequenciador automático Applied Biosystems ABI Prism 3730. A confirmação de espécie foi realizada através da submissão da seqüência nucleotídica no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-NIH) e comparação com as seqüências de outros fungos demáceos de importância médica depositadas no GenBank.

4.4 ANÁLISE DE DADOS

Foi organizado um banco de dados com auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para armazenamento dos dados coletados dos prontuários dos pacientes do IPEC, através de uma ficha de protocolo. As variáveis de interesse foram as sócio-demográficas (sexo, idade, local de residência e atividade ocupacional na época provável da infecção, trauma local); clínicas (tempo de evolução da doença, tipo clínico das lesões, forma clínica conforme gravidade e localização das lesões, sintomas associados, comorbidades, uso de medicamentos para outras patologias); laboratoriais pré e pós-tratamento (exame micológico direto e cultura, histopatológico, hemograma e bioquímica); terapêuticas (eventuais tratamentos anteriores para cromoblastomicose, tipo de tratamento realizado (cirúrgico ou sistêmico), drogas utilizadas, dose diária, tempo e regularidade do tratamento, presença de eventos adversos com uso do medicamento, conclusão ou não do tratamento e resposta terapêutica e evolutivas (reativação das lesões durante o seguimento pós-tratamento, seqüelas). Foram descritas as frequências simples das variáveis categóricas ou qualitativas (sexo, profissão, localização das lesões, tipo e formas clínicas, como foi feito o diagnóstico, tipo de tratamento realizado, conclusão ou não do tratamento, seguimento pós-tratamento) e medida de tendência central (média) das variáveis quantitativas discretas ou contínuas (idade, tempo de tratamento em meses). Foram calculadas também as medidas de tempo de tratamento instituído no nosso serviço até a cura clínica para diferentes categorias de gravidade e para cada uma das espécies de fungo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1

Este artigo constitui o relato de caso de CBM causada por *C. carrionii* num paciente residente no Rio de Janeiro Este agente é raro no Brasil e trata-se da primeira descrição no estado do Rio de Janeiro. Além do mais, o paciente apresentava a forma grave segundo a classificação adotada (Queiroz-Telles e cols., 1992) e evoluiu com a cicatrização total das lesões após 12 meses de tratamento, representando uma ótima resposta à terapia utilizada. Este artigo foi submetido à Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em fevereiro de 2008.

***Cladophialophora carrionii*: A rare agent of chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil.**

Marcelle de F. MOUCHALOUAT, Maria Clara G. GALHARDO, Paulo Cezar Monteiro FIALHO, Janice Mery C. de Oliveira COELHO, Rosely Maria ZANCOPÉ-OLIVEIRA Antonio Carlos F. do VALLE.

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Summary

A 73 year-old male farm laborer from a rural area presented a 15 years history of extensive tumoral lesions over his left leg. Histopathological studies of skin biopsy showed pseudoepitheliomatous hyperplasia and granulomatous chronic inflammatory process with muriform cells, thus confirming chromoblastomycosis (CBM). *Cladophialophora carrionii* was isolated in culture. Treatment with itraconazole 400mg/day for 12 months resulted in complete remission of lesions. As far we aware, this is the first case report of CBM caused by *Cladophialophora carrionii* in Rio de Janeiro, Brazil.

Resumo

Lavrador, com 73 anos, residente em área rural apresentava há 15 anos lesões tumorais disseminadas na perna esquerda. Exame histopatológico de biópsia de pele mostrou hiperplasia pseudo-epiteliomatosa e processo inflamatório crônico granulomatoso com células muriformes, confirmando o diagnóstico de cromoblastomicose (CBM). *Cladophialophora carrionii* foi isolado na cultura. Tratamento com itraconazol 400 mg/dia durante 12 meses resultou na completa remissão das lesões. Este é o primeiro relato de CBM causado por *C. carrionii* no Rio de Janeiro, Brasil.

Keywords: Chromoblastomycosis; *Cladosporium*; Brazil.

Introduction

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic disease of cutaneous and subcutaneous tissues caused by filamentous fungi of the *Dematiaceae* family (with melanic-type pigment in its wall).

Most cases have been described in tropical and subtropical regions, mostly in Madagascar, Brazil, Japan, Venezuela and México¹⁵. In the world most infections are caused by *Fonsecaea pedrosoi*. *C. carrionii* is the second common agent, presenting in dry endemic areas with a dry climate, for example Madagascar and Venezuela^{5,9}.

In Brazil, the second place in prevalence rate of the world, *Phialophora verrucosa* after *F. pedrosoi*, is the most common agent of CBM. Also there, at least in medline, lilacs and scielo databases, *C. carrionii* has not been described as agent of this mycosis. Here we report the first case of CBM caused by *C. carrionii* in Rio de Janeiro, Brazil.

Case report

A 73-year-old male, farm laborer, living in Itaboraí, a rural city far 45 km from Rio de Janeiro, presenting painful lesions over his left leg for 15 years was referred to the outpatient clinic of infectious dermatology (IPEC – Fiocruz). He did not remember what could have caused the lesions. The patient denied other conditions, such as diabetes and hypertensive disease. At physical exam, he was in poor health and nutritional conditions. Lesions were erythematous to violaceous papules, painfull, in different size, that formed tumoral lesions with irregular bleeding on the surface of the left leg, the largest lesion measuring 8x6cm (Fig. 1). In some lesions we noted presence of larvae suggestive of myiasis, and there was little edema in the affected leg. Local lymph nodes were not involved.

Laboratory tests (full blood count, liver function and glucose) showed normal values. An X-ray indicated no bone involvement.

Biopsy was performed on one of the lesions. Haematoxylin and eosin stained sections showed pseudoepitheliomatous hyperplasia and granulomatous chronic inflammatory process with multinucleate giant cells, epithelioid cells, histiocytes, lymphocytes and neutrophils inside microabscesses. There were muriform cells within and outside the multinucleate giant cells (Fig. 2). Additionally special stains PAS and *Grocott* were done.

KOH preparation was negative. Culture on Sabouraud 2% glucose agar yielded velvety olive-black colony within 4 weeks (Fig. 3a). Microscopic slide examination of culture material on potato glucose agar revealed long, flexuous, branching chains of conidia, regular in size, in accordance with *C. carrionii* (Fig. 3b). Additionally the agent was identified by molecular sequence data of the ITS1-ITS2 regions of the rDNA. The sequence matched *C. carrionii* in GenBank.

The patient was initially treated with ivermectin and cephalexin for secondary infection. Itraconazole 200mg twice a day was administered and cure was observed after 12 months. There were no side effects to the drug. Atrophic scars were formed in healed areas (Fig. 4). Mycological examination was negative and histopathology showed inflammatory process with lymphocytes and cicatricial fibrosis. One year after itraconazole discontinuation, the patient remains without recurrence.

Discussion

In Brazil, there is scant information concerning the incidence of CBM, as it is not a reportable condition. This mycosis has been reported especially in Pará, followed by Rio Grande do Sul, Paraná and Maranhão. As a whole, *F. pedrosoi* and *P. verrucosa* are the primary main agents¹³. Other agents of CBM identified are *F. compacta*, *Exophiala jeanselmei*, *E. castellanii*, and *Rhinochrysiella aquaspersa*^{4,6,10,14} (table 1).

C. carrionii is ubiquitous in the semi-arid area, where xerophytes are found, predominantly *Cactaceae*, that is possible the natural reservoir of the fungus³. Surprisingly, the patient was living in Itaboraí, a place with tropical climate, temperature range 12-33°C (average 18°C), differing considerably from areas where *C. carrionii* is found.

