

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**RESPOSTAS POLARES À INFECÇÃO PELA CROMOBLASTOMICOSE
ANTES E APÓS AS TERAPIAS**

TESE DE DOUTORADO

RENAN MINOTTO

PORTO ALEGRE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

RESPOSTAS POLARES À INFECÇÃO PELA CROMOBLASTOMICOSE
ANTES E APÓS AS TERAPIAS

RENAN MINOTTO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Albano Edelweiss

**Tese de Doutorado com área de
concentração em Dermatologia
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, para obtenção do grau de
Doutor em Medicina.**

Tese de Doutorado

Porto Alegre

M666r Minotto, Renan

Respostas polares à infecção pela cromblastomicose antes e após as terapias / Renan Minotto ; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2009.

111 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Cromblastomicose 2. Granuloma 3. Classificação 4. Pele 5. Lesões 6. Micoses 7. Terapia I. Edelweiss, Maria Isabel Abano II. Título.

NLM: WR 300

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

DEDICATÓRIAS

Este estudo é dedicado àqueles que ainda acreditam ser importante para os pacientes o poder dos bons sentimentos, como um sincero sorriso, um afetuoso abraço, uma palavra amiga, um elogio por superar uma adversidade, a vibração por uma vitória conquistada, o alívio quando conseguimos a cura tão desejada, pois estes são valiosos alicerces para que tenhamos mais fraternidade. Por guiarem-me nesta direção, pela força, carinho, amor e companheirismo, toda a minha dedicação e o meu muito obrigado a Deus, aos meus pais Valdir e Hilda, aos meus irmãos Ricardo e Renato, e à minha namorada Rosanie.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela possibilidade de obtenção deste título.

À equipe do Centro de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte para a realização desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Albano Edelweiss, pelo aprendizado, por sua dedicada orientação e interesse científico.

A todos os membros e amigos do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, em especial Dr. Roberto Lopes Gervini, Dr. César Duílio Varejão Bernardi, Dr. Joel Schwartz, Dr. Ernani Siegmann Duvelius e Dr. Gerson Vetoratto, pelos ensinamentos, confiança, respeito e consideração.

Ao Dr. Mauro Soilbelman e à Dr^a. Taís Moreira pela assessoria em Bioestatística e Epidemiologia.

À Prof^a. Marybel Rivero, pela revisão da versão em língua inglesa.

Ao Prof. Dr. Clóvis Bopp, *in memoriam*, pelos estudos sobre esta doença.

Aos pacientes, sem os quais este trabalho não seria possível.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AnfB – Anfotericina B
CBM – Cromoblastomicose
CHSCPA – Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre
CM – Cromomicose
5 – FC – 5-fluorocitosina
5 – FU – 5 fluorouracil
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
GMMO – Granuloma Micótico Misto Organizado
HE – Hematoxilina-Eosina
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – 4 – interleucina 4
MIC – Concentração Inibitória Mínima
 μm – micrômetro
PAS – Ácido Periódico de Shiff
PCR – reação em cadeia da polimerase
rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal
Th1 – Linfócito T-auxiliar 1
Th2 – Linfócito T-auxiliar 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	16
Figura 2: <i>Phialophora verrucosa</i>	16
Figura 3: <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17
Figura 4: <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17
Figura 5: <i>Cladophialophora carrionii</i>	17
Figura 6: <i>Cladophialophora carrionii</i>	17
Figura 7: <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17
Figura 8: Mapa fisiográfico do RS.....	21
Figura 9: Raro caso de CBM com lesões planas faciais disseminadas.....	24
Figura 10: Caso incomum de CBM com lesões elevadas e disseminadas no membro inferior e carcinoma associado (seta).....	25
Figura 11: Caso raro de CBM com lesões elevadas disseminadas recrudescente após várias terapias.....	25
Figura 12: Exemplo de lesão plana (seta).....	25
Figura 13: Exemplos de Lesões elevadas (setas).....	25
Figura 14: Extensa lesão plana (limitada pelas setas).....	26
Figura 15: Detalhe de lesão plana (seta).....	26
Figura 16: Granuloma micótico misto organizado polar com alta intensidade dos elementos celulares (setas) e fungos (seta azul), em biópsia de lesão elevada. HE 20x.....	33
Figura 17: Granuloma micótico misto organizado polar com baixa intensidade dos elementos celulares e fungos (seta), em biópsia de lesão plana. HE 40x.....	34
Figura 18: Imagem de GMMO polar de baixa intensidade em biópsia lesão plana. HE 40x....	34
Figura 19: Imagem de gigantócito contendo célula fúngica deteriorada em GMMO polar de baixa intensidade em biópsia de lesão plana. HE 100x no original.....	34
Figura 20: Imagem de GMMO polar de alta intensidade em biópsia de lesão elevada mostrando eosinófilos, plasmócitos, linfócitos, macrófagos, células gigantes, neutrófilos e corpos escleróticos. HE 40x no original.....	34
Figura 21: Imagem de GMMO polar de alta intensidade em biópsia de lesão elevada mostrando infiltrado linfo-plasmocitário, com macrófagos, presente na periferia dos granulomas. HE 40x no original.....	35
Figura 22: GMMO polar de baixa intensidade em biópsia de lesão plana. HE 20x no aumento original.....	35
Figura 23: GMMO polar de alta intensidade em biópsia de lesão elevada com áreas de fibrose e vasculite. HE 10x.....	35
Figura 24: Esquema de reação granulomatosa tipo 1 e tipo 2.....	36

RESUMO

Este estudo avaliou pacientes portadores de cromoblastomicose, sendo feita uma categorização clínica em dois grupos, de acordo com a forma clínica da lesão dermatológica: o primeiro composto por indivíduos com lesões elevadas e o segundo formado por casos com lesões planas, com biópsias realizadas antes e depois dos tratamentos. Através de critérios semiquantitativos, os elementos anatomopatológicos foram analisados, constatando-se a presença do padrão granulomatoso chamado granuloma micótico misto organizado, com baixa intensidade em lesões planas e alta em elevadas.

Evidenciou-se que pacientes com lesões planas evoluíram bem clinicamente, com exames micológicos negativos e sem recidivas (bons respondedores), porém aqueles com lesões elevadas apresentaram evolução clínica desfavorável, com exames micológicos positivos e doença recidivante ou recalcitrante, apesar dos tratamentos recebidos (maus respondedores). E, entre os componentes histopatológicos reacionais à invasão fúngica, verificou-se associação significativa para fibrose, podendo levar a um pior prognóstico.

Estes achados clínicos e histopatológicos conferem a esta patologia uma idéia de polaridade, à guisa dos fenômenos das formas polares da hanseníase, da fagocitose, e dos agentes de baixa virulência. Os autores propõem uma classificação morfológica dos granulomas da CBM em dois tipos polares: granuloma micótico misto organizado (GMMO) polar com alta intensidade dos elementos celulares (que corresponderia ao polar não tuberculóide) e GMMO polar com baixa intensidade (que corresponderia ao polar tuberculóide).

Palavras-chave: cromoblastomicose, granulomas polares, formas clínicas, patologia da cromoblastomicose, efeitos/tratamentos.

ABSTRACT

Patients with chromoblastomycosis were studied and dichotomized into two groups according to the clinical lesions: flat and elevated ones which were biopsied before and after treatments. Histopathological structures underwent through semiquantitatively analysis evidencing the mixed organized mycotic granuloma with low intensity of histopathological elements in flat lesions and high in elevated ones.

Flat lesions have improved clinically with negative micological studies (good responders) while elevated lesions' patients did not (bad responders). It was found significant association between evidence of fungus and fibrosis with a poor prognosis.

Clinical and histopathological findings suggest a polarity concept to this disease based on the phenomenal polar forms of hanseniasis, fagocytosis and the low virulence agents. The authors proposed a morphological classification of the chromoblastomycosis' granulomas into two polar types: polar mixed organized mycotic granuloma (MOMG) with high intensity of the cellular elements (like the polar non tuberculoid type) and the polar MOMG with low intensity (like the polar tuberculoid type).

Key-words: chromoblastomycosis, polar granulomas, clinical forms, pathology of chromoblastomycosis, effects/treatments.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIAS	IV
AGRADECIMENTOS	V
ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	11
2. BUSCA DE INFORMAÇÕES	13
3. REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1. Aspectos Conceituais.....	14
3.2. Agentes Etiológicos.....	15
3.3. Aspectos Epidemiológicos.....	17
3.4. Modos de Aquisição da Moléstia.....	21
3.5. Respostas Cutâneas (Lesões Macroscópicas) à Infecção pela CBM.....	22
3.6. Diagnóstico da Doença.....	26
3.7. Respostas Histopatológicas (Lesões Microscópicas) à Infecção pela CBM....	28
3.8. Diagnósticos Diferenciais.....	40
3.9. Terapêuticas.....	41
3.10. Prognóstico.....	45
4. OBJETIVOS	48
5. REFERÊNCIAS	49
6. ARTIGOS	63
6.1. Artigo 1. Versão em inglês.....	63
6.2. Artigo 2. Versão em inglês.....	83
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	109

1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, de caráter crônico, presente em diversas regiões do mundo. São raros estudos que abordem tratar-se de uma doença polar, com dois padrões de lesões dermatológicas (planas e elevadas), cada qual com distintas expressividades do granuloma micótico misto organizado (presente na doença), e dos elementos extracelulares, e que finalmente mostrem as respostas macro e microscópicas à invasão fúngica e as correlacionem antes e após os tratamentos.

Entre os agentes causadores desta doença, os mais citados são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladisporium carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa*, os quais se encontram com mais frequência no solo, em vegetais, espinhos de plantas, vegetação em decomposição e em madeiras putrefatas, sob forma saprofítica. A contaminação ocorre, em geral, por inoculação direta do agente, apesar de existirem alguns estudos sugerindo a inalação e localização pulmonar primária com posterior disseminação da doença. É comum no ambiente agrícola, acometendo trabalhadores rurais, porém não se restringe a este âmbito, pois tem distribuição cosmopolita estando presente em regiões mais urbanizadas.

Ao exame dermatológico, as lesões apresentam formas elevadas (verrucosas, vegetantes, nodulares, papulosas) ou planas (eritematosas, descamativas, atróficas, escamosas), únicas ou múltiplas, localizadas ou disseminadas, e os pacientes possuem predominantemente ou uma ou outra forma. Pode ocorrer disseminação linfática e hematogênica com comprometimento de órgãos internos ou grande expansão pela superfície tegumentar. Carcinomas eventualmente desenvolvem-se em lesões cromoblastomicóticas, além de outras doenças fúngicas e bacterianas coinfetando estes pacientes. A cromoblastomicose costuma apresentar uma evolução insidiosa, podendo haver reativação após aparente melhora clínica, tendendo à cronicidade, independente dos tratamentos realizados, principalmente em lesões elevadas. Outras complicações são

linfedema crônico, evolução para elefantíase, associados a quadros de isolamento social, péssima qualidade de vida e incapacidade para o trabalho.

O exame histopatológico revela que os organismos causadores da doença são encontrados dentro de células ou livres nos tecidos, como esporos marrom-escuros, de paredes espessadas, de estrutura complexa, variando de 5 a 15 μm , e a presença de uma reação inflamatória granulomatosa, com um padrão ainda pouco esclarecido, associada a outros elementos morfológicos a investigar, por exemplo, fibrose dérmica extensa e progressiva associada com persistente estímulo antigênico das estruturas fúngicas.

Baseados em idéias e conceitos morfológicos sobre a classificação da inflamação granulomatosa em granulomas polares, associando-se com os graus de diferenciação e comportamento da expressividade dos elementos micro e macroscópicos em lesões de CBM, os autores entenderam que é possível aplicá-los nesta entidade, agregando-se os conceitos de baixa virulência dos seus agentes causadores e dos mecanismos de fagocitose variáveis.

Com o intuito de contribuir para o entendimento desta doença, desenvolveu-se esta pesquisa, aprofundando-se alguns aspectos até então pouco esclarecidos, tais como estabelecer uma padronização e dicotimização entre os diferentes tipos macroscópicos de lesões dermatológicas, e seus respectivos elementos microscópicos, em resposta a esta infecção e suas associações antes e após os tratamentos.

2. BUSCA DE INFORMAÇÕES

A revisão bibliográfica foi realizada nas bases de dados da *web* PUBMED - MEDLINE – COCHRANE - BVS - LILACS, bem como livros-texto, dissertações, teses e artigos contidos em suas referências.

Usando o termo “chromoblastomycosis”, foram encontrados 733 artigos na internet. Restringindo para “clinical of chromoblastomycosis”, achados 126 trabalhos e, para “clinical forms of chromoblastomycosis”, 5 artigos. Com “histopathology of different cutaneous lesions of chromoblastomycosis”, “histopathology of diferent dermatological forms of chromoblastomycosis” ou “histopathology of clinical dermatological forms of chromoblastomycosis”, encontrado 1 artigo. Para “polar granulomas in chromoblastomycosis”, nenhum artigo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos Conceituais:

Afecções por fungos demáceos tiveram várias classificações desde a sua descoberta, sendo ainda muito polêmica sua taxonomia (1-18). No passado, argumentava-se contra o nome cromblastomicose (CBM), pela tese de que o fungo causador da doença reproduzia-se por septação, ao contrário da blastomicose, onde seria por brotamento (11), entretanto replicava-se que, por ser produzida por fungos que mantêm formas arredondas na vida parasitária, adequava-se com o conceito das blastomicoses (18). Porém, defendia-se que, em pacientes com uma resposta imune alterada, a doença poderia produzir um quadro sistêmico grave, com metástases viscerais, sendo usada, então, a denominação cromomicose (CM) (12). Por outro lado, CM seria menos apropriado para especificar a doença cutânea clássica, uma vez que incluiria uma variedade de afecções por agentes etiológicos demáceos (como a feohifomicose), sendo mais adequada a denominação cromblastomicose (16). McGinnis (15) defende o termo cromblastomicose e rejeita cromomicose. Neste estudo, acompanhando o raciocínio de diversos autores (10,13,15,16,18), usa-se o nome cromblastomicose.

Classicamente, a ocorrência da CBM é relatada em áreas tropicais, afetando, principalmente, homens e trabalhadores rurais, nos membros inferiores. É uma afecção pertencente ao grupo das micoses subcutâneas, com histórico de longa evolução, tendo como agentes causadores fungos demáceos que vivem como saprófitas no solo ou materiais orgânicos na natureza, e no reino vegetal (19-22). A lesão inicial ocorre no local de inoculação, o qual ocorre freqüentemente por implantação traumática, raramente com invasão sistêmica (23-25). Um dos exemplos utilizados seria o de pessoas que manipulam madeiras, como os carpinteiros, conforme descrito no caso de um profissional, que após 1 ano, apresentava uma lesão eritematosa na mão (26). Após a implantação do fungo,

desenvolve-se uma série de alterações microscópicas na pele, que irão caracterizar a formação de lesões cutâneas visíveis (18-27).

Os achados em biópsias cutâneas revelam, entre outros, granulomas, fibrose, e fungos na fase leveduriforme, os quais apresentam um espessamento de sua parede celular, diferente do observado quando em meios de cultura a 25°C ou a 37°C. Em pacientes debilitados os mesmos organismos podem ter morfologia miceliana. (13,29,30).

3.2. Agentes Etiológicos:

Os fungos demáceos causadores da CBM possuem pigmentação escura, devido à presença de melanina em sua parede celular, formando colônias aveludadas de crescimento lento que variam de tons marrom e verde escuros, nos meios de cultura (3,14-17). Os gêneros e espécies são distingüidos uns dos outros e identificados com bases na morfologia de seus conidióforos e modo pelos quais seus conídios unicelulares são produzidos. As espécies mais descritas são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e *Rhinoctadiella aquaspersa*, as quais são encontradas em plantas, no solo, na vegetação em decomposição e em madeiras putrefatas, sob forma saprofítica (18-21,31-34). *Fonsecaea pedrosoi* é o agente etiológico mais descrito (19,20,35-37), porém existem relatos de outras espécies, como *Fonsecaea monophora* uma nova espécie isolada de *Fonsecaea pedrosoi* (38) e *Taenolella boppii* (14).

Os fungos demáceos responsáveis pela CBM são dimórficos: a fase leveduriforme, a 37°C em cultura, é a que mais está presente em lesões cutâneas (fase parasítica). A fase de hifa desenvolve-se nos meios de cultura a 25°C (fase saprofítica). O fato de células leveduriformes serem mais freqüentemente encontradas do que hifas, provavelmente se deve à ausência de fatores necessários para a morfogênese das hifas ou um efeito inibitório

local relacionado com o micro-ambiente cutâneo incluindo os mecanismos de defesa do hospedeiro (10,13,18,39,40).

F. compacta e *F. pedrosoi* são polimórficos, isto é, eles podem formar mais do que um tipo ou arranjo de conídios em uma única cultura. A reprodução é por septação. Na observação microscópica podem apresentar três tipos de frutificação: a) *Cladosporium*: esporulação acrógena e catenulada; b) *Phialophora*: esporulação semi-endógena; c) *Rhinocladiella*: esporulação acropleurógena. *F. pedrosoi* apresenta os três tipos, sendo o do tipo *Cladosporium* o predominante (15,17,18,23).

Os mecanismos pelos quais a fase filamentosa saprofítica transforma-se para a parasítica no homem não são totalmente entendidos. Nas áreas teciduais afetadas, os fungos podem apresentar formas esféricas ou ovóides, alguns com filamentação e coloração acastanhada (15,17,18,34,35), que recebem vários sinônimos: células escleróticas, corpos escleróticos, corpos Medlar, corpos fumagóides e células muriformes, entre outros. Os corpos escleróticos são, para alguns autores, uma forma vegetativa intermediária, interrompida, entre morfologia de levedura e hifa (22,23). Aparecem como leveduras arredondadas de 5 a 15 µm de diâmetro. Filamentos de hifas são vistos mais comumente do que células escleróticas quando o organismo metastatiza para outras partes do corpo, como o cérebro (15,18,41). Mais recentemente, têm sido usados métodos de análise molecular de rDNA correlacionando com a patogenicidade, virulência e descrição de novas espécies (42).

Exemplos de agentes da CBM:



Figura 1: *Rhinocladiella aquaspersa*



Figura 2: *Phialophora verrucosa*

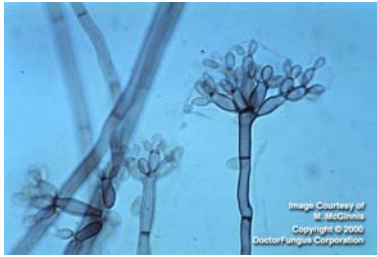


Figura 3: *Fonsecaea pedrosoi*



Figura 4: *Fonsecaea pedrosoi*

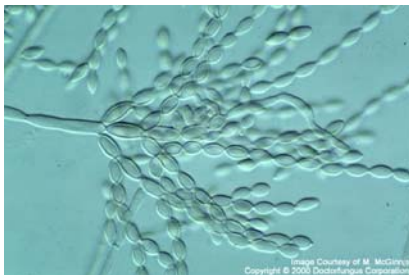


Figura 5: *Cladophialophora carrionii*



Figura 6: *Cladophialophora carrionii*



Figura 7: *Fonsecaea pedrosoi*

Fonte: www.doctorfungus.com

3.3. Aspectos Epidemiológicos:

A primeira publicação sobre esta entidade nosológica foi em 1915 (1) e, desde então, estudos tem sido realizados em diversas regiões do mundo.

É uma doença ubiqüitária, entretanto muitos casos ocorrem em regiões de clima tropical e subtropical (10,18,21,23,29,32,43,44-50). Existem estudos publicados de CBM em diversos países nos últimos anos, como mostram alguns exemplos: Sri Lanka (51), Líbia (52), Tailândia (53) e México (54,55). Casos da doença também foram publicados no Nepal e, dentre estes, houve diagnósticos iniciais de carcinoma e de psoríase (56). Em Portugal (26) foram recentemente descritos casos em carpinteiros. Na China (38,57) foi descrita há poucos meses uma nova espécie, além de novos casos da doença. No Japão (58,59) foram relatados casos associados com hanseníase e outros casos de lesões em membros superiores. Na Índia (60) e em Guadalupe (61) também foram relatados casos de acometimento de membros superiores.

Jayalakshmi e cols. (46), na Malásia, publicaram um estudo de casos de cromoblastomicose, sendo todas as lesões em membros inferiores. Na maioria dos pacientes houve uma suspeita clínica inicial de que a lesão fosse de origem maligna.

Bansal e cols. (47), na Jamaica, revisaram 31 casos. A idade média foi de 56 anos, e a proporção de homens atingidos para mulheres acometidas pela doença foi de 5:1, sendo mais freqüente nos membros inferiores. Estudo micológico havia sido efetuado em 16 casos (tendo sido encontrado *F. pedrosoi* em 14 pacientes).

Kombila e cols. (45), no Gabão, estudaram 64 casos de CBM, sendo grande parte deles provenientes de zonas rurais. Em 78,5% dos casos, houve acometimento dos membros inferiores. *F. pedrosoi* foi a única espécie encontrada.

Esterre e cols. (43), estudaram 1343 casos de cromoblastomicose vistos em Madagascar. O fungo isolado foi *F. pedrosoi* em 61,8% dos casos. Duas áreas geográficas distintas de focos da doença foram identificadas, uma ao norte, com maior precipitação de chuvas e florestas, com maior número de casos, e outra ao sul, de clima semidesértico, com vegetações diferentes. Curiosamente, apesar de *F. pedrosoi* ser o organismo mais isolado no mundo, na Austrália e na África do Sul *C. carrionii* é usualmente o principal agente responsável (50).

Diaz Almeida e cols. (49), em Cuba, estudaram 72 casos de CBM, observando uma proporção de seis homens para cada mulher afetada. Os membros inferiores foram acometidos em 60% dos casos. *Fonsecaea pedrosoi* foi evidenciado em 63% dos casos.

Pastrana Fundora e cols. (48), também em Cuba, publicaram mais casos de cromoblastomicose, e viram que a maioria dos pacientes tinha mais de 40 anos de idade, sendo que 82,9 % eram do sexo masculino e 77,2% eram provenientes de área rural. Acometimento de membros inferiores ocorreu em 60% dos casos.

Na Colômbia e Equador, 75% ou mais dos casos envolveram *F. pedrosoi*, o restante sendo causado por *P. Verrucosa* (32,62).

Na Argentina também são descritos casos da moléstia (21). Na Venezuela existem vários relatos e, recentemente, foram descritos pacientes com lesões planas em membros superiores (44,63).

No Brasil, a primeira publicação data de 1922 (2). A doença está presente em diversos estados, sendo a maioria dos casos por *F. pedrosoi* (10,19,20,31,64-72).

