



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CROMOBLASTOMICOSE: apresentação clínica, evolução terapêutica e associação com achados histopatológicos.

YANKEE COSTA MAGALHÃES DINIZ

São Luís
2019

YANKEE COSTA MAGALHÃES DINIZ

CROMOBLASTOMICOSE: apresentação clínica, evolução terapêutica e associação com achados histopatológicos.

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFMA Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Nível: Mestrado.

Orientadora: Prof^a Dr^a Conceição de Maria Pedrozo Silva de Azevedo.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Sirlei Garcia Marques.

São Luís
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Diniz, Yankee Costa Magalhães.

CROMOBLASTOMICOSE: : apresentação clínica, evolução terapêutica e associação com achados histopatológicos / Yankee Costa Magalhães Diniz. - 2019.

70 f.

Coorientador(a): Sirlei Garcia Marques.

Orientador(a): Maria de Conceição Pedrozo Silva de Azevedo.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Cromoblastomicose. 2. Fungo. 3. Histopatológico. 4. Tratamento. I. Azevedo, Maria de Conceição Pedrozo Silva de. II. Marques, Sirlei Garcia. III. Título.

YANKEE COSTA MAGALHÃES DINIZ

CROMOBLASTOMICOSE: apresentação clínica, evolução terapêutica e associação com achados histopatológicos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Conceição de Maria Pedrozo Silva de Azevedo (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª Dr^ª Raimunda Ribeiro Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª Dr^ª Juliana Ribeiro Alves dos Santos
Universidade Ceuma

Profa. Dr^ª Vanda Maria Ferreira Simões
Universidade Federal do Maranhão

“Fiz o melhor que pude na corrida, cheguei até o fim, conservei a fé.”

2 Timóteo 4:7

AGRADECIMENTOS

- À Deus, que deu a oportunidade de realizar o desejo do meu coração, me sustentando, inspirando e abençoando em todos os momentos;
- À Universidade Federal do Maranhão, por oportunizar Programas de Pós-Graduação nos níveis de formação como o proposto pelas Ciências da Saúde;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, por receber acadêmicos e pesquisadores para garantir qualidade nas produções científicas;
- À minha orientadora Prof^a Dr^a Conceição Pedrozo, que acompanhou e orientou este trabalho;
- À minha coorientadora, Prof^a Dr^a Sirlei Garcia Marques, que oportunizou esse momento na minha vida ajudou e orientou a execução do trabalho;
- À Dr^a Raimunda Ribeiro da Silva, pela ajuda e atenção dispensada em vários momentos nas leituras das lâminas;
- Ao Prof. Dr. Bismarck Ascar Sauaia, que se disponibilizou em muitos momentos e incansavelmente na construção dos dados estatísticos;
- A Dr^a Maria Rosa Bomfim, pela ajuda e orientação nas publicações;
- Ao meu esposo Dalciney Maximo Diniz, por sempre me incentivar, acompanhar, ajudar e trazer a esperança nos momentos difíceis;
- A minha amada e, pequena Evlyn, por suas orações e palavras de ânimo e conselhos: “Mãe, tudo que a gente começa tem que terminar”;
- À minha mãe Delci Magalhães, que sempre lutou por mim e sempre foi minha fortaleza usada por Deus para me guiar nos momentos difíceis.
- À minha irmã Yonara Magalhães, mais que irmã, a quem devo todas as minhas formações, pois sem ela e Deus não teria chegado até aqui;
- Aos demais familiares, que ajudaram nas lutas do dia-a-dia;
- Aos colegas de trabalho do setor da Microbiologia, que apoiaram, ajudaram e me incentivaram;
- A técnica Marisa do Laboratório Cedro, que ajudou na organização e retiradas dos materiais do setor da Patologia;
- À Samira Hachem e Elie Hachem, proprietários do Laboratório Cedro que permitiram, proporcionando e oportunizaram a realização do mestrado.

RESUMO

Introdução: A Cromoblastomicose é uma doença crônica e de evolução lenta que acomete o tecido celular cutâneo e subcutâneo, tendo como principal agente etiológico, *Fonsecaea pedrosoi*. Podendo apresentar aspecto polimórfico, de evolução lenta, atingindo principalmente os membros inferiores de trabalhadores rurais. **Objetivo:** Analisar os achados histopatológicos correlacionando com tipo lesional, gravidade e terapias realizadas em pacientes portadores de agentes da CBM. **Metodologia:** É um estudo descritivo, analítico, longitudinal dos casos confirmados, com amostra de conveniência, realizado no Centro de Referência Infecçiosa e Parasitária da Universidade Federal do Maranhão entre fevereiro/2017 a agosto/2018. Os testes de pesquisa direta, a cultura do fungo e microcultivo foram utilizados para confirmar o diagnóstico e o histopatológico para realizar as correlações e análises deste estudo. O tratamento foi realizado com itraconazol, para os pacientes com doença leve (200mg/dia), e em doença moderada e grave, itraconazol (400mg/dia). Em pacientes com lesões infiltrativas, associou-se imiquimode, tópico, 3 vezes por semana e nos pacientes com baixa resposta terapêutica e os que puderam comparecer no ambulatório a cada 15 dias, associou-se nitrogênio líquido. **Resultados:** A investigação clínica e epidemiológica dos 52 casos apresentou variação de idade entre 50 a 60 anos (n=21;40%); predominância: do sexo masculino (n=48; 92%), de trabalhadores rurais, de gravidade moderada (n=25;48%), de lesão em placa (n=38;73,08%), de granulomas supurativos (n=20;38,46%) e oriundos em sua maioria da Baixada Maranhense. Nas associações de achados histopatológicos e lesões, houve maiores percentuais para polimorfonuclear, linfócitos e hiperplasia pseudoepiteliomatosa, apontando para uma tentativa de eliminação do fungo (p<0,0001). Na correlação entre os achados histopatológicos e o tratamento, a proliferação vascular apresentou em menor quantidade nos locais das lesões, podendo prejudicar assim a concentração do antifúngico utilizado no tratamento. A carga fúngica apresentou redução nos tratamentos com itraconazol e itraconazol associado com nitrogênio líquido. **Discussão:** O itraconazol é um medicamento utilizado nas terapias de CBM que pode alcançar curas e melhoras dos quadros clínicos da maioria dos pacientes, principalmente nos que apresentam gravidade leve a moderada, após longos períodos de tratamento. Já em pacientes com lesões graves nota-se uma resposta diferenciada, isto talvez, ocasionada pela diminuição das concentrações teciduais de itraconazol. Os fatores que podem estar envolvidos nestas reduções das concentrações teciduais são as fibroses teciduais, edemas e coinfeções bacterianas, muito encontradas nos tecidos subcutâneos. É nesse momento que outras estratégias terapêuticas podem ser utilizadas como as associações com o nitrogênio líquido local ou o imiquimode. **Conclusão:** A cromoblastomicose tem comportamento endêmico no estado do Maranhão. O itraconazol em monoterapia apresentou os melhores resultados em termos de cura e redução de intensidade da carga fúngica do que em associação com nitrogênio líquido. O nitrogênio líquido apesar de apresentar reduções na intensidade da carga fúngica, tem que ser avaliado seu custo benefício. E a associação de itraconazol com imiquimode não apresentaram boa evolução, sendo evidenciada com aumento da intensidade da carga fúngica.

Palavras-chave: Cromoblastomicose; Fungo; Histopatológico; Tratamento.

ABSTRACT

Introduction: Chromoblastomycosis is a chronic and slowly evolving disease that affects the cutaneous and subcutaneous cellular tissue. Its main etiological agent is *Fonsecaea pedrosoi*. It may present polymorphic aspect, of slow evolution, reaching mainly the lower limbs of rural workers. **Objective:** To analyze the histopathological findings correlating with lesion type, severity and therapies performed in patients with CBM agents. **Methodology:** This is a descriptive, analytical, longitudinal study of confirmed cases with a convenience sample, conducted at the Infectious and Parasitic Reference Center of the Federal University of Maranhão from February / 2017 to August / 2018. The direct research, fungal culture and microculture tests were used to confirm the diagnosis and histopathology to perform the correlations and analyzes of this study. Treatment was with itraconazole for patients with mild disease (200mg / day) and for moderate and severe itraconazole (400mg / day). In patients with infiltrative lesions, imiquimod, topical, was associated 3 times a week and in patients with low therapeutic response and those who could attend the outpatient clinic every 15 days, was associated with liquid nitrogen. **Results:** The clinical and epidemiological investigation of the 52 cases presented age variation between 50 and 60 years (n = 21; 40%); predominance: male (n = 48; 92%), rural workers, moderate severity (n = 25; 48%), plaque injury (n = 38; 73.08%), suppurative granulomas (n = 20; 38.46%) and mostly from the Baixada Maranhense. In the associations of histopathological findings and lesions, there were higher percentages for polymorphonuclear, lymphocytes and pseudoepitheliomatous hyperplasia, pointing to an attempt to eliminate the fungus (p <0.0001). In the correlation between the histopathological findings and the treatment, vascular proliferation presented in smaller quantity in the lesion sites, which may impair the concentration of the antifungal used in the treatment. The fungal load decreased in treatments with itraconazole and itraconazole associated with liquid nitrogen. **Discussion:** Itraconazole is a drug used in CBM therapies that can achieve cures and improvements in the clinical condition of most patients, especially those with mild to moderate severity after long periods of treatment. In patients with severe lesions, there is a differentiated response, perhaps caused by the decrease in tissue concentrations of itraconazole. Factors that may be involved in these reductions in tissue concentrations are tissue fibroses, edema, and bacterial co-infections, which are commonly found in subcutaneous tissues. It is at this time that other therapeutic strategies can be used such as associations with local liquid nitrogen or imiquimod. **Conclusion:** Chromoblastomycosis has endemic behavior in the state of Maranhão. Itraconazole alone had the best results in terms of cure and reduction of fungal load intensity than in association with liquid nitrogen. Liquid nitrogen, despite presenting reductions in fungal load intensity, must be evaluated its cost benefit. And the association of itraconazole with imiquimod did not show a good evolution, being evidenced with increased fungal load intensity.

Keywords: Chromoblastomycosis; Fungus; Histopathological; Treatment.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CBM	Cromoblastomicose
CLR	Receptores de Lectina do tipo C
CM	Corpúsculo Muriforme
CREDIP	Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias
FDA	Food and Drug Administration
GSL	Glicoesfingolipídeos
HE	Coloração de Hematoxilina e Eosina
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IMQ	Imiquimode
ITZ	Itraconazol
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NK	Natural Killer Cell
NL ₂	Nitrogênio Líquido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
PAMP	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
ROS	Reativas de Oxigênios
TLR	Toll-like Receptors
TLR2	Receptor do Tipo Toll 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificações quanto ao tipo de lesão.....	19
Figura 2	Classificações das lesões quanto a gravidade.....	20
Figura 3	Apresentação clínica macro e microscópica da CBM, na pele humana.....	21
Figura 4	Alvos celulares dos antifúngicos.....	24
Figura 5	Fórmula molecular do itraconazol $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O$	25
Figura 6	Fórmula molecular do Imiquimode $C_{14}H_{16}N_4$	27
Figura 7	Mecanismo de ação do imiquimode de uso tópico.....	28
Figura 8	Percentual de origem dos casos de CBM identificados nas regiões do Estado no ambulatório do CREDIP, São Luís, Maranhão, no período fevereiro/2017 a agosto/2018.....	37
Figura 9	Granuloma supurativo.....	38
Figura 10	Corpúsculo muriforme em tecido.....	40
Figura 11	Eliminação transepitelial de corpúsculo muriforme na camada córnea.....	40

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Distribuição das características epidemiológicas de pacientes com agentes da CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto/2018.....	35
Tabela 2	Distribuição das características clínicas de pacientes portadores de CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto/2018.....	36
Tabela 3	Tipos de granulomas encontrados nos tipos lesionais.....	38
Tabela 4	Associação entre achados histopatológicos e tipos de lesão em pacientes com agentes da CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto/2018.....	39
Tabela 5	Associação entre os escores dos achados histopatológicos e níveis de Gravidade em pacientes em pacientes com agentes da CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto/2018.....	41
Tabela 6	Correlação entre achados histopatológicos e tratamentos.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Carga fúngica, início do tratamento (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	43
Gráfico 2	Carga fúngica, durante o tratamento (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	43
Gráfico 3	Carga fúngica, início do tratamento com ITZ + NL2 (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	43
Gráfico 4	Carga fúngica, início do tratamento com quantitativos totais (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	43
Gráfico 5	Carga fúngica, durante o tratamento ITZ (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	44
Gráfico 6	Carga fúngica, durante o tratamento ITZ + IMQ (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	44
Gráfico 7	Carga fúngica, durante o tratamento ITZ + NL2 (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	44
Gráfico 8	Carga fúngica, durante o tratamento com quantitativos totais (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Histórico	14
2.2	Agente etiológico	16
2.3	Epidemiologia	16
2.4	Resposta imune na cromoblastomicose	17
2.5	Manifestações clínicas	18
2.6	Diagnóstico	20
2.7	Tratamentos	22
2.7.1	Métodos químicos	22
2.7.1.1	Polienos.....	22
2.7.1.2	Azóis.....	23
2.7.1.2.1	Itraconazol.....	24
2.7.1.3	Imiquimode.....	26
2.7.2	Método Físico.....	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODO	30
4.1	Tipo de estudo e período de realização	30
4.2	Local de estudo	31
4.3	População e amostra	31
4.4	Critérios de inclusão	31
4.5	Critérios de exclusão	31
4.6	Coleta das amostras clínicas	31
4.6.1	Processamento laboratorial das biópsias.....	32
4.6.2	Exame micológico direto das biópsias.....	32
4.6.3	Cultura das amostras clínicas para isolamento dos fungos.....	32
4.6.4	Identificação dos Fungos Isolados das Amostras Clínicas.....	32
4.6.5	Exame histopatológico das biópsias.....	33
4.12	Tratamento	34
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34

6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
7	RESULTADOS	34
8	DISCUSSÃO.....	45
9	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma doença crônica e de evolução lenta que acomete o tecido celular cutâneo e subcutâneo, tendo como principal agente etiológico, *Fonsecaea pedrosoi*. Pode apresentar aspecto polimórfico, atinge principalmente os membros inferiores de trabalhadores rurais. (BONA, CANTON e FUENTEFRIA, 2010; CORREIA, VALENTE et al., 2010; GOMES, VICENTE et al., 2016).