In this case, the patient was an agricultural worker as typical of CBM that suffered commonly injuries¹³. He denied any injury. The median incubation period for CBM is not known; however, most cases progress slowly, e.g. 15 years like this case, over many years and sometimes decades.

Our patient presented tumoral lesions, but the clinical aspect of the lesions is diverse; verrucous is the most frequently reported lesion, and most lesions are present on the lower limbs^{4,5,13}.

In this study, rRNA gene ITS region was amplified and sequenced. We think that identification based on molecular sequence with high sensitivity provide an additional way of diagnosis of CBM.

Itraconazole, is the drug of choice for CBM and seems the best therapy primarily for *C. carrionii*, that responds faster than *F. pedrosoi* to antifungal agents^{1,12}. Our patient showed good response, with cure in 12 months of treatment, in spite of the severe form of the disease¹¹. Treatment should be continued until clinical resolution; which usually occurs after several months of therapy². Relapse is common, however, especially in the most extensive lesions⁵.

Although itraconazole seems the best antifungal treatment, only surgical excision was curative in patients that showed no improvement with itraconazole¹⁶.

We concluded that CBM caused by *C. carrionii* is rare in Brazil, has been found in Itaboraí/Rio de Janeiro, a place that not have ecological conditions (dry climate, spiny areas) to the growth of fungi. This shows the importance to isolate the agent and begin therapy sooner, might previous the successful result.

Acknowledgements: We acknowledge Patrícia M. Silva Tavares for her collaboration.

References:

1. BONIFAZ, A.; MARTINEZ-SOTO, E.; CARRASCO-GERARD, E. *et al.* Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. **Int. J. Dermatol.**, **36(7)**:542-7, 1997.
2. BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; & SAUL, A. - Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, **44(1-2)**:1-7, 2001.
3. DE HOOG, G.S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G. *et al.* - Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Med. Mycol.**, **38 (suppl. 1)**: 243-250, 2000.
4. LONDERO, A.T. & RAMOS, C.D. – Cromoblastomicose no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **An. Bras. Dermatol.**, **64(3)**: 155-8, 1989.
5. LOPEZ, M.R. & MENDEZ T.L.J. - Chromoblastomycosis. **Clin Dermatol.**, **25(2)**:188-94, 2007.
6. MARQUES, S.G.; PEDROZO SILVA C.M.; RESENDE M.A.; ANDREATA L.S. & COSTA, J.M.L.G. – Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Med. Mycol.**, **42**: 261-265, 2004.
7. MAPURUNGA, A.C.P.; GONÇALVES, H.M.G.; SILVA, J.B.; CABRAL, S.E.S.X. & DIÓGENES, M.J.N. - Micoses profundas no Ceará - Estudo dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará (1983 a 1988). **An. Bras. Dermatol.**, **65(3)**: 117-118, 1990.
8. MAPURUNGA, A.C.P.; TEIXEIRA, F.L.L.; BARGIONA, S.P.; GONÇALVES, H.M.G.; MONTEIRO, C.M. & LIMA, A.A.B. - Micoses profundas diagnosticadas no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) no período de 1978 a 1989. **An. Bras. Dermatol.**, **66(5)**: 243-250, 1991.
9. PEREZ-BLANCO, M.; HERNANDEZ, V.R.; GARCIA-LUMBRIA, L. *et al.* - Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. **Med Mycol.**, **44(5)**:467-71, 2006.
10. QUEIROZ-TELLES, F.F. Chromoblastomycosis in the State of Paraná: etiology, epidemiology, clinic and treatment with itraconazole, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30(4)**:345-6, 1997.
11. QUEIROZ-TELLES, F.; MCGINNIS, M.R. & SALKIN, I. – Subcutaneous mycoses. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, **17**: 59-85, 2003.

12. RESTREPO, A. - Treatment of tropical mycoses. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **31(3 Pt 2)**:S91-102. 1994.
13. SILVA, J.P.; SOUZA, W. & ROZENTAL, S. - Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, **143**: 171-175, 1999.
14. SILVA, A.C.C.M.; NETO, S.A.; GALVÃO, C.E.S.; MARQUES, S.G.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, C.M.P.; FISCHMAN, O.; SILVA, R.R.; COSTA, M.R.S.R. & COSTA, J.M.L. – Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. I-Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **25(1)**:37-44, 1992.
15. TYRING, S.; LUPI, O. & HENGGE, U. - Chromoblastomycosis. In: Cardoso de Brito A. Tropical dermatology. São Paulo, Elsevier, 2005. p. 203
16. VIJAYA, D. & KUMAR, BH. Chromoblastomycosis. **Mycoses**, **48(1)**:82-4, 2005.



Fig 1: extensive tumoral lesions.

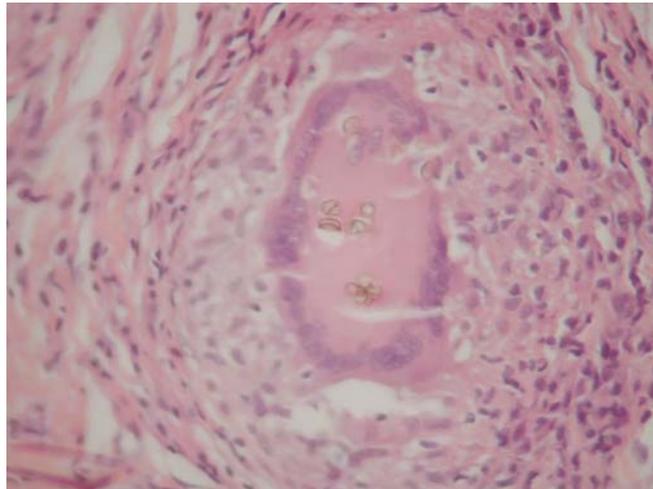


Fig 2: sclerotic cells within multinucleate giant cell (HE 400X).



Fig 3: *C. carrionii*: A. Velvety olive-black colony. B. long, flexuous, branching chains of conidia that are regular in size (slide culture).



Fig. 4: Atrophic scars formed in healed areas.

Table 1: CBM in Brazil according to the literature.

	N° cases	Main agent (N°)	Other agent
Pará ¹³	325	<i>F. pedrosoi</i> (77)	<i>Phialophora verrucosa</i> (1)
Rio Grande do Sul ⁴	100	<i>F. pedrosoi</i> (96)	<i>Phialophora verrucosa</i> (4)
Paraná ¹²	71	<i>F. pedrosoi</i> (95.5%)	<i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Exophiala jeanselmei</i> and <i>E.</i> <i>castellanii</i>
Maranhão ¹²	13	<i>F. pedrosoi</i> (9)	-
Ceará ⁷	05	-	-
Rio de Janeiro ⁸	02	<i>F. pedrosoi</i> (1)	-

5.2 ARTIGO 2

Este artigo representa a casuística dos 14 casos atendidos por nossa equipe no IPEC. Foram apresentadas as características epidemiológicas, clínicas, diagnósticas e terapêuticas da CBM no nosso serviço. Este artigo está pronto para ser submetido à Revista *Medical Mycology*.

CHROMOBLASTOMYCOSIS: STUDY OF 14 CASES IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL.

Short title: Chromoblastomycosis study in Brazil

Authors: Marcelle de F. Mouchalouat¹, Maria Clara Gutierrez Galhardo¹, Rosely Maria Zancopé-Oliveira², Paulo Cezar Monteiro Fialho, Janice Mery C. de Oliveira Coelho³, Patrícia Morais e Silva Tavares², Antonio Carlos Francesconi do Valle¹.