Mello e Silva (66), no estado do Maranhão, estudando casos de cromoblastomicose, encontraram alta prevalência nos pacientes do sexo masculino, entre 50 e 60 anos de idade, a maioria de trabalhadores rurais, sendo que 84,6% apresentavam lesões em membros inferiores. *F. pedrosoi* foi o agente mais isolado.

Silva e cols. (68), relataram 30 casos de cromoblastomicose, também no Maranhão, sendo que em dois casos havia associação com Hanseníase.

Talhari e cols. (65), na região amazônica, estudaram casos de CBM. As condições climáticas encontradas, incluíam a presença de floresta tropical, alta precipitação de chuvas e temperatura média anual de 26°C.

Também na região amazônica brasileira, Silva JP e cols. (67) revelaram 325 casos da doença. A idade dos pacientes variou de 41 a 70 anos, e 86,1% eram trabalhadores rurais, sendo 93,2% homens e 80,7% mostravam lesões nos membros inferiores. Em São

Paulo, mais estudos sobre a moléstia também foram publicados (73). Há poucos meses, no Pará, novos relatos feitos sobre forma plana da doença (74).

No Rio Grande do Sul (RS), os primeiros relatos de CBM na literatura datam de 1938 feitos por Pereira e cols. (4), em pacientes originários de zonas rurais, com história crônica de ferimentos nos membros inferiores. Sucessivamente, houve o relato de mais casos da doença por Pereira filho (8) e Neves da Silva e cols. (9). Bopp (10), em um referencial estudo, ressaltou vários aspectos desta moléstia no Rio Grande do Sul, havendo predomínio geográfico na metade norte do estado. Bopp e Bernardi (69) estudaram, no RS, novos casos da doença verificando predominância de zonas rurais, acometendo trabalhadores do campo. Os autores verificaram que o clima e elementos do solo, os quais variam de acordo com as regiões do Rio Grande do Sul, são significativos no que concerne à sobrevivência dos referidos fungos. Neste estudo, constataram sua ocorrência habitualmente junto aos vales dos cursos de água do triângulo norte do estado, onde se combinavam os índices favoráveis de umidade e calor com a grande fertilidade dos solos.

Londero e Ramos (64,70) relataram seus estudos sobre casos de cromoblastomicose vistos no interior do Rio Grande do Sul. Lesões foram encontradas na face e em membros superiores. Havia uma maior proporção de homens afetados. O agente isolado foi *F. pedrosoi*. Matte e cols. (71), publicaram novos casos de cromoblastomicose diagnosticados no interior do Rio Grande do Sul.

Minotto e cols. (19,20) ressaltaram os aspectos clínicos e evolutivos em vários casos de CBM no Rio Grande do Sul, verificando que *F. Pedrosoi* era o agente causador em 96% dos pacientes. Foram constatadas localizações atípicas das lesões e associações com outras doenças nos mesmos sítios de CBM.

Novos casos sobre esta patologia têm sido divulgados a cada ano no RS (19).

Distribuição de uma população de portadores de CBM de acordo com as regiões fisiográficas no estado do RS:

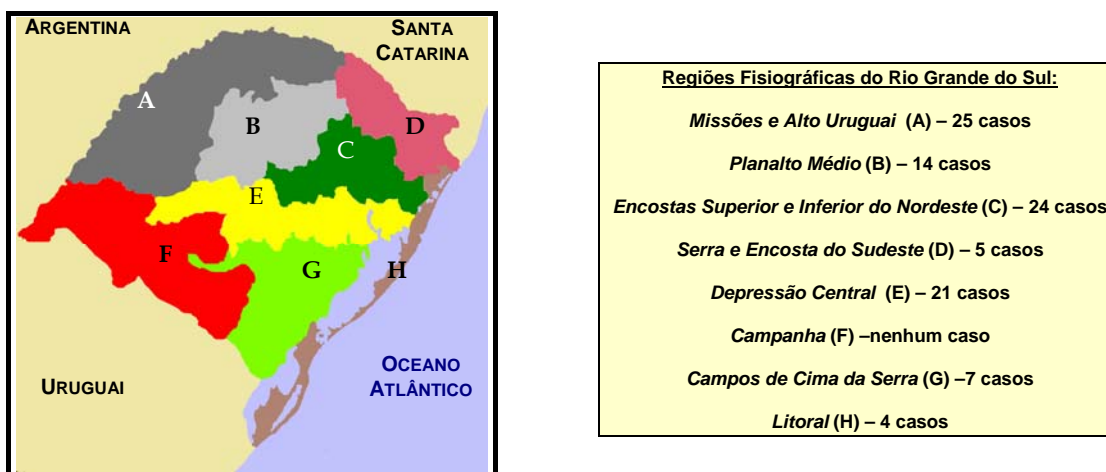


Figura 8: Mapa fisiográfico do RS.

Fonte: Minotto R, et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. J Am Acad Dermatol 2001; 44: 585-92.

3.4. Modos de Aquisição da Moléstia:

O contágio ocorre mais frequentemente por inoculação percutânea do fungo, através de traumatismos cutâneos produzidos por elementos onde ele esteja presente, tais como vegetais, espinhos, fragmentos de madeira, troncos, ou folhas contaminadas (19,20,26,27).

Elementos fúngicos pigmentados foram encontrados em lascas de madeira, em associação com reação inflamatória granulomatosa, contidas em biópsias de pacientes que sofreram traumatismos com gravetos de árvores, os quais continham os mesmos organismos, desenvolvendo CBM causada por *F. pedrosoi* depois do trauma (10,15,26,27,69).

Ocorre que nem sempre há o episódio de trauma, sugerindo-se que as lesões cutâneas da CBM possam surgir a partir da inalação do agente, pela descrição de foco pulmonar primário silencioso inicial, com posterior disseminação hematogênica da doença, devido à ausência de uma reação cancriforme característica. A obtenção de culturas de *F. pedrosoi* a partir do material proveniente de lavado brônquico de pacientes portadores de lesões cutâneas de CBM comprova essa possibilidade, principalmente em casos de localização cerebral. Este ponto de vista é suportado também por relatos ocasionais de disseminação hematogênica e pela observação de múltiplas áreas de calcificação no raio-x de tórax de pacientes com CBM (11,72,75-84).

A propagação do fungo, após sua penetração na pele, dá-se por via linfática. Pela via sangüínea, em casos graves, a doença pode propagar-se por todo o organismo. Em geral, a disseminação orgânica ocorre em casos sob uso prolongado de corticosteróides, imunossupressores ou na vigência da associação com doença grave ou doenças onde ocorra imunodepressão como a AIDS (24,77,78,80). No Japão e no Brasil relataram-se casos de pacientes com hanseníase que tiveram CBM (58,68). Recentemente foram verificados casos de CBM detectados por métodos moleculares de seqüência de rRNA, em pacientes com transplante de rins (85).

Tem sido sugerido que os organismos implantados possam permanecer quiescentes por longos períodos de tempo (18). É possível que traumas repetidos e danos teciduais ao local sejam requeridos antes dos organismos estarem capazes de iniciar o processo da doença, originando as lesões cutâneas (27).

3.5. Respostas Cutâneas (Lesões Macroscópicas) à Infecção pela CBM:

A CBM é geralmente confinada às superfícies cutâneas e, no ponto de inoculação, costuma surgir, inicialmente, uma diminuta lesão, com raro prurido ou dor (55). Vários

meses após, no local de implantação do fungo, visualizam-se as lesões dermatológicas, descritas com diferentes morfologias: nodulares, verrucosas, papulosas, hiperkeratóticas e vegetantes (19,20,37,52,54,74,79,86). Relatam-se, também, lesões eritematosas, descamativas, escamosas, eritemato-descamativas, eczematosas, psoriasiformes e atróficas (19,20,55,59,67,73,79,87). Costumam ser lesões bem circunscritas e de crescimento lento. Ao exame clínico, as lesões assumem aspectos e tamanhos variados com diferentes diâmetros, podendo serem de pequenas ou grandes dimensões, nem sempre de fácil reconhecimento, simulando outras doenças (59,86,87).

Além disso, o quadro dermatológico revela aspectos localizados ou acometendo vários segmentos topográficos, talvez por auto-inoculação ou por via linfática, surgindo novas lesões de mesmo padrão, que chegam a atingir grandes extensões (63). Às vezes tendem a ulcerar, surgindo odor desagradável em consequência da maceração dos tecidos e infecção secundária (19).

As lesões, então, podem ser planas ou elevadas e, nestes casos, chegam a ter relevâncias com mais de 3 cm acima da superfície cutânea (18). Essas vegetações, nodulosidades e verrucosidades, irregulares e pedunculadas, lembram o aspecto de couve-flor (18). A doença é usualmente confinada aos pés e pernas, mas o envolvimento das mãos, nádegas, orelhas, tórax, face, abdômen, e outras superfícies têm sido relatado, algumas vezes podendo representar disseminação linfática e/ou hematogênica (19,20).

Portanto, nos últimos anos, várias outras topografias, além dos membros inferiores, foram descritas (19,20,26,52,55,59,63,74,88-90). A face é raramente infectada, como aconteceu em uma garota de 16 anos, na Líbia, sem associação com trauma, recorrente após seis anos do primeiro tratamento (52). É também incomum a disseminação com formação de lesões cutâneas generalizadas, por contigüidade, lesões linfangíticas ou hematogênicas (19,20), e casos de abscessos cerebrais onde se isolou *F. pedrosoi* (77). CBM ocorrendo em outros sítios que não a pele são raros (18,50,77,81), exemplos: alterações nas unhas com melanoníquia estriada longitudinal (91), ósseas com sinovite e

osteomielite (92) e quadros oftalmológicos com ceratite fúngica (88), devidos à *Fonsecaea pedrosoi*.

Uma pesquisa procurou associar, em casos de CBM, os achados de histopatologia com as formas clínicas da doença, em 19 pacientes sem tratamentos, sendo observados dois tipos de reações teciduais: dos 15 que apresentavam lesões verrucosas, observou-se uma reação granulomatosa supurativa, rica em fungos, e dos 4 casos com lesões eritematosas ou atróficas, viu-se uma reação granulomatosa menos supurativa, com poucos fungos (73).

A CBM evolui lentamente, produzindo fibrose tecidual que prejudicará a circulação linfática, com aumento do volume da parte acometida e conseqüente elefantíase, com perda total ou parcial da capacidade funcional do membro atingido (10,18-20,22,44,72). Carcinomas eventualmente surgem a partir de lesões cromoblastomicóticas, mascarando o diagnóstico e complicando ainda mais o prognóstico, os quais desenvolvem-se vagarosamente, similares àqueles que surgem a partir de queimaduras, úlceras fagedênicas tropicais e úlceras hansênicas crônicas (79). Outras complicações são linfedema com evolução para elefantíase, lesões inestéticas, quadros de isolamento social levando muitas vezes ao abandono dos tratamentos, péssima qualidade de vida, incapacidade para o trabalho e cronicidade da doença (19,20,39,68,81).

Exemplos de lesões clínicas de CBM:



Figura 9: Raro caso de CBM com lesões planas faciais disseminadas.



Figura 10: Caso incomum de CBM com lesões elevadas e disseminadas no membro inferior e carcinoma associado (seta).



Figura 11: Caso raro de CBM com lesões elevadas disseminadas recrudescente após várias terapias.



Figura 12: Exemplo de lesão plana (seta).



Figura 13: Exemplos de Lesões elevadas (setas).

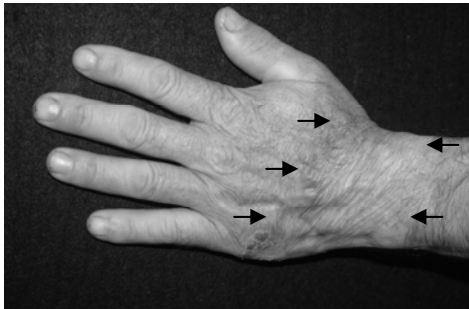


Figura 14: Extensa lesão plana (limitada pelas setas).

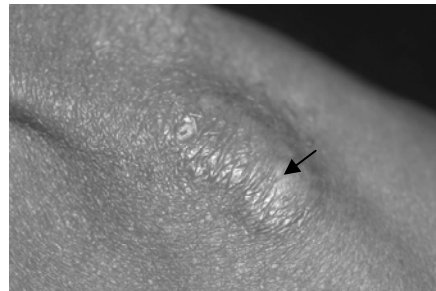


Figura 15: Detalhe de lesão plana (seta).

Fonte: Fototeca do Serviço de Dermatologia do CHSCPA.

3.6. Diagnóstico da Doença:

O diagnóstico é feito através dos aspectos clínicos e laboratoriais. O aspecto clínico das lesões cutâneas é, na maioria das vezes, sugestivo para o diagnóstico. A confirmação laboratorial é feita através de exame micológico direto e cultural e exame histopatológico (10,12,15,18,19).

Com relação ao exame micológico direto, o material das lesões é examinado entre lâmina e lamínula, previamente tratado com hidróxido de potássio, possibilitando a demonstração do fungo, observando-se células arredondadas, de contornos nítidos, acastanhadas e, por cultura, estabelece o diagnóstico do agente. Algumas dessas células apresentam septações, às vezes, em mais de um plano. O diagnóstico laboratorial pelo exame direto é relativamente fácil, mas deve sempre ser confirmado por cultura. Isto é importante na avaliação prognóstica, pois algumas espécies podem disseminar-se para o cérebro e outros órgãos. Uma vez que os agentes da CBM não são inibidos pela

cicloheximida ou cloranfenicol, meios seletivos usando estes antibióticos devem ser usados. O cultivo do material em meios apropriados possibilitará o crescimento do fungo, podendo ser necessário, no mínimo, 6 semanas para que isso ocorra. Em contraste com espécies saprofitas do solo, a maioria dos agentes, comumente isolados da CBM, cresce lentamente. As colônias são escuras e iniciam-se por pequenos pontos na superfície dos meios de cultura. O exame microscópico das colônias evidencia variações morfológicas do seu aparelho reprodutor (conidióforo), o que serve para a identificação dos diferentes agentes causadores da CBM (18,34,72,93,94).

O exame histopatológico da biópsia mostrará o fungo, o qual pode ser observado em meio a diversas estruturas morfológicas ou, mais freqüentemente, no interior de células gigantes, sob a forma de células arredondadas, com nítida membrana, acastanhada, sendo a hematoxilina-eosina, o PAS, o Gomori-Grocott e o Ziehl, modificado por Fite-Faraco, as principais colorações utilizadas para melhor visualizá-lo (93).

Parece afetar predominantemente o homem, havendo descrições de uma doença fúngica semelhante em anfíbios (15,17,18). Infecção natural em animais com os organismos que causam CBM ocorrem, mas é raramente relatada. Poucos casos têm sido encontrados em cães, gatos, cavalos e sapos, como relatado em um estudo, onde detectou-se afecção cutânea causada por *Fonsecaea pedrosoi* em um cachorro (95). Com relação à inoculação em animais para estudos diagnósticos, utiliza-se o material proveniente do doente ou suspensão salina da cultura do fungo para ser injetado, por via endovenosa, intratesticular ou intraperitoneal, em ratos, obtendo-se a formação de um granuloma, rico em parasitos, o qual é observado ao exame microscópico dos tecidos (96). Através de outros modelos experimentais realizados, ao se injetar suspensão de cultura de *F. pedrosoi* em camundongos previamente submetidos a injeções endovenosas de cortisona, verificaram-se lesões nodulares, localizadas na pele, em tecido conjuntivo, no cérebro e em outros órgãos, cujo exame micológico das lesões cutâneas revelou a presença de células muriformes

idênticas às encontradas na CBM humana, enquanto as lesões cerebrais evidenciaram somente hifas (10,15,17,18,31,69).

Com relação aos testes sorológicos, eles não são utilizados rotineiramente, pela falta de sensibilidade e de especificidade do antígeno, sendo freqüentes as reações cruzadas entre os demais fungos demáceos (72,96). Entretanto, estudos foram feitos para detecção da resposta imune celular tipo hipersensibilidade retardada a antígenos metabólicos de *F pedrosoi* (cromomicina) em testes cutâneos, sugerindo que este antígeno pode ser usado como auxiliar no diagnóstico da doença e em estudos epidemiológicos para determinação da prevalência da doença em áreas endêmicas (97,98).

Os fungos demáceos são usualmente identificados por estudos morfológicos, porém um estudo (99) desenvolveu um teste diagnóstico com reação em cadeia da polimerase (PCR) marcando o DNA ribossomal para uma identificação mais rápida e específica do gênero *Fonsecaea*, principalmente para cepas que são difíceis de identificar pelos métodos morfológicos. Então, para identificar o agente causal, pode-se usar a PCR em análise seqüencial direta, em complemento aos métodos usuais que incluem microscopia com hidróxido de potássio a 20%, confirmação histopatológica das células escleróticas, cultura em Sabouraud, método de cultura de lâmina e microscopia eletrônica (58).

3.7. Respostas Histopatológicas (Lesões Microscópicas) à Infecção pela CBM:

As doenças granulomatosas estão presentes em uma vasta literatura e, historicamente, a sarcoidose foi o paradigma que desencadeou vários destes estudos, tanto que em várias conferências e artigos são encontrados títulos como: “sarcoidose e outras doenças granulomatosas”. Todavia, é importante lembrar que patologias infecciosas são a causa mais comum de entidades nosológicas granulomatosas em todo o mundo, e que nos granulomas cutâneos causados por microorganismos, além dos elementos celulares, são

observadas uma miríade de outras estruturas, tais como proliferação vascular, vasculite, ulceração, fibrose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa (100).

De um modo geral, uma das primeiras manifestações na formação de uma resposta inflamatória granulomatosa qualquer é o agrupamento de células mononucleares, como resultado da persistência de algum produto não degradável e de hipersensibilidade ativa, medidas estas as quais tentam conter a molécula estimulatória, envolvendo-a. O processo inflamatório inicial é acompanhado pela organização do granuloma, uma estrutura altamente dinâmica e compacta feita por um grupamento central de fagócitos mononucleares e seus descendentes (células epitelióides e multinucleadas) geralmente rodeadas por um anel de linfócitos, além de outras células (50,100-106).

Um granuloma se forma, então, por uma série de etapas e eventos, sendo o resultado final de um intercâmbio complexo entre organismo invasor, antígeno, substância química, droga ou outro irritante, antigenemia prolongada, atividades de macrófagos, complexos imunes circulantes, enfim, uma vasta série de mediadores biológicos. Áreas de reatividade inflamatória ou imunológica atraem macrófagos, os quais podem se fundir para formar células gigantes multinucleadas, além de transformação celular de macrófagos em células epitelióides. O granuloma é um sítio ativo de numerosas enzimas e citocinas e, com o tempo, agregam-se fibronectina e numerosos fatores de progressão. O resultado final é o granuloma epitelióide que progride sob o impacto de fatores de crescimento transformador e derivado de plaquetas em direção à fibrose (100,101,104).

Em processos onde há inflamação crônica granulomatosa, ocorrem novos capilares formados e, ao redor, fibroblastos, histiócitos e tecido conjuntivo fibroso. Sempre associados estão os tipos usuais de células inflamatórias, isto é, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, entre outros (100,101,103,104).

O infiltrado celular de todas as dermatoses inflamatórias simples consiste, predominantemente, de células que chegam à pele da corrente sangüínea ou de seus modificadores: leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, linfócitos e

plasmócitos. Esses podem desaparecer sem deixar traços, por morte celular, absorção ou por migração para outras partes, tais como linfonodos. Histiócitos presentes no tecido podem ser estimulados a tornarem-se macrófagos ativados e podem permanecer como evidência de inflamação passada (100-103).

Uma vez reconhecido o quadro histológico em uma biópsia como sendo de inflamação crônica granulomatosa é conveniente colocá-lo em uma de duas amplas classes. Uma delas compreende processos que consistem quase exclusivamente de linfócitos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas. Neste grupo estão a sífilis, tuberculose, hanseníase, sarcoidose, leishmaniose, histoplasmose e alguns granulomas de corpo estranho. A outra classe é caracterizada por um infiltrado misto no qual leucócitos, neutrófilos e eosinófilos são acrescentados aos linfócitos e elementos histiocíticos. Neste grupo estão a maioria das infecções fúngicas profundas (100-106).

Resgatando o conceito e classificação da inflamação granulomatosa, encontramos relatado em várias doenças infecciosas, principalmente e inicialmente na hanseníase, uma visão interessante sobre as formas de granulomas: o de granulomas polares. Neste estudo (107), também se revela que existe uma confusão sobre definições de tipos de granulomas em várias doenças granulomatosas, e que estas diferenças e nuances entre os granulomas não tem sido muito detalhadas pela maioria dos patologistas. Então, baseando-se em estudos sobre a inflamação granulomatosa na hanseníase, foi proposta uma classificação morfológica dos granulomas em tipos polares: tuberculóide e não tuberculóide, correspondendo a dois extremos da lesão. O tipo polar tuberculóide acompanha a lei de Jadassohn-Lewandowsky, seu agente etiológico é ausente ou escasso (fagocitose completa). O tipo polar não tuberculóide não acompanha a lei de Jadassohn-Lewandowsky, seu agente etiológico é sempre presente ou abundante (fagocitose incompleta). Parece que esta proposta de definição dos granulomas combina morfologia com atividade funcional de macrófagos, facilmente observados em exames histopatológicos de rotina com microscópio

óptico. E a natureza do agente etiológico e sua virulência e resposta Th1/Th2 também devem ser avaliadas (107).

Baseados nestes conceitos de morfologia e de classificação, em um outro estudo (108), sobre granulomas polares e hanseníase, concluiu-se que o comportamento “benigno” ou “maligno” da hanseníase depende dos graus de diferenciação tuberculóide das lesões. Se a lesão é histologicamente bem diferenciada em direção a um granuloma tuberculóide polar (hanseníase tuberculóide), ela terá um comportamento “benigno”. Ao contrário, se esta diferenciação é ausente (hanseníase virchowiana) ou pobre (hanseníase borderline interpolar) o comportamento da lesão será “maligno”.

Em um estudo sobre esquistossomose (109), uma doença com reação fibrosante e granulomatosa, a forma severa da doença com lesões mais intensas foi associada com citocinas pró-inflamatórias tipo Th2 persistentemente elevadas, enquanto formas mais leves da patologia estavam presentes quando as citocinas Th1 dominavam. A definição de perfis imunes distintos associados com formas polares de esquistossomose abre oportunidades para estudos comparativos com indivíduos que sofram de outras doenças granulomatosas severas.