Em 2018, a Organização Mundial de Saúde incluiu a CBM entre as diversas doenças tropicais negligenciadas que são endêmicas nas zonas tropicais e subtropicais, acometem principalmente as áreas com populações pobres, de zonas rurais, com baixo acesso a saúde e educação, como a África (OMS, 2018).

A cromoblastomicose se apresenta de forma endêmica em várias áreas do planeta e se destaca em diversos estados brasileiros por sua prevalência. Já em 1973, Bopp identificou três focos da doença no Brasil: um no Norte, com a contribuição do Pará, outro no Suldeste, com os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo e um terceiro, localizado no Sul do país, abrangendo o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. No Nordeste poucos casos tinham sido relatados (BOPP; BERNARDI, 1973).

Esse status de áreas endêmicas no Brasil são ainda hoje confirmadas por Queiroz-Telles (2017), quando afirma a presença de casos sem diagnóstico e conseqüentemente sem tratamento, atingindo pessoas de baixo poder socioeconômico, vivendo na zona rural, onde sobrevivem dos frutos da terra, mantendo contato permanente com a vegetação e o solo. (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

No Maranhão (MA), os primeiros relatos de cromoblastomicose na literatura datam de 1981 feitos por Ferreira e colaboradores, com descrição dos aspectos histopatológicos apresentados por oito pacientes portadores de cromoblastomicose (FERREIRA et al., 1981). Na década seguinte, vários relatos foram publicados, tendo como estudo referencial a publicação de 12 casos por Silva e colaboradores (1992), quando se evidenciou que 83,3% dos casos eram oriundos da Baixada Maranhense, constatando-se a existência de uma provável área endêmica para a cromoblastomicose (SILVA et al., 1992). Sucessivamente, vários estudos continuaram sendo realizados e relatados em 20 anos de cromoblastomicose no Maranhão,

quando se apresentou 150 casos desta micose, com características clínicas, epidemiológicas e diagnóstico etiológico (AZEVEDO et al., 2012). Este estudo evidenciou que 86,4% dos pacientes apresentavam forma moderada ou grave da doença, sendo 78,8% oriundo da mesorregião norte (onde se localiza a Baixada Maranhense), confirmando a região como endêmica para esta patologia (AZEVEDO et al., 2012).

Os desafios acerca desta patologia fúngica continuaram ao longo dos anos no Estado, apresentando importante casuística, com número crescente de casos, tendo-se cadastrado no serviço de referência ao atendimento de cromoblastomicose, cerca de 200 casos, nos últimos 27 anos, em sua maioria, nas formas moderada e grave, dificultando a resposta terapêutica diante dos antifúngicos disponíveis para o seu manejo.

Desta maneira, os estudos que iniciaram em 1989, gerando vários entendimentos desta doença: como a observação de uma área endêmica no Estado do Maranhão (SILVA et al., 1992), a relação da quebra de coco babaçu e cromoblastomicose em região glútea (MARQUES et al., 2006), a relação entre resposta Th1 com doença leve e resposta Th2 com doença moderada e grave (GIMENES et al., 2005). Além da observação de produção de IgG em maiores títulos nos pacientes com doença grave (AZEVEDO et al., 2012) e transformação neoplásica em pacientes com lesões crônicas pela cromoblastomicose (AZEVEDO et al., 2015). Ainda há uma lacuna sobre as manifestações histopatológicas apresentadas nestes pacientes e suas repercussões na apresentação clínica, gravidade da doença e alterações apresentadas com os tratamentos realizados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

A Cromoblastomicose (CBM) foi descrita pela primeira vez por Maximilliano Willibaldo Rudolph (1914), médico que escreveu em um periódico internacional "Sobre a figueira brasileira", nos estados de Minas Gerais e Goiás (RUDOLPH, 1914). Em 1915, Medlar e Lane, publicaram, nos Estados Unidos, a partir de suas descobertas sobre "uma infecção cutânea causada por um novo fungo" em um paciente que morava na cidade de Boston. As lesões verrucosas estudada desse paciente foram nomeadas *Phialophora verrucosa* e eram naturalmente idênticas às observadas

previamente nos pacientes brasileiros de Pedroso e Rudolph (LANE, 1915; MEDLAR, 1915; CASTRO; CASTRO, 1987).

Em 1922, Brumpt afirmou que o agente causador da infecção, no caso de Pedroso não era *Phialophora verrucosa*, mas uma nova espécie, que ele denominou de *Hormodendrum pedrosoi*, em homenagem ao pesquisador brasileiro. Na Argentina em 1936, Negroni, classificou taxonomicamente este fungo como *Fonsecaea pedrosoi* (NEGRONI, 1936; BAYLES, 1989). Terra e colaboradores, em 1922, descreveram, para estes fungos, um segundo método de esporulação que corresponde ao gênero *Acrotheca*. E Carrión, em 1923, descreveu um terceiro agente causador da cromoblastomicose, denominado *Fonsecaea compacta* (CARRIÓN, 1936; MCGINNIS, 1983).

Terra e colaboradores em 1922, atribuíram o nome Cromoblastomicose para designar infecções causadas por fungos dematiáceos que apresentam nos tecidos do hospedeiro, células de cor castanho amarronzadas e paredes densas, denominados corpos escleróticos, localizadas em microabscessos subcutâneos. No entanto, esse termo foi proposto para distinguir um grupo de infecções fúngicas cutâneas e subcutâneas crônicas, conhecidas como dermatite verrucosa. No tecido, estes fungos não se reproduzem por brotamento, como é sugerido pelo nome cromoblastomicose e, sim, por septação (TERRA et al., 1922; MOORE; ALMEIDA, 1935; MCGINNIS, 1983). Para corrigir este aspecto ambíguo da nomenclatura, foi introduzido o termo "Cromomicose", que incluía todas as infecções causadas por fungos escuros, independentemente de sua apresentação clínica, histopatológica e micológica, tornando-se, por anos, enganoso, pois descrevia dois grupos distintos de infecções que continham diferenças no diagnóstico, tratamento e prognóstico (MOORE; ALMEIDA, 1935). Em virtude disso, Ajello et al. (1974), criaram o nome "Feohifomicose" para designar um grupo importante, distinto e heterogêneo de infecções micóticas exibidas no tecido celular como leveduras dematiáceas, filamentos de pseudohifas e hifas, que podem ser curtas, grandes e distorcidas ou a combinação destas.

As células muriformes encontrados nos tecidos dos pacientes de cromoblastomicose estão ausentes nas lesões e abscessos de feohifomicose. Portanto, McGinnis (1983) e McGinnis e colaboradores (1985) propuseram que o termo cromoblastomicose fosse usado para denotar infecção crônica de tecidos cutâneo e subcutâneo, caracterizados por hiperqueratose, hiperplasia pseudo-

epiteliomatosa, microabscesso e presença de corpos escleróticos ou células muriformes, nos tecidos do hospedeiro.

2.2 Agente etiológico

Os fungos pertencentes a CBM, taxonomicamente são da ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*, podendo ser agrupados em sete gêneros: *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Rhinocladiella*, *Exophiala*, *Veronaea* e *Cyphellophora* sendo a *Fonsecaea* e a *Cladophialophora* os gêneros mais frequentes causadores de infecções por fungos melanizados (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; NAJAFZADEH et al., 2010; ZHU et al., 2015; GOMES et al., 2016).

2.3 Epidemiologia

Os fungos causadores da CBM são encontrados em todo o mundo, principalmente em regiões de zonas tropicais e subtropicais (QUEIROZ-TELLES et al., 2015; DE HOOG et al., 2004)

Organismos de vida saprófita são encontrados na matéria orgânica em decomposição: vegetais, espinhos, fragmentos de madeira, troncos, folhas contaminadas e na microbiota do solo e água (MINOTTO et al., 2001; MENEZES et al., 2008).

Os conídeos encontrados na vida saprofítica se transformam em corpúsculos muriformes (corpúsculos escleróticos), após trauma do tecido, ocorrendo disseminação por via linfática. Ocorrem frequentemente em pessoas que exercem atividades agrícolas, demonstrando uma natureza ocupacional da doença (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

A prevalência e incidência da micose causada pelos agentes da CBM são desconhecidas por serem casos esporádicos. Entretanto, a maioria dos relatos são de clima tropical e subtropical, sendo os países de maior prevalência de CBM: Cuba, República Dominicana, México Colômbia, Venezuela e Brasil (SARKAR et al., 2017).

A maior prevalência da doença está localizada na parte norte da Venezuela e em Madagascar. No Brasil, a região amazônica é a que possui maior número de registro (OMS, 2018).

O Brasil ocupa lugar de destaque na casuística mundial, pois a doença se comporta como endêmica em diversas regiões, com estimativa de 1/196 mil habitantes, encontrando-se em várias regiões do país: Região Amazônica, Rio Grande

do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Maranhão, sendo o *F. Pedrosoi*, o principal agente etiológico (MINOTTO et al., 2001; SILVA, 1998; QUEIROZ-TELLES et al., 2003; CORREIA et al., 2010).

Doença considerada ocupacional, por atingir trabalhadores rurais, coletores de babaçu, madeireiros, com quadros de infecção mais frequentemente, em homens. Em sua maioria, pessoas que não utilizam qualquer proteção ao exercer suas atividades, de péssimas condições nutricionais e de higiene, favorecendo assim a instalação da CBM (OMS, 2018).

É debilitante, de transmissão indireta, que leva a incapacidade para o trabalho, desencadeando efeitos negativos sobre a vida do indivíduo, em todos os seus aspectos: sociais, econômicos, psicológicos e familiares, gerando assim cronicidade e perdas na qualidade de vida (PIRES et al., 2012; OMS, 2018).

2.4 Resposta imune na cromoblastomicose

Os fungos causadores da CBM afetam principalmente os indivíduos imunocompetentes e a gravidade varia de acordo com a idade, a viabilidade e a quantidade de inóculo do parasita (SOUSA et al., 2011).

Os mecanismos de defesa dos microrganismos que causam a CBM ainda não foram completamente elucidados, sendo colocada a possibilidade de que a imunidade dos pacientes que desenvolveram a doença, de forma crônica, possui algum tipo de falha imunológica (MINOTTO, 2010).

Os macrófagos realizam importante papel na resposta inata, para o controle do crescimento fúngico (WALTER et al., 1982).

A função de distribuição e de apresentação de antígenos em amostras de biópsias, foram investigadas em um estudo que definiu a maioria dos antígenos visualizados, como material homogêneo ou granulados no citoplasma dos macrófagos (SOTTO, 2004).

Os macrófagos ativados demonstram ter uma ação fungistática e não fungicida permitindo a sobrevivência e até a proliferação da *F. pedrosoi* dentro da célula (ROZENTAL et al., 1994).

Sotto et al. (2004) afirmaram que o número elevado de macrófagos nas biópsias de pele de pacientes com CBM demonstram o envolvimento da célula no controle da infecção.

Clinicamente, a CBM é caracterizada por hiperplasia pseudoepiteliomatosa com microabscessos epidérmicos e, granuloma dérmico, que tem sua participação com macrófagos e neutrófilos que desencadeiam a ativação das células T, através da apresentação de antígenos (AVILA et al., 2003). Os neutrófilos e macrófagos são células chave na resposta imune contra os fungos causadores da cromoblastomicose. E as reações granulomatosas típicas observadas em pacientes com a doença são reguladas por polimorfonucleares (URIBE et al., 1989).

É comprovado que indivíduos de áreas endêmicas com exposição prévia aos fungos desenvolvem uma resposta humoral específica, embora não esteja clara a correlação com o curso da doença (ESTERRE et al., 1997).

Em estudos realizados em reações imunes mediadas por células nas lesões cutâneas, foram encontradas: nas lesões em placa verrucosa, presença de granuloma supurativo, apresentando muitas células fúngicas, enquanto nas lesões em placa atrófica, granuloma tuberculóide, com poucos fungos. Segundo os autores, os pacientes com lesões em placa verrucosa apresentam resposta imunológica tipo Th2, enquanto os pacientes com lesão em placa atrófica apresentam resposta tipo Th1. (D'AVILLA et al., 2003). Alguns estudos afirmam que os agentes da CBM induzem a formação de granulomas, porém não está bem elucidado, e que a formação do granuloma pode ser induzida por baixas concentrações de lipídios extraídos de agentes como *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *C. carrioni* e *P. verrucosa* (SILVA; EKIZLERIAN, 1983). No entanto, outros autores verificaram que não somente os lipídeos retirados destes fungos, mas os que constituem a parede celular seriam responsáveis pela formação do granuloma (SAN-BLAS, 1982; SILVA; FAZIOLI, 1985; OKUDA, 1992).

2.5 Manifestações clínicas

As lesões iniciais traumáticas através de agentes infecciosos em áreas expostas do corpo, tem seu período de inoculação variável entre semanas e meses. A progressão ocorre inicialmente de uma lesão de pápula rósea e lisa para lesões que podem se apresentar escamosas ou ainda mesmo com aspectos polimórficos, facilmente confundidos com outras doenças infecciosas e não infecciosas (MINOTTO, 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Tendo como característica a disseminação por contiguidade, produzindo assim lesões satélites, normalmente acompanhada de prurido, um dos sinais importantes

desta patologia, a CMB apresenta classificação quanto ao tipo lesional (Figura 1) em: nodular, verrucosa, tumoral, cicatricial, placa, mistas ou polimórficas (CARRIÓN, 1950; modificado por QUEIROZ-TELLES et al., 2003).