¹Laboratório de Dermatologia, ²Laboratório de Micologia, ³Laboratório de Anatomia Patológica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to: Marcelle de F. Mouchalouat, Rua Carlos Oswald 140, bl. 01, apto. 105, Rio de Janeiro-Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 22 793-120; Fax: +55 21 3325-9248; E-mail: marcelle.figueiredo@ipec.fiocruz.br

Summary

The epidemiologic data, clinical presentation and treatment of 14 cases of chromoblastomycosis diagnosed in Rio de Janeiro (Brazil) were described. Diagnosis was attained by mycological and histopathological findings demonstrating the characteristic muriform cells. Male patients (71.4%) ranging from 32 to 77 years old and farm laborer and construction workers predominated. The duration of disease varied from 8 months to 32 years. The most common presentations were the verrucous form in six (42.9%) followed by tumoral form in three patients, predominantly of severe (50%) and moderate (42.9%) intensity. Lower limbs (50%) and upper limbs (21.4%) were the most affected body sites. *Fonsecaea pedrosoi* isolated from 10 (71.4%) and *Cladophialophora carrionii* isolated from one case were identified by mycological procedures and molecular sequencing data of the ITS1-ITS2 regions of the rDNA. Eleven patients (78.6%) were treated and followed up. Three patients received oral itraconazole 200-400mg/d, five patients received oral itraconazole 200-400mg/d combined with fluconazole 200mg/d and surgery without antifungals was performed in three cases. The duration of therapy varied from 12 to 48 months. Cure rate was 81.8% (9/11) and none relapse was observed after two years follow-up.

Keywords: Chromoblastomycosis, *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, Polymerase chain reaction, Brazil.

Introduction

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic subcutaneous mycosis caused by dematiaceous fungi with melanic-type pigment in its wall. This fungus is found in soil, plants and plant debris. CBM has been reported on all continents, and most cases have been described in tropical and subtropical regions. Madagascar and Brazil are the first and second most important foci of this mycosis, respectively [1, 2]. Other endemic regions have been described in Japan [3], Australia [4], Mexico [5], and Venezuela [6]. *Fonsecaea pedrosoi* is worldwide the most frequent agent followed by *Cladophialophora carrionii*, and *Phialophora verrucosa*. CBM affects mainly male individuals that work in contact with soil, suffering injuries often, e.g. farm laborer, and live in rural areas; diagnosis takes long time to be done due to the difficulty to arrive in specialized outpatients' clinics located in urban areas [2]. Clinical features are variable, classified as nodular, tumoral, verrucous, plaque, and cicatricial lesions [7]. The verrucous form is the most frequent, and lower limbs, followed by upper limbs are the most common localizations [2, 5, 7, 8]. CBM is difficult to treat due to the long course of disease and fibrosis in the lesions, resulting in poor response in the majority of cases.

In Brazil, where CBM is not listed in the National Diseases Notification Registry, the disease was reported in some states like Pará [2], Rio Grande do Sul [8], Paraná [9], Maranhão [10], Pernambuco [11], Mato Grosso [12], Rondônia [13], Ceará [14], and Rio de Janeiro [15]. *Fonsecaea pedrosoi*, followed by *P. verrucosa*, are the most important agents. Here we report a study of a series of 14 cases diagnosed in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

Materials and methods

This study was approved by Ethical Committee of IPEC/FIOCRUZ.

A series of fourteen CBM cases in the state of Rio de Janeiro, diagnosed from 1994 to 2005 were included in this study. All were attended at the dermatology outpatient clinic of the Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a reference center for Infectious Diseases. Patients included in the study presented muriform cells, characteristic of CBM, in histological or mycological studies. The lesions were classified according to localization, clinical variety (nodular, tumoral, verrucous, plaque, and cicatricial), [7] and intensity (mild, moderate and severe) [16]. Biopsy of lesions was performed in all cases, and materials were analyzed through histological and mycological studies. Haematoxylin and eosin stained histological sections, and direct examination with 10% potassium hydroxide (KOH) were performed to search for the presence of dark brown muriform cells. Additional PAS and Grocott's methenamine silver stains were performed. Culture on Sabouraud 2% glucose agar isolated the agents, subsequently identified by slide culture microscopy (Riddel method). Before, during (every two months), and after antifungal treatment, laboratorial exams were performed: complete blood count, glucose blood levels and liver function tests for a better control of possible adverse effects. Ten isolates obtained in this study were also identified by molecular sequencing of the ITS1-ITS2 regions of the rDNA. For DNA extraction, the strains were grown on 2% malt extract broth for fourteen days at 30°C. Briefly, 500 mg of cellular mass and few glass beads were transferred to 1,5mL tubes and 500mg of extraction buffer (10mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 1mmol/L EDTA [pH 8.0], 1% sodium dodecyl sulfate, and 100µg/mL proteinase K) were added. The samples were vortexed and incubated in a water bath at 37°C for 1 hour (h). Two hundred microliters of 5.0mol/L NaCl were added and the tubes were incubated in a water bath at 65°C

for 10 min, and 100µg of 10% CTAB/4.1% NaCl solution was added. Tubes were mixed by vortex and incubated in a water bath at 65°C for twenty minutes. RNase (10mg/mL) was added and the tubes were incubated in a water bath at 37°C for 2h. Samples were extracted with chloroform-isoamyl alcohol (24:1, [v/v]). DNA was precipitated with cold isopropanol and incubated for 30min, rinsed twice with ice-cold 70% ethanol, dried at room temperature, and reconstituted in 50µL of distilled water [17]. The PCR mix consisted of 10mM Tris-HCl buffer containing 50mM KCl, pH 8.0 (Invitrogen), 1.5mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2mM deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen), and 1.25U of *Taq* polymerase (Invitrogen). Primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) were added to a final concentration of 0.2mM each. Template DNA was added at a final concentration of 20ng per 100µl of the reaction mixture. Initial denaturation of template DNA was achieved by heating at 95°C for 5 min. This was followed by 30 cycles of 30s at 95°C, 30s at 58°C, and 1min at 72°C. A final extension step was conducted for 10 min at 72°C. Primers ITS1 and ITS4 reported by White *et al.* were used in amplification of rDNA including ITS1, gene 5,8 S (rDNA) and ITS2 by polymerase chain reaction (PCR) [18]. Direct sequencing of the PCR amplicons was performed with a sequencing kit using the ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNA sequences were edited by program BioEdit Sequence Alignment Editor (version 5.09) (Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC), and aligned with those from other medically important dematiaceous fungi that are available at the GenBank.

Results

Epidemiologic and clinical features (Table 1)

The demographic characteristics were ten men (71.4%) and four women (28.8%), with mean age of 61 years (range: 39 to 77). Regarding the place of residence, 85.7% (12 patients) lived in Rio de Janeiro, and two in others states (Piauí and Paraíba). Eleven (78.6%) patients reported contact with soil: eight in professional activities (farm laborers, construction workers gardeners), and three in recreational activities. Only three (21.4%) of the reported injuries begun after plant or wood lesion. The duration of disease ranged from 8 months to 32 years. The most frequent localization was in the lower limbs in seven patients (50%), followed by upper limbs in three patients (21.4%). Other body areas involved: back and face, in one patient each (7%). In two cases, patients presented extensive lesions. The most frequent clinical variety was verrucous in six (42.9%) patients (Figure 2), followed by tumoral in three cases (21.4%) (Figure 3). A combination of two clinical forms was seen in two cases (14.3%). In two patients (14.3%), disease presented as plaque (Figure 1). Regarding intensity, the severe form was the most found, in seven (50%) patients, followed by moderate in six (42.9%) cases, and mild in only one case (7.1%). Symptoms were itching in two cases, and pain in one case. Bacterial secondary infection was the most frequent complication (28.6%) followed by myiasis in 7.1%.