O padrão Th1/Th2 é importante na determinação do tipo de resposta granulomatosa e na regulação do processo de formação de fibrose no local. Observa-se, em lesões granulomatosas, hiperplasia de fibroblastos, havendo uma ligação com padrão Th2 com liberação de IL-4, a citocina que é um fator quimiotático para fibroblastos, capaz de estimular a produção de proteínas de matriz extracelular (100).

Tendo como foco os elementos anatomopatológicos existentes em lesões de CBM, têm-se descrito, ao longo dos anos, a presença de abscessos miliares, abscessos neutrofílicos intraepidérmicos, dérmicos e nódulos granulomatosos, pobremente definidos com feixes de numerosos neutrófilos nos centros dos granulomas (5-7,10,13,18,50,110). A literatura ora relata predominância de granuloma supurativo, ora de histiocitário e, por outro lado, também cita que os granulomas são na maioria do tipo tuberculóide. Encontram-se

afirmações de que existem formas histológicas distintas, com diferentes predominâncias (supurativas, tuberculóides e histiocitárias), porém há contestações a este respeito e, ainda, relatos de que estas formas podem coexistir em um mesmo paciente (5-7,10,22,50). A epiderme mostra hiperqueratose, paraqueratose, hiperplasia pseudo-epiteliomatosa e acantose irregular. O derma contém um infiltrado inflamatório granulomatoso denso, composto predominantemente de células mononucleares (histiócitos, linfócitos, plasmócitos), células epitelioides, células gigantes e polimorfonucleares (22,33,62,101,111).

Lê-se, também, que as aparências histológicas da CBM são similares às da esporotricose, com hiperqueratose, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e granulomas na derme superior e média, e que os granulomas na CBM são na maioria do tipo tuberculóide, embora poucos granulomas supurativos estejam presentes, além de microabscessos intraepidérmicos freqüentemente presentes, mas não tão numerosos quanto na esporotricose (50).

Na CBM, a estrutura formativa do arranjo granulomatoso deve ser estudada com maior profundidade, através de uma análise histopatológica mais minuciosamente detalhada (100,102,110,112-114). Apenas um trabalho, de 16 biópsias, sem tratamentos, observou que, na CBM, neutrófilos, macrófagos e infiltrado linfoplasmocitário organizavam-se concentricamente ao redor do fungo e iniciavam a formação de um granuloma micótico misto organizado, um granuloma modificado pela presença de neutrófilos polimorfonucleares. Os grupos de neutrófilos predominavam nos centros dos granulomas. Células gigantes de corpo estranho estavam presentes, bem como linfócitos, plasmócitos, e outras células da reação inflamatória crônica. O aspecto histológico seria aquele de um granuloma de corpo estranho entremeado com microabscessos. Outros achados foram fibrose dérmica extensa, associada ao persistente estímulo antigênico fúngico, em pacientes que apresentam CBM com longos anos de evolução, além de uma reação granulomatosa crônica, e um extenso infiltrado dérmico, associado a uma hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme (23).

Na CBM, a inabilidade do tecido fibrótico de ser remodelado parece estar correlacionado com a natureza e organização dos componentes da matriz, porém os fatores que disparam os eventos fibrogênicos iniciais permanecem ainda a serem caracterizados (104,110,115,116). Pesquisadores analisaram 11 casos de CBM, sem históricos de tratamentos, e evidenciaram que a dificuldade no tratamento poderia estar relacionada à extensa fibrose dérmica, com persistência dos fungos *in situ*, viáveis, e numerosos mastócitos (110,117).

Em um outro estudo, através de uma análise microscópica semiquantitativa, foi associado, os achados de histopatologia e imunohistoquímica com as formas clínicas de CBM em 19 pacientes sem tratamentos. Os resultados mostraram 15 indivíduos com lesões verrucosas, os quais apresentavam reação granulomatosa com granuloma supurativo, com muitos fungos e com uma resposta imunológica tipo Th2, e 4 casos com lesões atróficas e eritematosas, que apresentaram uma reação granulomatosa com granuloma menos supurativo, lembrando tuberculóide, com poucos fungos e com uma resposta tipo Th1 (73).

Exemplos de lesões histopatológicas de CBM:

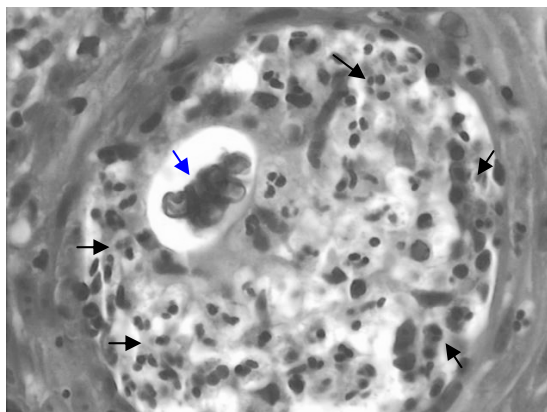


Figura 16: Granuloma micótico misto organizado polar com alta intensidade dos elementos celulares (setas) e fungos (seta azul), em biópsia de lesão elevada. HE 20x.

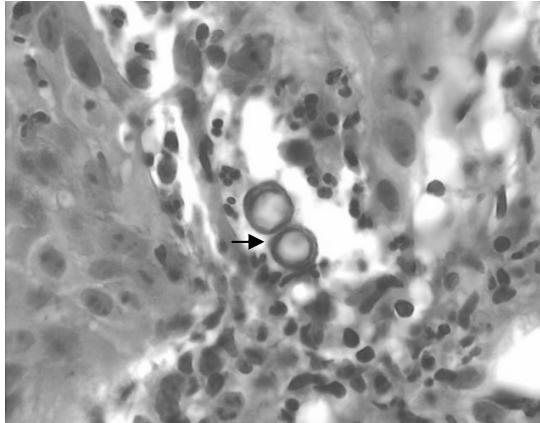


Figura 17: Granuloma micótico misto organizado polar com baixa intensidade dos elementos celulares e fungos (seta), em biópsia de lesão plana. HE 40x.

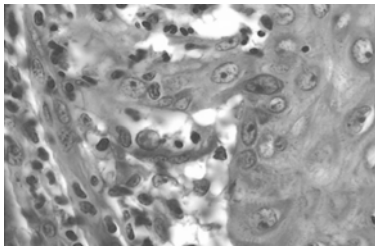


Figura 18: Imagem de GMMO polar de baixa intensidade em biópsia lesão plana. HE 40x.

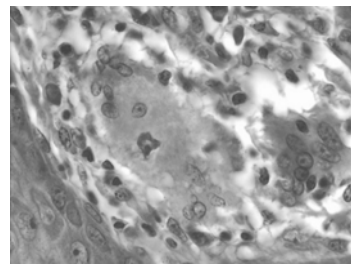


Figura 19: Imagem de gigantócito contendo célula fúngica deteriorada em GMMO polar de baixa intensidade em biópsia de lesão plana. HE 100x no original.

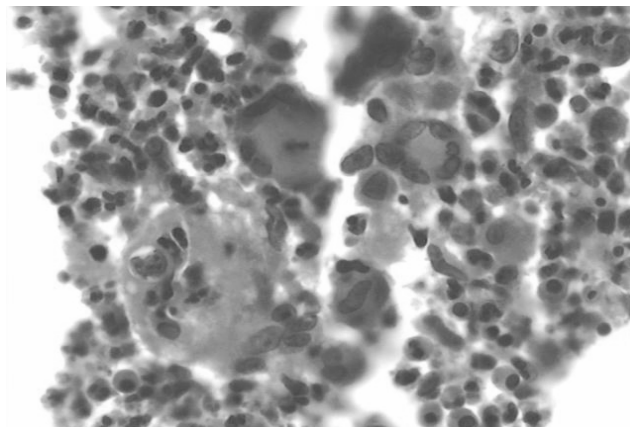


Figura 20: Imagem de GMMO polar de alta intensidade em biópsia de lesão elevada mostrando eosinófilos, plasmócitos, linfócitos, macrófagos, células gigantes, neutrófilos e corpos escleróticos. HE 40x no original.

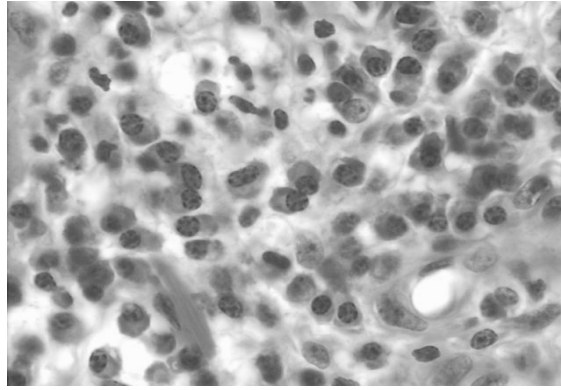


Figura 21: Imagem de GMMO polar de alta intensidade em biópsia de lesão elevada mostrando infiltrado linfo-plasmocitário, com macrófagos, presente na periferia dos granulomas. HE 40x no original.

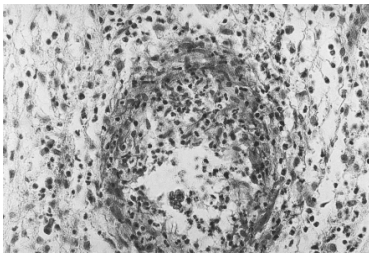


Figura 22: GMMO polar de baixa intensidade em biópsia de lesão plana. HE 20x no aumento original.



Figura 23: GMMO polar de alta intensidade em biópsia de lesão elevada com áreas de fibrose e vasculite. HE 10x.

Fonte: Fototeca do Serviço de Dermatologia do CHSCPA.

Todos os granulomas podem ser considerados como estruturas dinâmicas, compostos de múltiplos tipos de células e compartilhando, em comum, a presença de um acúmulo central de células mononucleares circundadas por células T ativadas e liberadoras de uma quantidade de citocinas. Dependendo do antígeno envolvido na formação do granuloma, a resposta inflamatória granulomatosa é associada a um padrão de produção de citocinas predominantemente tipo Th1 ou Th2, explicando os aspectos histopatológicos específicos nos granulomas resultantes (100).

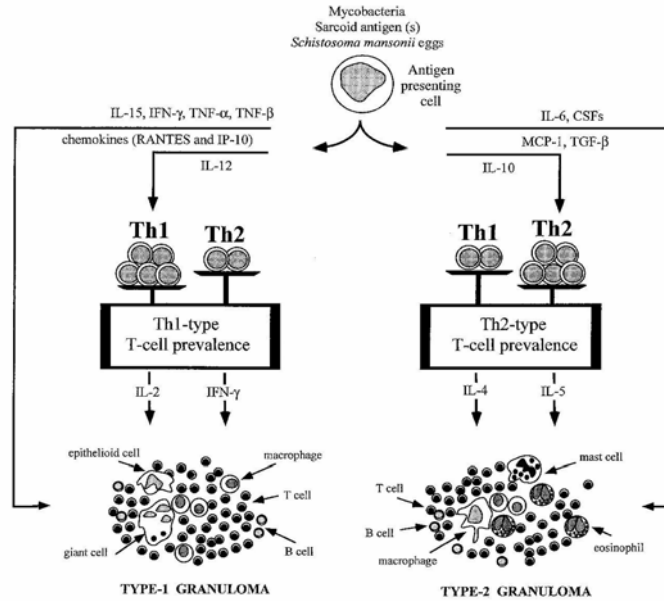


Figura 24: Esquema de reação granulomatosa tipo 1 e tipo 2.

Fonte: James & Zumla. *The Granulomatous Diseases*. Cambridge University Press, 2003.

Com relação aos aspectos dos agentes causadores da CBM nas biópsias, observa-se uma única ou múltiplas estruturas leveduriformes, dourado-amarronzadas, amarronzadas, ou marrom-escuras, de paredes espessadas, freqüentemente septadas ou multisseptadas, arredondadas, chamadas células escleróticas, podendo estarem localizadas dentro de células gigantes, livres nos tecidos ou em microabscessos (28,76,93,114). Os diâmetros das células fúngicas variam de 5 a 15 μm (13,118,119). As formas infectivas são, usualmente, células conídias e pequenos fragmentos de hifas. *In vivo*, lesões iniciantes apresentam uma mistura de células escleróticas e hifas enquanto lesões antigas apresentam células escleróticas como tipo morfológico predominante. Corpos escleróticos costumam ser encontrados em lesões de CBM diagnosticadas inicialmente como um carcinoma epidermóide ou outro tumor e, em cortes histológicos, a lesão não-ulcerada que não é infectada secundariamente, mostra uma hiperplasia pseudoepiteliomatosa de grau muito alto ou acantose extrema, podendo simular outras patologias. (18,39,117-119).

A observação de formas parasíticas de *F pedrosoi* em lesões cutâneas humanas demonstrou que na camada hiperkeratótica superficial da pele formava um arranjo composto por hifas septadas ramificadas e células escleróticas. Foi observado que estes elementos participavam de uma estrutura chamada tubo germinativo. Constatou-se, então, que a epiderme seria capaz de eliminar alguns dos organismos das lesões cutâneas, com o epitélio desempenhando um importante papel na chamada eliminação transepitelial do fungo. A acantose extrema, a hiperplasia pseudoepiteliomatosa, existente na CBM, parece ser uma resposta celular aos fungos contidos em microabscessos (23,28).

Ao se examinarem cortes histológicos de lesões de cromoblastomicose, observaram o fenômeno da eliminação transepitelial, que consiste na expulsão, através da epiderme, de tecido degenerado ou de qualquer outro material depositado na intimidade da derme e considerado estranho ao organismo. As estruturas fúngicas aparecem rodeadas por proliferações epidérmicas, migrando para cima, dentro de microabscessos intraepidérmicos, e expelidas para a superfície da pele. A presença de material estranho na derme pode provocar reações teciduais variáveis e distintas, incluindo necrose e formação granulomatosa. Tais materiais, se presentes na derme superficial, podem eventualmente ser removidos através de ulceração e destruição da epiderme que o recobre (23,28,117).

Doenças em que ocorre eliminação transepitelial de elementos de lesões não cromoblastomicticas, incluem calcinosis cutis, osteoma perforans, granuloma anular, elastose perfurante serpiginosa, colagenose perfurante reativa, foliculite perfurante e necrobiose lipídica diabetorum. Os mecanismos precisos e fatores responsáveis pela indução da eliminação transepitelial não são totalmente conhecidos. Parecem estar intimamente relacionados ao processo de hiperplasia pseudoepiteliomatosa, cujo estímulo para seu surgimento também não é bem esclarecido.(28,117-119)

Estudos sobre fungos sugerem que vários fatores determinam sua patogenicidade, entre estes citam-se melanina, estruturas lipídicas e polissacarídeos de parede celular (25,112-114). Na CBM, pouco é conhecido a cerca desses componentes em seus agentes,

o que talvez elucidasse, por exemplo, relatos de que macrófagos não teriam nenhuma atividade fungicida ou fungistática contra *F. pedrosoi*, e que horas após o início da interação, os macrófagos seriam completamente destruídos pelos fungos (23,75,113,117,120). Em estudos sobre a reação tecidual e as mudanças morfológicas dos fungos na CBM, viu-se que a maioria dos elementos fúngicos aparecia com a parede celular mostrando uma aparência irregular aparentando ser continuamente atacada por neutrófilos polimorfonucleares (119). Todas as mudanças morfológicas da derme e epiderme seriam referentes a reações de defesa contra o fungo existente nas lesões cutâneas (112-114).

Do ponto de vista imunológico, a reação de hipersensibilidade tardia é mais associada com infecção fúngica do que a imediata, conforme relatos de testes cutâneos para diagnóstico imunológico de micoses (98). Hipersensibilidade tardia tem sido demonstrada em pacientes com CBM, a qual diminui depois da cura clínica. Como freqüentemente ocorre reativação da doença após esta aparente cura, talvez exista alguma relação da diminuição deste tipo de hipersensibilidade com a recorrência da infecção (35,40).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro na CBM não foram ainda de todo investigados. Tem sido sugerido que a imunidade mediada por células em pacientes com CBM de longa duração apresenta falhas. Como resultado, estes indivíduos tornam-se incapazes de desenvolver uma reação imune eficiente. Sugere-se que existam mecanismos que controlam a resposta de células T e influenciam seu papel no desenvolvimento da CBM (87,89,121-123).

Alguns estudos têm se focado na interação entre hospedeiro e fungo, mostrando uma resposta predominantemente imune celular, com ativação de macrófagos envolvidos na fagocitose do fungo (86,87,89). Existe o mecanismo de fagocitose, entretanto a morte de células fúngicas foi raramente observada (97). A habilidade de *Fonsecaea pedrosoi* em produzir componentes semelhantes à melanina, secretados ou associados à parede celular

fúngica, protege-o contra a destruição pelas células imunológicas do hospedeiro (114,121-125).

Até o momento, a resposta imune mediada por células T na CBM é indefinida. Em pacientes com formas mais severas da doença, há uma proliferação ineficiente de células T e, ao contrário, em pacientes com formas mais leves da doença, foi observada uma proliferação eficiente de células T (121). Outros estudos apontam que monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas de CBM apresentam perfis funcionais e fenotípicos distintos, pois *F pedrosoi* induziria diferenciação no papel dos monócitos de pacientes com formas leves e graves de CBM (87,89).

Com o propósito de estudar a imunidade natural nesta doença, foi realizada uma avaliação de amostras seqüenciais de sangue obtidas antes, durante e ao final dos tratamentos. Os pacientes com formas mais severas da doença, com múltiplas lesões, apresentaram altos títulos de imunoglobulinas específicas, comparados com pacientes com lesões localizadas. Altos níveis de IgM foram detectados, podendo ser uma consequência de constante estímulo antigênico pelo continuado e lento processo de persistência fúngica, enquanto a imunoglobulina A representou um potencial marcador de *status* imune. Os níveis séricos de IgG correlacionaram-se com a cronicidade e extensão das lesões (29).

O papel da imunidade natural contra a maioria dos fungos patogênicos é incerto, especialmente a participação dos anticorpos. Em áreas endêmicas, uma parte da população que tem sido exposta aos fungos causadores da CBM provavelmente irá desenvolver uma resposta humoral específica, com um nível significativo de anticorpos circulantes, mas não a doença (29,34,80,98).

Anticorpos precipitados têm sido detectados em vários estudos sorológicos em pacientes com CBM, mas o papel destes fatores humorais no mecanismo de defesa do hospedeiro contra fungos demáceos permanece não esclarecido, suscitando novos estudos sobre a relação parasita-hospedeiro na CBM e para determinar se a persistência e

multiplicação de leveduras nesta doença é relacionada a forma do fungo e/ou a uma resposta imune mediada por células inadequada do hospedeiro (13,80,112-114,98).

Usando anticorpos monoclonais contra neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, avaliou-se a reação imune mediada por células na CBM. O padrão de distribuição dos neutrófilos e macrófagos sugere que a persistência *in situ* do fungo é o fator principal na patogênese e progressão da doença (80,112,114,117).

A persistência fúngica na CBM pode estar relacionada ao padrão de infiltração de células imunes e o envolvimento de macrófagos (122). A CBM é uma micose crônica subcutânea caracterizada por uma resposta inflamatória granulomatosa, entretanto, pouco é conhecido a respeito do padrão dos subtipos de linfócitos e dos modos de recrutamento dos mesmos em associação com persistência dos fungos nos locais nos infiltrados celulares das lesões de CBM (86,89,122).

Embora os mecanismos imunes envolvidos no controle do fungo pareçam ser de origem celular, alguns auto-anticorpos podem estar ligados com a cronicidade e a extensão das lesões nesta patologia. Muitos fatores relevantes à suscetibilidade ou mecanismos de resistência em humanos ainda são desconhecidos. A imunidade natural na CBM não é bem entendida porém, não tem efeito protetor, tendo a doença um padrão de evolução debilitante e crônico (73,112-114).

3.8. Diagnósticos Diferenciais:

Os achados anatomopatológicos encontrados na esporotricose e na paracoccidioidomicose podem revelar granulomas mistos e eliminação transepidermica dos agentes etiológicos e, na feohifomicose, embora existam granulomas mistos, não há eliminação transepitelial. Por outro lado, outras micoses, tais como histoplasmose e doença de Jorge Lobo (Lacaziose), tem granulomas que não são modificados por neutrófilos, nem apresentam eliminação transepitelial. (23). Na Lacaziose a expressão clínica da

enfermidade não é monomorfa, sendo propostos dois grupos polares: hiperérgico (máculas e gomas) e hipoérgico (queloidiforme) (126).

A esporotricose, assim com a CBM, é uma micose subcutânea e excepcionalmente profunda (127), cujos fungos causadores também são encontrados em vegetais em decomposição, espinhos e no solo, ocorrendo infecção usualmente por inoculação do organismo, sendo a maioria das lesões em membros superiores e face (128), podendo haver formas de disseminação sistêmica em casos de etilistas, imunossupressão e AIDS (129). O aspecto clínico, para diagnóstico diferencial, seria a forma cutânea fixa (128).

As lesões iniciais da CBM, quando mostram crescimento centrífugo, lembram aquelas da blastomicose, porém usualmente não têm as bordas elevadas bem formadas, e múltiplas pequeninas pústulas que estão presentes nesta (10,72).

Algumas doenças classicamente deverão ser consideradas no diagnóstico diferencial da CBM, entre elas a pinta, framboesa, sífilis terciária, tuberculose cutânea verrucosa, micetoma, candidíase, carcinomas, leishmaniose verrucosa, micetoma, esporotricose verrucosa, paracoccidioidomicose, lobomicose, piodermite vegetante, lupus vulgar, lupus eritematoso, hanseníase e outras. Linfedema, em estágios avançados da doença, assemelha-se ao pé musgoso tropical. (10,17-20,72,81,82).

3.9. Terapêuticas:

A CBM é uma infecção fúngica que induz lesões de pele de difícil tratamento, pois em muitos casos não são obtidas respostas satisfatórias e muito freqüentemente recidiva, portanto os tratamentos ainda não são de eficácia absoluta, e numerosas tentativas são relatadas, com pobre efetividade e sérios efeitos colaterais (74,61,123). Métodos antigos incluíram iodeto de sódio endovenoso, iodeto de potássio e a vitamina D2 (calciferol) por via oral, além de iontoforese e radioterapia (10,72).

Medidas terapêuticas, algumas associadas ou não, incluem drogas como 5-fluorocitosina (5FC) oral, a qual como monoterapia, seria de eficácia questionável, associando-se então, para efeito sinérgico, ao tiabendazol, entretanto este também é citado sozinho (72). Relatavam-se associações de 5FC tópico com o uso endovenoso da anfotericina B (AnfB) e calciferol via oral (72,130). O uso de anfB endovenoso, associado com 5FC via oral, teria bons resultados (130). Em pequenas lesões, existem descrições de anfB intralesional, combinado com 5FC oral, entretanto, foi relatado ineficácia, pelos baixos níveis séricos obtidos, comparando com os valores de concentração inibitória mínima obtidos em laboratório (15,131).