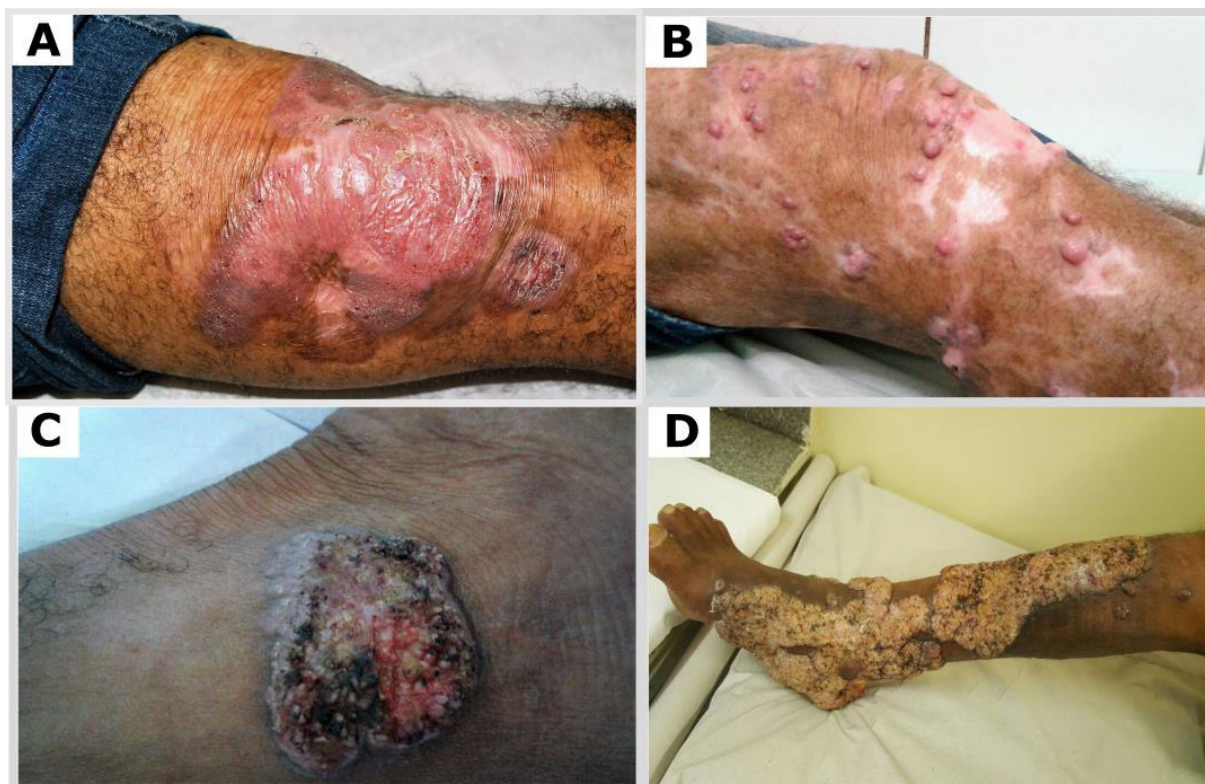


Figura 1. Classificações quanto ao tipo de lesão.

Fonte: Própria (2017).

Legenda: (A) Lesão em Placa (B) Lesão Nodular (C) Lesão verrucosa (D) Lesões Tumoral e Nodular.

Adicionalmente, pode-se classificar a CMB quanto à gravidade das lesões (Figura 2) em: leve, moderada e grave (QUEIROZ-TELLES et al., 2003). A gravidade, pode estar relacionado ao tempo de evolução da doença, local da afecção e adesão do paciente ao tratamento, assim como hábitos de higiene, os mecanismos de defesa inatos do paciente. Apesar disso tudo a CBM é prevalente em pacientes imunocompetentes (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).



Figura 2. Classificações das lesões quanto a gravidade

Fonte: Própria (2018).

Legenda: (A) Lesão leve (B), Lesão moderada (C) Lesão grave

As lesões da CBM evoluem lentamente se não tratadas, podendo atingir e prejudicar a via linfática levando a perda ou a incapacidade funcional do membro que foi atingido, com fibrose tecidual, podendo complicar evoluindo carcinomas, linfedemas entre outras doenças (MINOTTO, 2001).

2.6 Diagnóstico

Os diagnósticos mais utilizados para CBM são:

1. Exame direto de secreção, raspado ou biópsia lesional: preparado com hidróxido de potássio a 20% (KOH). Observam-se estruturas arredondadas, de cor marrom, com septações diametrais, lembrando moedas de cobre, também conhecidas como corpos fumagóides, células escleróticas ou células muriformes (CARRIÓN, 1936; LACAZ et al., 1984) (Figura 3A e 3C).

2. Exame histopatológico de material de biópsia: as reações ocorridas em resposta à presença do agente dematiáceo são facilmente demonstradas quando corados com hematoxilina-eosina, caracterizando-se por ocorrência de hiperplasia epidérmica, reações granulomatosas, podendo ter microabscessos, infiltrado inflamatório, principalmente composto de macrófagos e células gigantes; e eliminação transepitelial de fungos (BATRES et al., 1978; URIBE et al., 1989). (Figura 3A e 3B)

3. Cultura de secreção, raspado ou biópsia: semeados em meio de ágar-Sabouraud glicose ou Mycobiotic, as colônias suspeitas apresentam crescimento lento, iniciando como pontos escuros, violáceos, cinzas ou verdes. A identificação do agente etiológico é feita por microcultivo em lâmina, pela técnica de Ridell, que tem a prioridade de visualizar a disposição dos filamentos e do arranjo dos conídios (LACAZ et al., 1984) (Figura 3A e 3D).

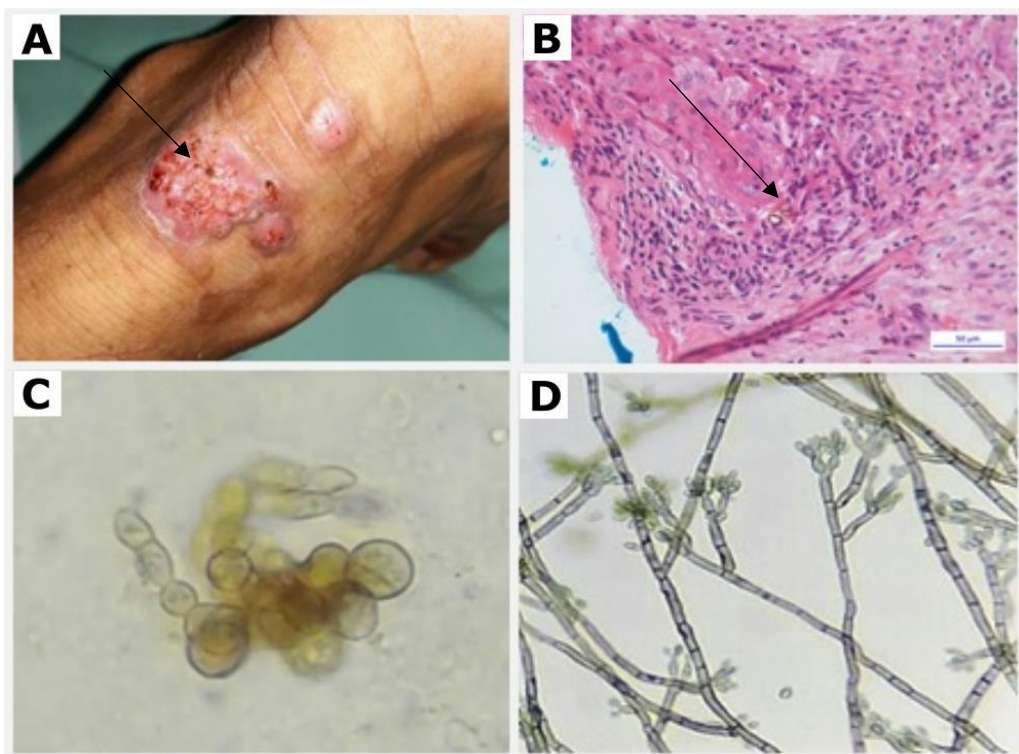


Figura 3. Apresentação clínica macro e microscópica da CBM, na pele humana.

Fonte: Própria (2018).

Legenda: (A) Lesões verrucosa e nodular, em paciente de 63 anos. (B) Anatomopatológico mostrando o corpúsculo murifórme aumento 40x. (C) Exame micológico direto com KOH a 20% aumento 40x, com visualização dos corpúsculos murifórmes. (D) Microcultivo identificando *Fonsecaea pedrosoi* aumento 40x.

2.7 Tratamentos

Apesar dos avanços na terapia medicamentosa antifúngica observada nos últimos anos, a cromoblastomicose ainda constitui um sério problema para os que manejam esta doença. Diversos foram os métodos empregados ao longo das décadas, mostrando a ineficácia de vários deles. As modalidades terapêuticas podem ser agrupadas em duas categorias: métodos químicos e físicos. Estas modalidades podem ser empregadas isoladamente ou agrupadas (QUEIROZ-TELLES et.al., 2017).

2.7.1 Métodos químicos

2.7.1.1 Polienos

A anfotericina B é o fármaco pertencente deste grupo, um dos mais utilizados, antifúngico desenvolvido a partir do *Streptomyces nodosus* que em 1995 se constituiu em um polieno de primeira linha para as infecções invasivas graves, mas que apresentou grave efeito nefrotóxico, sendo que esse efeito pode ser reversível após a sua suspensão em algumas semanas, podendo ocasionar lesões residuais em casos em que o uso seja realizado de forma prolongada, gerando assim, a necessidade do desenvolvimento de novas formulações que reduzam seus efeitos (RIVAS; CARDONA-CASTRO, 2009).

Devido a isso, foram criadas novas preparações de anfotericina B com menos lipídios, a citar: de dispersão coloidal, lipossomal e complexo lipídico de anfotericina B, apresentam mecanismo de ação através da ligação ao ergosterol na membrana plasmática celular do fungo, fazendo com que haja o aparecimento de poros e este, desorganiza a função da membrana, permitindo a perda de potássio e outros cátions, até que ocorra a morte celular (MOREIRA, 2010). Estas formulações permitem seu uso por tempo prolongado com menos efeitos nefrotóxicos e mielotóxicos, porém sem constatação *in vivo* na terapêutica da cromoblastomicose (GALERA, 2000).

Uma das limitações da anfotericina B na terapêutica da cromoblastomicose é o alto grau de resistência à droga pelos organismos causadores da doença. Gold et al. (1956) mostraram que a concentração inibitória mínima para as espécies *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta* e *Phialophora verrucosa* era tão alta quanto 40mcg/ml. Desta forma, o uso parenteral isolado dessa droga se tornou inviável, pois as doses toleráveis por seres humanos -1 a 1,5mg/kg/dia- produzem níveis plasmáticos de até

1,8mcg/ml, bastante inferior à concentração inibitória mínima (COSTELLO; DEFEO; LITTMAN, 1959).

Com isso, optou-se pelo uso subcutâneo da anfotericina B, possibilitando a obtenção de altas concentrações tissulares sem manifestações deletérias sistêmicas (COSTELLO; DEFEO; LITTMAN, 1959; LESHCHENKO et al., 1989; SILVA et al., 1999).

2.7.1.2 Azóis

No final da década de 60 surgiram os azóis, o mecanismo de ação desta medicação de ação fungistática, é a inibição da biossíntese do ergosterol a partir do lanosterol, que desorganiza a estrutura e função da membrana celular, inibindo assim seu crescimento. Isto se dá por agir no Citocromo P450 do fungo, inibindo a enzima 14-alfa-demetilase que é responsável por transformar o lanosterol em ergosterol, que é importante na formação e permeabilidade da membrana celular. Desta maneira, o mecanismo de ação age inibindo a ação das enzimas oxidativas que estão relacionadas ao Citocromo P450. Além disso, acumula peróxido de hidrogênio causando danos também as organelas celulares (MOREIRA, 2010) (Figura 4).

Os azóis se dividem em duas classes: imidazóis e triazóis. Os imidazóis surgiram na década de 60 a partir da necessidade de se obter novos medicamentos como forma de reduzir os efeitos adversos da anfotericina B. Na década de 80 surgiram os triazóis, que possuem uma maior especificidade no sítio alvo em comparação aos imidazóis, apresentando desta forma, menores efeitos adversos, entre os mais conhecidos desta classe estão: fluconazol, posoconazol, itraconazol e voriconazol (MOREIRA, 2010; WLHALEN et al., 2016).

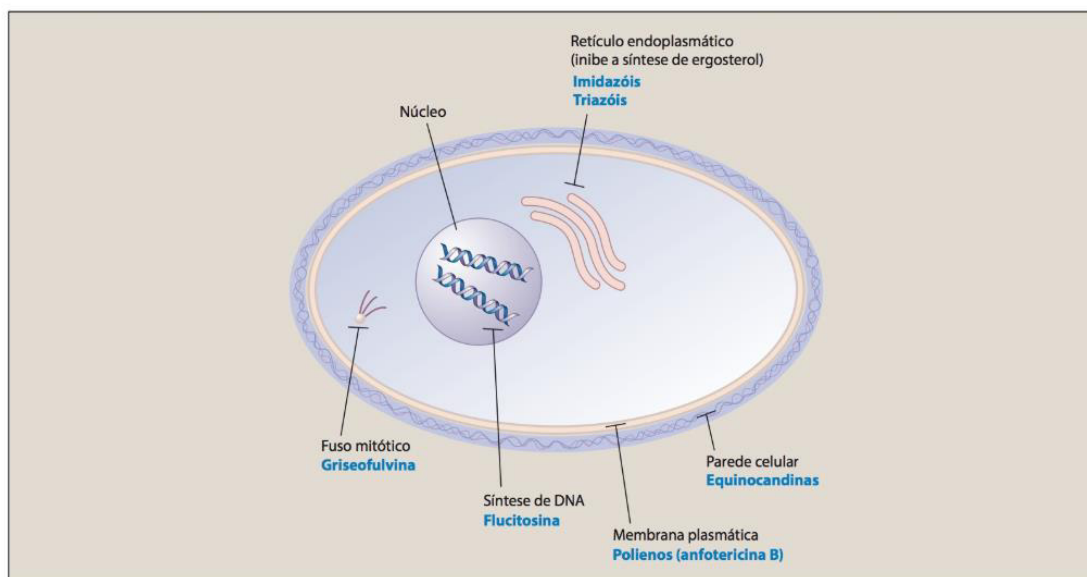


Figura 4. Alvos celulares dos antifúngicos.