Associated diseases

Hypertensive arterial disease was present in 6 patients (42.9%) and diabetes mellitus in four (28.6%). One patient presented cerebral cysticercosis (7.1%) and another drug induced immunodepression by tacrolimus and mycophenolate mofetil after kidney transplantation (7.1%) (case 13).

Laboratory diagnosis

Direct mycological exams were positive in eleven of fourteen cases (78.6%). The primary causal agent was *F. pedrosoi* in 71.4% (10/14). *C. carrionii* was identified only in one patient (case 8). It was not possible to identify one strain, and in two cases culture was negative. About histology, chronic inflammatory infiltration and granulomatous process with microabscesses and inflammatory cells were found showing dark brown muriform cells, were observed in all patients.

Treatment and follow-up (Table 1)

Among fourteen patients, eleven received clinical or surgical therapy. Previous therapies in others centers were performed in three patients. In eight patients (57.1%) clinical regimens were performed as follows: monotherapy with oral itraconazole (ITZ) 200-400mg/d in three cases (21.4%) and combined with fluconazole (FLC) 200mg/d in five cases (35.7%). Cryotherapy was performed in two cases as adjuvant (case 3 and 5). The duration of therapy ranged from 12 to 48

months. Surgery was performed in three cases presenting small single lesions accessible to surgical excision (cases 9, 12 and 13), including the patient with immunodepression. Cure was seen in nine of eleven treated cases (81.8%). Follow-up during a period of two years showed absence of relapses. Three patients did not treat at IPEC: two were transferred to other services and one died due to a cerebral vascular accident (case 4).

Molecular sequencing

Ten culture isolates were identified by molecular sequencing data of the ITS1-ITS2 regions of the rDNA. The sequence matched well *F. pedrosoi* in nine isolates and *C. carrionii* in one isolate in GenBank, thus corroborating the morphological identification by mycologic procedures.

Discussion

This study reports CBM in Rio de Janeiro, a state of Brazil where this disease is scarce. At IPEC/FIOCRUZ, a reference center for Infectious Diseases, CBM represented 1.4% of the total subcutaneous mycoses diagnosed during the study period (1,049 patients), representing the second most common mycosis after sporotrichosis. The disease affects adults that commonly suffered minor trauma in work, difficult to associate with the beginning of the disease, as in our study where half of the patients reported trauma. CBM has not an established period of incubation and has a long course of progression. In this study this was demonstrated by the older age of our patients (mean 61 years), and half of patients presenting more than ten years of disease

progression (Table 1). We can assume how difficult it is for these patients to reach a specialized public outpatient clinic, along with the fact that CBM lesions may be present for many years with minor discomfort, and medical attention is usually sought because of the mycosis' complications, including secondary infection, cosmetic reasons, or elephantiasis.

In Brazil there are no reported cases of CBM in children and adolescents like seen in Falcón state, in Venezuela [6]. They reported CBM in people with less than twenty years old, probably due to contact with plants and wood. Male individuals predominated, the majority of them living in Rio de Janeiro. Nevertheless, women represented 28.8%, differently from what Silva and cols, 1999 found in Pará, with only 6.7% women. Possibly the low rate is not related only to professional activity, since women in Pará work in contact with the soil, but also female sexual hormones may protect them from the disease, like it is the case in paracoccidioidomycosis [2]. Interestingly, in Japan the difference of sex rate is minimal [3].

The most common lesions were localized in the lower limbs, similar to other reported cases in Brazil [8,9] and in the world, but differently from Australia [4], Japan [3], and Venezuela [6], where upper limbs lesions predominated. In the latter, for the authors this fact could explain by contact of the patients with *Cactaceae* plants and fences, which are made with tree trunks in the vicinity to the patients' houses. In Brazil, in Pará, *F. pedrosoi* was isolated from a patient's lesion and from thorns of *Mimosa pudica* L which inoculated the pathogen. The patient reported trauma by this plant, known as "maria dormideira" in Brazil. Dematiaceous fungi found firmly adhered to the plant's cuticle, suggested a real interaction between *F. pedrosoi* and *Mimosa pudica* L. [19]. Marques *et al.* in Maranhão, collected a total of 68 samples including shell of babassu coconut, stem and leaves of babassu palm, wood and bark of decomposing trees and soil. Isolation of dematiaceous fungus was reported in nine samples. Thus, demonstrating that babassu palm, a typical plant of this region that is important source of materials for economy, presents a

source of these fungi, and is probably a risk factor of infection [20]. In our study, *F. pedrosoi* was the primary agent isolated, and *C. carrionii*, very rare agent in Brazil, was isolated from a patient who lived lifelong in Rio de Janeiro, considerably far from areas where this agent is found, in dry climate, spiny areas. This fact surprised us and reinforced the importance of culture methods for the isolation of CBM agents (Mouchalouat MF, submitted results). About histopathology, we found no different characteristics than other authors reported in literature [21]. Molecular diagnosis based on PCR identification of the isolates demonstrated its feasibility.

As CBM may be caused by different agents, this method can be important to certify the species, identifying strains which identification is not possible by morphologic methods, and probably also identifying new species [17, 22]. Verrucous presentation was the most common clinical form found (Figure 2). Regarding disease intensity, severe form predominated in our study in patients with advanced age, long course of disease progression and co-morbidities. Nevertheless, elderly patients (above 65 years) presenting moderate form had earlier diagnosis (case 3 and case 4 in Table 1). Gimenes et al. [23] showed that in the severe form, Th2 profile predominated and in the mild form Th1 profile; an efficient immune response able to prevent the development of the disease.

CBM is a challenge because the duration of treatment is long and relapse is common. Clinical regimens with ITZ alone and combined with FLC were used for moderate and severe forms, and for those with previous treatment history without cure. Our choice of this combined therapy for severe forms was suggested by our previous good experience in a case of entomophthoromycosis who was unsuccessfully treated with other drugs [24]. On that topic, other authors reported this same association with success [26, 27]. Both azoles act inhibiting ergosterol synthesis, differing only in solubility and half-life time. Recently, Gupta et al. 2002, used terbinafine and itraconazole in four patients with a long CBM disease course and poor or non response to several

treatments, with good results [28]. In this study, the duration of therapy ranged from 12 to 48 months. Although the patients were submitted to this long lasting therapy, they presented good tolerability to these azoles.

The patient from which *C. carrionii* was isolated (case 8) used ITZ for the shortest period in the study, despite the severe form of CBM. Probably it was due a higher *C. carrionii in vitro* sensibility to ITZ that was already shown in a previous study [29]. Differently *F. pedrosoi* did not present this type of pattern. In this study, cryotherapy with liquid nitrogen was used only as an adjuvant, not as reported in other cases like Castro et al., using this method as monotherapy, from 30s to 4min, in two cycles, or previously ITZ to treat twenty-two patients with CBM. Cure without relapse in three years of follow-up was defined in nine patients (40.9%), and eight patients (36.4%), were still under observation (presenting clinical cure, but less than three years of follow-up) [30].