Cetoconazol foi relatado com bom resultado, quando associado ao uso de 5-fluorocitosina, em casos onde havia sido ineficaz como monoterapia, pois avaliações *in vitro* mostraram que as drogas atuam de modo sinérgico (36,132).

Um artigo abordando pacientes portadores de lesões planas descreve tratamentos com 5-fluorouracil (5-FU a 1% em creme) tópico, ajoene (0.5% em gel) tópico, eletrodessecação e/ou fulguração e, em casos onde não houve resposta satisfatória, foi acrescentado itraconazol (100 mg/dia por 1 mês) (63).

Itraconazol, mesmo sendo usado por mais de um ano, não resultaria em melhora do quadro clínico, segundo relatos e, além disso, foi demonstrado que a sua eficácia estaria diminuída em casos de lesões extensas. Entretanto, a combinação de itraconazol para reduzir o tamanho das lesões, com tratamento subsequente das lesões remanescentes com criocirurgia, representaria uma boa alternativa terapêutica (36,72,81,131,133). Entretanto, em outro relato, um paciente que apresentava uma pequena lesão elevada, foi tratado somente com 200mg por dia de itraconazol por 6 meses, com uma boa resposta e cura clínica (26).

Em outra revisão, Itraconazol 200mg por dia por 6 a 9 meses foi usado com regressão das lesões planas (74). Em casos de formas clínicas graves, extensas,

recomenda-se associar anfotericina B e itraconazol (61), ou associar itraconazol com glucan intramuscular (90).

Estudos sobre o uso de saperconazol mostraram regressão das lesões após vários meses de tratamento (36). Testes com voriconazol e com itraconazol mostraram MICs semelhantes, em testes de atividade *in vitro* (134).

Bons resultados podem ser obtidos com criocirurgia para pequenas lesões, e, para as lesões maiores, itraconazol e, em alguns casos, a combinação dos dois tratamentos, entretanto em uma série de casos com estas terapêuticas, viu-se que em 31% houve cura, em 57% ocorreu recrudescência e em 12% não houve melhora alguma (54). Em uma placa bem pequena eritematosa e descamativa de 1,5 cm de diâmetro o tratamento envolveu excisão cirúrgica da lesão com margens de 5 mm e o *follow up* três anos mais tarde não revelou nenhuma recorrência (59).

A realização de cirurgia, indicada por autores em lesões pequenas e iniciais, com excisão larga e profunda, acompanhada de enxertia, foi referida com bons resultados, complementando-se com medicação antifúngica, preferencialmente itraconazol (55,61,115,130). Além de tratamento com excisão cirúrgica da área afetada e agentes antimicóticos, modalidades físicas como manipulação da temperatura ou combinações destes também são citadas (37). Dependendo das dimensões e da localização da lesão, o tratamento cirúrgico, com pequena margem, pode não necessitar de enxertia, associando a antifúngicos orais, termoterapia ou combinações destes (59).

A termoterapia, já relatada, tem sua ação pelo potencial efeito fungicida ou fungistático do calor, ou pela estimulação dos mecanismos de defesa através do maior fluxo sanguíneo e estímulo da fagocitose, no tratamento de pequenas lesões (72).

A eletrofulguração e a curetagem poderiam ser usadas em casos de lesões recentes e pequenas, mas observações sobre estes métodos alertaram sobre disseminação do fungo localmente ou através dos linfáticos (15). Os raros relatos de uso de *laser* de CO₂, revelaram-se eficazes (72).

Utilizando somente nitrogênio líquido, o acompanhamento posterior à terapia evidenciou melhora clínica em pacientes (15,133).

Na esporotricose cutânea, forma fixa, em lesões que lembravam a CBM, o itraconazol mostra-se eficaz, em esquema de pulsos, 400 mg por dia por uma semana, com parada de três semanas, com exames laboratoriais de base e após mensalmente. A droga foi administrada em pulsos até a cura clínica e micológica. Obteve-se bons resultados clínicos em 80% dos casos, com um número médio de pulsos de 3,5 sendo efetivo no tratamento da esporotricose cutânea, e pode ser considerada uma nova escolha de tratamento que pode levar a uma importante redução na dose total de uso de medicação (127).

Sobre a terbinafina, pacientes infectados com *F. pedrosoi* tratados por vários meses, tiveram cura micológica e clínica significativas, com atividade *in vitro* mais fungicida que a do itraconazol (135-137). Além disso, a distribuição do colágeno tipo 1 foi caracterizada por imunohistoquímica com marcadores anti-metaloproteinases 1 e 9, em lesões de pele de CBM antes e após tratamento com terbinafina e, após 1 ano de terapia, houve decréscimo da síntese de colágeno tipo 1 com parcial melhora da lesão fibrótica, independentemente da cura da infecção fúngica (138).

Relatou-se baixos níveis de resistência das cepas ao fluconazol, entretanto outros estudos demonstraram altos valores de MICs (131,139).

Baseados nas dificuldades experimentadas no sucesso do tratamento da CBM, foram testadas a suscetibilidade *in vitro* de 12 isolamentos humanos primários de *F. pedrosoi* a vários antifúngicos. Uma proporção significativa dos isolados testados foi resistente aos antifúngicos experimentados, como revelaram os altos valores de MIC. Assim, 33% dos isolados foram resistentes à anfotericina B; 58,3% à fluorocitosina e 66,7% ao fluconazol e nenhum resistente ao itraconazol. As determinações de concentração letal mínima revelaram que grande proporção dos isolados não foi morta nem pela anfotericina B (91,7%), fluorocitosina (91,7%), fluconazol (100%) ou ainda, pelo itraconazol (41,7%) (139).

Muitas formas de doenças causadas por fungos demáceos requerem ambos tratamentos, cirúrgicos e medicamentosos. Desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e terapêuticas combinadas podem ajudar no combate à infecção (83). Citam-se posaconazol, (85) e também quimioterapia regional com melfalan e actinomicina D em casos extremos (140). Novas drogas incluindo micafungina e anidulafungina necessitam de maiores testes para que possam ser utilizados com segurança nesta doença (141).

Em muitos casos de CBM, as terapêuticas são usadas de modo simultâneo, combinadas, como relatado em dois pacientes que usaram combinação de terapia com itraconazol e terbinafina durante os estágios iniciais de tratamento e foram completamente curados em um curso de tratamento relativamente curto (38). Em outro relato, a combinação dos efeitos da terbinafina, itraconazol e anfotericina B contra agentes da CBM foram avaliados *in vitro*, e foi visto sinergismo e nenhum antagonismo com a combinação entre terbinafina e itraconazole. Quando anfotericina B foi combinada com terbinafina ou itraconazol, nenhum sinergismo ou antagonismo foi notado (57).

São necessárias maiores investigações sobre esta patologia antes que se possam considerar novas armas terapêuticas, como testes *in vitro* e estudos experimentais com modelos animais, com a finalidade de se escolher o regime terapêutico mais efetivo, em função dos históricos de recidivas freqüentes mesmo com tratamentos adequados (30,131,137,139,142,143).

3.10. Prognóstico:

Existe consenso em relação à grande dificuldade na obtenção da cura desta doença, descrita como uma enfermidade rebelde, pois várias tentativas terapêuticas, isoladas ou em associações medicamentosas, parecem falhar a medida que transcorre o *follow-up* do paciente (10,15,18,19,44).

Os fungos demáceos, incluindo os causadores da cromoblastomicose, estão largamente distribuídos no meio-ambiente, com a maioria dos casos ocorrendo em indivíduos imunocompetentes. Podem ser uma importante causa de sinusite invasiva e sinusite fúngica alérgica, apontando-se que a infecção pode seguir-se à inalação. Quadros de infecção disseminada são incomuns, mas sua incidência está crescendo, particularmente entre indivíduos imunocomprometidos (83,84).

A identificação da espécie do agente etiológico é importante na avaliação prognóstica, juntamente com a realização de testes de suscetibilidade *in vitro*, devido ao curso crônico e progressivo da CBM, e pelo fato de algumas espécies disseminarem-se para o cérebro e outros órgãos (12,15,17,18,96).

O prognóstico torna-se, então, reservado nos casos de metástases sistêmicas e na existência de lesões cutâneas disseminadas. O estado elefantíaco, o edema, e as ulcerações do membro atingido são responsáveis pela incapacitação funcional, prejudicando as atividades normais e o trabalho do paciente. Em ulcerações ou cicatrizes antigas, poderão ocorrer carcinomas (15,19,20,72,79).

Em 2007, no Nepal, foram publicadas séries de casos, entre os quais haviam diagnósticos iniciais de carcinoma de células escamosas e outros de psoríase, sendo ressaltada a necessidade de acurácia na realização de um diagnóstico mais precoce para que se tenha um melhor prognóstico (56). Estudo publicado em 2005 na Tailândia demonstrou que *F pedrosoi* é o agente mais encontrado, requerendo tratamento de longa duração, cujo resultado depende do *status* imune do paciente (53).

Em 2006, na Venezuela, casos foram relatados em uma região semi-árida, endêmica, com lesões predominantemente nos membros superiores, eritematosas e escamosas (77,27% dos pacientes). 54,55% tinham parentes próximos com CBM e 86,36% eram homens. Novamente enfatiza-se a importância do diagnóstico precoce em doenças micóticas de difícil manejo, como a CBM, pois assim as respostas terapêuticas podem ser mais favoráveis, evitando-se a evolução para a cronicidade, com manifestações clínicas

deformantes e incapacitantes associadas a esta patologia, destacando-se que, com intervenções precoces, pode-se empregar tratamentos com menores possibilidades de efeitos adversos e adquirindo-se um alto percentual de respostas terapêuticas favoráveis. (63).

Por conseguinte, a Cromoblastomicose tem sido caracterizada como uma doença crônica, com persistência dos fungos *in situ*, com ausência de bons resultados clínicos apesar dos tratamentos realizados, o que leva a pensar que vários aspectos estão inter-relacionados nos mecanismos envolvidos na resposta granulomatosa, os quais devem ser mais detalhados e estudados com maior profundidade, incluindo o detalhamento da composição da reação inflamatória em estudos mais avançados e aprofundados sobre os elementos anatomopatológicos e padrões de polaridade, verificando-se influências do tipo clínico de lesão e abordagens terapêuticas, além de outras questões como aspectos da resposta imune e a complexidade da parede celular fúngica (53,56,63,73,83,84,110,124,125,142,143). A CBM ainda é uma doença órfã, com questionamentos médicos persistentes, abordando a taxonomia e ecoepidemiologia dos agentes etiológicos, conhecimentos básicos da patogênese das lesões, o processo fibrótico, resposta imunológica, polimorfismo genético de isolados selvagens ou em desenvolvimento em modelos experimentais, e investigações clínico-histopatológicas mais aprofundadas para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapêuticas (143).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral:

4.1.1. Estudar a estrutura anatomopatológica da cromblastomicose associando com o aspecto clínico das lesões dermatológicas antes e depois dos tratamentos.

4.2. Objetivos Específicos:

4.2.1. Estabelecer uma classificação dos tipos macroscópicos e dos aspectos microscópicos de lesões de cromblastomicose.

4.2.2. Avaliar os graus de intensidade dos elementos histopatológicos em lesões de cromblastomicose.

4.2.3. Verificar o comportamento das lesões quanto à ocorrência de polaridade na cromblastomicose tanto clínica como histologicamente.

4.2.4. Comparar as respostas macroscópicas e microscópicas à infecção antes e após os tratamentos.

5. REFERÊNCIAS

1. Lane CG. A cutaneous lesion caused by a new fungus (*Phialophora verrucosa*). *The Journal of Cut Dis* 1915; 33: 840-846.
2. Terra F, Torres M, Fonseca Filho O, Arêa Leão AE. Novo tipo de dermatite verrucosa: micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Brasil Med* 1922; 36:363-68.
3. Fonseca O, Leão AEA. As chromoblastomycoses. *Rev Med Cir Bras* 1930; 38: 216-36.
4. Pereira OB. Cromoblastomicose: identificação dos dois primeiros casos autochtones do Rio Grande do Sul [Tese]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Medicina de Porto Alegre; 1938. p. 120.
5. Pedroso A, Gomes JM. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora Verrucosa*. Trabalho do Laboratório Anátomo-patológico e da 4^a. Enfermaria de Medicina da Santa Casa de S. Paulo; 1939; São Paulo, Brasil.
6. Tibiriçá PQT. Anatomia Patológica da Dermatite Verrucosa Cromomicótica [Tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1939. p. 90.
7. Azulay RD. Histopatologia da Cromoblastomicose. *Anais da 2^a. Reunião da Associação de Dermatologia e Sifilografia*; 1947; São Paulo, Brasil. p. 205-210.
8. Pereira Filho MJ. O pé musgoso de Thomas e a cromoblastomicose no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Rev Med R G Sul* 1949; 5: 66-99.
9. Neves da Silva N. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul. *Rev Bras Derm Sifilogr* 1949; 24: 131-142.
10. Bopp C. Cromoblastomicose: Contribuições ao Estudo de alguns de seus aspectos [tese]. Porto Alegre (RS): Universidade do Rio Grande do Sul; 1959. p. 290.
11. Vollum DI. Chromomycosis: a review . *Br J Dermatol* 1977; 96: 454-458.
12. Zaias N. Chromomycosis. *J Cutan Pathol* 1978; 5: 155-164.

13. Walter P, Garin Y, Richardd-Lenoble D. Chromoblastomycosis. *Virchows Arch Pathol Anat* 1982; 397: 203-214.
14. Bopp C , Vetoratto E, Borelli D. Cromoblastomicose causada por nova espécie: *Taenolella boppii* . *Med Cut I L A* 1983 ; 11: 221-226 .
15. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 1-16.
16. Matsumoto T, Matsuda T. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Semin Dermatol* 1985; 4: 240-251.
17. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Cromomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, eds. *Micologia Medica*. 8^a.ed. São Paulo: Sarvier; 1991. p. 373-86.
18. Rippon JW. Chromoblastomycosis. In: Rippon JW. *Medical Mycology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 276-96.
19. Minotto R, et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul , Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 585-92.
20. Minotto R. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos e histopatológicos. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica com ênfase em Dermatologia. UFRGS. 2003. 181 p.
21. Romano MS. Histopatologia de las micosis profundas de mayor frecuencia en el Noroeste Argentino. *Arch Argent Dermatol* 1996; 46: 175-182.
22. Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. Chromoblastomycosis. In: Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. *Histopathology of Mycotic Diseases*. Atlanta: Wolfe Medical Publications; 1998. p. 42-9.
23. Fabio-Uribe J, Zuliaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 1989; 105: 1-6.
24. Drommer F, Dupont B. The increasing problem of fungal infections in the imunocompromised host. *J Mycol Med* 1996; 6: 1-6.

25. Celio LS, Erizlerian M. Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *F. pedrosoi*, *F. compactum*, *Cladosporium carrioni* and *P. verrucosa*. *J Gen Microbiol* 1985; 131:187-194.
26. Menezes N, Varela P, Furtado A, Couceiro A, et al. Chromoblastomycosis associated with *Fonsecaea pedrosoi* in a carpenter handling exotic woods. *Dermatol Online J* 2008; 14: 5-9.
27. Rubin HA, Bruce S, Rosen T, Mollie M. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 951-4.
28. Batres E, Wolf J, Rudolph AH, Knox JM. Transepithelial elimination of cutaneous chromomycosis. *Arch Dermatol* 1978; 114: 1231-1232.
29. Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 497-500.
30. Esterre P, Ravisse P, Peyrol S, Pradinaud R, Sainte-Marie D, Dupont B, Grimaud JA. Immunopathologie de la lesion cutane de chromomycose. *J Mycol Med* 1991; 1: 201-207.
31. Barros TF. Obtenção e caracterização parcial química e imunológica de antígenos de agentes da cromoblastomycose [dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1992. p. 80.
32. Celi S, Gamboa P, Molina N, Montoya C, Rodriguez D. Estudio sobre la sensibilidad cutánea a antígenos de chromoblastomycosis en Medellín y Sahún. Barranquilla (Colombia), 1986. *Salud Uninorte* 1988; 4: 37-44.
33. Sánchez-Mirt A, Pérez-Blanco M, Caleiras E, Rangel O. Histopatología y Ultraestructura de la cromomycosis causada por *Cladosporium carrionii*. *Invest Clin* 1995; 36: 173-182.

34. Martini JP, Costa HC, Souza LCF. Crescimento rápido da cromomicose utilizando eucalipto como meio de cultivo. *Salusvita* 1986; 5: 72-82.
35. Ibrahim-Granet O, Bièvre C, Jendouibi M. Immunochemical characterisation of antigens and growth inhibition of *F. pedrosoi* by species-specific IgG. *J Med Microbiol* 1988; 26: 217-222.
36. Cardona-Castro N, Agudelo-florez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis Murine Model and *in vitro* test to evaluate the sensitivity of *F. pedrosoi* to ketoconazol, itraconazole and saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 779-784.
37. Milam CP, Fenske NA. Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin.* 1989;7:219-25.
38. Zhang J, Xi L, Lu C, Li X, Xie T, Zhang H, Xie Z, Sybren DH. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. *Mycoses.* 2008 ; 21: 124-127.
39. Binford CH, Dooley JR. Chromomycosis. In: Binford CH, Connor V, editors. *Pathology of tropical and extraordinary diseases.* New York: Institute of Pathology; 1976. p. 178-214.
40. Iwatsu T, Miyaji M, Taguchi H, Okamoto S, Kurita N. Skin test-active substance prepared from culture filtrate of *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia* 1979; 67: 101-105.
41. Carrión AL. Chromoblastomycosis and related infections. *Int J Dermatol* 1975; 14: 27-32.
42. de Hoog GS, Nishikaku AS, Fernandez-Zeppenfeldt G, Padín-González C, Burger E, Badali H, Richard-Yegres N, van den Ende AH. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. *Stud Mycol.* 2007; 58:219-34.

43. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 45-47.
44. Gohman-Yahk M, Benjamim Loker D. Afecciones Cutáneas Granulomatosas tropicales. Caracas Venezuela. *Archivos del Hospital Vargas* 1998; 30: 9-14.
45. Kombila M. Chromoblastomycosis in Gabon. Study of 64 cases. *Sante* 1995; 5: 235-244.
46. Jayalakshmi P, Looi LM, Soo-Hoo TS. Chromoblastomycosis in Malaysia. *Mycopathologia* 1990; 109: 27-31.
47. Bansal AS, Prabhakar P. Chromomycosis: a twenty-year analysis of histologically confirmed cases in Jamaica. *Trop Geogr Med* 1989; 41: 222-226.
48. Pastrana Fundora F. Chromomycosis: 15 years incidence. *Rev Cuba Hig Epidemiol* 1989; 27: 285-292.
49. Diaz Almeida JG, Gonzalez MT, Dube AD. Cromoblastomycosis en Cuba, estudio retrospectivo clínico y epidémico de 72 enfermos. *Rev Cub Med Trop* 1978; 30: 95-108.
50. Strutton G. The granulomatous reaction pattern. In: Weedon D. *The skin*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1992. p. 181-207.
51. Attapattu MC. Chromoblastomycosis—a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. *Mycopathologia*. 1997;137:145-51.
52. Siala E, Gastli M, Ben Abdallah R, Barbouche R, Zallaga N, Bouratbine A, Aoun K. Recurrent chromomycosis of the face and extremities: first case report from libya. *Med Trop*. 2007;67:69-71.
53. Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: current concerns. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2005;46:81-6.
54. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*. 2001;44:1-7.

55. López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol.* 2007;25:188-94.
56. Pradhan SV et al. Chromoblastomycosis in Nepal: a study of 13 cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007 ;73:176-8
57. Yu J, Li R, Zhang M, Liu L, Wan Z. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol.* 2008; 4:1-3.
58. Miyagi H, Yamamoto Y, Kanamori S, Taira K, Asato Y, Myint CK, Kayo S, Hosokawa A, Hagiwara K, Uezato H. A case of chromoblastomycosis appearing in an Okinawa patient with a medical history of Hansen's disease. *J Dermatol.* 2008; 35: 354-61.
59. 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;48:85-9.
60. Paniz-Mondolfi AE, Colella MT, Negrín DC, Aranzazu N, Oliver M, Reyes-Jaimes O, Pérez-Alvarez AM. Extensive chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* successfully treated with a combination of amphotericin B and itraconazole. *Med Mycol.* 2008;46:179-84.
61. Levang J, Muller P, Marreel A, Nicolas M, Puzenat E, Aubin F, Humbert P. Chromomycosis in Guadeloupe. *Ann Dermatol Venereol.* 2008;135:111-5.
62. Uribe F, Leon W, Velasquez JP. Modificaciones tisulares a nivel de la piel en algunas micosis. *Acta Médica Colombiana* 1982; 7: 171-179.
63. Pérez-Blanco M, Hernández Valles R, García-Humbría L, Yegres F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Med Mycol.* 2006 ;44: 467-71.

64. Londero AT, Ramos CD. Chromomycosis: a clinical and mycologic study of thirty-five cases observed in the hinterland of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25: 132-35.
65. Talhari S, Cunhas MGS, Schettini APM. Deep mycosis in Amazon region. *Int J Dermatol* 1988; 27: 481-84.
66. Mello e Silva AC. Chromoblastomycosis in the state of Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; 25: 37-44.
67. Silva JP, Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* 1999; 143: 171-175.
68. Silva CMP, Silva ACM, Marques SC, *et al.* Associação de cromoblastomicose e hanseníase: relato de dois casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 27: 241-244.
69. Bopp C, Bernardi C. Geopatologia da Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul. *Med Cut* 1973; 7: 1-8.
70. Londero AT, Ramos CD. Cromoblastomicose no interior do Rio Grande do Sul. *An Bras Dermatol* 1989; 64: 155-158.
71. Matte SMW e cols. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 309-311.
72. Trindade Filho J. Cromicose. In: Talhari S, Garrido Neves R. *Dermatologia Tropical*. São Paulo: MEDSI editora; 1995. p. 219-231.
73. 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: 51-60.
74. Salgado CG, da Silva MB, Yamano SS, Salgado UI, Diniz JA, da Silva JP. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*. 2008; 24:142-47.
75. Rozental S, Alviano CS, Souza W. The in vitro susceptibility of *F. pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia* 1994; 126: 85-91.