Fonte: (WHALEN, FINKEL, et al., 2016)

2.7.1.2.1 Itraconazol

É um triazol sintético, lipossolúvel que interage com enzimas microsossomais hepáticas, de fórmula molecular $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$, com atividade antifúngica, e biodisponibilidade, com apresentação oral, cápsula e intravenosa, utilizadas com a ciclodextrana como forma de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade (Figura 5). No entanto, no Brasil é encontrado apenas como cápsula, o que compromete o sítio de ação. O fármaco possui uma boa distribuição nos ossos, tecido adiposo (pulmão, fígado, baço, unha, pele e cérebro) e, baixa concentração no líquido raquidiano e saliva (WHALEN et al., 2016). Possui alta metabolização hepática e por isso é necessário realizar ajuste de dose em pacientes que apresentam comprometimento hepático e pacientes com insuficiência cardíaca e disfunção cardíaca, já que possui efeito inotrópico negativo (MOREIRA, 2010; WHALEN et al., 2016).

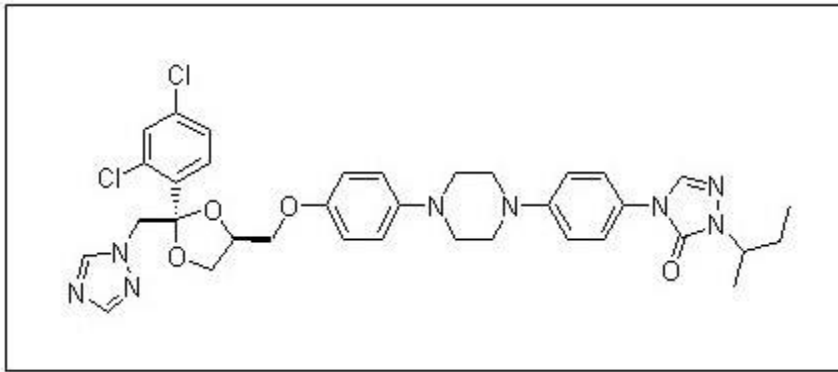


Figura 5. Fórmula molecular do itraconazol C₃₅H₃₈Cl₂N₈O₄.

Fonte: (MOREIRA, 2010).

O itraconazol deve ser administrado imediatamente após uma refeição, com auxílio de água, fato que favorece a biodisponibilidade; importante que haja acidez estomacal suficiente para garantir que o itraconazol seja absorvido totalmente no organismo. Importante ressaltar a administração de antiácidos somente antes ou depois de duas horas ao uso do itraconazol (EUROFARMA, 2017).

É muito lipofílico podendo alcançar concentrações teciduais de até 25 vezes maior que o nível sérico (ANDRADE et al., 2004).

É considerado a terapia de primeira linha de acordo com vários ensaios clínicos abertos e não comparativos. É o mais utilizado nos tratamentos para CBM, sendo assim a terapia padrão para esta doença. As taxas de cura variam de 15 a 80%. Tem a capacidade de inibir a biossíntese do ergosterol da membrana celular via 14-esterol desmetilase, uma coenzima do citocromo P450 oxidase, gerando membranas celulares defeituosas que perdem a fluidez e a permeabilidade (QUEIROZ-TELLES et.al., 2009).

A sua formulação em cápsula mostra atividade clinicamente significativa contra a maioria dos agentes CBM, sendo mais eficaz contra *C. carrionii* do que contra *F. pedrosoi*. No geral, são recomendadas doses para adultos de 200 a 400 mg/dia. A duração do tratamento varia entre 8 a 10 meses. Embora esse medicamento é administrado até que os critérios de cura sejam alcançados. E a criocirurgia pode ser usada conjuntamente para ajudar a remover as lesões cutâneas ativas restantes (NAJAFZADEH, et.al., 2010).

Os primeiros casos relatados de cromoblastomicose responsivos ao itraconazol foram divulgados por Lavallo et al. (1987) no México (LAVALLE et al., 1987). Tratava-se de dois casos de cromomicose causados por *Fonsecaea pedrosoi* onde se obteve a cura clínica e micológica em um e melhora significativa no outro. Outro estudo inicial

mostrava a eficácia do itraconazol quando empregado nas doses de 100 a 200 mg diários por 6 meses em casos de cromoblastomicose causados por *Cladophialophora carrioni* (BORELLI, 1987). Fato semelhante foi observado por Restrepo et al. (1988) na doença causada por *Fonsecaea pedrosoi*, porém com menor índice de cura micológica (RESTREPO et al, 1988).

Estudos experimentais em camundongos mostraram que o itraconazol faz com que os cortes histopatológicos apresentem menor infiltrado inflamatório dérmico, diminuição do número de células fúngicas e aumento da fibrose dermo-epidérmica, sugerindo assim que a droga deveria ser considerada uma nova opção na terapêutica antifúngica (DEFAVERI; GRAYBILL, 1990). No Brasil, Queiroz-Telles (1992) mostrou excelentes resultados no tratamento cromoblastomicose com itraconazol, obtendo cura clínica, micológica e histológica em 88% dos pacientes portadores de lesões leves e melhora significativa das lesões em pacientes portadores de lesões graves QUEIROZ-TELLES et al., 1992).

Seishima et al. (2004) determinaram as concentrações do itraconazol em tecidos com lesões causadas por *Fonsecaea pedrosoi* e em tecidos sem lesões após tratamento oral com dose acumulada de 2,3g de itraconazol. Verificaram que as concentrações da medicação eram maiores na porção central que nas regiões periféricas das lesões (SEISHIMA et al., 2004). No itraconazol podem ocorrer baixos níveis plasmáticos e concentrações teciduais devido as deficiências de absorção intestinal. E devem ser observadas as interações medicamentosas devido à inibição competitiva do sistema enzimático do citocromo P450 3A4, pois há pacientes que recebem outros medicamentos que são metabolizados que utilizam essa via (QUEIROZ-TELLES et.al., 2017).

A associação do itraconazol com outras drogas é escassa na literatura, porém Bolzinger et al. (1991) mostraram que o uso do itraconazol associado a 5-Fluorocitosina promovia boa resolução das lesões até em casos mais disseminados (BOLZINGER et al., 1991).

2.7.1.3 Imiquimode

Surgiu em 1995, imiquimode, fármaco pertencente à classe das imidazoquinolinaminas (amina heterocíclica), sintetizado nos Estados Unidos (Aldara™, 3M Pharmaceuticals Saint Paul, Minnesota, Estados Unidos), pertence à classe de agentes imunomoduladores da resposta imune; também referido como S-26308 ou R-

837, com fórmula equivalente a (1- (2-metilpropil) -1H-imidazo [4,5-C] quinolin-4-amina) e fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_4$, aprovada para o tratamento de verrugas genitais e perianais, já em 1997, pela Food and Drug Administration (FDA) (Figura 6)

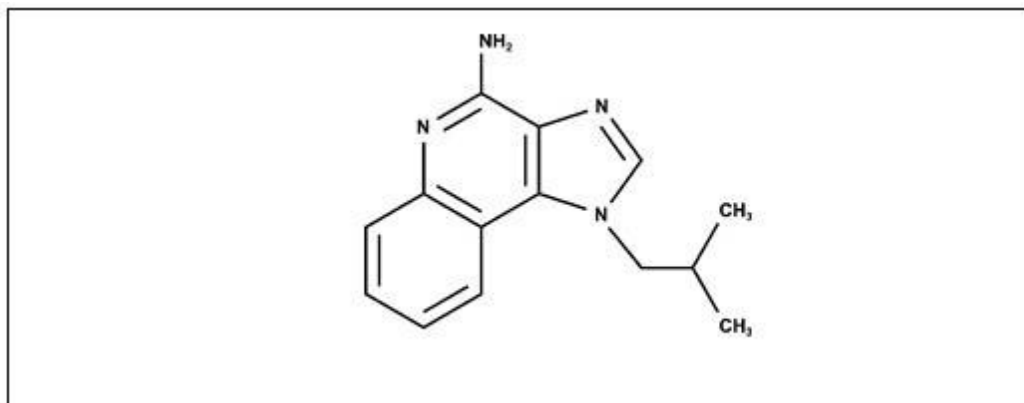


Figura 6. Fórmula molecular do Imiquimode $C_{14}H_{16}N_4$

Fonte: (HANNA, ABADI e ABBAS, 2016)

Em 2004 foi aprovada para o tratamento de ceratose actínica e carcinoma basocelular superficial. Insolúvel em água e de fórmula farmacêutica disponível em emulsão, tem sido bem tolerada, mas apresenta efeitos adversos como: dor, queimação, edema, coceira e erosão (SYED, 2001; HANNA et al., 2016).

O seu mecanismo de ação ainda não é muito claro, sabe-se apenas que o uso tópico estimula as vias inatas e adaptativas do sistema imune através da indução da produção da citocinas que podem estimular a produção de interferon IFN- γ , fator de necrose tumoral IFN- γ e interleucinas IL-6,8,3 e 4 (JOBANPUTRA et al., 2006; SYED, 2001; HANNA et al., 2016) (Figura 7).

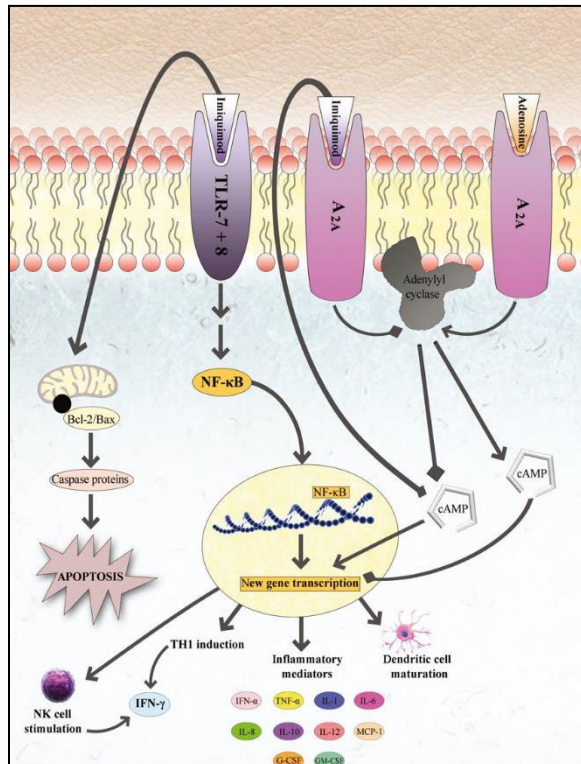


Figura 7. Mecanismo de ação do imiquimode de uso tópico.
Fonte: (HANNA et al., 2016)

De ação tópica, o imiquimode se liga ao TLR-7, agonista, faz parte da imunidade inata e agonista de TLR-8 e, ativa NF-κB (desempenhando a sua função de transcrição), produzindo citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ, TNF-γ, IL-6 e IL-8). Indiretamente, o medicamento aumenta a imunidade adquirida, através do estímulo da produção do TH1 citocina e IFN-γ, que em altas concentrações leva a apoptose de células tumorais através da estimulação da proteína Bcl-2 e família caspase de proteases. De atividade pró-inflamatória da via de sinalização do receptor de adenosina A (2A) e receptor da adenilil ciclase. O Imiquimode ou a adenilil ciclase forma AMP- cíclico e estimula a transcrição de novo gene (HANNA et al., 2016).

Foi utilizado em outras indicações de doenças infecciosas e não infecciosas, com resultados promissores, incluindo leishmaniose tegumentar americana (FIROOZ et al., 2006). Tem um único relato de seu uso para terapia de CBM, a 5% aplicado 4 a 5 vezes por semana mostrando ser um potencial agente adjuvante quando combinado com itraconazol. Os efeitos colaterais são raros, incluindo sensação de coceira e queimação. Após uso prolongado, um infiltrado liquenoide pode surgir como reflexo do aumento da imunidade local (SOUSA et al., 2014).

2.7.2 Método Físico

Dentre os métodos físicos, a *cirurgia*, é de excelência nas lesões iniciais, porém, não aconselhável em lesões extensas, pois a excisão cirúrgica isolada concorre com o risco de disseminação; A *termoterapia*, *terapia a laser* e *terapia fotodinâmica*, adjuvantes ao tratamento, são utilizadas em combinação com a administração de antifúngicos (COSTELLO et al., 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Outro método físico importante é a *crioterapia* ou *criocirurgia*, compreende a aplicação terapêutica de ar seco, frio, com temperatura entre -110 °C e -140 °C (COSTELLO et al., 2012; SELFE et al., 2014).

A Criocirurgia é um método de baixo custo que pode ser realizado em ambulatório e sem administração de anestésicos, de eficácia para o alcance da cura da CBM, principalmente em lesões localizadas (PIMENTEL et al., 1989). Nesta técnica o congelamento deve alcançar 60 segundos, para que se forme uma espécie de bloco de gelo que depois é descongelada fazendo com que haja a destruição vigorosa do tecido (MORAES et al., 2008).

Acredita-se que o frio não seja responsável pela destruição dos fungos negros. Estudo demonstrou que as baixas temperaturas alcançadas não são diretamente responsáveis pela destruição dos fungos nas lesões de CBM, uma vez que as colônias de fungos permanecem viáveis por até 12 dias após exposição a temperatura de até -196°C. É provável que as alterações teciduais induzidas pelo frio, como a necrose, inflamação ou mesmo uma possível adjuvância imunológica sejam os responsáveis pela destruição tardia dos fungos (CASTRO et al., 2003).

Os efeitos adversos mais frequente após *crioterapia* são: bolhas, hipopigmentação pós-inflamatória, edema, cicatrizes hipertróficas, dor e infecção bacteriana secundária (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). O primeiro relato do uso da criocirurgia em cromoblastomicose foi realizado por Ramirez em 1978 (MORAES et al., 2008).

A associação do nitrogênio líquido com itraconazol tem uma ação mais eficiente em lesões pequenas, mas também podem ser utilizadas em áreas maiores que podem ser congeladas parcialmente ou progressivamente. Sendo uma opção de tratamento para cromoblastomicose, no entanto, recidivas podem ocorrer com o reaparecimento

de lesões nodulares ou verrucosas, geralmente periféricas e às cicatrizes atróficas, mas podem ser tratadas novamente com nitrogênio líquido (MORAES et al., 2008).

A combinação de antifúngicos e ou métodos físicos, no geral, é utilizado na prática terapêutica como uma das últimas opções nos casos de micoses refratárias e avançadas de CBM. No entanto, não há evidências que apoiem a superioridade da combinação de dois antifúngicos sistêmicos sobre as demais combinações de tratamentos da CBM (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Analisar os achados histopatológicos correlacionando com tipo lesional, gravidade e terapias realizadas em pacientes portadores de agentes da CBM atendidos no CREDIP (Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias) em São Luís - Maranhão.