The immunosuppressed patient presented a single lesion and moderate form, differing from expected [31]. We believe this could be explained by the fact that this patient has attended regularly the outpatient clinic due to his underlying disease (kidney transplantation), and so the diagnosis was done in an earlier stage. Surgery has been the best treatment of choice for this case, for which clinical therapy was contra-indicated due to drug interactions, and the disease presented in mild or moderate forms with a single lesion [3, 32]. Piña-Penabad et al. described one case caused by *E. jeanselmei* presenting a small single verrucous form of CBM in the hand six months after renal transplant using immunosuppressant drugs. The patient used ITZ for one month, followed by surgical excision. She was cured and did not present relapse after one year of follow-up [33].

CBM is difficult to treat due to the different response rates of the agents to the same antifungal drug, associated with the long duration of the therapy. Here, in spite of the severe forms (50%) the cure rate in those treated was high (81.8%), and relapse was not reported in two years of follow-up. Bonifaz et al. found cure only in 31%, and improvement in 57% of fifty-one patients [5], and Queiroz-Telles et al. 2003, reported cure in four (44%) of nine patients with the severe form [29]. We believe that the good results were due to patients having attended a center with specialized laboratories, with ability to diagnosis uncommon mycosis, and the clinic has the drugs required for the patients' complete clinical therapy. Further on, it is important to emphasize the importance of the diagnosis in early stages of the mycosis when the lesions are small and can be soon treated.

Acknowledgements: We acknowledge Mônica dos Santos Elias for her collaboration in fungus; and Bodo Wanke for revising this paper.

References:

1. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER et al. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 45-47.
2. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* 1999; 143: 171-175.
3. Kondo M, Hiruma M, Nishioka Y, et al. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. *Mycoses* 2005; 48: 221-225.
4. Currie BJ, Carapetis JR. Skin infections and infestations in Aboriginal communities in northern Australia. *Australas J Dermatol* 2000; 41: 139-43; quiz 144-145.
5. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44: 1-7.
6. Pérez-Blanco M, Valles RH, García-Humbría L et al. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Medical Mycology* 2006; 44: 467-471.
7. Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I et al Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17: 59-85, viii.
8. Minotto R, Bernardi CD, Mallmann LF et al. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 585-592.

9. Telles Filho FdQ. A Cromoblastomicose no Estado do Paraná: Etiologia, Epidemiologia, Clínica e Terapêutica com Itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1997; 30: 345-346.
10. Silva ACCMe, Serra Neto A, Galvão CES, et al. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão: I - aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 1992; 25: 37.
11. Lacerda AM. Cromoblastomicose em Pernambuco. In: *Simpósio Nacional de Micologia Médica: Cromoblastomicose, Lobomicose, Paracoccidioidomicose, Criptococose*; 2005; 2005: 31-33.
12. Rezende SBT, M.; Hahn, R.C.; Fontes, C.J. Cromomicose em Mato Grosso: Descrição Clínico-Epidemiológica de Série de Casos. In: *XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 2007: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2007: 94.
13. Alves MAC, L.M.A. Caracterização Clínica e Epidemiológica dos Pacientes Portadores de Cromoblastomicose na Região de Monte Negro - Rondônia. In: *XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 2007: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2007: 101.
14. Mapurunga ACP, Gonçalves HMG, Silva JB et al. Micoses profundas no Ceará: estudo dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará (1983-1988). *An. bras. dermatol* 1990; 65: 117.

15. Mapurunga ACP, Teixeira FLdL, Bargiona SP, et al. Micoses profundas diagnosticadas no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Jaffrée e Guinle (HUGG) no período de 1978 a 1989. *An. bras. dermatol* 1991; 66: 243.
16. Queiroz-Telles F, Purin KS, Fillus JN et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol* 1992; 31: 805-812.
17. de Andrade TS, Cury AE, de Castro LG et al. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 267-72.
18. White TJ, Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J, ed. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990: 315-322.
19. Salgado CG, da Silva JP, Diniz JAP et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2004; 46: 33-6.
20. Marques SG, Silva CMP, Saldanha PC et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. *Jpn J Med Mycol* 2006; 47: 305-311.
21. Uribe-J F, Zuluaga AI, Leon W et al. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 1989; 105: 1-6.

22. Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K. Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 404-407.
23. Gimenes VMF, de Souza MDG, Ferreira KS et al. Cytocines and lymphocyte proliferation in patients with clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and Infection* 2005; 7: 708-713.
24. Valle AC, Wanke B, Lazera MS, Monteiro PC et al. Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43: 233-236.
26. Queiroz-Telles FF, J.N.; Saad, L.M.; Carvalho, A.N.; Escuissato, D.L.; Fernandez-Bordignon, G.; Pinheiro, R.M.; Purim, K.S. *Successful Treatment of Cerebral Phaeohyphomycosis With Azole Combined Therapy*. In: *4 th Symposium on Topics in Mycology: Fungal Dimorphism*; 1992; UK; 1992: 284.
27. Takemoto C. *One case of pulmonary aspergillosis successfully treated with itraconazole*. In: *47 th Kyushu Regional Congress of Japanese Society for Tuberculosis, 35 th Kyushu Regional Congress of Japanese Society of Chest Diseases*; 1995; Japan; 1995.
28. Gupta AK, Taborda PR & Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology* 2002; 40: 529-534.
29. Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I et al. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17: 59-85, viii.

30. Castro LGM, Pimentel ERA & Lacaz CS. Treatment of chromoblastomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int J Dermatol* 2003; 42: 408-412.
31. Neiva CLS, Souza VA, de Freitas RMC et al. Cromomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi* em paciente com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42: 334-337.
32. Vijaya D, Kumar BH. Chromoblastomycosis. *Mycoses* 2005; 48: 82-84.
33. Peña-Penabad C, Durán MT, Yebra MT et al. Chromomycosis due to *Exophiala jeanselmei* in a renal transplant recipient. *Eur J Dermatol* 2003; 13: 305–307.

Table 1: Clinical features and treatment of cromoblastomycosis cases enrolled in this study

Patient	Course (years)	Age (years)	Gender	Clinical features	Local	Intensity	Trial regimen (mg/d)	Follow-up
1	32	67	Male	verrucous+tumoral	extensive	severe	ITZ 400+ FLC 200	cure
2	2	65	Male	tumoral	lower limb	severe	none*	–
3	4	72	Male	verrucous	upper limb	moderate	ITZ 400	cure
4	4	69	Male	verrucous+nodular	lower limb	moderate	none**	–
5	20	42	Female	verrucous	lower limb	moderate	ITZ 400+ FLC 200	lost
6	11	47	Male	verrucous	extensive	severe	ITZ 400+ FLC 200	cure
7	32	72	Male	verrucous	face	severe	ITZ 400+ FLC 200	cure
8	15	73	Male	tumoral	lower limb	severe	ITZ 400	cure
9	<1***	56	Male	plaque	upper limb	mild	surgery	cure
10	17	68	Female	tumoral	lower limb	severe	ITZ 200+ FLC 200	cure
11	2	53	Male	verrucous	lower limb	moderate	none*	–
12	5	39	Male	plaque	back	moderate	surgery	cure
13	<1***	55	Female	verrucous	lower limb	moderate	surgery	cure
14	12	77	Female	verrucous	upper limb	severe	ITZ 200	death

* Transferred to another service; ** Died due to another cause different of CBM; ***Case 9 (5 months) and case 13 (8 months); ITZ= Itraconazole FLC=Fluconazole.



Fig 1: Verrucous and tumoral form of severe chromoblastomycosis presenting 32 years of evolution.



Fig 2: Tumoral form of chromoblastomycosis.



Fig 3: Cromblastomycosis: plaque form in back.

6 CONCLUSÕES

1) A CBM é uma micose rara no Rio de Janeiro. Toda a casuística aqui apresentada (14 casos em 11 anos) foi referenciada de outros centros de saúde e não sendo nenhum paciente por demanda espontânea.