76. Lever WF. Fungal Diseases. In: Lever WF. Histopathology of the skin. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1998. p. 517-51.
77. Salem FA, Kannangara DW, Naschum R. Cerebral Chromomycosis. Arch Neurol 1983; 40: 173-4.
78. Duggan JM, Wolf MD, Kaufmann CA. *P. Verrucosa* infection in an AIDS patient. Mycoses 1995; 38: 215-218.
79. Esterre P, Pecarrere JL, Raharisolo C, Huerre M. Squamous cell carcinoma arising from chromomycosis. Ann Pathol 1999; 19: 516-20.
80. Diamond RD. Immune response to fungal infection. Rev Infet Dis 1989; 11: 1600-1604.
81. Paul C, Dupont B, Pialoux G, Auril MF, Pradunaud R. Chromoblastomycosis with malignant transformation and cutaneous-synovial secondary localization. The potential therapeutic role of itraconazole. J Med Vet Mycol 1991; 29: 313-316.
82. Londero AT, Ramos CD, Fischman O. Cromoblastomicose primária do nariz. O hospital 1968; 74: 323-328.
83. Brandt ME, Warnock DW. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. J Chemother. 2003;15:36-47.
84. Silveira F, Nucci M. Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. Curr Opin Infect Dis. 2001;14:679-84.
85. Chowdhary A, Guarro J, Randhawa HS, Gené J, Cano J, Jain RK, Kumar S, Khanna G. A rare case of chromoblastomycosis in a renal transplant. Med Mycol. 2008 Mar;46(2):163-6.
86. Mazo Fávero Gimenes V, Da Glória de Souza M, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Vagner de Castro Lima Santos D, Pedroso e Silva Cde M, Almeida SR. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. Microbes Infect. 2005 ;7:708-13.

87. Sousa MG, Azevedo CD, Nascimento RC, Ghosn EE, Santiago KL, Noal V, Bomfim GF, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DW, Almeida SR. Fonsecaea pedrosoi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *J Leukoc Biol.* 2008; 18:87-93.
88. Höfling-Lima AL, Guarro J, Freitas D, Godoy P, Gené J, Souza LB, Zaror L, Romano AC. Clinical treatment of corneal infection due to Fonsecaea pedrosoi-case report. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68:270-2.
89. Sousa MG, Azevedo Cde M, Nascimento RC, Ghosn EE, Santiago KL, Noal V, Bomfim GF, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DW, Almeida SR. Fonsecaea pedrosoi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *J Leukoc Biol.* 2008;84:864-70.
90. Silva Azevedo CD, Marques SG, Resende MA, Gonçalves AG, de Castro Lima Santos DV, da Silva RR, de Sousa MD, de Almeida SR. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. *Mycoses.* 2008 ; 26: 89-93.
91. Sarti HM, Vega-Memije ME, Domínguez-Cherit J, Arenas R. Longitudinal melanonychia secondary to chromoblastomycosis due to Fonsecaea pedrosoi. *Int J Dermatol.* 2008;47:764-5.
92. Sharma NL, Sharma VC, Mahajan V, Shanker V, Sarin S. Chromoblastomycosis with underlying osteolytic lesion. *Mycoses.* 2007;50:517-9.
93. Beçak W e Paulete J. Técnicas de Citologia e Histologia. In: Beçak W. Técnicas de Coloração. 2ª. ed. Rio de Janeiro (RJ): RJ Livros Técnicos e Científicos; 1976. p. 1-67.
94. Rosen T, Gyorkey F, Joseph LM, Batres E. Ultrastructural Features of Chromoblastomycosis. *Int J Dermat* 1980; 19: 461-468.

95. Rajeev S, Clifton G, Watson C, Miller D. *Fonsecaea pedrosoi* skin infection in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 2008 ;20:379-81.
96. Ahrens J, Graybill JR, Abishawl A, Tio FO, Rinaldi MG. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Med Hyg* 1989; 40: 651-658.
97. Garcia Marques S, Pedroso E Silva Cde M, Aparecida Resende M, Moura Silva AA, Mendes Caldas Ade J, Lopes Costa JM. Detection of delayed hypersensitivity to *Fonsecaea pedrosoi* metabolic antigen (chromomycin). *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2008;49:95-101.
98. Esterre P, Jahevitra M, Ramarcel E. Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. *J Micol Med* 1997; 7: 137-141.
99. de Andrade TS, Cury AE, de Castro LG, Hirata MH, Hirata RD. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:267-72.
100. Copra S, Veja-lópez F. Skin granulomas in clinical practice. In: Geraint James D, Zumla A. *The granulomatous disorders.* 1st ed. Cambridge: Cambridge University; 2003. p. 485-527.
101. Epstein WL. Granulomatous inflammations in the skin. In: Epstein WL. *Pathology of Granulomas.* New York: Raven Press; 1993. p. 221-60.
102. Pinkus E, Mehregan AH. Mixed cell granulomas. In: Pinkus E, Mehregan AH. *Pinkus' guide to dermatohistopathology.* 4th ed. Connecticut: Appleton-century-crofts; 1986. p. 277-298.
103. Boros DL. Granulomatous Inflammations. In: Boros DL. *Granulomatous inflammations.* 3rd. ed. Detroit: Press; 1995. p. 191-95.
104. Reis LF, Ventura TG, Souza SO, Arana-Pino A, et al. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifillyne on hepatic *Schistosoma mansoni*

- granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 107-12.
105. Adams D. The biology of the granuloma. In: Ioachin HL, editor. Pathology of granuloma. New York: Raven Press; 1983. p. 1-20.
 106. Hirsch BC, Johnson WC. Pathology of granulomatous diseases. Mixed inflammatory granuloma. Int J Dermatol 1984; 23: 585-97.
 107. Michalany J, Michalany NS. A new morphological concept and classification of granulomatous inflammation: the polar granulomas. International Journal of Dermatology. 2008; 16: 574 – 579.
 108. Michalany J, Michalany NS. Histogenic differentiation of polar tuberculoid granuloma and the “benign” or “malignant” behaviour of hanseniasis. Hansenol Int. 1989;14:83-6.
 109. Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. Immunol Rev. 2004;201:168-79
 110. Esterre P, Peyrol S, Guerret S, Saint-Maire D, Pradinaud R, Grimaud JA. Cell-matrix Patterns in the Cutaneous Lesion of Chromomycosis. Path Res Pract 1992; 188: 894-900.
 111. Ricard-Blum S, Hartmann DJ, Esterre P. Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. Eur J Clin Invest 1998; 28: 748-54.
 112. Sotto MN, T. De Brito T, Silva AMG, Vidal M, et al. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. J Cutan Pathol 2004; 31: 14–18.
 113. Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, et al. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. Mycopathologia 2006; 161: 195–203.

114. Pereira da Silva J, Batista da Silva M, Salgado UI, Diniz JAP, et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 104–111.
115. Bayerl C, Fuhrmann E, Coelho CC, Lauk LJ, Moll I, Jung EG. Chromomycosis. *Mycoses* 1998; 41: 447-52.
116. Ricard-Blum S, Hartmann DJ, Esterre P. Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 748-54.
117. Esterre P, Peyrol S, Sainte-Marie D. Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993; 422: 285-91.
118. Harada S, Kusunoki T. Scanning electron microscopic observation of the parasitic forms of the *F. pedrosoi* in a human skin lesion. *Micopathologia* 1983; 82: 33-7.
119. Okuda C, Ito M, Oka K. Relationship between tissue reactions and morphological changes of the fungi in chromoblastomycosis: morphometry and electron microscopy. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 95-9.
120. Stevens R.L. and Austen K F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunology Today* 1989; 10: 381-386.
121. Mazo Fávero Gimenes V, Da Glória de Souza M, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Vagner de Castro Lima Santos D, Pedroso e Silva Cde M, Almeida SR. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect.* 2005;7:708-13.
122. Sá 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;49:49-53.
123. Santos AL, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS, Rodrigues ML, Alviano CS. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. FEMS Microbiol Rev. 2007;31:570-91.
124. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. Curr Opin Infect Dis. 2003 Apr;16(2):91-6 .
125. Alviano DS, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. Infect Immun. 2004 Jan;72(1):229-37.
126. de Brito AC; Quaresma JAS. Lacaziose (doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. An. Bras. Dermatol. 2007; 82: 187-92.
127. Bonifaz A, Fierro L, Saúl A, Ponce RM. Cutaneous sporotrichosis. Intermittent treatment (pulses) with itraconazole. Eur J Dermatol. 2008 ;18:61-4.
128. Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V, Fierro L, Rosales A, Palacios C, Araiza J. Sporotrichosis in childhood: clinical and therapeutic experience in 25 patients. Pediatr Dermatol. 2007;24:369-72.
129. Kauffman CA, Hajjeh R, Chapman SW. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2000;30:684-7.
130. Restrepo A. Treatment of tropical mycosis. J Am Acad Dermatol 1994; 31: 91-102.
131. Caligiorne RB, Resende MA, Melillo PHC, Peluso CP, Carmo FHS, Azevedo V. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. Medical Mycology 1999; 37: 405-409.
132. Silber JG, Gombert ME, Green KM, Shalita AR. Treatment of chromomycosis with ketoconazole and 5-fluorocytosine. J Am Acad Dermatol 1983; 8: 236-238.

133. Kullavanijakya P, Rojanevamich V. Successful treatment of chromoblastomycosis due to *F. pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. *Int J Dermatol* 1995; 34: 804-7.
134. McGinnis MR, Pasarell L, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR, Rinaldi MG. In vitro activity of voriconazole against selected fungi. *Medical Mycology* 1998; 36: 239-242.
135. Esterre P, Inzank K, Ramarcel E. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine. *Br J Dermatol* 1996; 134: 33-36.
136. Hay RJ. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. *B J Dermatol* 1999; 141: 36-40.
137. McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Medical Mycology* 1998; 36: 243-246.
138. Esterre P, Risteli L, Ricard-Blum S. Immunohistochemical study of type I collagen turn-over and of matrix metalloproteinases in chromoblastomycosis before and after treatment by terbinafine. *Pathol Res Pract.* 1998;194 :847-53.
139. Bedout C, Gómez BI, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *F. pedrosoi* to antifungals . *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39: 145-148.
140. Damian DL, Barnetson RS, Thompson JF. Treatment of refractory chromomycosis by isolated limb infusion with melphalan and actinomycin D. *J Cutan Med Surg.* 2006;10:48-51.
141. Scheinfeld N. A review of the new antifungals: posaconazole, micafungin, and anidulafungin. *J Drugs Dermatol.* 2007 ;6:1249-51.
142. Silva CL, Fazioli RA. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *J Med Microbiol* 1985; 20: 299-305.
143. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis.* 2006 ;19(2):148-52.

6. ARTIGOS CIENTÍFICOS

6.1. Primeiro Artigo (Versão em Inglês):

PATTERN ANALYSIS OF CUTANEOUS CHROMOBLASTOMYCOSIS INFECTION: EVIDENCE OF A POLARITY CONCEPT IN CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL LESIONS

Renan Minotto^{1,4*}; Maria Lúcia Scroferneker^{3,4}; Maria Isabel Albano Edelweiss^{2,4,5}.

¹Preceptor, Dermatology Service, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Brazil;

²Professor, Department of Pathology, Faculdade de Medicina, and Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³Professor, Department of Microbiology, Instituto de Biociências, and Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁴Student of Post-Graduate Course in Medicine – Medical Sciences, Doctorate Degree, Emphasis in Dermatology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁵Preceptor, Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

*Correspondence to: Dr. Renan Minotto - Rua Comendador Rheingantz, 750 apto. 701. Bairro Bela Vista - CEP 90450-020 - Porto Alegre, RS - Brasil. E-mail: rminotto@gmail.com

ABSTRACT

Histopathological findings of cutaneous biopsies from 79 patients with untreated chromoblastomycosis infection were studied and associated with type of macroscopic dermatological lesions. The authors described the granuloma present in this disease and showed the concept of polarity in clinical lesions and histopathological aspects. The mixed organized mycotic granuloma was analysed through a semi-quantification of its components (grouped concentrically around fungi as mononuclears, lymphoplasmocytic infiltrate and polymorphonuclears influx mainly by neutrophils), which have the probability of been more intense (OR=14,06 and $p<0,001$) in elevated lesions (55 patients) with 76% of high intensity (++ to +++) than in flat lesions (24 patients) which had 67% of low intensity of these components (0 to +). Fungus had the probability (OR=18,53 and $p<0,001$) to be more intense in elevated lesions and fibrosis had OR=32,29 with $p<0,001$. Pseudoepitheliomatous hyperplasia, transepithelial elimination, vasculitis, ulceration and vascular neof ormation were also analysed by the same method and associated with clinical aspect of the lesion and we found significant association where had high intensity of fungi with the presence of high intensity of the others structures in elevated lesions.

Key words: chromoblastomycosis, clinical forms of chromoblastomycosis, chromoblastomycotic granuloma, histopathology, pathology of granulomas, polar granulomas.

INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) is a deep fungal infection associated with a specific granulomatous reaction. The causative agents of CBM are found intracellularly or free in tissues as thick-walled dark brown spores measuring 5 to 15 μ in diameter. In literature, there are different histopathological descriptions of the granuloma in CBM (like suppurative, tuberculoid and histiocytic), but few papers have focused its definition on a consensus and related it with clinical aspects of lesions (1-24).

Pinkus (13) described that a mixed granuloma is the result from the proliferation of mononuclear cells, showing both phagocytic and secretory activity. Uribe (16) reported that the mixed organized mycotic granuloma (MOMG) is a mononuclear granuloma modified by the influx of neutrophils, giving rise to a suppurative neutrophilic infiltrate. D'Avila (25) associated the histopathology and cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion with different clinical forms of the disease. Re-examining the concept of polar granulomas (12,39-41), based principally on studies of hanseniasis, and by observing and comparing cases of CBM in our service, we decided to appofundate the analisys and studies about this fungal infection, because it could be possible that in CBM exits a particular kind of polarity either in macroscopic or in microscopic lesions.

The present study intends to clarify some aspects of this disease through an evaluation of all cellular and morphological elements of the skin biopsies of CBM lesions in a detailed histopathological structural analysis, showing the descriptive morphological aspects involved and their association with the type of dermatological lesion.

PATIENTS AND METHODS

This is a cross-sectional study with 79 CBM patients, whose diagnosis were confirmed by direct mycological examination, culture and histopathology, from the Dermatology Service (DS) of Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil, a historical reference service of CBM established by Clovis Bopp (11) with standardized protocols and rich archives of several published cases. The new cases included here were untreated (incident cases at the DS), in a sample of demand, seen at the latest years, and included 27 from another survey underwent by us (4) of 100 cases.

Inclusion criteria were all patients with positive direct mycological examination and cultural with identification of the agent and sclerotic cells at the histopathology in cases without treatments. Exclusion ones were patients already using therapies at the first consultation, negative mycological and histopathological studies and/or insufficient tissue in paraffin blocks. This study was approved by local ethics committee and identifying data from patients were not revealed.

New slides with hematoxylin-eosin (HE) and Grocott's methenamine silver (GMS) were made and re-examined by two researchers (MIE and RM), blinded to the clinical data, in consensus to the histopathological findings, which were studied semiquantitatively through models already established by Bopp (11), Minotto (1), Uribe (16), and D'Ávila (25), adapted for this study, by counting ten high-power fields (400x) and their presences were coded in degrees of intensity and classified in two categories, as low intensity (LI) when the intensity was from 0 (absent) to + (paucity), and as high intensity (HI) when the intensity was from ++ (frequent) to +++ (multiplicity).

Histopathological variables observed in slides were multinucleated giant cells, neutrophils, macrophages, eosinophils, lymphocytes, plasma cells, fungi, pseudoepitheliomatous hyperplasia, transepithelial elimination, fibrosis (identified under polarized light microscopy), vasculitis, ulceration and vascular neoformation. The cells that

constitute the granulomas were standardized, as authors choice, into three larger categories: Group A - mononuclear phagocytic system: macrophages and multinucleated giant cells; Group B - polymorphonuclear phagocytic system: neutrophils and eosinophils; Group C - lymphoplasmocytic infiltrate: lymphocytes and plasma cells.

Clinical variables obtained in the patients' files of DS were gender, race, age, local of lesion and clinical appearance of biopsied lesion. The type of the biopsied dermatological lesion was divided into two categories: elevated lesion (when it was papulous, nodular, verrucous or vegetant), and flat lesion (when it was atrophic, erythematous, desquamative or squamous).

Descriptive statistics was used for the analysis of quantitative variables (means) and qualitative variables (n (%)). The associations of interest were analyzed through the bi-variate analysis by using Qui-Square and Exact Fisher's Tests (Yates correction when necessary) and were presented Odds Ratio (OR) with respective confidence interval (CI 95%), using a significance level of 5%. The Epi Info program version 3.5.1 and the SPSS program version 16.0 was used for the statistical analysis.

RESULTS

Figure 1 shows the sequence in the MOMG pattern formation towards in the two poles.

Samples from the 24 flat lesions and from the 55 elevated lesions which were biopsied are shown in Figures 2 and 3, respectively.

All the 79 lesions were caused by *F pedrosoi*.

Clinical and epidemiological data from the 79 studied patients are seen on Table 1.

Table 2 shows the degrees of intensity of the histopathological findings associating with the type of dermatological lesion.

All the 79 patients had MOMG at the histopathology, but we found two poles of intensity of the microscopic components, according to the type of dermatological lesion: the probability of to exist higher intensity of the elements (cells from groups A, B and C) of the MOMG in the elevated lesions was 14,06 ($p < 0,001$) when compared to the flat lesions (elevated lesions had 76% of HI and the flat lesions had 67% of LI). These two distinct histopathological aspects of the MOMG (HI and LI, the two poles) are shown on figures 4 and 5, respectively. The probability of fungus to be higher in elevated lesions was 18,53 ($p < 0,001$) when compared to flat lesions. Fibrosis and pseudoepitheliomatous hyperplasia had OR of 32,29 and 30,06, respectively ($p < 0,001$). Transepithelial elimination showed OR=0,26 ($p < 0,001$) indicating a protective effect of the elevated lesions. The mean for structural elements were also analysed and we found 67% of LI in flat lesions and 76% of HI in elevated lesions (OR=14,06 and $p < 0,001$). Others results are seen on table 2.

As seen in Table 1, the disease was more prevalent in Caucasians. Concerning to the time of disease evolution and the histopathological findings, as well patients' age and gender, the authors did not found statistical significance.

Table 3 shows a significance threshold ($p < 0,001$) by way of Fisher's exact test revealed more probability of to have higher intensity of cellular elements (groups A,B,C) and structural components (fibrosis, transepithelial elimination, ulcerations, pseudoepitheliomatous hyperplasia, vascular proliferation, and vasculitis) when high intensity of fungus were observed at the elevated dermatological lesions, highlighting the polymorphonuclear group (OR=35,66) confirming that this group particularize the type of granuloma in CBM. We found OR=32,73 for fibrosis, OR=29,12 for pseudoepitheliomatous hyperplasia and OR=0,13 for transepithelial elimination (denoting protection). The others elements are seen on table 3.

DISCUSSION

The causative agents of subcutaneous and systemic mycoses lead to the influx of mononuclear phagocytic cells at the wounded sites, thus producing a granulomatous reaction, but in CBM, fungi simultaneously induce a response of the polymorphonuclear system, giving rise to a inflammatory infiltrate with persistent influx of neutrophils (figure 1). This influx particularize and characterizes the granuloma in CBM, producing the called MOMG, and in this work we found different patterns of intensity of its microscopic elements associated with the type of the macroscopic lesion (13,16,19,23).

We dissected the granulomatous formation observed in CBM (12,13,16) to analyze the elements of the cellular infiltrate, first in isolation, and afterwards, combined in order to understand their structure. Thus, the cellular composition of the infiltrate revealed that three large groups of cells were present and concentrically organized around the fungal agent, forming the MOMG (16), with the continuous recruiting of neutrophils originating the suppurative component of the granuloma in CBM. The morphological aspects of the mixed organized mycotic granuloma formation, step by step, with central neutrophil exudation, can be seen in figure 1, as idealized by the authors.

The dermatological appearance of the lesion (figures 2 and 3) had a correspondent expression in MOMG and structural components. The type of granuloma is the same (MOMG), but the expression of their components (polarity) varies according to the macroscopic lesion (HI in elevated and LI in flat), showing our new polarity concept, and the same occurs with the majority of the others morphological elements (table 2), which are more expressive in the elevated lesions than in the flat.

There are few review studies that focus on histopathological response to CBM and different clinical aspects of this disease. As the studies on this pathology have not been conclusive, and it is presented worldwide, we decided to study the primary tissue modification triggered by the fungal agent and its associations related to lesions. New

approaches are necessary to show how the inflammatory reaction occurs in CBM according to different clinical aspects of the lesions (26-38).

Table 3 shows that in elevated lesions where HI of fungi were presented existed significant association with HI to the majority of the cell elements and structures analyzed indicating that an elevated lesion may be prone to difficult therapeutical management, more difficult prognostics and a “malignant behaviour” (table 2) while a flat lesion may present a better clinical evolution due to its low intensity of pathological elements.

Considering clinical-epidemiological data presented in table 1, a significant number of patients were female (40,51%) and that a expressive number of individuals presented lesions in other parts of the body (67,09%) comparing to patients presented lesions on the lower limbs(32,91%). Based on semiological descriptions, the greater number of individuals presented isolated little flat lesions or little elevated lesions in groups. Flat lesions were found predominantly on upper limbs and elevated lesions were found in other parts of the body, and the average evolution time of the disease was 4,9 years. Comparing to previous studies about this disease in the world, it is possible that is occurring changes or they may indicate different geographical characteristics or a sort of change in the epidemiological profile in recent years, including a shorter period of evolution until diagnosis (4,26-38).

Another characteristic of CBM is a rare phenomenon called transepithelial elimination, on which the epithelium covering the lesions plays a role in the elimination of the fungus, where paths for fungal elimination are observed (8,16,24). The precise pathogenic pathway is not clearly understood yet, but we found a significant association between fungi, fibrosis, transepithelial elimination and type of lesion ($p < 0,001$). Fungi and fibrosis were more intense in elevated lesions, but despite the association of pseudoepitheliomatous hiperplasya and transepithelial elimination of the fungi described on the literature, it is possible that the fibrosis may difficult the transepithelial elimination of fungus, and we found a protective effect between elevated lesion and transepithelial elimination (OR=0,26 comparing with flat lesions and OR=0,13 when associated with high intensity of fungus in elevated lesions). On the other

hand, fibrosis was less intense in flat lesions and the transepithelial elimination of the fungi could be easier.