3.2 Objetivos Específicos

- Conhecer os aspectos epidemiológicos, forma clínica, e tratamentos realizados e nos pacientes portadores de CBM;
- Avaliar os graus de intensidade dos achados histopatológicos, associados aos diversos tipos lesionais e gravidade dada CBM;
- Comparar os achados histopatológicos encontrados da clínica da CBM, de acordo com o tratamento implementado, no período estudado: itraconazol, em monoterapia, e em associação com crioterapia (nitrogênio líquido) e imunomodulador tópico (imiquimode).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Tipo de estudo e período de realização.

Estudo descritivo, analítico, longitudinal dos casos confirmados de CBM atendidos no CREDIP (Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias), da UFMA, no período de fevereiro de 2017 a agosto de 2018.

4.2 Local de Estudo

O estudo foi realizado no ambulatório do CREDIP, da UFMA, Centro de referência, no Maranhão para a CBM, com assistência de profissional infectologista, especialista em Doença Infectocontagiosa, cadastrado na unidade e que realizaram exames para CBM, num período de 10 anos, com atendimento e acompanhamento de mais de 200 portadores da doença.

4.3 População e amostra

Amostra de conveniência, compreendendo a população de indivíduos com diagnóstico de CBM entre fevereiro/2017 a agosto/2018.

O estudo foi realizado com exame histopatológico e microbiológico no momento do diagnóstico clínico e entre 6 meses de tratamento, com outra coleta de biópsia com exame histopatológico para avaliação da resposta inflamatória local. (Anexo A e Anexo B).

Os dados foram anotados em uma ficha-protocolo do serviço ambulatorial com variáveis sociodemográficas, clínicas, terapêuticas, assim como a descrição dos achados histopatológicos (Anexo C).

4.4 Critério de inclusão

Foram incluídos na pesquisa todos os pacientes com diagnóstico de CBM, cadastrados e em tratamento regular no CREDIP, que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE (Anexo D).

4.5 Critério de exclusão

Todos os pacientes com diagnóstico de CBM, em abandono do tratamento e/ou em tratamento irregular e aqueles com diagnóstico negativo para a doença.

4.6 Coleta das amostras clínicas

As amostras clínicas foram coletadas por biópsia de tecido por meio de punch, sob anestesia local de lidocaína a 5%, sendo acondicionadas em tubo de vidro estéril contendo 2 ml de soro fisiológico a 0,85% estéril e transportadas ao laboratório de microbiologia, em caixas térmicas apropriadas, conforme recomendação da RDC nº 302 (BRASIL, 2005). A escolha do local a ser biopsiado foi determinado pela presença de pontos negros (fungo) presentes nas lesões com sinais de infecção secundária.

4.6.1 Processamento laboratorial das biópsias

As biópsias foram processadas na Microbiologia do Laboratório Cedro, São Luís-Maranhão e, colocadas em placas de Petri estéreis, fragmentadas em pequenos pedaços com auxílio de lâmina de bisturi nº. 15. Os vários fragmentos foram utilizados para realizar o exame micológico direto e a cultura para fungos.

4.6.2 Exame micológico direto das biópsias

Fragmentos da biópsia foram examinados entre lâmina e lamínula com hidróxido de potássio (KOH) a 20%, em microscópio óptico com objetiva 40x (ANVISA, 2008).

4.6.3 Cultura das amostras clínicas para isolamento dos fungos

Os fragmentos da biópsia foram semeados em meios de cultura Sabouraud Dextrose Ágar Difco™ (SDA) e Mycobiotic Ágar BBL™, incubados à temperatura de 28°C a 37°C em estufa bacteriológica por um período de 12 a 30 dias e examinados após crescimento (ANVISA, 2008).

4.6.4 Identificação dos fungos isolados das amostras clínicas

As identificações das linhagens isoladas foram realizadas com base na macromorfologia das colônias e na micromorfologia da conidiogênese segundo a técnica de microcultivo Riddell (1950). Para os exames micromorfológicos foram utilizados o meio de Ágar Batata Dextrose Difco™ (PDA). Dois cubos de PDA foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi nº 15 estéreis e colocados sobre a superfície de uma lâmina de vidro acondicionada dentro de uma placa de Petri. Em seguida, fragmentos da colônia do fungo dematiáceo foram inoculados em quatro pontos laterais do meio PDA. Os cubos de ágar então recobertos com lamínula, com adição de água estéril para fazer uma câmara úmida. As placas de microcultivos foram incubadas a 28°C em estufa bacteriológica por 12 a 30 dias. Após esse período, retiraram-se as lamínulas contendo os crescimentos fúngicos e, em seguida montadas as lâminas com lactofenol-azul de algodão. A leitura foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 40x. (ANVISA, 2008) (Anexo B).

4.6.5 Exame histopatológico das biópsias

No preparo do material de biópsia para exame histopatológico, foi aplicada a técnica de inclusão em parafina e coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). A partir do ato cirúrgico, os fragmentos coletados foram imersos em formaldeído a 10%, garantindo a integridade do material, em seguida, encaminhado ao laboratório para o processamento com desidratação em solução de álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) com banhos sucessivos de 1h. Para garantir a total desidratação do tecido, a última etapa se repete em triplicata; seguidamente o material é submerso em xilol I e II com duração de 1h em cada banho. O xilol é solvente da parafina e desalcoolizante. Por fim, encaminhado para a estufa de parafina absoluta a 54°C, por duas imersões sucessivas, impregnando o material.

Na etapa seguinte, de inclusão com a parafina líquida a 60° e com o auxílio de uma forma de metal em “L”, foi constituído o bloco de tecido. A etapa seguinte confere microtomia em micrótomo de parafina, com corte da fita de tecido na espessura de 4 a 7 micra, colhidas em lâminas de vidro, a partir do banho – Maria, meio que favorece o desaparecimento das dobras da fita, para a posterior, leitura do diagnóstico. O material sobre a lâmina leva um banho rápido de albumina para melhor adesão no vidro e, é encaminhado à estufa de secagem padrão por 10 minutos a 60°C para derretimento da parafina. Seguidamente o material é imerso em solvente (xilol) em banhos rápidos na etapa de desparafinação. Por fim, encaminhados à coloração com HE. Os cortes são hidratados, imersos em banhos rápidos com álcool etílico em concentrações decrescentes e logo hidratados, procedeu-se a coloração com hematoxilina, com banho de 1 minuto, retirando-se o excedente do corante com água, em seguida o tecido foi imerso em eosina, lavado com álcool etílico em banho rápido e clarificado com solvente xilol, também em banho rápido. Na última etapa, de montagem, uma gota de resina entelã foi colocada sobre os cortes e cobertos com lamínulas, expostos à temperatura ambiente para secagem. A leitura foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 40x. Todos os cortes processados e coloridos ocorreram em triplicata, para garantir a visualização do fungo em diferentes profundidades do corte.

As análises das lâminas foram realizadas para avaliar e quantificar os elementos histopatológicos (Anexo A). A contagem dos elementos histopatológicos foram realizadas por meio de microscopia óptica, sendo as estruturas analisadas na

objetiva de 100x, com contagem dos achados histopatológicos. O grau de intensidade da presença destes elementos foi quantificado segundo os seguintes escores: 0 (Ausente), + (Raros), (Frequentes) ++ e (Numerosos) +++ (MINOTTO, 2009).

As variáveis histopatológicas analisadas foram: hiperplasia pseudoepiteliomatosa, granuloma epiteliomatoso, granuloma de Langerhans, histiócitos, microabscesso, proliferação vascular, polimorfonuclear e corpúsculo muriforme.

4.12 Tratamento

O tratamento no estudo foi realizado com itraconazol para os pacientes com doença leve 200mg/dia, e em doença moderada e grave, foi itraconazol 400mg/dia. Em pacientes com lesão infiltrativas, associou-se imiquimode, tópico, 3 vezes por semana e naqueles com baixa resposta terapêutica e os que puderam comparecer no ambulatório a cada 15 dias, associou-se nitrogênio líquido.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário do Maranhão/HU/UFMA, em 13 de Outubro de 2015 sob o número do Parecer Consubstanciado 1.276.342.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram compilados em banco do Programa Excell 2000 e analisados com auxílio do software SPSS 10.0 software, com aplicação de provas estatísticas do teste *t Student*, teste não paramétrico de aderência e KRUSKAL-WALLIS; teste ANOVA, o coeficiente de correlação de Pearson e teste de qui-quadrado de Pearson . Em todos os testes aplicados foi considerado o nível de significância $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

Foram avaliados 52 pacientes, com coleta de exames na primeira consulta, com dados epidemiológicos apresentados na tabela 1, observando-se maior ocorrência do sexo masculino (92%) ($p < 0,0001$), idade entre 50 e 60 anos (40%) ($p = 0.0027$), com idade média de 57,9 anos e todos tinham atividade na lavoura, tendo sido utilizado o teste de aderência para proporções esperadas iguais (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das características e de tratamento Epidemiológicas de pacientes com agentes da CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto /2018.

VARIAVÉIS EPIDEMIOLÓGICAS		PORTADORES DE CBM		
		<i>n</i>	%	(<i>p</i>)
SEXO	Masculino	48	98	≤0.0001
	Feminino	04	08	
IDADE	30 – 40	03	06	0.0027
	40 – 50	11	21	
	50 – 60	21	40	
	60 –	17	33	
PROFISSÃO	Lavrador	52	100	
TOTAL GERAL		52	100	

Legenda: n: total da amostra; %: porcentagem

As características clínicas dos pacientes (Tabela 2) demonstraram que a maioria dos pacientes tinham entre 1 e 10 anos de doença do aparecimento dos primeiros sinais e sintomas (63%), com maior ocorrência de doença moderada (48%); lesão em placa (73,08%); acometimento de membros inferiores (92%) e tratamento realizado com itraconazol (55,17%), tendo sido definidos através de teste de aderência para proporções esperadas iguais.

Tabela 2. Distribuição das características clínicas de pacientes portadores de CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto/2018.

VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		PORTADORES DE CBM		
VARIÁVEIS CLÍNICAS		n	%	(p)
TEMPO DE DOENÇA (anos)	01 – 10	33	63,00	≤0.0001
	10 – 20	12	23,00	
	20 – 30	06	12,00	
	30 –	01	02,00	
GRAVIDADE	Leve	10	19,00	0.0388
	Moderada	25	48,00	
	Grave	17	33,00	
TIPO DA LESÃO	Placa	38	73,08	≤0.0001
	Verrucosa	24	46,15	
	Nodular	14	26,92	
	Tumoral	04	07,69	
LOCAL DA LESÃO	MI	48	92,00	≤0.0001
	MS	02	04,00	
	MI e outras partes do corpo	02	04,00	
TRATAMENTO	ITZ	16	55,17	≤0.0001
	ITZ + NL ₂	07	24,14	
	ITZ + IMQ	06	20,69	
TOTAL GERAL		29	100	

Legenda: n: total da amostra, %: porcentagem, IMQ= Imiquimode, ITZ = Itraconazol, NL₂=Nitrogênio Líquido, MI = Membros Inferiores, MS = Membros Superiores.

Todos os casos eram autóctones do estado do Maranhão, sendo a maioria oriunda de cidades da Baixada Maranhense, são elas: Pinheiro com o maior número de casos (9,62%), Pedro do Rosário (3,85%) e Palmeirândia, São Bento e Viana (com 1,92%, cada)). A mesorregião norte apresentou o maior número de pacientes atendidos (n=39; 75%), seguido da região oeste (n=8; 15,4%), região leste (n=3; 5,8%) e centro oeste (n=2; 3,8%) (Gráfico 1).

Regiões Maranhenses x Casos de Cromoblastomicoses

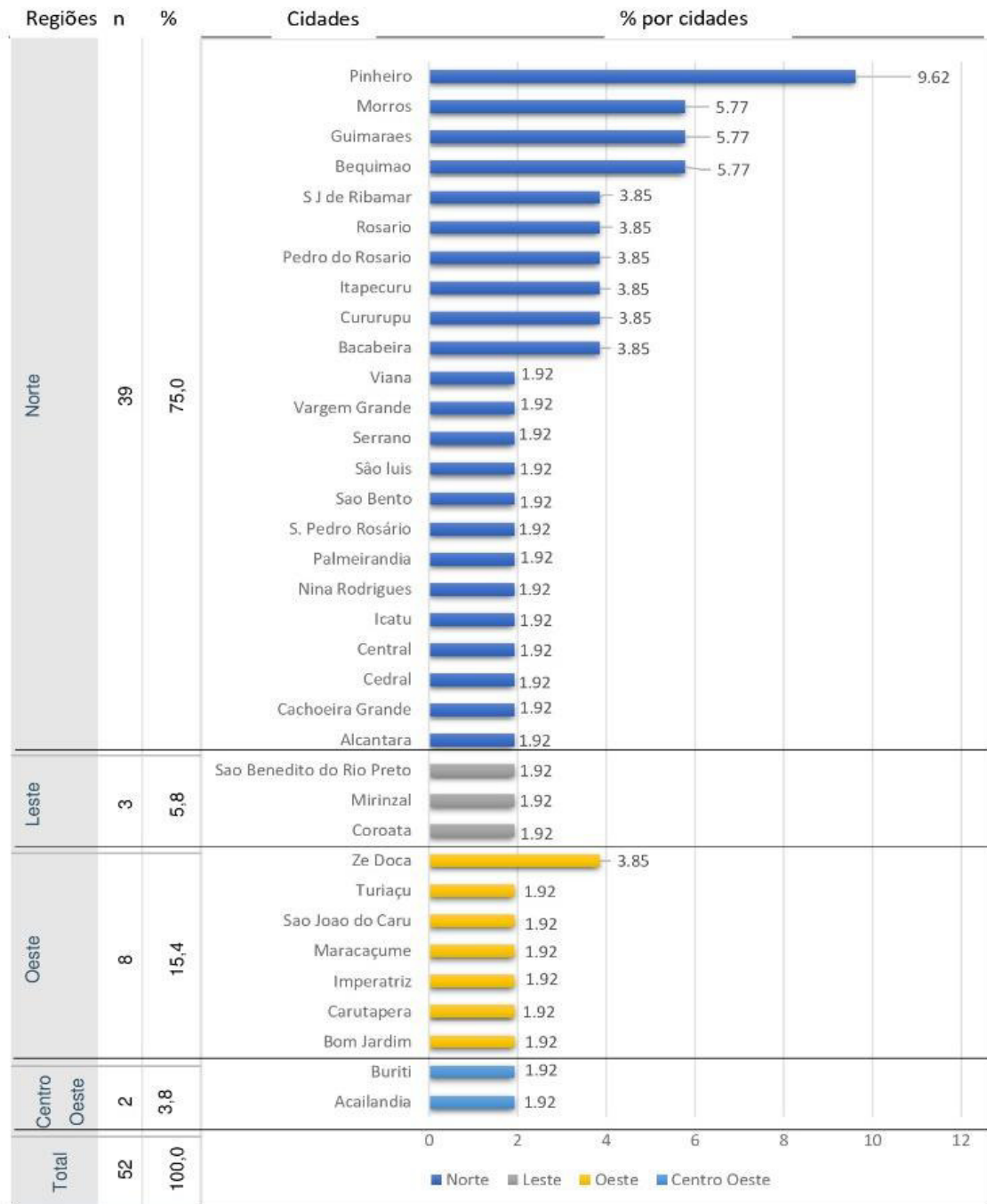


Figura 8: Percentual de origem dos casos de CBM identificados nas regiões do Estado no ambulatório do CREDIP, São Luís, Maranhão, no período fevereiro/2017 a agosto/2018
Fonte: Própria, 2018

Foram investigados os granulomas na análise histopatológica, tendo sido encontrados: granulomas supurativos, granulomas mistos (supurativo e epitelióide) e granulomas epitelióide e avaliado os tipos lesionais. O granuloma supurativo foi o mais prevalente em todos os tipos lesionais, sendo os granulomas mistos (supurativo e

epitelióide) o segundo mais encontrado. Tendo sido definidos através de teste de qui-quadrado de Person (Tabela 3).