2) O principal agente isolado foi *F. pedrosoi* em 71,4 %. Entretanto foi descrito pela primeira vez um agente raro causador de CBM no Rio de Janeiro e Brasil, o *C. carrioni*, que é encontrado em clima semiárido e seco.

3) A biologia molecular pelo método de PCR foi útil na confirmação dos agentes envolvidos na CBM.

4) O perfil clínico e epidemiológico predominante foi sexo masculino, idoso (mais de 60 anos), com comorbidades associadas, contato com solo na história prévia (78,6%), doença com mais de 10 anos de evolução (50%), tipo clínico verrucoso (50%), forma grave (50%) e localizada em membro inferior (50%).

5) O grau de gravidade da CBM esteve relacionado não apenas ao tipo clínico e tamanho da lesão, mas também ao tempo de doença.

6) Foi obtida uma elevada taxa de cura (81,8%) e ausência de recorrência, corroborando a eficácia do tratamento clínico (monoterapia com ITZ) e cirurgia para as formas leve, moderada e sem resposta à terapia prévia; e tratamento combinado (ITZ associado ao FLC) para as formas graves.

7) Dos casos tratados, o paciente do qual foi isolado o *C. carrionii*, apesar de apresentar uma forma considerada grave de CBM, evoluiu para a cura num período de tratamento curto (um ano).

8) A CBM associada à imunossupressão pode ter seu curso favorável, desde que sejam realizados diagnóstico e tratamento precoces.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ablitz P, Fukushima K, Takizawa K, Nieda N, Miyaji M, Nishimura K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. J Clin Microbiol. 2003; 41(2):873-6.
2. Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K. Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. J Clin Microbiol. 2004; 42(1):404-7.
3. Agarwalla A, Khanal B, Garg VK, Agrawal S, Jacob M, Rani S, et al. Chromoblastomycosis: report of two cases from Nepal. J Dermatol. 2002; 29(5):315-9.
4. Alves MAC, L.M.A. Caracterização Clínica e Epidemiológica dos Pacientes Portadores de Cromoblastomicose na Região de Monte Negro - Rondônia. In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2007. p. 101.
5. Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. Mycoses. 2004; 47(5-6):216-21.
6. Azulay RD, Serruya J. Hematogenous dissemination in chromoblastomycosis. Report of a generalized case. Arch Dermatol. 1967; 95(1):57-60.
7. Barchiesi F, Di Francesco LF, Scalise G. In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997; 41(8):1812-4.
8. Bedout C, Gómez BL, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1997; 39(3):145-8.
9. Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. Mycopathologia. 2006; 161(4):195-203.
10. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. Mycoses. 2001; 44(1-2):1-7.

11. Bonifaz A, Martinez-Soto E, Carrasco-Gerard E, Peniche J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int J Dermatol.* 1997; 36(7):542-7.
12. Bonifaz A, Saul A, Paredes-Solis V, Araiza J, Fierro-Arias L. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J Dermatolog Treat.* 2005; 16(1):47-51.
13. Bopp C. Cromoblastomicose [livre docência]. Porto alegre: Universidade do Rio Grande do Sul; 1959.
14. Buot G, Bachmeyer C, Benazeraf C, Bourrat E, Beltzer-Garrelly E, Binet O. Chromoblastomycosis: an unusual diagnosis in Europe. *Acta Derm Venereol.* 2005; 85(3):259-60.
15. Castro LG, Pimentel ER, Lacaz CS. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int J Dermatol.* 2003; 42(5):408-12.
16. Castro LGM. Mecanismo de cura da cromomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. *An bras. dermatol.* 1989; 64(6):297-300.
17. Currie BJ, Carapetis JR. Skin infections and infestations in Aboriginal communities in northern Australia. *Australas J Dermatol.* 2000; 41(3):139-43; quiz 44-5.
18. da Silva JP, Alviano DS, Alviano CS, de Souza W, Travassos LR, Diniz JA, et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 33(1):63-9.
19. d'Avila SC, Pagliari C, Duarte MI. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia.* 2003; 156(2):51-60.
20. d'Ávila SCGP, Pagliari C, Duarte MIS. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms. *Mycopathologia.* 2002; 156:51-60.
21. de Andrade TS, Cury AE, de Castro LGM, Hirata MH, Hirata RDC. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2007; 57:267-72.
22. de Brito AC. Chromoblastomycosis. In: Tyring S, Lupi O, Hengge U, editors. *Tropical Dermatology*: Elsevier; 2005. p. 203-5, 13.

23. De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA, Van Den Ende AH, Queiroz-Telles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol.* 2004; 42(5):405-16.
24. De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende AH, et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol.* 2000; 38 Suppl 1:243-50.
25. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER, Pecarrere JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55(1):45-7.
26. Esterre P, Inzan CK, Ramarcel ER, Andriantsimahavandy A, Ratsioharana M, Pecarrere JL, et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br J Dermatol.* 1996; 134 Suppl 46:33-6; discussion 40.
27. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(3):497-500.
28. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(2):148-52.
29. Ezughah FI, Orpin S, Finch TM, Colloby PS. Chromoblastomycosis imported from Malta. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28(5):486-7.
30. Ezzine-Sebai N, Benmously R, Fazaa B, Chaker E, Zermani R, Kamoun MR. Chromomycosis arising in a Tunisian man. *Dermatol Online J.* 2005; 11(2):14.
31. Farbiarz SR, de Carvalho TU, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30(4):265-73.
32. Gimenes VM, Criado PR, Martins JE, Almeida SR. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia.* 2006; 162(2):97-101.
33. Gomez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16(2):91-6.
34. Gon AS, Minelli L. Melanoma in a long-standing lesion of chromoblastomycosis. *International J of Dermatology.* 2006; 45:1331-3.
35. Gupta AK, Taborda PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol.* 2002; 40(5):529-34.

36. Hamza SH, Mercado PJ, Skelton HG, Smith KJ. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol*. 2003; 30(5):340-3.
37. Hira K, Yamada H, Takahashi Y, Ogawa H. Successful treatment of chromomycosis using carbon dioxide laser associated with topical heat applications. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002; 16(3):273-5.
38. Hofmann H, Choi SM, Wilsmann-Theis D, Horre R, de Hoog GS, Bieber T. Invasive chromoblastomycosis and sinusitis due to *Phialophora verrucosa* in a child from northern Africa. *Mycoses*. 2005; 48(6):456-61.
39. Hussain I, Rashid T, Haroon TS. Parenteral vitamin D(3) and oral terbinafine for refractory chromoblastomycosis. *Br J Dermatol*. 2002; 146(4):704.
40. Kikuchi Y, Kondo M, Yaguchi H, Hiruma M, Ikeda S. [A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* presenting as a small plaque on the left upper arm: a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan.]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2007; 48(2):85-9.
41. Ko CJ, Sarantopoulos GP, Pai G, Binder SW. Longitudinal melanonychia of the toenails with presence of Medlar bodies on biopsy. *J Cutan Pathol*. 2005; 32(1):63-5.
42. Kondo M, Hiruma M, Nishioka Y, Mayuzumi N, Mochida K, Ikeda S, et al. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. *Mycoses*. 2005; 48(3):221-5.
43. Kow-Chung KJ, Bennett JE. Chromoblastomycosis. In: Bennett KJK-CJE, editor. *Medical Mycology*: Lea & Febiger; 1992. p. 337-55.
44. Kullavanijaya P, Rojanavanich V. Successful treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. *Int J Dermatol*. 1995; 34(11):804-7.
45. Kumarasinghe SP, Kumarasinghe MP. Itraconazole pulse therapy in chromoblastomycosis. *Eur J Dermatol*. 2000; 10(3):220-2.
46. Lacaz CS, Zamith VA, Salebian A, Gonzaga M. Reacao intradermica ao antígeno EP-1 de *Fonsecaea pedrosoi*. *An bras. dermatol*. 1982; 57(4):185-7.
47. Lacerda AM. Cromoblastomicose em Pernambuco. In: *Simpósio Nacional de Micologia Médica: Cromoblastomicose, Lobomicose, Paracoccidioidomicose, Criptococose*. 2005. p. 31-3.