The mixed organized mycotic granulomas present in CBM have a distinct pattern from those of others mycoses, because they are modified by the persistent presence of neutrophilic polymorphonuclear components caused by persistence of fungi, and the MOMG in CBM have a distinct polarity according to the clinical type of lesion. The other morphological elements studied may also be subject to new research because there have been interesting features in their expressions, according to type of clinical lesion, not related in other granulomatous fungal infections, for example, in elevated lesions when a higher intensity of fungus was present, we found a significant and positive association with expressive dermal fibrosis, and this fibrotic tissue can be a barrier and impair the diffusion of antifungal drugs and the transepithelial elimination of the etiologic agent. This fibrotic mechanism in CBM (20-22) could be a model for studies which to try explain the etiopathogenesis of other obscures fibrotic diseases. And the abundant pseudoepitheliomatous hyperplasia, ulcerations, vascular proliferation and vasculitis noted in CBM lesions should be also better investigated.

A morphological concept and classification of granulomatous inflammation have been idealized: the polar-granulomas. Introducing this theme, in a study (39), the authors also have revealed the confusion concerning the definition of the type of granulomas in several granulomatous diseases, and that differences between granulomas were overlooked by the majority of pathologists. And, based on studies about granulomatous inflammation in leprosy, a morphological classification of granulomas into polar types, tuberculoid and non tuberculoid, was proposed. The polar tuberculoid type follows the Jadassohn- Lewandowsky law, its etiologic agent is absent or scarce (complete phagocytosis). The polar non tuberculoid type does not follow the Jadassohn- Lewandowsky law, its etiologic agent is always present or copious (incomplete phagocytosis). It seems that this proposed definition of granulomas combines morphology with functional activity of macrophages, easily

observed in routine histopathological examination by optical microscopy. And the nature of the etiologic agent and its virulence, and Th1/Th2 response may also be investigated to understand the molecular effectors of this immunologic reaction.

Based on these morphological concept and classification, in another study (40) of polar granulomas and hanseniasis, the authors concluded that the “benign” or “malignant” behaviour of hanseniasis depends on the degree of tuberculoid differentiation of the lesions. If the lesion is histologically well differentiated toward a polar tuberculoid granuloma (tuberculoid hanseniasis) it will have a “benign” behaviour. On the contrary, if this differentiation is absent (virchowian hanseniasis) or poor (interpolar borderline hanseniasis) the behaviour of the lesion will be “malignant”.

In a study (41) of schistosomiasis, a granulomatous and fibrosing reaction disease, the severe form of disease with more intense lesions was associated with persistently elevated pro-inflammatory T-helper-2 (Th2)-type cytokines, whereas milder pathology is present when Th1 cytokines dominate. The definition of distinctive immune profiles associated with polar forms of schistosomiasis opens opportunities for comparative studies with individuals suffering from others severe granulomatous diseases.

In another study focused on CBM (25) the authors observed 15 cases of elevated lesions where a Th2 response was found and 4 flat lesions' cases where a Th1 response was found in 19 untreated patients.

According to these studies, once again we have evidences that in CBM is possible a polarity concept, in both clinical and histopathological aspects, because the association of a flat macroscopic lesion with low intensity of the microscopic elements (with a “benign behavior”) and a elevated macroscopic lesion with high intensity of the microscopic elements (with a “malignant behavior”) had significant clinical and statistical findings. The authors of this research have detailed and proposed to refresh the name of the granuloma in CBM: mixed organized micotyc granuloma, with high intensity or low intensity of their components,

which could follow the concept of classification for those types already described: the non tuberculoid and tuberculoid polar forms, respectively.

Finally, the two kinds of dermatological lesions, flat and elevated, in CBM, are an interesting model to study the different intensities of the histopathological elements on mixed organized mycotic granuloma formation according to clinical lesion, not only because the fungus is easily observed in histological sections, but also because the course of infection is chronic and the lesions are generally limited to the subcutaneous tissue and skin (4,24-30,32,34,35), so we may infer from a macroscopic viewpoint what are the microscopic findings in a skin lesion in terms of clinical-therapeutical association.

Further studies on focus the immunological pattern based in immunomarkers in tissue for the inflammatory infiltrate and serous immunological expression of these markers will be our next step in this topic.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Prof. Dr. Roberto Gervini, head of the Dermatology Service, and Prof. Dr. Mauro Soibelman, head of the Division of Research, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre and to Center for Experimental Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

1. Minotto R. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos e histopatológicos. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica com ênfase em Dermatologia. UFRGS. 2003. 181 p.
2. Epstein WL. Granulomatous inflammations in the skin. In: Ioachin HL, ed. Pathology of Granulomas. Raven Press, New York 1998; 221-60.
3. Lever WF. Fungal Diseases. In: Lever WF. Histopathology of the skin. 8a. ed. Lippincott Raven, Philadelphia 1998; 517-51.
4. Minotto R, et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. J Am Acad Dermatol 2001; 44: 585-92.
5. Carrión AL Chromoblastomycosis and related infections. Int J Dermatol 1975; 14: 27-32.
6. Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. Chromoblastomycosis. In: Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. Histopathology of Mycotic Diseases. Wolfe Medical Publications, Atlanta 1998; 42-9.
7. McGinnis MR Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. J Am Acad Dermatol 1983; 8: 1-16.
8. Rippon JW. Chromoblastomycosis. In: Rippon JW. Medical Mycology. 3a. ed. WB Saunders Company, Philadelphia 1998; 276-96.
9. Sánchez-Mirt A, Pérez-Blanco M, Caleiras E, Rangel O Histopatología y Ultraestructura de la cromomicosis causada por *Cladosporium carrionii*. Invest Clin 1995; 36: 173-182.
10. Azulay RD Histopatologia da Cromoblastomicose. An. 2^a. Reunião Ass Derm Sífil Brasil 1947; 205-210, Anais SBD.
11. Bopp C. Cromoblastomicose: Contribuições ao Estudo de alguns de seus aspectos (Tese). Porto Alegre (RS): UFRGS 1959; 290.

12. Copra S, Veja-lópez F Skin granulomas in clinical practice. In: Geraint James D, Zumla A. The granulomatous disorders. 1st ed. Cambridge University, Cambridge 2003; 485-527.
13. Pinkus E, Mehregan AH. Mixed cell granulomas. In: Pinkus E, Mehregan AH. Pinkus' Guide to Dermatohistopathology. 4th ed. Appleton-century-crofts, Connecticut 1986; pp 277-298.
14. Strutton G. The granulomatous reaction pattern. In: Weedon D. The skin. 3rd ed. Churchill Livingstone, London 1992; pp 181-207.
15. Tibiriçá PQT. Anatomia Patológica da Dermatite Verrucosa Cromomycótica. Tese. Fac Méd Univ S Paulo 1939; pp 190.
16. Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. Mycopathologia 1989; 105: 1-6.
17. Boros DL. Granulomatous Inflammations. 3a. ed. Detroit 1995: pp 191-95.
18. Romano MS. Histopatología de las micosis profundas de mayor frecuencia en el Noroeste Argentino. Arch Argent Dermatol 1996; 46: 175-182.
19. Hirsch BC, Johnson WC. Pathology of granulomatous diseases. Mixed inflammatory granuloma. Int J Dermatol 1984; 23: 585-97.
20. Esterre P, Peyrol S, Guerret S, Saint-Maire D, Pradinaud R, Grimaud JA. Cell-matrix Patterns in the Cutaneous Lesion of Chromomycosis. Path Res Pract 1992; 188: 894-900.
21. Esterre P, Peyrol S, Sainte-Marie D. Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromomycosis. Virchows Archiv A Pathol Anat 1993; 422: 285-91.
22. Ricard-Blum S, Hartmann DJ, Esterre P. Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. Eur J Clin Invest 1998; 28:748-54.

23. Uribe F, Leon W, Velasquez JP. Modificaciones tisulares a nivel de la piel en algunas micosis. *Acta Med Colomb* 1982; 7: 171-179.
24. Walter P, Garin Y, Richardd-Lenoble D. Chromoblastomycosis. *Virchows Arch Pathol Anat* 1982; 397: 203-214.
25. 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: 51-61.
26. Pérez-Blanco M et al. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Med Mycol* 2006; 44:467-71.
27. Pradhan SV et al. Chromoblastomycosis in Nepal: a study of 13 cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007; 73:176-8.
28. Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: current concerns. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005; 46:81-6.
29. Siala E, Gastli M, Ben Abdallah R, Barbouche R, Zallaga N, Bouratbine A, Aoun K. Recurrent chromomycosis of the face and extremities: first case report from libya. *Med Trop* 2007; 67:69-71.
30. López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; 25:188-94.
31. Milan CP, Fenske NA. Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin* 1989; 7:219-25.
32. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44:1-7.
33. Attapattu MC. Chromoblastomycosis—a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. *Mycopathologia* 1997; 137:145-51.
34. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* 1999; 143:171-5.

35. 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; 48:85-9.
36. Sousa MG, Azevedo Cde M, Nascimento RC, Ghosn EE, Santiago KL, Noal V, Bomfim GF, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DW, Almeida SR. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *J Leukoc Biol* 2008; 84:864-70.
37. Mazo Fávero Gimenes V, Da Glória de Souza M, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Vagner de Castro Lima Santos D, Pedroso e Silva Cde M, Almeida SR. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect* 2005; 7:708-13.
38. Salgado CG, da Silva MB, Yamano SS, Salgado UI, Diniz JA, da Silva JP. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol* 2008; 104:108.
39. Michalany J, Michalany NS. A new morphological concept and classification of granulomatous inflammation: the polar granulomas. *International Journal of Dermatology* 2008; 16: 574 – 579.
40. Michalany J, Michalany NS. Histogenic differentiation of polar tuberculoid granuloma and the "benign" or "malignant" behaviour of hanseniasis. *Hansenol Int* 1989; 14:83-6.
41. Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev* 2004; 201:168-79.

Table 1 – Clinical and epidemiological data on 79 patients with CBM treated at Dermatology Service, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

CHARACTERISTICS	VALUES
Patient's average age (years)*	46,3
Average time of evolution of the disease (years)*	4,9
Gender	
Male	47 (59%)
Female	32 (41%)
Ethnics	
Caucasian	58 (73%)
African-american	17 (22%)
Not specified	4 (5%)
Type of biopsied lesion	
Flat	24 (30%)
Elevated	55 (70%)
Anatomic regions	
Head or neck	11 (14%)
Shoulders or chest	14 (18%)
Abdomen or buttocks	11 (14%)
Upper limbs	17 (22%)
Lower limbs	26 (33%)

* Characteristics presented as means, the other characteristics were presented in n (%)

Table 2 – Association between skin lesion and the expressivity of respective histopatological findings in 79 patients diagnosed with CBM: the polarity concept.

Histopathological findings	Dermatological lesion (N=79)				P	OR	CI95%
	Elevated (N=55)		Flat (N=24)				
	HI "malignant behaviour"	LI "benignal behaviour"	HI "malignant behaviour"	LI "benignal behaviour"			
- Cells:							
- group A cells (phagocitic mononuclear system)	41 (75%)	14 (25%)	8 (33%)	16 (67%)	<0,001	11,88	9,57-17,59
- group B cells (phagocitic polimorfonuclear system)	45 (82%)	10 (18%)	9 (38%)	15 (62%)	<0,001	16,90	12,68-19,50
- group C cells (lymphoplasmocytic infiltrate)	40 (73%)	15 (27%)	7 (29%)	17 (71%)	<0,001	11,48	9,01-17,70
- MOMG (A+B+C)	42 (76%)	13 (24%)	8 (33%)	16 (67%)	<0,001	14,06	12,02-16,42
- Pathogenical agents:							
- fungi	44 (80%)	11 (20%)	8 (33%)	16 (67%)	<0,001	18,53	13,70-21,27
- Structural elements:							
- fibrosis	51 (93%)	4 (7%)	7 (29%)	17 (71%)	<0,001	32,29	19,90-40,77
- transepithelial elimination	19 (35%)	36 (65%)	16 (67%)	8 (33%)	<0,001	0,26	0,09-0,41
- ulceration	45 (82%)	10 (18%)	6 (25%)	18 (75%)	<0,001	13,50	8,78-15,23
- pseudoepitheliomatous hyperplasia	50 (91%)	5 (9%)	7 (29%)	17 (71%)	<0,001	30,06	16,95-42,67
- vascular neoformation	46 (84%)	9 (16%)	6 (25%)	18 (75%)	<0,001	15,33	10,20-19,72
- vasculitis	40 (73%)	15 (27%)	6 (25%)	18 (75%)	<0,001	12,13	8,86-18,17
- MEAN (structural elements)	42 (76%)	13 (24%)	8 (33%)	16 (67%)	<0,001	14,06	12,02-16,42

HI (high intensity on histopathological findings ++ to +++); LI (Low intensity on histopathological findings 0 to +); Group A (giant cells and macrophages); Group B (eosinophils and neutrophils); Group C (lymphocytes and plasma cells).

Table 3 – Association between HI of cellular and structural findings and HI of fungi in elevated lesions.

Cellular and Structural elements	Fungi		
	p	OR	CI95%
Group A	<0,001	23,72	18,76-27,99
Group B	<0,001	35,66	23,76-45,11
Group C	<0,001	19,98	16,77-30,98
Fibrosis	<0,001	32,73	20,29-43,17
Transepithelial elimination	<0,001	0,13	0,06-0,31
Ulcerations	<0,001	13,87	9,04-19,21
Pseudoepitheliomatous hyperplasia	<0,001	29,12	16,52-38,79
Vascular proliferation	<0,001	18,88	15,51-27,52
Vasculitis	<0,001	19,09	15,73-29,23

Group A (phagocitic mononuclear system); Group B (phagocitic polimorfonuclear system); Group C (lymphoplasmocytic infiltrate).

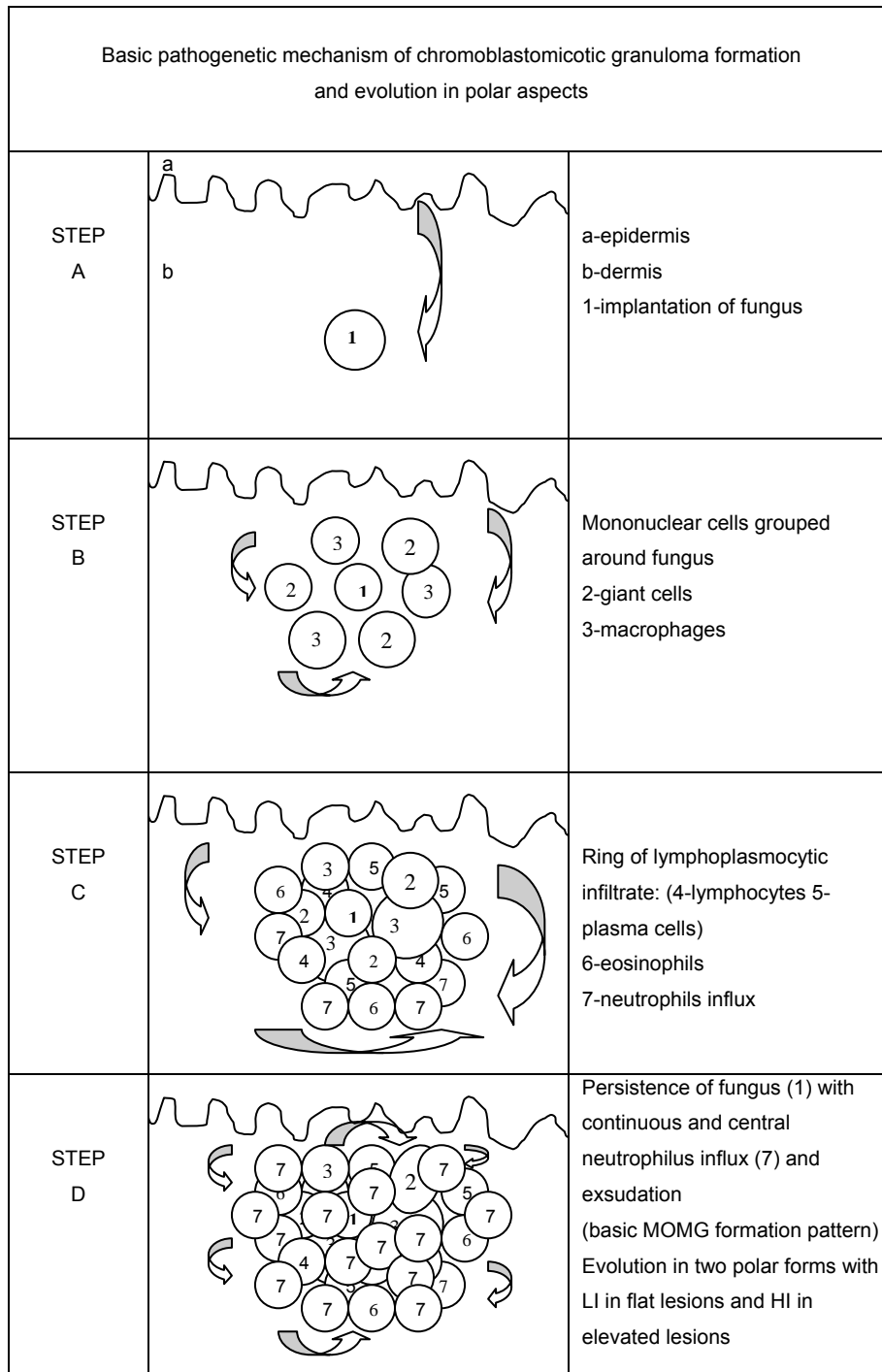


Figure 1 – MOMG formation and evolution through polarity concepts as idealized by authors



Figure 2 – Flat CBM lesion on the elbow.



Figure 3 – Elevated CBM lesion on the trunk.

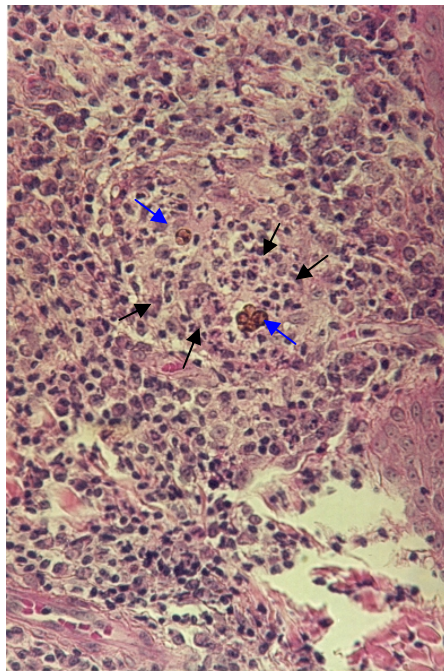


Figure 4 – MOMG. Biopsy of case from figure 3. HI of components. Neutrophilus influx (black arrows) and fungus (blue arrows). HE 20x.

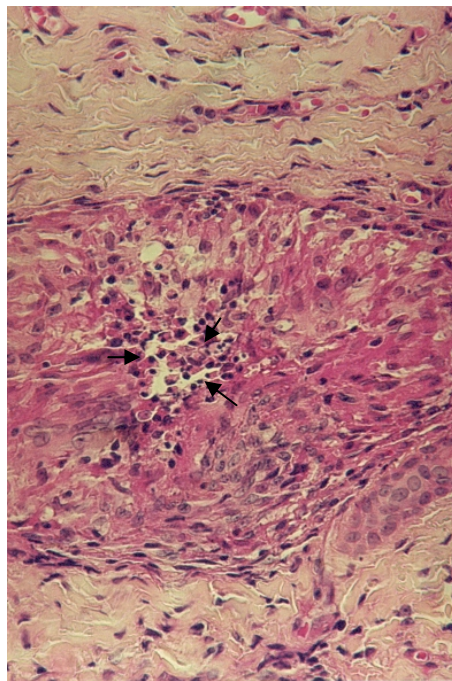


Figure 5 – MOMG. Biopsy of case from figure 2. LI of components including sparse neutrophils (arrows) and absence of fungus in this field (fagocited?). HE 40x.

6.2. Segundo Artigo (Versão em Inglês):

A MORPHOLOGICAL STUDY ON EVOLUTION OF CUTANEOUS CHROMOBLASTOMICOTIC INFECTION BEFORE AND AFTER THERAPIES

Renan Minotto^{1,4*}; Maria Lúcia Scroferneker^{3,4}; Maria Isabel Albano Edelweiss^{2,4,5}.

¹Preceptor, Dermatology Service, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Brazil;

²Professor, Department of Pathology, Faculdade de Medicina, and Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³Professor, Department of Microbiology, Instituto de Biociências, and Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁴Student of Post-Graduate Course in Medicine – Medical Sciences, Doctorate Degree, Emphasis in Dermatology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁵Preceptor, Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

*Correspondence to: Dr. Renan Minotto - Rua Comendador Rheingantz, 750 apto. 701. Bairro Bela Vista - CEP 90450-020 - Porto Alegre, RS - Brasil. E-mail: rminotto@gmail.com

ABSTRACT

This study compared 39 patients with elevated lesions of chromoblastomycosis and 22 patients with flat lesions evaluating the morphological components of biopsies in cases with regular follow-up before and after treatments. Patients with elevated lesions had persistence of high intensity of the histopathological findings (with not significant statistical analysis through odds ratio and $p=0,1$) associated with a unsatisfactory response to therapy and those with flat lesions showed more decreasing of the intensity of this findings (with significant statistical analysis to all elements through odds ratio and $p=0,01$) with a satisfactory response to therapies. After treatments the relative risk of high intensity of these components in the elevated lesions were higher than those of flat lesions ($p<0,001$). The high and low intensity of the histopathological elements in association with the type of lesion denoted the presence of polarity of the granulomas in this disease either before or after therapies.

Key words: histopathology, chromoblastomycosis, effect of therapies, macroscopic lesions, subcutaneous mycosis, polar granulomas.

INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) is a fungal infection inducing skin lesions of hard treatment and frequent recurrence with granulomatous lesions associated with various histopathological elements, mainly fibrosis, and presence of dematiaceous fungal agents found intracellular or free in tissues as characteristic thick-walled dark brown spores, measuring 5 to 15 μ in diameter (1-9).

There are different descriptions of granulomas in CBM (10-19), but until now, few authors, like Pinkus (16), and Uribe (14) have described, as characteristic of this fungal

infection, a mixed organized mycotic granuloma (MOMG), a kind of mononuclear granuloma modified by the persistent influx of neutrophils.

The low especificity and some confusions about descriptions of the granulomatous pattern in CBM reported in the literature and the observations of the polar granulomas like that of hanseniasis suggest a concept of polarity in CBM through a in deep analysis and comparing with others diseases where this polarity was reported (4,10,14,16-19,26).

CBM is an infectious disease with a chronic, usually insidious and often debilitating character. It presents a slowly but progressively growing process, not responding to the usual treatments and quite often recurrent (3,4,27,36-38), with few studies in literature about the relationships between type of clinical lesion and microscopical aspects (26,28,30,39-44). Based on these facts, the present study aims to compare the histopathological responses of flat and elevated lesions before therapies and after in bad and good responders.