Tabela 3. Tipos de granulomas encontrados nos tipos lesionais

Granulomas	Placa			Nodular			Verrucosa			Tumoral		
	n.	%	<i>p</i>	n.	%	<i>p</i>	n.	%	<i>p</i>	n.	%	<i>P</i>
Ausente	06	11,54		09	17,31		03	05,77		01	01,92	
Epitelióide	01	01,92					01	01,92				
Supurativo	20	38,46	≤ 0,001	09	17,31	≤ 0,001	12	23,08	0,579	02	03,85	≤ 0,001
Misto	11	21,15		03	05,77		08	15,38		01	01,92	
Total	38	73,08		21	40,39		24	46,15		04	07,69	

Legenda: n: total da amostra; %: porcentagem

Nas lesões em placa, nodular e tumoral os granulomas apresentaram-se mais prevalentes ($p \leq 0,0001$) com exceção da lesão verrucosa ($p = 0,579$).

A lesão em placa, que foi o tipo lesional mais prevalente nos pacientes com CBM, estava presente em 73,08% dos pacientes, dentre estes 38,46% tinham granulomas supurativos (Figura 9) 21,15% pacientes com granulomas mistos (supurativo e epitelióide) e 1,92% paciente com granulomas epitelióide.

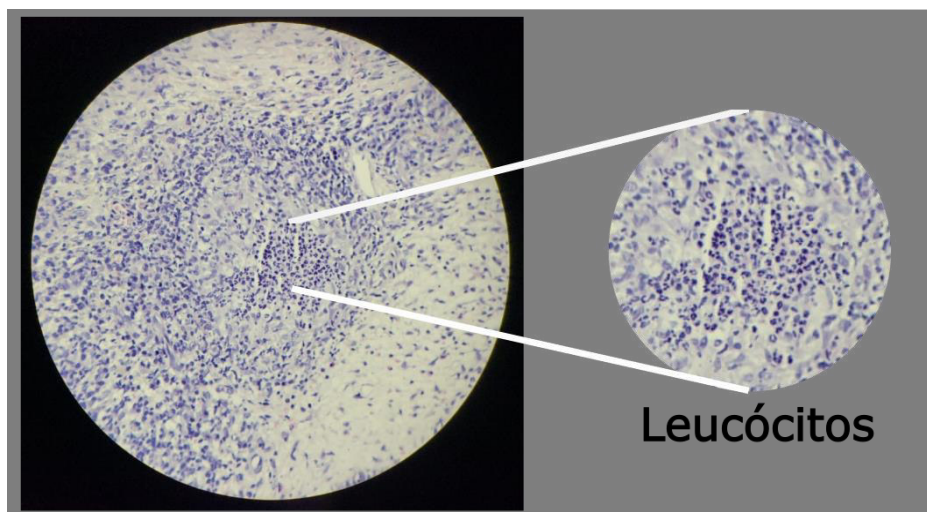


Figura 9. Granuloma supurativo.

Legenda: HE 40 x. Granuloma supurativo. Descrição: Detalhe para o grande número de leucócitos polimorfonucleares circundados por histiócitos e linfócitos.

Fonte: Própria, 2018.

Sobre a associação de achados histopatológicos e tipos lesionais, verificou-se que todas as lesões apresentaram escore máximo de polimorfonucleares, linfócitos e hiperplasia pseudoepiteliomatosa foi obtido ($p < 0,0001$) altamente significativo através

do teste não paramétrico de KRUSKAL-WALLIS, indicando a tentativa de eliminação do fungo (Tabela 4).

No entanto, os achados histopatológicos foram mais evidentes nas lesões em placa e lesões verrucosas, após análise com auxílio do teste t de Student com $p < 0,05$.

Tabela 4. Associação entre achados histopatológicos e tipos de lesões em pacientes com agentes da CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro/2017 a agosto/2018.

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	TIPOS DE LESÕES							
	PLACA		TUMORAL		VERRUCOSA		NODULAR	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Corpúsculo Muriforme	38	100	04	100	24	100	14	100
Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa	38	100	04	100	23	95,83	14	100
Granuloma Langerhans	27	71,05	02	50	19	79,17	11	78,57
Granuloma Epiteliomatoso	14	36,84	02	50	08	33,33	06	42,86
Histiócitos	32	84,21	03	75	20	83,33	13	92,86
Microabscesso	37	97,37	03	75	22	91,67	13	92,86
Proliferação Vascular	38	100	04	100	23	95,83	14	100
PMN	38	100	04	100	24	100	14	100
Linfócitos	38	100	04	100	24	100	14	100
Total Parcial	38	100	04	100	24	100	14	100
Total Geral			52				100	

Legenda: n = total da amostra; %: porcentagem.

A relação da gravidade da doença e os achados histopatológicos, encontrados, mostram com aplicação do teste ANOVA que *granulomas* de Langherans (20,83%) e linfócitos (22,92%) foram mais frequentes em pacientes com doença moderada ($p = 0.0320$). Também a doença moderada apresentou maior intensidade de hiperplasia pseudoepiteliomatosa (23,81%) e polimorfonuclear (20,63%) ($p=0.0052$). Esses achados histopatológicos: granulomas de Langherans, linfócitos, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e polimorfonucleares estão todos envolvidos no processo de eliminação transepitelial (Figura 10 e 11) (Tabela 5).

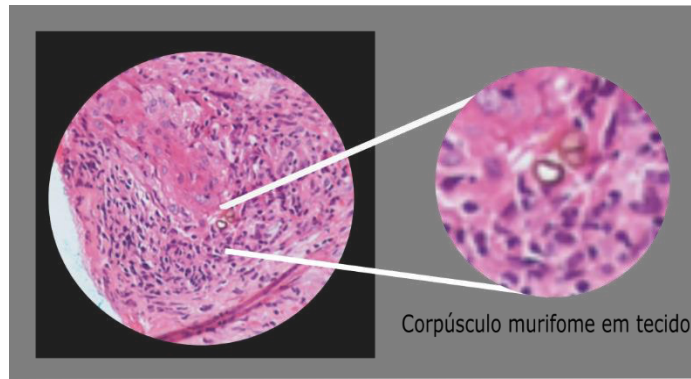


Figura 10. Corpúsculo muriforme em tecido.

Legenda: HE em 40x. Descrição: Anatomopatológico mostrando corpúsculos murifórmes em tecido com hiperplasia pseudoepiteliomatosa e granuloma de Langerhans.

Fonte: Própria, 2018.

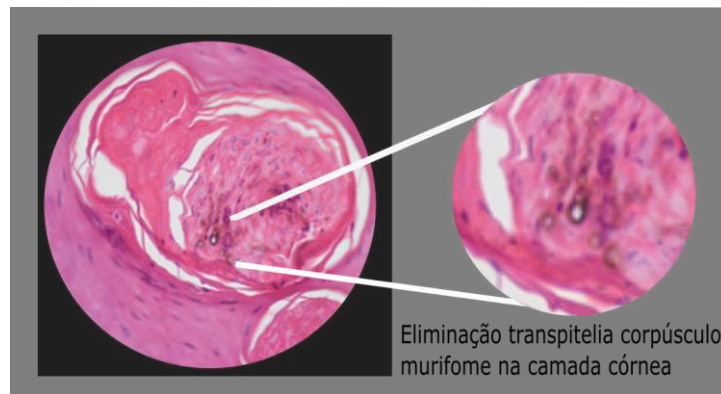


Figura 11. Eliminação transepitelial de corpúsculo muriforme na camada córnea.

Legenda: HE em 40x. Descrição Anatomopatológico mostrando corpúsculos murifórmes em camada córnea.

Fonte: Própria, 2018.

Tabela 5. Associação entre os escores dos achados histopatológicos e níveis de Gravidade em pacientes com agentes da CBM, São Luís, Maranhão, fevereiro, 2017 a agosto, 2018.

GRAVIDADE <i>versus</i> ESCORES DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS																								
ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	0 – AUSENTES						1 – RAROS						2 - FREQUENTES						3 - NUMEROSOS					
	Leve		Moderada		Grave		Leve		Moderada		Grave		Leve		Moderada		Grave		Leve		Moderada		Grave	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	%	n	%	n
Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa					01	04,76	07	18,92	05	07,81	03	06,67	01	04,76	05	10,42	04	12,50	03	17,65	15	23,81	09	23,68
Granuloma de Langerhans	01	16,67	03	12,00	06	28,57	03	08,11	08	12,50	05	11,11	02	09,52	10	20,83	03	09,38	04	23,53	04	06,35	03	07,89
Granuloma Epiteliomatoso	04	66,67	17	68,00	09	42,86	03	08,11	04	06,25		00,00	02	09,52	01	02,08	05	15,63	01	05,88	03	04,76	03	07,89
Histiócitos		00,00	04	16,00	03	14,29	07	18,92	15	23,44	10	22,22	03	14,29	02	04,17		00,00		00,00	04	06,35	04	10,53
Microabscesso		00,00	01	04,00	04	19,05	04	10,81	07	10,94	08	17,78	03	14,29	06	12,50	04	12,50	03	17,65	11	17,46	03	07,89
Proliferação Vascular	01	16,67		00,00		00,00	05	13,51	13	20,31	07	15,56	03	14,29	05	10,42	06	18,75	01	05,88	07	11,11	04	10,53
Polimorfonuclear		00,00		00,00		00,00	02	05,41	04	06,25	07	15,56	04	19,05	08	16,67	06	18,75	04	23,53	13	20,63	04	10,53
Linfócitos		00,00		00,00		00,00	06	16,22	08	12,50	05	11,11	03	14,29	11	22,92	04	12,50	01	05,88	06	09,52	08	21,05
Total Parcial	06	100,00	25	100,00	21	109,52	37	100,00	64	100,00	45	100,00	21	100,00	48	100,00	32	100,00	17	100,00	63	100,00	38	100,00
Total Geral																								

Legenda: n: total da amostra; %: porcentagem.

A análise de achados histopatológicos nos tratamentos propostos foi realizada em 29 pacientes. Observou-se nesta análise que continua ocorrendo a tentativa de defesa do sistema imune contra o agente infeccioso, em todos os tratamentos. São achados significantes para a relação Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa e Granuloma de Langerhans, Histiócitos; Granuloma de Langerhans e Histiócitos, Microabscesso, Proliferação Vascular, Polimorfonuclear, Linfócitos, Corpúsculo Muriforme; Histiócitos e Microabscesso, Proliferação Vascular, Polimorfonuclear, Linfócitos, Corpúsculo Muriforme, com coeficiente de correlação de Pearson ($p < 0.05$, $R^2 > 80\%$, $(r) > 0.9$). A proliferação vascular, que parece ajudar a transportar o medicamento até o local da lesão, mostra-se com grande intensidade no início do tratamento (Tempo 0) em todos os pacientes ($n=29$). Após 6 meses de tratamento (Tempo 1) apenas 11 pacientes apresentaram proliferação vascular nos locais das lesões. Os corpúsculos muriformes apresentaram redução nos tratamentos com itraconazol e itraconazol + nitrogênio líquido, após os 6 meses de tratamento (Tempo 1) No tratamento com imiquimode não ocorreu mudança do número de corpúsculos muriformes 6 pacientes (Tempo 0 e Tempo 1) (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação entre achados histopatológicos e tratamentos.

Achados Histopatológicos	ITZ		ITZ+IMQ		ITZ+NL2		Total		p
	Tempo								
	0	1	0	1	0	1	0	1	
Corpúsculo muriformes	16	13	06	06	07	06	29	25	$\leq 0,001$
Hiperplasia pseudoepiteliomatosa	15	16	06	06	07	07	28	29	
Granuloma de Langerhans	14	05	04	04	05	04	23	13	
Granuloma epitelial	07	08	05	01	03	01	15	10	
Histiócitos	13	15	05	05	06	07	24	27	
Microabscesso	15	13	06	05	07	07	28	25	
Proliferação vascular	16	06	06	01	07	04	29	11	
Polimorfonucleares	16	16	06	06	07	07	29	29	
Linfócitos	16	08	06	04	07	03	29	15	

Legenda: ITZ = Itraconazol, IMQ= Imiquimode, NL₂=Nitrogênio Líquido, 0= início do tratamento e 1= durante o tratamento.