48. Lokuhetty MD, Alahakoon VS, Kularatne BD, De Silva MV. Zeil Neelson and Wade-Fite stains to demonstrate medlar bodies of chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol.* 2007; 34(1):71-2.
49. Mapurunga ACP, Gonçalves HMG, Silva JB, Cabral SESX, Diógenes MJN. Micoses profundas no Ceará: estudo dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará (1983-1988). *An. bras. dermatol.* 1990; 65(3):117.
50. Mapurunga ACP, Teixeira FLdL, Bargiona SP, Gonçalves HMG, Monteiro CM, Lima AAB. Micoses profundas diagnosticadas no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Jaffrée e Guinle (HUGG) no período de 1978 a 1989. *An. bras. dermatol.* 1991; 66(5):243.
51. Marques SG, Pedrozo Silva CM, Resende MA, Andreato LS, Costa JM. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med Mycol.* 2004; 42(3):261-5.
52. Marques SG, Silva Cde M, Saldanha PC, Rezende MA, Vicente VA, Queiroz-Telles F, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhao Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2006; 47(4):305-11.
53. Mattêde MGS, Júnior LP, Coelho CC, Mattêde AF. Dermatite verrucosa cromoparasitária (cromomicose). *An bras. dermatol.* 1990; 65(2):70-4.
54. Mello e Silva AC, Serra Neto A, Galvao CE, Marques SG, Saldanha AC, Pedroso e Silva CM, et al. [Fonsecaea pedrosoi-caused chromoblastomycosis in the state of Maranhao. I. The clinical, epidemiological and evolutionary aspects]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1992; 25(1):37-44.
55. Mendoza L, Karuppayil SM, Szaniszló PJ. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses.* 1993; 36(5-6):157-64.
56. Minotto R, Bernardi CD, Mallmann LF, Edelweiss MI, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44(4):585-92.
57. Mosquera J, Sharp A, Moore CB, Warn PA, Denning DW. *In vitro* interaction of terbinafine with itraconazole, fluconazole, amphotericin B and 5-flucytosine against *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50:189-94.
58. Muhammed K, Nandakumar G, Asokan KK, Vimi P. Lymphangitic chromoblastomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2006; 72(6):443-5.
59. Nagao K, Matsumoto H, Sugiura M, Hata Y. [A case of chromomycosis arising in a Japanese-Brazilian patient]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2001; 42(3):119-22.

60. Naranjo F, Márquez I, V. FA, Navas T, Yegres N, Yegres JF. Cromomicosis por *Cladophialophora carrionii*: características citogenéticas básicas: comunicación preliminar. Med interna (Caracas). 2004; 20:131-7.
61. Negroni R, Tobon A, Bustamante B, Shikanai-Yasuda MA, Patino H, Restrepo A. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005; 47(6):339-46.
62. Neiva CLS, Souza VA, de Freitas RMC, Santiago AMST, Resende MA, de Pádua PM. Cromomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi* em paciente com lúpus eritematoso sistêmico. Rev Bras Reumatol. 2002; 42(5):334-7.
63. Nimrichter L, Barreto-Bergter E, Mendonca-Filho RR, Kneipp LF, Mazzi MT, Salve P, et al. A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. Microbes Infect. 2004; 6(7):657-65.
64. Nobrega JP, Rosemberg S, Adami AM, Heins-Vaccari EM, Lacaz Cda S, de Brito T. *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis ("chromoblastomycosis"): first human culture-proven case reported in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45(4):217-20.
65. Oberto-Perdigón L, Romero H, Pérez-Blanco M, Apitz-Castro R. Inmunoanálisis enzimático (ELISA) en la evolución terapéutica de la cromoblastomycosis por *Cladophialophora carrionii* en el área endémica del Estado Falcón, Venezuela. Rev Iberoam Micol. 2005; 22:39-43.
66. Okan G, Rendon M. Chromoblastomycosis in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2001;15(2):188-9.
67. Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, dos Santos AL. Secretory aspartyl peptidase activity from mycelia of the human fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi*: effect of HIV aspartyl proteolytic inhibitors. Res Microbiol. 2006; 157(9):819-26.
68. Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, dos Santos AL. The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 46(1):21-9.
69. Park SG, Oh SH, Suh SB, Lee KH, Chung KY. A case of chromoblastomycosis with an unusual clinical manifestation caused by *Phialophora verrucosa* on an unexposed area: treatment with a combination of amphotericin B and 5-flucytosine. Br J Dermatol. 2005; 152(3):560-4.

70. Peña-Penabad C, Durán MT, Yebra MT, Rodríguez-Lozano J, Vieira V, Fonseca E. Chromomycosis due to *Exophiala jeanselmei* in a renal transplant recipient. *Eur J Dermatol.* 2003; 13:305-7.
71. Perez-Blanco M, Hernandez Valles R, Garcia-Humbria L, Yegres F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. *Med Mycol.* 2006; 44(5):467-71.
72. Poirriez J, Breuillard F, Francois N, Fruit J, Sendid B, Gross S, et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 63(1-2):61-3.
73. Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17(1):59-85, viii.
74. Queiroz-Telles F, Purim KS, Boguszewski CL, Afonso FC, Graf H. Adrenal response to corticotrophin and testosterone during long-term therapy with itraconazole in patients with chromoblastomycosis. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40(6):899-902.
75. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN, Bordignon GF, Lameira RP, Van Cutsem J, et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol.* 1992; 31(11):805-12.
76. Radford SA, Johnson EM, Warnock DW. In vitro studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1997; 41(4):841-3.
77. Rasul ES, Hazarika NK, Sharma A, Borua PC, Sen SS. Chromoblastomycosis. *J Assoc Physicians India.* 2007; 55:149-51.
78. Rezende SBT, M.; Hahn, R.C.; Fontes, C.J. Cromomicose em Mato Grosso: Descrição Clínico-Epidemiológica de Série de Casos. In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;* 2007. p. 94.
79. Rippon JW. Chromoblastomycosis and related dermal infections caused by dematiaceous fungi. In: Rippon JW, editor. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and The Pathogenic Actinomycetes*: W. B. Saunders Company; 1982. p. 249-76.
80. Rosen T, Overholt M. Persistent viability of the Medlar body. *Int J Dermatol.* 1996; 35(2):96-8.

81. Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*. 1994; 126(2):85-91.
82. Sa VC, Silva TA, Reis CM, Cunha FQ, Figueiredo F, Bocca AL. The pattern of immune cell infiltration in chromoblastomycosis: involvement of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 and fungi persistence. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49(1):49-53.
83. Saeb M, Arenas R. Cromomicosis: informe de cinco casos con énfasis histopatológico y terapéutico. *Dermatologia Venezolana*. 1999; 37(2):46-50.
84. Salgado CG, da Silva JP, da Silva MB, da Costa PF, Salgado UI. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5(8):528.
85. Salgado CG, da Silva JP, Diniz JA, da Silva MB, da Costa PF, Teixeira C, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004; 46(1):33-6.
86. Sauerteig E, Hernandez R, Salfelder K, Bastidas C. Acute chromoblastomycosis provoked by an insect bite in an immunosuppressed patient. *Mycoses*. 1998; 41(5-6):191-4.
87. Schell WA. Agents of Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Microbiology and Microbial Infections: Topley & Wilson's*; 1998. p. 315-36.
88. Seishima M, Oyama Z, Oda M, Ishigo S. Distribution of an antifungal drug, itraconazole, in pathological and non-pathological tissues. *Eur J Dermatol*. 2004; 14(1):24-7.
89. Sevigny GM, Ramos-Caro FA. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* with low-dose terbinafine. *Cutis*. 2000; 66(1):45-6.
90. Silva ACCM, Serra Neto A, Galvão CES, Marques SG, Saldanha ACR, Silva CdMPE, et al. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão: I - aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1992; 25(1):37.
91. Silva CM, da Rocha RM, Moreno JS, Branco MR, Silva RR, Marques SG, et al. [The coconut babacu (*Orbignya phalerata martins*) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhao, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995; 28(1):49-52.
92. Silva CMP, Marques SG, Silva RR, Junior SSS, Junior DRTM, Costa JML. Cromoblastomicose tratada com itraconazol sistêmico associada a anfotericina B intralesional. *An bras. dermatol*. 1999; 74(1):41-4.

93. Silva DBd. Micose de Lane e Pedroso (cromomicose ou cromoblastomicose) [livre docência]. Belém: Faculdade de Medicina e Cirurgia do Pará; 1955.
94. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*. 1999; 143(3):171-5.
95. Sotto MN, De Brito T, Silva AM, Vidal M, Castro LG. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*. 2004; 31(1):14-8.
96. Takemoto C. One case of pulmonary aspergillosis successfully treated with itraconazole. In: 47 th Kyushu Regional Congress of Japanese Society for Tuberculosis, 35 th Kyushu Regional Congress of Japanese Society of Chest Diseases. Japan; 1995.
97. Telles Filho FdQ-. Cromoblastomicose. In: Tavares W, Marinho LAC, editors. *Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias*: Atheneu; 2005. p. 225-9.
98. Telles Filho FdQ. A Cromoblastomicose no Estado do Paraná: Etiologia, Epidemiologia, Clínica e Terapêutica com Itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997; 30(4):345-6.
99. Tsuneto LT, Arce-Gomez B, Petzl-Erler ML, Queiroz-Telles F. HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1989; 27(3):181-5.
100. Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: current concerns. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2005; 46(2):81-6.
101. Ungpakorn R, Reangchainam S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin Exp Dermatol*. 2006; 31(2):245-7.
102. Uribe-J F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia*. 1989; 105(1):1-6.
103. Valle AC, Wanke B, Lazera MS, Monteiro PC, Viegas ML. Entomophthoramycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001; 43(4):233-6.
104. Vicente VA, de Angelis DA, Filho Q-TF, Pizzirani-Kleiner AA. Isolation of *Herpotrichiellacious* fungi from the environment. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001; 32:47-51.
105. Vidal MS, Castro LG, Cavalcante SC, Lacaz CS. Highly specific and sensitive, immunoblot-detected 54 kDa antigen from *Fonsecaea pedrosoi*. *Med Mycol*. 2004; 42(6):511-5.

106. Vidal MS, de Castro LG, Cavalecate SC, Lacaz Cda S. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003; 45(6):315-8.
107. Vijaya D, Kumar BH. Chromoblastomycosis. Mycoses. 2005; 48(1):82-4.
108. Wackym PA, Gray GF, Jr., Richie RE, Gregg CR. Cutaneous chromomycosis in renal transplant recipients. Successful management in two cases. Arch Intern Med. 1985; 145 (6): 1036-7.

ANEXO A – Ficha de protocolo

Cromoblastomicose - protocolo de estudo n°

- 1- Nome:
- 2- Data do 1º atendimento: ____/____/____
- 3- Registro:
- 4- Data de nascimento: ____/____/____
- 5- Idade:
- 6- Sexo: 1- M() 2- F()
- 7- Profissão ao adoecer:
- 8- Naturalidade:
- 9- Raça: 1- BR() 2- NG() 3- PD()
- 10- Bairro que residia qdo do início da doença:
- 11- Município qdo do início da doença:

- 12- Tempo de aparecimento das lesões:
 - 12.1- em meses: em anos:
 - 12.2- não respondeu ()
 - 12.3- não sabe informar()

- 13- Localização das lesões:
 - 13.1- Face S() N()
 - 13.2- Pescoço S() N()
 - 13.3- Tórax S() N()
 - 13.4- Abdome S() N()
 - 13.5- Dorso S() N()
 - 13.6- MSup S() N()
 - 13.7- MInf S() N()
 - 13.8- Reg. Glútea S() N()

- 14- Caract. das lesões:
 - 14.1- Quantidade: única S() N()
múltipla S() N()
 - 14.2- Extensão: até 4cm S() N()
5-14cm S() N() >15cm S() N()

- 15-Tipo clínico:
 - 15.1- placa S() N()
 - 15.2- verrucosa S() N()
 - 15.3- cicatricial S() N()
 - 15.4- nodular S() N()
 - 15.5- tumoral S() N()

- 16- Gravidade:
 - 16.1- leve S() N()

16.2- moderada S() N()

16.3- grave S() N()

17- S/Sintomas:

17.1- prurido S() N()

17.2- dor S() N()

17.3- infecção secundária S() N()

17.4- edema S() N()

18-História epidemiológica:

18.1- trauma local com planta/madeira S() N()

18.2- picada de inseto S() N()

18.3- ignorado ()

19- Diagnóstico:

19.1- elem.muriformes ao direto S() N() não realizado ()

19.2- elem.muriformes ao histopatológico S()

N() não realizado ()

19.3- cultura do material F. pedrosoi()

C. carrionii() negativa() não identificada() não realizada()

20-Tratamento prévio:

20.1- clínico S() N()

20.2- cirúrgico S() N()

21-Tratamento clínico prévio:

21.1- anfotericina B S() N()

21.2- itraconazol S() N()

21.3- terbinafina S() N()

21.4- fluconazol S() N()

21.5- não realizado S() N()

22- Desfecho tto prévio:

22.1- cura S() N()

22.2- abandono S() N()

22.3- transferência S() N()

22.4- interrupção por ef.adverso S() N()

22.5- não realizado S() N()

23- Tto clínico: datar

23.1- itraconazol 200mg S() N()

23.2- itraconazol 400mg S() N()

23.3- itraconazol 200mg +fluconazol 200mg

S() N()

23.4- itraconazol 400mg +fluconazol 200mg
S() N()

24- Tto cirúrgico:

24.1- crioterapia S() N()

23.2- exérese S() N()

25- Desfecho:

25.1- cura S() N()

25.2- abandono S() N()

25.3- transferência S() N()

25.4- interrupção por ef.adverso S() N()

25.5- morte S() N()

26-Efeitos Adversos:

26.1- aumento de transaminases S() N()

26.2- náuseas S() N()

27- Controle de cura:

27.1- elem.muriformes ao direto S() N() não realizado ()

27.2- elem.muriformes ao histopatológico S()

N() não realizado ()

27.3- cultura do material F. pedrosoi()

C. carrionii() negativa() não identificada() não realizada()

27.4- fibrose no histopatológico S() N() não realizado()