PATIENTS AND METHODS

This is a historical cohort study with before and after type of analysis without control group. Population included CBM patients at the Dermatology Service, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Brazil, which have a historical research in this pathology by Clovis Bopp (2). The 67 cases seen in the latest years were studied in a sample of demand and included 19 cases from another study underwent by us (3) with 100 individuals. All had positive direct mycological examination, culture and histopathology realized at the first consultation, without treatments, and submitted to a second mycological and biopsy studies after therapies. The study was approved by local ethics committee and identifying data from patients were not revealed.

Inclusion criterions were untreated patients with a first biopsy and mycological studies who underwent to usual therapies described in literature for CBM and followed at least for 6

months with a second biopsy and mycological study for control and the exclusion ones were interruption of treatments, insufficient material in the paraffin blocks of biopsies, absent of mycological studies and individuals not followed with regularity.

The macroscopic aspect of the biopsied dermatological lesion, before and after treatment, was classified into two types: flat (for erythematous, scaly, squamous, desquamation and atrophic) and elevated (for verrucous, vegetant, nodular and papulous).

The microscopic aspects were studied in slides, staining with hematoxylin-eosin (HE) and Grocott's methenamine silver (GMS) and examined by two observers (RM and MIE) blinded to the clinical data, and the analysis consisted of a semiquantitative analysis of the cell subsets and morphological elements of extracellular matrix in the inflammatory infiltrates (seen on tables 1, 2 and 3) that was performed by counting ten high-power fields (400x), in consensus by the two examiners, and the presence of each component were coded in degrees of intensity by a model of semiquantitative analysis already established in the past by Bopp (2), Uribe (14), Minotto (4) and D'Ávila (26) and adapted to this study, and classified as high intensity (HI), when show an intensity of ++ (frequent) to +++ (multiplicity), and as low intensity (LI) when the intensity was 0 (absent) to + (paucity). These findings were associated with the type of dermatological lesion biopsied before and after therapies.

All the patients were treated with combined strategies preconized in the literature for CBM (systemic antifungal drugs like terbinafine, itraconazole, amphotericin B, fluconazole, and more invasive methods like intralesional antifungals, surgery and cryosurgery).

The average time length between the first biopsy taken before and the second one taken after therapies was 7.1 months (ranging from 6 to 9 months). The second biopsy was taken in order to verify the histological pattern when it comes to clinical improvement or not besides the mycological tests, according to protocols of the Dermatology Service.

The authors selected patients who had biopsies before and after treatments, and direct and cultural mycological studies before and after treatments. Based on protocols established in the past by Bopp (2) and the recordings in the patients' files in the latest years, the authors

standardize the evolutionary pattern of the disease and create a denomination, with the patients been dichotomized in two categories: “bad responders” to therapy and “good responders” to therapy. A “bad response” to therapy was observed when the dermatological lesion did not improved and there were persistence of fungi at mycological studies after therapies. A “good response” to therapy was observed when the dermatological lesion improved and there were not persistence of fungi at mycological studies after therapies. The authors decided to analyse this cases in the flat and elevated type of lesions (diagram 1) according to this classification, and in cases with regular follow up the biopsies were analyzed for detecting intensities of all the histological elements, and compared them before and after therapies to detect differences that reflected these responses.

Analysis were realized with Qui-square test and Fisher’s exact test with Yates correction and test of McNemar, with Odds Ratio (OR) and Relative Risk (RR) with confidence interval of 95% (CI 95%). A significance level of 5% was used. The Epi Info program version 3.5.1 and the SPSS program version 16.0 were used for the statistical analysis.

RESULTS

The fungal agent encountered in all cases was *F pedrosoi*.

Results of macroscopic analysis on skin lesions have shown that patients should be divided in two groups: the ones who present flat lesions and those who present elevated lesions. Macro and microscopic analysis of the lesions have shown evidence that CBM is a polar disease, either before or after treatment. There are distinctive predominance of flat or elevated lesions on each patient and histological types showing predominance on microscopic components either with low or high intensity, respectively.

The study included 67 patients who were divided into two groups, according to the clinical course of disease and to the type of dermatological lesion (diagram 1): 24 (36%) of them had flat and 43 (64%) had elevated lesions, biopsied before and after therapies. “Bad responders” ’ cases were found in 61% and out of these, 5% were flat lesions and 95% were elevated lesions. “Good responders” ’ cases were 39%, with 85% of flat lesions and 15% of elevated lesions. Flat lesions had “bad response” to therapy in 8% and “good response” in 92%. Elevated lesions were “bad responders” in 91% and “good responders” in 9% after therapies (diagram 1). According to the inclusion and exclusion criterions, 61 patients (22 flat lesions and 39 elevated lesions) had their biopsies analysed histopathologically before and after treatments, performing a total of 122 biopsies studied (tables 1, 2 and 3).

Table 1 shows these flat lesions before and after therapies and several elements such as mixed organized mycotic granuloma and many others components including fungi and fibrosis were analysed morphologically and their intensity were numbered and their percentage described (n (%)) with odds ratio and 95% confident interval. To this cited elements, we found a high intensity in 32%, 36% and 36%, before and after treatment they showed 14%, 5% and 5%, respectively. The probability (OR) of this components to be higher before therapies were 6,71, 11,80 and 11,80.

Table 2 shows those elevated lesions before and after treatments with the same elements analysed but no statistical significances were found.

Table 3 presents the elevated and flat lesions after treatments. Here, the relative risk (RR) of MOMG to have higher intensity in elevated lesions was 30,31. The risk of fungi to be higher in elevated lesions was 55,60 and the risk of fibrosis to be more intensity in these elevated lesions was 58,36. As seen on tables 1 and 3, flat lesions (considered “good responders” cases), despites the negative mycological examination, had 5% of HI for fungus on biopsies.

Macroscopical lesions of CBM before treatment are seen in figures 1 (elevated) and 3 (flat), and after treatment in figures 2 (elevated) and 4 (flat). Microscopical aspects of

biopsied lesions before treatments can be seen in figures 5 (elevated) and 7 (flat), and after therapies in figures 6 (elevated) and 8 (flat).

After treatment, elevated lesions' cases had persistence or recrudescence of the disease ("bad responders" to therapy), some of them developed *de novo* lesion in the same site of the apparent cured lesion, and another biopsy was taken in this same recrudescence site. Another group of flat lesions' patients biopsied after therapies had no persistence or recrudescence ("good responders"). Results of microscopic analysis before and after treatment on "good" (flat lesions) and "bad" (elevated lesions) responders are shown on tables 1 and 2 and on table 3 we compares the two groups after treatments. Despite that, 2 cases of flat lesions were "bad responders" and 4 cases of elevated lesions were "good responders" (diagram 1).

DISCUSSION

CBM is a fungal disease whose pathogenic events may be better understood and its histopathology findings better associated with clinical aspects. The treatment shows poor effectiveness and serious side effects. The disease is epidemiologically important in several geographic regions, which has triggered studies focused on the biology and pathogenic mechanisms during the interaction of fungi with different hosts' elements (20,24,25,32,35,39,44). CBM is difficult to treat, frequently recurrent, frequently resistant and refractory to multiple systemic and local treatments, and advanced disease may impair individual's quality of life (3,4,21-23,30,31,33,34,37). However, little is known regarding the pattern of histopathological aspects in flat and elevated lesions before and after therapies.

In recent literature (26), in a survey of 19 patients, without treatment, it was observed two types of tissue reaction in biopsies according to type of lesion: the cutaneous lesion presenting as a verrucous plaque (15 cases of elevated lesions) had a granulomatous

reaction with a suppurative granuloma (MOMG with high intensity of the elements) with several fungi cells. It was suggested that patients with this type of lesion have a type Th2 immunological response (“bad response” to therapy), while in erythematous atrophic plaque (4 cases of flat lesions) had a granulomatous reaction less suppurative resembling a tuberculoid granuloma (MOMG with low intensity of the elements) with few fungi cells and a type Th1 response (“good response” to therapy). These findings confirm the hypotheses that CBM is a polar disease relating either to polar granuloma or polar lesions respectively.

Authors (18) had classified the granulomas in type 1 and type 2. The type 1 granuloma had Th1-type T-cell, epithelioid cells, macrophages and giant cells as we observed in flat lesions. The Type 2 granuloma had Th2-type T-cell, mast cells, eosinophils and macrophages as we observed in elevated lesions.

Besides that, the host defense mechanism in CBM has also not been thoroughly extensively investigated, and the cell-mediated immunity in patients with long-standing chromoblastomycosis is somehow impaired, with monocytes from patients with different clinical forms of chromoblastomycosis present distinct phenotypic and functional profiles (44). In another study (39), focused on fungus-host interaction, although phagocytosis did occur, death of fungal cells was rarely observed, maybe by the ability of *Fonsecaea pedrosoi* to produce secreted or cell wall-associated melanin-like components, protecting against destruction by host immune cells in vitro. Until now, according to these studies, the T cell immune response in chromoblastomycosis is undefined, and in the patients with the severe form of the disease (elevated lesions), an inefficient T cell proliferation were induced. In contrast, in patients with a mild form of the disease (flat lesions), an efficient T cell proliferation was observed.

As seen on table 1 (flat lesions), before treatments, the entire elements available have showed low intensity, with exception of transepithelial elimination (TE) with 68% and after we observed more decrease of all them, in contrast of TE (45%). On table 2 (elevated lesions), TE was 36% and the others components were higher and after therapies, this same pattern

persists. In “bad responders” cases (elevated dermatological lesions), we observed low intensity of transepithelial elimination and noted important aspects of fibrosis like prominent thickness and a high intensity of fungus, different from “good responders” cases (flat dermatological lesions), where there was a major prominent of transepithelial elimination with lower intensity of fungus and fibrosis. Statistical analysis revealed $RR=0,58$ (table 3) denoting a “protective” aspect of the elevated lesions (maybe by fibrosis) on the elimination of the fungi. The fibrosis is an important aspect in CBM (45-48) that can be associated with “bad response” to the therapy because it may impair the diffusion of antifungal drugs in affected tissues and prevent its access from destroying fungal structures, leading to a poor prognostic due to a persistent and expressive dermal fibrosis in elevated lesions and we have noted many mast cells surrounded fibrosis. This relationship of fibrosis, mast cells and fungus is not totally understood in CBM, and the use of antifibrotic drugs combined with antifungal drugs in “bad responders” ’ cases could be tried. A study (36) has evaluated the distribution of collagen type 1 characterized by immunohistochemical with antimetaloproteinases 1 and 9 on CBM lesions before and after being treated with terbinafine. After one year of therapy there was a decrease of collagen type 1 synthesis and partial improvement of fibrosis unrelated to the cure of the fungal infection.

CBM was recalcitrant in 61% of the cases (diagram 1) with the elevated lesions corresponding to 95% of these cases, and the flat 5% showing an important prognostic value for the type of macroscopic dermatological lesion in this disease. Thus, in CBM, the kind of macroscopic lesion allows to infer a prognosis provided that there was evidence that 91% of elevated dermatological lesions were recalcitrant and 8% of flat lesions were also recalcitrant, despites the therapies. We observed “bad responses” in 2 flat lesions and we observed “good responses” in 5 elevated lesions, but this cases had an irregular follow up.

Of the 67 patients of this study, 61 have had long follow-ups, and the “bad responders” ’ cases have had new courses of treatment, and periodic biopsies to be explored in another survey.

Recent studies have shown that both elevated and flat lesions have been presented in smaller dimensions maybe due to the diagnosis at earlier stages of the disease. Comparing to the literature (41), the incidence of other surrounding sites of infection had increased like upper extremities, face, neck, and buttocks, and when compared to reports in the past (30,37,39-41,43,44,48), cases affecting the lower extremities had decreased (figure 9 and 12), whilst cases involving others sites had increased (figures 10 and 11).

A recent report (41) of a woman with a very small, erythematous and scaly lesion of CBM on the superior limb confirms all these aspects. When the patient presents this type of lesion, the treatment could be surgical excision of the lesion with margins, with a major possibility of a follow up with no recurrence. Overall, the treatment for this kind of CBM lesion could be either by oral administration of antifungal agents, excision, or a combination of these methods.

Another recent paper (30) describes cases of chromoblastomycosis (CBM) in children and adolescents all resided in a CBM endemic area in the semi-arid zone of the Venezuela. Lesions consisted of erythematous, desquamation or squamous plaques located primarily on the upper limbs. In this report, another alternative of treatment could be with topical 5-fluorouracil and electrodesiccation and/or fulguration, and in bad responder's cases associated with oral itraconazole. These cases emphasize the importance of early diagnosis in difficult-to-treat mycotic diseases such as CBM. By early intervention we were able to employ topical treatment with a minimum of adverse effects to achieve a high percentage of favorable therapeutic responses. Thus, the patients are able to avoid the evolution of the chronic, deforming and incapacitation clinical manifestations associated with CBM.

In a CBM case (43) of a healthy man with a solitary and small elevated lesion located on the right thigh, the patient was treated with oral itraconazole, with a good response and clinical cure in 6 months that left only an atrophic scar. It seems that lesions located on the upper limbs respond to treatment more effectively than the lesions located on the lower

limbs. However, solitary and recent small lesions, either elevated or flat on lower limbs appears respond positively to the treatment as well.

We have observed in the patients' files of our Dermatology Service good results with cryosurgery in association with 200 mg/day of itraconazole for flat lesions and for elevated lesions surgical excision and 200mg of itraconazole in both cases for a period of time at least for six months.

Comparing to other fungal diseases, sporotrichosis is another subcutaneous mycosis with different clinical forms like cutaneous lymphangitic form and fixed cutaneous form, where itraconazole leading to good results (49,50). In a survey (49), it was used orally 400 mg/day for one week with a 3-week break (pulses); thereafter the drug was administered as pulses until clinical and mycological cure was achieved. No patient had side effects and no laboratory test abnormalities occurred. Intermittent or pulsed itraconazole was effective in treating cutaneous sporotrichosis. We suggest that it may be considered as a new treatment choice and maybe useful in small CBM lesions.

Despite the "good response" to therapy, with negative mycological tests, when the slides were reexamined, we found a case of flat lesion with HI of fungi. Based on this fact, the authors concluded that either in flat or elevated lesions fungi may be hidden in regions of more fibrosis, difficult to access on scraping for mycological examination, and this observation reveals the importance of biopsy for control of treatments.

Patients who had "good response", though microscopic study presenting LI of fungus (almost all absent) have shown mostly destroyed fungi with clinical and mycological remission of the disease, whereas patients had "bad response" on the treatment, presenting HI with several and not destroyed fungi. We have perceived in the follow up that a macroscopic lesion hasn't changed its original characteristics either they were flat or elevated. During the clinical evolution after treatment, flat lesions improved the dermatological characteristics and cosmetic patterns better than an elevated lesion. Some elevated lesions have improved by being less relief, maybe to the surgical proceedings,

better in clinical and cosmetic patterns, but still presented hardness and elevations due to fibrosis and pseudoepitheliomatous hyperplasia with lesser significant results than flat lesions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Prof. Dr. Roberto Gervini, head of the Dermatology Service and to Prof. Dr. Mauro Soibelman, head of Division for Research, both of Santa Casa de Porto Alegre, and the staff of Center for Experimental Research at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

1. Walter P, Garin Y, Richardd-Lenoble D. Chromoblastomycosis. *Virchows Arch Pathol Anat* 1982; 397: 203-214.
2. Bopp C. Cromoblastomicose: Contribuições ao Estudo de alguns de seus aspectos (Tese). Porto Alegre (RS): URGs 1959; p. 290.
3. Minotto R, et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul , Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 585-92.
4. Minotto R. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos e histopatológicos. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica com ênfase em Dermatologia. UFRGS. 2003; p. 181.
5. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 1-16.
6. Romano MS. Histopatología de las micosis profundas de mayor frecuencia en el Noroeste Argentino. *Arch Argent Dermatol* 1996; 46: 175-182.

7. Uribe F, Leon W, Velasquez JP. Modificaciones tisulares a nivel de la piel en algunas micosis. *Acta Med Colomb* 1982; 7: 171-179.
8. Sánchez-Mirt A, Pérez-Blanco M, Caleiras E, Rangel O. Histopatología y Ultraestructura de la cromomicosis causada por *Cladosporium carrionii*. *Invest Clin* 1995; 36: 173-182.
9. Carrión AL. Chromoblastomycosis and related infections. *Int J Dermatol* 1975; 14: 27-32.
10. Reis LF, Ventura TG, Souza SO, Arana-Pino A, et al. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifillyne on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 107-1.
11. Esterre P, Peyrol S, Sainte-Marie D. Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993; 422: 285-91.
12. Boros DL. Granulomatous Inflammations. 3a. ed. Detroit 1995; pp. 191-95.
13. Esterre P, Peyrol S, Guerret S, Saint-Maire D, Pradinaud R, Grimaud JA. Cell-matrix Patterns in the Cutaneous Lesion of Chromomycosis. *Path Res Pract* 1992; 188: 894-900.
14. Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis 1989; *Mycopathologia* 105: 1-6.
15. Hirsch BC, Johnson WC. Pathology of granulomatous diseases. Mixed inflammatory granuloma. *Int J Dermatol* 1984; 23: 585-97.
16. Pinkus E, Mehregan AH. Mixed cell granulomas. In: Pinkus E, Mehregan AH. *Pinkus' Guide to Dermatohistopathology*. 4th ed. Appleton-century-crofts, Connecticut 1986; pp. 277-298.
17. Strutton G. The granulomatous reaction pattern. In: Weedon D. *The skin*. 3rd ed. Churchill Livingstone, London 1992; pp. 181-207.

18. Copra S, Veja-lópez F. Skin granulomas in clinical practice. In: Geraint James D, Zumla A. The granulomatous disorders. 1st ed. Cambridge University, Cambridge 2003; pp. 485-527.
19. Ricard-Blum S, Hartmann DJ, Esterre P. Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:748-54.
20. Silva CL, Fazioli RA. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *J Med Microbiol* 1985; 20: 299-305.
21. Caligiorne RB, Resende MA, Melillo PHC, Peluso CP, Carmo FHS, Azevedo V. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. *Medical Mycology* 1999; 37: 405-409.
22. Bedout C, Gómez BI, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *F. pedrosoi* to antifungals. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39: 145-148.
23. Restrepo A. Treatment of tropical mycosis. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 91-102.
24. Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, et al. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia* 2006; 161: 195–203.
25. Sotto MN, T. De Brito T, Silva AMG, Vidal M, et al. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 14–18.
26. 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: 51-61.
27. Pereira da Silva J, Batista da Silva M, Salgado UI, Diniz JAP, et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 104–111.

28. Pradhan SV et al. Chromoblastomycosis in Nepal: a study of 13 cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007 ;73:176-8
29. Pérez-Blanco M et al. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Med Mycol.* 2006; 44:467-71.
30. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19:148-52.
31. Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: current concerns. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2005; 46:81-6.
32. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16: 91-6.
33. Silveira F, Nucci M. Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14: 679-84.
34. Brandt ME, Warnock DW. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother.* 2003; 15: 36-47.
35. Alviano DS, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect Immun.* 2004; 72: 229-37.
36. Esterre P, Risteli L, Ricard-Blum S. Immunohistochemical study of type I collagen turn-over and of matrix metalloproteinases in chromoblastomycosis before and after treatment by terbinafine. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 847-53.
37. Siala E, Gastli M, Ben Abdallah R, Barbouche R, Zallaga N, Bouratbine A, Aoun K. Recurrent chromomycosis of the face and extremities: first case report from libya. *Med Trop* 2007; 67: 69-71.
38. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* 1999; 143: 171-5.
39. Mazo Fávero Gimenes V, Da Glória de Souza M, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Vagner de Castro Lima Santos D, Pedroso e Silva Cde M, Almeida

- SR. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect* 2005; 7:708-13.
40. Salgado CG, da Silva MB, Yamano SS, Salgado UI, Diniz JA, da Silva JP. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol* 2008; 104:108.
41. 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; 48:85-9.
42. Pérez-Blanco M, Hernández Valles R, García-Humbría L, Yegres F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Med Mycol* 2006; 44:467-71.
43. Menezes N, Varela P, Furtado A, Couceiro A, Calheiros 3 I, Rosado 4 L, Mota G, Baptista A. Chromoblastomycosis associated with *Fonsecaea pedrosoi* in a carpenter handling exotic woods. *Dermatol Online J* 2008; 14:9.
44. Sousa MG, Azevedo Cde M, Nascimento RC, Ghosn EE, Santiago KL, Noal V, Bomfim GF, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DW, Almeida SR. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *J Leukoc Biol* 2008; 84:864-70.
45. Attapattu MC. Chromoblastomycosis—a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. *Mycopathologia* 1997; 137:145-51.
46. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44:1-7.
47. Milam CP, Fenske NA. Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin* 1989; 7:219-25.
48. López Martínez R, Méndez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; 25:188-94.

49. Bonifaz A, Fierro L, Saúl A, Ponce RM. Cutaneous sporotrichosis. Intermittent treatment (pulses) with itraconazole. Eur J Dermatol 2008; 18:61-4.
50. Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V, Fierro L, Rosales A, Palacios C, Araiza J. Sporotrichosis in childhood: clinical and therapeutic experience in 25 patients. Pediatr Dermatol 2007; 24:369-72.