Nos gráficos de 1 a 8 estão demonstradas as cargas fúngicas e sua evolução em relação ao tratamento utilizado pelos pacientes. Nos gráficos de 1 a 4 indicam o início do tratamento e nos gráficos 5 a 8 indicam a evolução do tratamento com o total de 29 pacientes. Ao analisar a intensidade da carga fúngica, observou-se que houve redução dos corpúsculos muriformes, sendo mais evidente no tratamento com

itraconazol em monoterapia. Todos os pacientes no início do tratamento apresentaram corpúsculos (n=29) e a maioria dos pacientes possuem carga dos fungos entre raros e frequentes, ressaltando que a maioria dos pacientes do estudo apresentaram lesões moderadas e grave.

Gráfico 1. Carga fúngica, início do tratamento com ITZ (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.

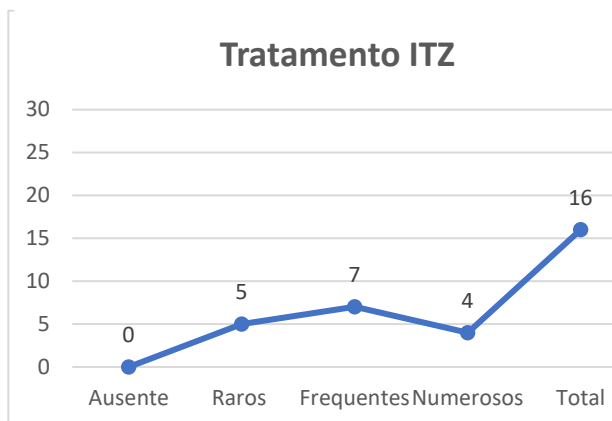


Gráfico 2. Carga fúngica, início do tratamento com ITZ + IMQ (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.

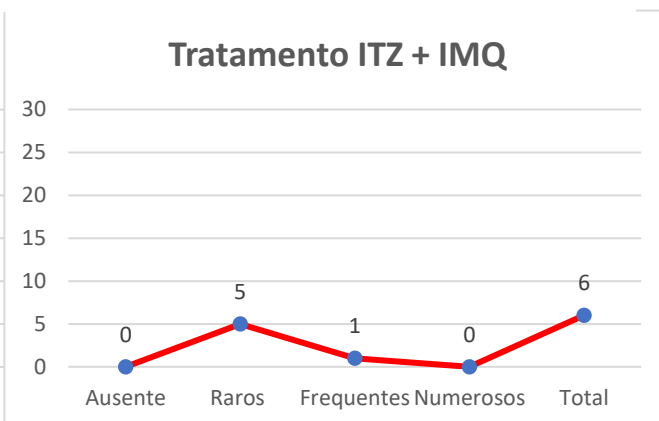


Gráfico 3. Carga fúngica, início do tratamento com ITZ + NL2 (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.

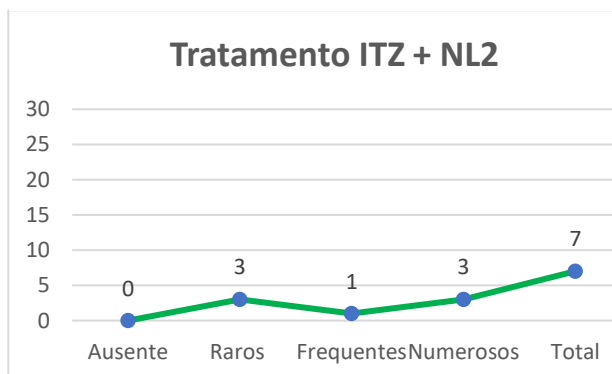
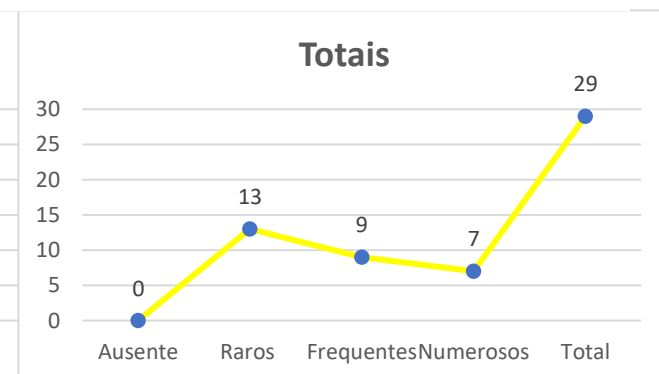


Gráfico 4. Carga fúngica, início do tratamento com quantitativos totais (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.



Nos gráficos de 5 a 8, 03 pacientes em tratamento com itraconazol e 01 paciente em tratamento com itraconazol + nitrogênio líquido apresentaram-se sem carga fúngica. Na carga fúngica *raros*, o itraconazol e o itraconazol + nitrogênio líquido continuaram apresentando boa evolução, com 06 pacientes utilizando o itraconazol e 04 pacientes utilizando o itraconazol + nitrogênio líquido. Observa-se assim a redução da intensidade da carga fúngica em relação ao início do tratamento. O mesmo não ocorre em relação ao tratamento com itraconazol + imiquimode, onde há um aumento da intensidade da carga fúngica em *frequentes* e *numerosos* em relação ao início do tratamento.

Gráfico 5. Carga fúngica, durante o tratamento ITZ (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.

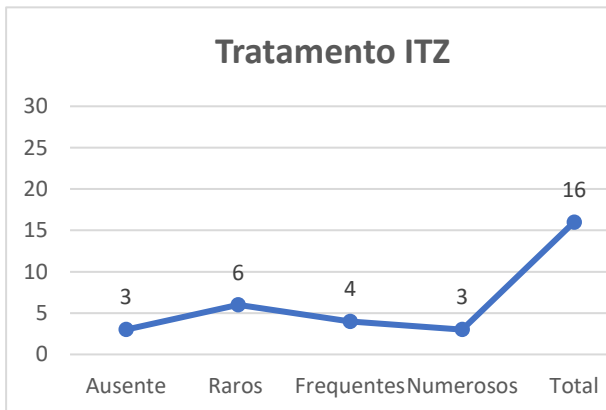


Gráfico 6. Carga fúngica, durante o tratamento ITZ + IMQ (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.

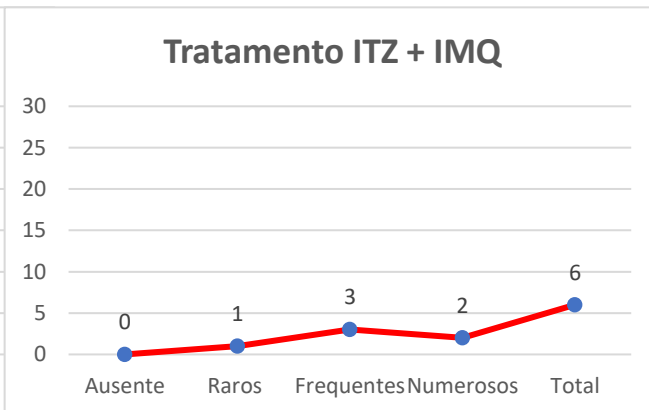


Gráfico 7. Carga fúngica, durante o tratamento ITZ + NL2 (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.

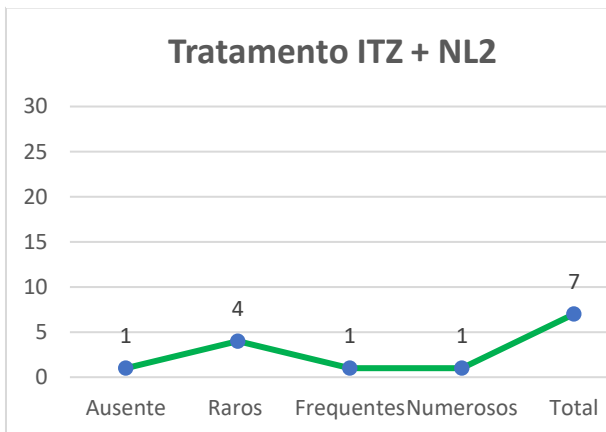
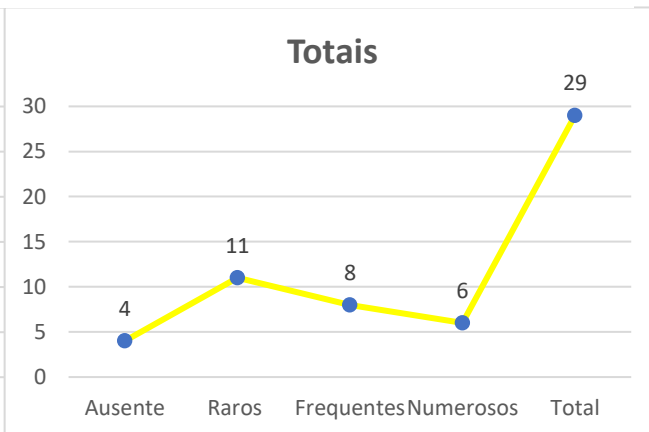


Gráfico 8. Carga fúngica, durante o tratamento com quantitativos totais (n=29 pacientes), sua evolução e relação com o tratamento.



Outro dado que deve ser observado é que durante o estudo com 52 pacientes, 04 (7,69%) pacientes abandonaram o tratamento, 10 (19,23%) pacientes ficaram curados, sendo 09 (17,30%) pacientes fizeram tratamento com itraconazol e 01 (1,92%) paciente fez tratamento com itraconazol e nitrogênio líquido.

8 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou 52 pacientes com CBM oriundos do Estado do Maranhão. Adultos, do sexo masculino, com idade de 50 a 60 anos e lavradores foram os mais acometidos. Resultados corroborados por Correia et al. (2010), que em estudo com 27 voluntários, mostraram maior prevalência de homens entre 51 a 60 anos e trabalhadores rurais.

Os membros inferiores foram os mais afetados e o tipo de lesão em placa a mais prevalente, observação semelhante ao encontrado no estudo de Agarwal et al. (2017), que mostrou 56,80% de comprometimento de membros inferiores e lesões em placas na sua amostra de 54,7% dos casos. O tempo de doença menor que 10 anos, mostra diferença dos resultados de Melo e Silva et al. (1992) com estudo no Maranhão, com tempo de doença dos pacientes da amostra maior de 10 anos, mostrando que a divulgação de informações sobre a patologia nas diversas cidades do interior do Maranhão, tem apresentado resultados, com diagnóstico mais precoce. Mas não se pode ignorar que a dificuldade de acesso aos serviços de saúde para diagnóstico e tratamento da doença ainda influenciam no tempo de evolução, assim como a gravidade das lesões.

Os resultados da terapia com itraconazol são limitados principalmente pela absorção intestinal deficiente, conseqüentemente levando a baixos níveis plasmáticos e teciduais, sendo necessário a monitorização terapêutica do fármaco. Infelizmente estão faltando ensaios clínicos comparativos para apoiar esta abordagem, bem como avaliação de pacientes que recebem outros medicamentos que sejam metabolizados pelo sistema enzimático do citocromo P450 3A4. Outros fatores que podem estar envolvidos nestas reduções das concentrações teciduais são as fibroses teciduais, edemas e coinfeções bacterianas, muito encontradas nos tecidos subcutâneos (DE HOOG et al., 2000). É nesse momento que outras estratégias podem ser utilizadas como adjuvantes terapêuticos, dentre eles associação de nitrogênio líquido local e o imiquimode. A combinação de itraconazol com nitrogênio líquido é uma alternativa para reduzir o tamanho das lesões extensas, pois estimula a destruição dos tecidos atingidos pela doença através do congelamento, promovendo as alterações da resposta imunológica no tecido (BONIFAZ et al., 1997; MORAES et al., 2008).

Já o imiquimode, como imunomodulador tópico, tem se apresentado como uma nova alternativa de tratamento clínico em associação com o itraconazol, devido suas propriedades imunorreguladoras que estimulam, tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adquirida (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Estudos realizados em ratos infectados por *Fonsecaea pedrosoi* utilizaram o imiquimode que ajudou a restaurar as respostas imunes inatas, resolvendo a infecção sem efeitos adversos (SOUSA et al., 2011). Em outro estudo, o imiquimode, foi aplicado inicialmente em monoterapia em um paciente com bons resultados, sendo necessária a associação apenas no final do tratamento com itraconazol e terbinafina para a obtenção da cura do paciente (SOUSA et al., 2014).

A Baixada Ocidental Maranhense tem-se apresentado como área endêmica da CBM no Estado, já relatado desde 1992, em trabalho Mello e Silva et al. (1992) coloca que a maioria dos pacientes eram procedentes da mesma área. A região apresenta-se alagadiça, quente e úmida, o que proporciona boas condições para o desenvolvimento do principal agente etiológico da CBM. Fato confirmado por pesquisas que relataram regiões de clima tropical e subtropical como áreas mais prevalentes da doença (LE et al., 2018; PIRES et al., 2012; CORREIA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2018).

Fonsecaea pedrosoi é um dos agentes mais comuns causadores da CBM, sendo isolado em todos os casos da amostra no presente estudo. Esse agente também se mostrou prevalente em estudo realizado no Pará, onde os autores avaliaram 47 casos, com isolamento de *Fonsecaea pedrosoi* (PIRES et al., 2012).

Histopatologicamente, a cromoblastomicose está entre as doenças granulomatosas que estimulam a concentração de células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear e simultaneamente uma resposta do sistema fagocítico polimorfonuclear. Os resultados apresentados neste estudo foram em parte corroborados por Avelar-Pires et al. (2013), pois a maioria dos granulomas encontrados foram os supurativos (46,5%), no entanto, foram encontrados granulomas tuberculóides (33,3%) em lesões verrucosas (55,4%) e seguidos de lesões em placa (26,2%), no estudo descritivo de 65 pacientes. As inflamações supurativas, são sugestivas de imunidade celular menos competente, pode ser o motivo pela qual essas lesões tornam-se mais graves.