Diagram 1. Skin lesion and therapeutical responses in 67 cases of CBM

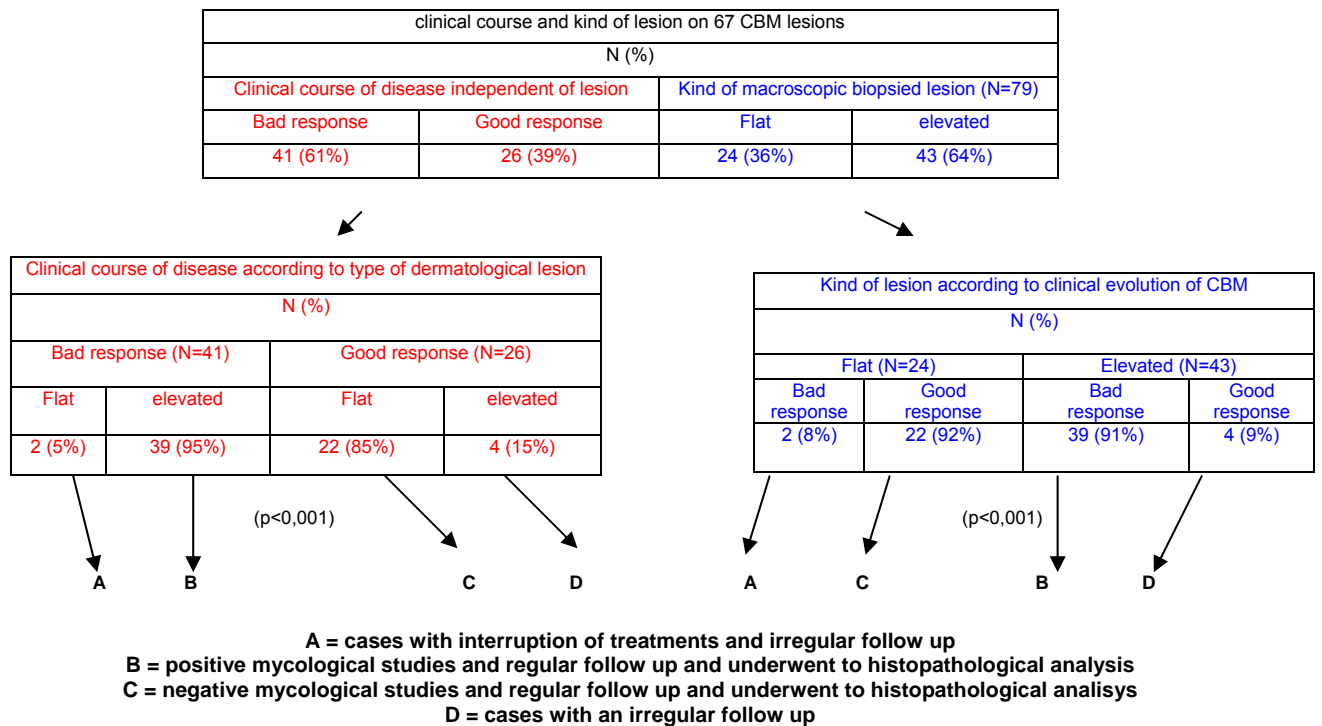


Table 1 – Frequencies of intensity of morphological elements in skin biopsies of CBM from 22 patients with flat lesions, before and after therapies.

KIND OF MICROSCOPIC COMPONENTS	BEFORE		AFTER		p	OR	CI95%
	N (%)		N (%)				
	HI	LI	HI	LI			
Cells							
Group A cells	7 (32%)	15 (68%)	3 (14%)	19 (86%)	0,01	6,71	4,89-10,30
Group B cells	8 (36%)	14 (64%)	4 (18%)	18 (82%)	0,01	5,37	3,57-8,70
Group C cells	7 (32%)	15 (68%)	3 (14%)	19 (86%)	0,01	6,71	4,89-10,30
MOMG (A+B+C)	7 (32%)	15 (68%)	3 (14%)	19 (86%)	0,01	6,71	4,89-10,30
Pathogenical agents							
Fungi	8 (36%)	14 (64%)	1 (5%)	21 (95%)	0,01	11,80	7,98-17,26
Structural elements							
Fibrosis	8 (36%)	14 (64%)	1 (5%)	21 (95%)	0,01	11,80	7,98-17,26
Transepithelial elimination	15 (68%)	7 (32%)	10 (45%)	12 (55%)	0,01	7,71	5,32-14,40
Ulceration	5 (23%)	17 (77%)	3 (14%)	19 (86%)	0,01	3,94	2,92-7,47
Pseudoepitheliomatous hyperplasia	8 (36%)	14 (64%)	1 (5%)	21 (95%)	0,01	11,80	7,98-17,26
Vascular neoformation	5 (23%)	17 (77%)	3 (14%)	19 (86%)	0,01	3,94	2,92-7,47
Vasculitis	5 (23%)	17 (77%)	3 (14%)	19 (86%)	0,01	3,94	2,92-7,47
MEAN (structural elements)	8 (36%)	14 (64%)	4 (18%)	18 (82%)	0,01	5,37	3,57-8,70

HI (high intensity of histopathological findings ++ to +++); LI (Low intensity of histopathological findings 0 to +); MOMG (mixed organized mycotic granuloma); Group A cells (Giant cells and Macrophages); Group B cells (Neutrophils and Eosinophils); Group C cells (Lymphocytes and plasma cells).

Table 2 – Frequencies of intensity of morphological elements in skin biopsies of CBM from 39 patients with elevated lesions before and after therapies.

KIND OF MICROSCOPIC COMPONENTS	BEFORE		AFTER		p	OR	CI95%
	N (%)		N (%)				
	HI	LI	HI	LI			
Cells							
Group A cells	30 (76%)	9 (24%)	26 (67%)	13 (33%)	0,1	2,08	0,56-6,29
Group B cells	32 (83%)	7 (17%)	31 (80%)	8 (20%)	0,1	1,28	0,37-3,37
Group C cells	29 (74%)	10 (26%)	26 (67%)	13 (33%)	0,1	2,02	0,50-5,91
MOMG (A+B+C)	30 (76%)	9 (24%)	28 (72%)	11 (28%)	0,1	2,05	0,52-6,01
Pathogenical agents							
Fungi	31 (80%)	8 (20%)	26 (67%)	13 (33%)	0,1	2,77	0,81-7,69
Structural elements							
Fibrosis	35 (91%)	4 (9%)	30 (76%)	9 (24%)	0,1	2,88	0,92-8,12
Transepithelial elimination	14 (36%)	25 (64%)	9 (24%)	30 (76%)	0,1	0,56	0,11-1,68
Ulceration	32 (83%)	7 (17%)	30 (76%)	9 (24%)	0,1	2,03	0,51-5,93
Pseudoepitheliomatous hyperplasia	36 (93%)	3 (7%)	31 (80%)	8 (20%)	0,1	2,79	0,89-7,85
Vascular neoformation	33 (85%)	6 (15%)	29 (74%)	10 (26%)	0,1	2,28	0,66-6,92
Vasculitis	29 (74%)	10 (26%)	25 (64%)	14 (36%)	0,1	2,21	0,62-6,88
MEAN (structural elements)	30 (76%)	9 (24%)	26 (67%)	13 (33%)	0,1	2,19	0,60-6,79

HI (high intensity of histopathological findings ++ to +++); LI (Low intensity of histopathological findings 0 to +); MOMG (mixed organized mycotic granuloma); Group A cells (Giant cells and Macrophages; Group B cells (Neutrophils and Eosinophils); Group C cells (Lymphocytes and plasma cells).

Table 3 – Frequencies of intensity of morphological elements in skin biopsies of CBM, according to the 39 patients with elevated lesions and the 22 with flat lesions, after treatments.

KIND OF MICROSCOPIC COMPONENTS	ELEVATED		FLAT		p	RR	CI95%
	N (%)		N (%)				
	HI	LI	HI	LI			
Cells							
Group A cells	26 (67%)	13 (33%)	3 (14%)	19 (86%)	<0,001	26,07	16,59-37,95
Group B cells	31 (80%)	8 (20%)	4 (18%)	18 (82%)	<0,001	38,58	26,05-49,34
Group C cells	26 (67%)	13 (33%)	3 (14%)	19 (86%)	<0,001	26,07	16,59-37,95
MOMG (A+B+C)	28 (72%)	11 (28%)	3 (14%)	19 (86%)	<0,001	30,31	21,50-41,67
Pathogenical agents							
Fungi	26 (67%)	13 (33%)	1 (5%)	21 (95%)	<0,001	55,50	42,42-66,88
Structural elements							
Fibrosis	30 (76%)	9 (24%)	1 (5%)	21 (95%)	<0,001	58,36	45,81-68,53
Transepithelial elimination	9 (24%)	30 (76%)	10 (45%)	12 (55%)	<0,001	0,58	0,42-0,69
Ulceration	30 (76%)	9 (24%)	3 (14%)	19 (86%)	<0,001	36,33	23,69-44,23
Pseudoepitheliomatous hyperplasia	31 (80%)	8 (20%)	1 (5%)	21 (95%)	<0,001	57,11	42,38-67,35
Vascular neoformation	29 (74%)	10 (26%)	3 (14%)	19 (86%)	<0,001	36,75	23,48-44,42
Vasculitis	25 (64%)	14 (36%)	3 (14%)	19 (86%)	<0,001	36,11	23,01-44,15
MEAN (structural elements)	26 (67%)	13 (33%)	4 (18%)	18 (82%)	<0,001	34,28	29,60-49,97

HI (high intensity of histopathological findings ++ to +++); LI (Low intensity of histopathological findings 0 to +); MOMG (mixed organized mycotic granuloma); Group A cells (Giant cells and Macrophages; Group B cells (Neutrophils and Eosinophils); Group C cells (Lymphocytes and plasma cells).



Figure 1 – CBM elevated lesions (arrows) on inferior limb before treatment.

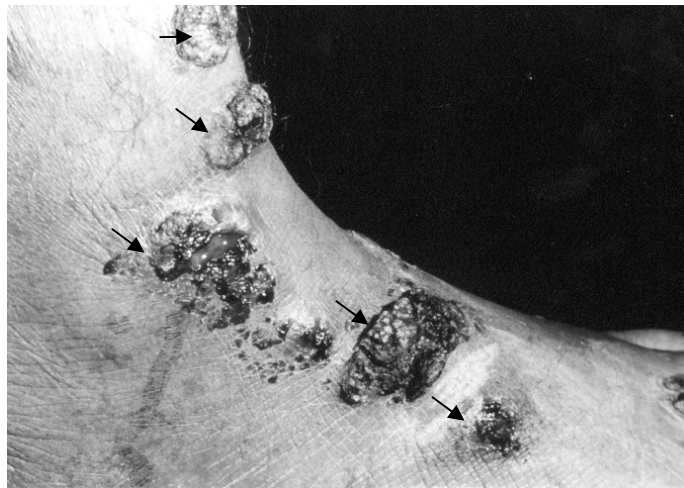


Figure 2 – CBM elevated lesions (arrows) on inferior limb after treatment.

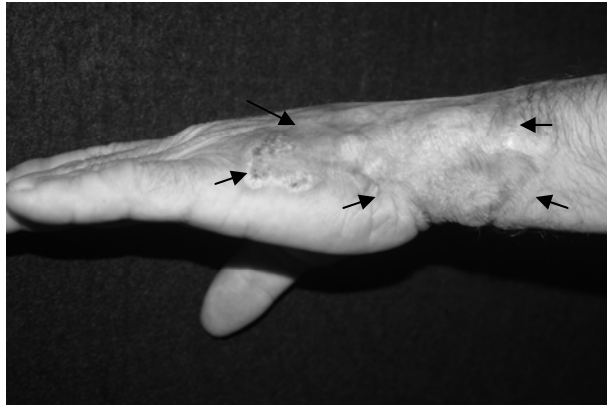


Figure 3. CBM flat and extensive lesion on hand and wrist (arrows showing lesions' borders) before treatment.

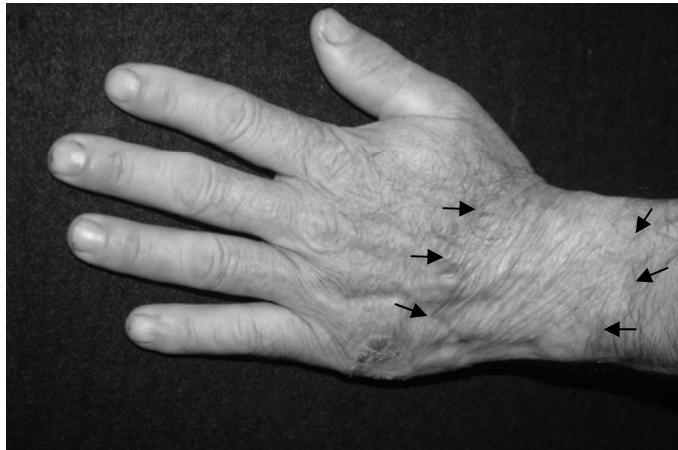


Figure 4. CBM flat and extensive lesion on hand and wrist (arrows showing lesions' borders) after treatment.

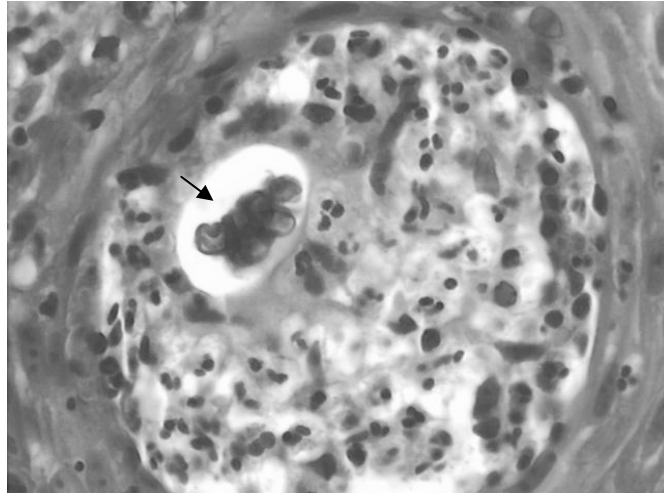


Figure 5 – The case of figure 1, biopsied before treatment. Fungi (arrow).
HE 40x magnification in the original.

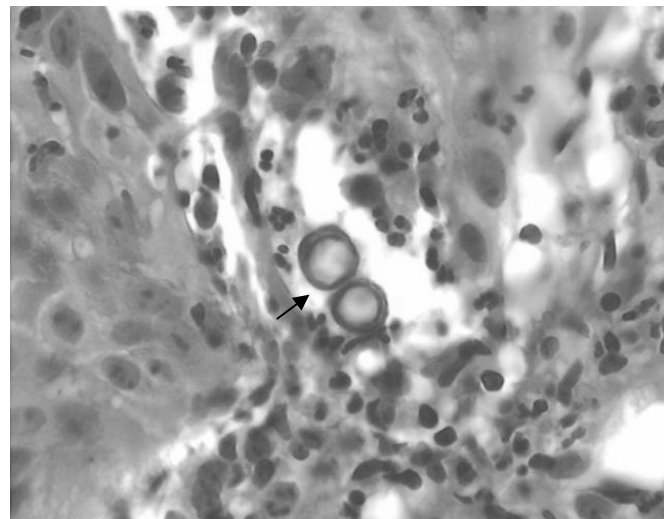


Figure 6 – The case of figure 2, biopsied after treatment. CBM recalcitrant case.
Fungus intact (arrow). HE 40x magnification in the original.

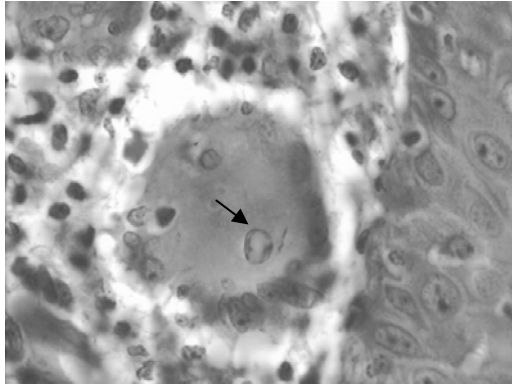


Figure 7. The case of figure 3. Biopsy of flat lesion before treatments showing intact fumagoid corp inside a giant cell. HE 100x in the original.

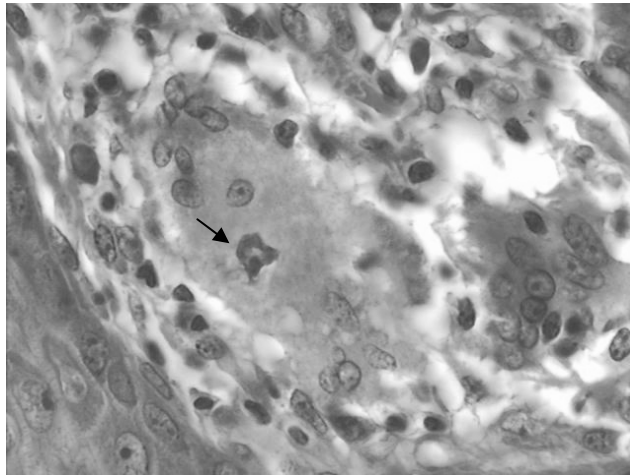


Figure 8. The case of figure 4. Biopsy of flat lesion after treatments showing destroyed fumagoid corp. HE 100x in the original.



Figure 9. Flat CBM lesion (Arrow).



Figure 10. Flat CBM lesion (arrow).



Figure 11. Elevated CBM lesion (arrow).

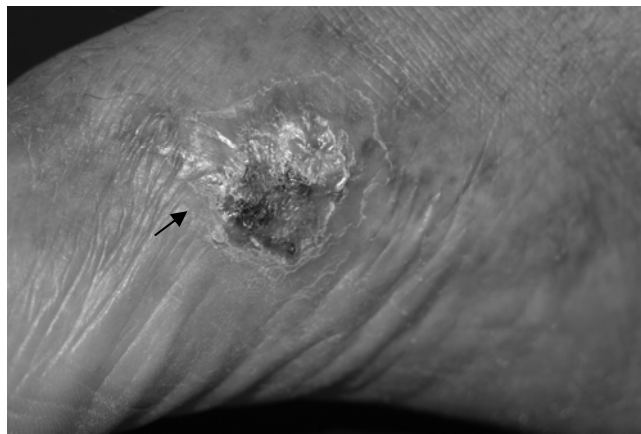


Figure 12. Flat and ulcerated CBM lesion (arrow).



Figure 13. Elevated CBM lesions (arrow).

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Na CBM existe uma formação granulomatosa muito singular, também com expressão em dois pólos, fechando com os conceitos de polaridade de granulomas. Provavelmente, devido ao fato de seu agente causador ter uma estrutura altamente complexa, além de dimensões muito maiores que outros organismos infectivos, muitos outros fatores, inclusive imunológicos também devem estar envolvidos nesta dicotimização, pelo permanente estímulo antigênico de estruturas fúngicas, mesmo daqueles não totalmente destruídos.

Por isto que, ao analisar todos os elementos anatomo-patológicos, percebeu-se que o granuloma existente na CBM apresenta um paralelo com aquele da hanseníase, que seria o modelo para estudo de granulomas polares. Na CBM, a polaridade é detectada pelas nuances de expressividade das estruturas histológicas, que variam de acordo com o tipo plano ou elevado de lesão.

Baseados em idéias e conceitos morfológicos sobre a classificação da inflamação granulomatosa que tratam sobre granulomas polares e as relações entre os graus de diferenciação e comportamento da expressividade dos elementos micro e macroscópicos em lesões de CBM, os autores concluíram que a boa resposta aos tratamentos (melhora clínica e laboratório negativo para fungos: micológico direto, cultural e histologia) em lesões planas e a má resposta (não melhora e positividade do laboratório) em lesões elevadas depende destes graus de diferenciação das lesões. De modo similar com a hanseníase, se a lesão é histologicamente bem diferenciada em direção a um granuloma tuberculóide polar, ela teria um comportamento mais “benigno” (GMMO com baixa intensidade). Ao contrário, se sua diferenciação é ausente ou pobre, o comportamento da lesão seria mais “maligno” (GMMO com alta intensidade). E, de acordo com estes conceitos, o fato dos agentes da CBM serem de baixa virulência, com mecanismos de fagocitose variáveis (completo, com lise ou incompleto, sem lise), reforçam a idéia de dois grupos polares distintos (novamente a

idéia de tuberculóides polares e não tuberculóides polares). Por conseguinte, é possível que possamos aplicar estes mesmos princípios gerais de comportamento de polaridade para a CBM.

Existe a necessidade de um maior esclarecimento sobre a expressividade dos elementos que fazem parte da reação inflamatória cromoblastomicótica, verificando que tipo de estrutura eles formam, e fatores que possam levar a possíveis nuances histológicas apresentadas (como associação com o tipo clínico de lesão), e estabelecer associações com estes diferentes aspectos (como o conceito de polaridade). Além disso, há a curiosidade de conhecer se os diferentes graus de invasão fúngica podem influenciar sobre a frequência da reação fibrótica do tecido conjuntivo nesta doença, e escassez de estudos em nosso meio avaliando as possíveis relações existentes entre vasculite, proliferação vascular, erosão, ulceração, eliminação transepitelial, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e a presença de fungos, em lesões cromoblastomicóticas. É importante ressaltar que existem zonas endêmicas desta doença no Brasil e em outros países, sendo importante verificar novas contribuições que auxiliem em um melhor entendimento, manejo clínico e perspectivas prognósticas. Esta doença tem assumido um caráter crônico, progressivo e recalcitrante, mesmo face à terapêutica vigente, o que torna relevante o estudo dos fenômenos morfológicos vistos em grupo de pacientes.

Com relação às constatações acima, esta pesquisa suscitou alguns equacionamentos, discutidos nos artigos científicos e levantou outras questões para serem estudadas.

Não é conhecida a prevalência, nem a incidência desta doença em nosso estado, pois não é notificada. Tem sido considerada uma doença rara, mas para tal conceito estes dados deveriam ser sabidos. A doença pode estar sendo diagnosticada mais precocemente, ou tratada presuntivamente, ainda nas localidades de origem, sem chegar aos grandes centros urbanos, porém sem uma notificação.

Recentes relatos tratam de outras áreas acometidas além dos membros inferiores. Talvez o fungo, saprófita do solo, vegetais, etc, pode estar presente em outros elementos de manuseio em pessoas com risco de exposição.

Reação fibrosante está presente e é severa nesta doença, em lesões elevadas, mais do que na maioria das outras doenças fúngicas. E por quê? Tem-se visto inúmeros mastócitos nestas lesões. Sabe-se de vários estudos que associam mastócitos à fibrose. Sabe-se que a parede celular destes fungos é altamente antigênica, composta de inúmeras substâncias, entre elas melanina. Poderia haver um mecanismo: fungo -> melanina -> mastócitos -> fibrose? Além disso, como os fungos ficam persistentes, *in situ*, haveria um circuito persistente de antigenicidade perpetuando este processo (fibrose dificultando difusão dos fármacos?)?

Vimos que existe uma associação de tipo de forma clínica com expressividade do granuloma, denotando polaridade na cromoblastomicose. O granuloma presente é o micótico misto organizado, com expressividade variável de acordo com a forma clínica. São necessários mais estudos para ver a resposta Th1 e Th2 e sua associação com estes aspectos: lesão tipo plana -> formação granulomatosa menos supurativa -> resposta Th1. Lesão tipo elevada -> formação mais supurativa -> resposta Th2.

Várias outras questões foram suscitadas. Poderia haver associação com HLA? Que terapêutica associar? Anti-fibrótica? Existem umas espécies mais patogênicas do que outras? Há variações na composição gênica do parasita conforme sua distribuição geográfica e epidemiológica? Conforme a espécie o tratamento é mais difícil? Enfim, esta entidade nosológica continua presente no mundo todo como um desafio, instigando a realização de novos estudos que também possam, inclusive, serem aplicados em outras doenças com padrões reacionais semelhantes.