Uribe-J et al. (1989) em seu estudo, mostra que o epitélio apresenta importante papel na eliminação transepitelial do fungo, revelando em sua amostra, hiperplasia

pseudoepiteliomatosa em 88,6% dos casos, com semelhança ao encontrado neste estudo. Há autores que sugerem que não somente a hiperplasia pseudoepiteliomatosa faz com que o fungo se mova em direção à epiderme, mas os polimorfonucleares em conjunto com outros elementos celulares formando os microabscessos, buscam realizar a eliminação transepitelial do microrganismo (MEHREGAN, 1977; URIBE et al., 1982). É nesse momento que o fungo é encontrado na camada córnea constituída de queratina para que seja eliminado. Entretanto, nesse momento o fungo pode entrar em estado vegetativo regular, ou se tornar um agente persistente alojando-se no tecido adjacente e prosseguindo com a infecção. Porém, o fungo pode se utilizar desse mecanismo para se manter ativo e favorecer a reativação da doença em momento oportuno.

No entanto, todo o mecanismo da eliminação transepitelial não foi totalmente esclarecido (BATRES et al., 1878; MINOTTO, 2009). Neste estudo, foram encontrados 16 pacientes (30,76%) que apresentavam fungos na camada córnea, dado corroborado por Avelar et al. (2013), onde a eliminação fúngica foi encontrada em 12 (18,5%) casos.

Em comparação com estudo realizado com 51 casos de CBM obtiveram cura de 31% dos pacientes, com vários tratamentos, entre eles, com itraconazol em 03 (5,76%) pacientes e criocirurgia e itraconazol em 04 (7,84%) pacientes, para pequenas lesões (BONIFAZ et al., 2001). Sendo assim, obtiveram maior porcentagem de cura com a variedade de tratamento, mas para o itraconazol e o nitrogênio líquido neste estudo obteve resultados um pouco maiores por ter menor variedade de tratamentos.

Diante dos resultados apresentados o itraconazol foi o tratamento que apresentou melhores resultados na redução da presença de corpúsculos muriformes e na cura de pacientes mais do que em associações. O que leva a inferir que o tratamento de escolha dentre estes analisados seria o itraconazol, sem necessitar de associações, porém o que chama a atenção são os tratamentos coadjuvantes que foram introduzidos por não haver resposta inicial em alguns pacientes ou por apresentarem lesões graves, de grandes extensões. Ao fazer a associação com nitrogênio líquido, demonstrou bons resultados, por ser o nitrogênio líquido um tratamento físico que em conjunto com uma possível adjuvância imunológica realiza essa redução fúngica que, no entanto, tem que ser avaliado o custo benefício.

A associação com imiquimode mostrou aumento da intensidade da carga fúngica, podendo-se explicar que foi utilizada em grande parte, quando o itraconazol não apresentava boa resposta terapêutica. Há poucos estudos sobre essa associação em casos de CBM, tendo-se um único estudo com 04 pacientes por Sousa et al. (2014), onde afirmaram que ao utilizar o imiquimode, haveria superação do defeito de reconhecimento inato do sistema imune reforçando as respostas inflamatórias, levando a depuração do patógeno e resolvendo assim a infecção. No entanto, no estudo realizado por Sousa et al. (2014) foi realizada a associação com a terbinafina. Apenas em um dos quatro pacientes, foi feita a associação do imiquimode com itraconazol, onde foram obtidos bons resultados, chegando até a cura. Não tendo sido corroborado por este estudo, fazendo-se necessário, mais pesquisas sobre a farmacodinâmica, farmacocinética e as interações medicamentosas, quando em associações com outros tratamentos. No entanto, o que se pode afirmar é que o itraconazol o melhor tratamento de escolha para Cromoblastomicose.

9 CONCLUSÃO

Os resultados possibilitaram concluir que:

- A CBM acomete homens, com idade de 50 a 60 anos, trabalhadores em contato direto com o solo;
- Os municípios que apresentaram maior prevalência de pacientes com CBM, também dispõem de condição climática e ambiental favorável à proliferação do agente;
- Redução significativa do tempo de ocorrência da doença, com gravidade moderada e lesões de placa, a divulgação de informações sobre a patologia nas diversas cidades do interior do Maranhão, tem apresentado resultados, com diagnóstico mais precoce;
- Achados, lesões e histopatologia se confirmam aos princípios de referencial bibliográfico, assim como o processo de eliminação transepitelial na atenção à evolução da doença e o tratamento disponível;
- *Fonsecaea pedrosoi* é um dos agentes mais comuns causadores da CBM isolados no Maranhão;
- Os tipos de inflamação mais presente nas lesões em placa foram granuloma supurativo e o granuloma misto (supurativo e epitelióide);

- O itraconazol em monoterapia, apresenta os melhores resultados em termos de cura e redução de carga fúngica do que em associação com imiquimode e nitrogênio líquido;
- O itraconazol e o nitrogênio líquido apresentaram bons resultados, no entanto, tem que ser avaliado seu custo benefício;
- A associação de itraconazol com imiquimode não apresentou boa evolução, sendo evidenciada com aumento da intensidade da carga fúngica;
- Pesquisar mais sobre a farmacodinâmica, farmacocinética e as interações medicamentosas quando em associações com outros tratamentos;
- É necessário continuar a analisar os tratamentos e evoluções dos pacientes de Cromblastomicose.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL R, SINGH G, GHOSH A, VERMA KK, P MRAGNAYANI, XESS I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 cases. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2017.
- AJELLO L, GEORGE LK, STEIL BIGEL RT, WANG K. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. Mycologia 1974; 66: 490-498.
- ANDRADE TS, CASTRO LGM, NUNES RS, GIMENES VMF, CURY AEC. Susceptibility of sequential Fonsecaea pedrosoi isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. Blackwell Publishing Ltd. Mycoses. 2004; 47: 216–221.
- ANVISA. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica, 2008.
- AVELAR-PIRES C, QUARESMA JUAREZ AS, MACEDO GMM DE, XAVIER MB, BRITO, ARIVAL C de B. Revisiting the Clinical and Histopathological Aspects of Patients with Chromoblastomycosis from the Brazilian Amazon Region. Archives of Medical Research 2013; 44: 302-306.
- AVILA SCGPD, PAGLIARI C, SEIXAS DMI. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. Mycopathologia 2003; 152: 51–60.
- AZEVEDO CMPS, MARQUES SG, SILVA NF, SILVA RR, SANTOS DWCL, AZEVEDO FS, STOIANOFF MAR. Twenty years of chromoblastomycosis in Maranhão. Mycoses 2012; 55:95–138.
- AZEVEDO CMPS, BRUÑA-ROMERO O, MARQUES SG, NASCIMENTO FRF DO, PINTO MC, SILVA LA, BOUILLET LEM, AZEVEDO FS DE, RESENDE AZEVEDO CMPS, MARQUES SG, SANTOS DWCL, SILVA RRS, SILVA NF, SANTOS DA, RESENDE-STOIANOFF MA. Squamous Cell Carcinoma Derived From Chronic Chromoblastomycosis in Brazil. Clinical Infectious Disease, 2015; 60: 1500-1504.
- BAYLES MAH. Chromomycosis: in Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. Tropical Fungal Infections. 1989; 4: 45-70.
- BATRES E, WOLF JR JE, RUDOLPH AH, KNOX JM. Eliminação transepitelial da Cromomicose Cutânea. Arch Dermatology 1978; 114: 1231-1232.
- BOLZINGER T, PRADINAUD R, SAINTE-MARIE D, DUPONT B, CHWETZOFF E. Traitement de quatre cas de chromomycose à Fonsecaea pedrosoi par l'association 5-fluorocytosine-itraconazole. Les Nouvelles Dermatologiques 1991; 10: 462-466.
- BONA E DE, CANTON ML, FUENTEFRÍA AM. Chromoblastomycosis in Santa Catarina state, Brazil. Revista Cubana Medicina Tropical. 2010; 62: 254-6.

BONIFAZ A, CARRASCO-GERARD E, SAUL A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*. 2001; 44: 1–7.

BONIFAZ A, MATINEZ-SOTO E, CARRASCO-GERARD E, PENICHE J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int J Dermatol* 1997; 36: 542-7.

BOPP C, BERNARDI C. Geopatologia da cromoblastomicose no Rio Grande do Sul. *Medicina Cutânea ILA* 1973; 7: 1-9.

BORELLI D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Reviews of Infectious Diseases* 1987; 9: 57-63.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento para Laboratórios Clínicos. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, de 14 de outubro de 2005.

BRUMPT E. *Precis de Parasitologie*, 3 ed. Paris: Ed. Masson et. cie, 1922; 1: 1105.

CARRIÓN, A. Chromoblastomycosis. A new clinical type caused by *Hormodendrum compactum*. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* 1936; 11: 663-682.

CARRIÓN, AL. Chromoblastomycosis. *Annals of New York Academy of Sciences* 1950; 50: 1255-1282.

CASTRO RM, CASTRO LGM. On the priority of description chromomycosis. *Mykosen* 1987; 30: 397-403.

CASTRO LGM, SALEBIAN A, LACAZ CS. Células fúngicas permanecem viáveis por até doze dias em lesões de cromomicose tratadas pela criocirurgia com nitrogênio líquido. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2003; 78: 279-82.

CORREIA RTM, VALENTE NTYS, CRIADO PR, MARTINS JEC 2010; 85: 448-54.

COSTELLO MJ, DEFEO CP, LITTMAN ML. Chromoblastomycosis Treated with Local Infiltration of Amphotericin B Solution. *Ama. Arch. of Dermatol.* 1959; 79: 184-193.

COSTELLO JT, ALGAR L, DONNELLY A. Effects of whole-body cryotherapy (2 110uC) on proprioception and indices of muscle damage. *Scandinavian Journal Medicine Science Sports* 2012; 22: 190–198.

DABOIT TC. Nanoemulsões de anfotericina B e itraconazol: avaliação da atividade antifúngica in vitro e in vivo em agentes da cromoblastomicose. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, 2013.

D'AVILA SCG, PAGLIARI C, DUARTE MIS. 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.

DEFAVERI J, GRAYBILL JR. Treatment of chronic murine chromoblastomycosis with the triazole SCH39304. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990; 42; 6: 601-606.

DE HOOG GS DE, ATTILI-ANGELIS D, VICENTE VA, GERRITS VAHG, QUEIROZ-TELLES F, GOMES RR, VICENTE VA, AZEVEDO M, SALGADO CG, DA SILVA M B. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* Species *Medical Mycology* 2004; 42: 405-416.

DE HOOG GS, QUEIROZ-TELLES F, HAASE G, FERNANDEZ-ZEPPEFELDT G, ATTILI ANGELIS D, GERRITS VAN DEN ENDE AHT, MATOS, H. PELTROCHE-LLACSAHUANGA T, PIZZIRANI-KLEINER AA, RAINER J, RICHARD-YEGRES N, VICENTE V, YEGRES F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology* 2000 38; 1: 243–250.

ESTERRE P, JAHEVITRA M, RAMARCEL E, ANDRIANTSIMAHAVANDY A. Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. *Journal de Mycologie Médicale* 1997; 7: 137-141.

ESTERRE P, QUEIROZ-TELLES F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006; 19; 148-152.

EUROFARMA. Itraconazol. Bula para pacientes. 2017. Acesso em: 05/09/2018. Disponível em: <<http://consultaremedios.com.br/itraconazol-eurofarma/bula>>

FERREIRA LA, YOKOYAM H, PORTELA MPC, FROZ RMA. Cromomicose com características clínicas e anatomopatológica de neoplasia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 14., Belo Horizonte, 1981. Anais. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Patologistas. 1981; 1: 137.

FIROOZ A, KHAMESIPOUR A, GHOORCHI MH. Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. *Arch Dermatol* 2006; 142:1575–9.

GALERA RML. Anfotericina B: determinación en diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación a estudios farmacocinéticas y de estabilidad química. 2000. 101p. Tesis (Doctoral)- Unidad de Monitorización de Fármacos del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona. Pos-Gradación en Farmacia, Barcelona, 2000: 101.

GIMENES VMF, SOUZA M DA G, FERREIRA KS, MARQUES SG, GONÇALVES AG, SANTOS DV DE CLS, SILVA C DE MP. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2005; 7: 708–13.

GOMES RR, VICENTE VAV, AZEVEDO CMPS DE, SALGADO CG, SILVA MB da S, QUEIROZ-TELLES F, MARQUES SG, SANTOS DWCLS, ANDRADE TS DE, TAKAGI E H, CRUZ KSC, FORNARI G, HAHN RC, SCROFERNEKER ML, CALIGINE RB, RAMIREZ-CASTRILLON M, JO DP DE A, HEIDRICH D, COLOMBO ARNALDO L, DE HOOG GS DE. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. PLOS Neglected Tropical Diseases 2016;10; 1-20.

HANNA E, ABADI R, ABBAS O. Imiquimod in dermatology: an overview. International Journal of Dermatology. 2016; 55: 831–844.

JOBANPUTRA KS, RAJPAL AV, NAGPUR NP. IMIQUIMOD. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2006; 72: 466-9.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC. Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Dermatite verrucosa cromoparasitária (cromomicose). São Paulo Sarvier 1984; 7: 275-284.

LANE C. A cutaneous disease caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. Journal of Cutaneous Diseases 1915; 33: 840-846.

LAVALLE P, SÚCHEL P, DE OVANDO F, REYNOSO S. Itraconazole for deep mycoses: preliminary experience in Mexico. Rev. Infect. Dis. 1987; 9: 64-70.

LE TA, NGUYEN KL, PHAM MH, VI T-T, DO NA. Case Report: A Case of Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Vietnam. Springer Nature B.V. Mycopathologia, 2018;1: 115–119.

LESHCHENKO VM, RUKAVISHNIKOVA VM, IL'CHENKO LS, KUKOLEVA LI, SHIRSHIKOVA II. Experience in the treatment of patients with chromoblastomycosis. Vestn. Dermatol. Venerol. 1989; 3: 69-72.

MARQUES SG, SILVA CMP, SALDANHA PC, RESENDE MA, VICENTE VA, QUEIROZ-TELLES F, COSTA JML. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the Shell of the Babassu Coconut (*Orbignya phalerata* Martin) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. Japanese Journal of Medical Mycology 2006, 47: 305-311.

MCGINNIS MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. Journal of the American Academy of Dermatology 1983; 8: 1-16.

MCGINNIS MR, AJELLO L, SCHELL MSD. A proposed nomenclature. Mycotic Diseases 1985; 24: 9-15.

MEDLAR, EMA cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*, with a study of the fungus. Journal of Medical Research, (From the Pathological Laboratory of the Boston City Hospit.) 1915, 32: 507-522.

MEHREGAN AH. Perforating dermatoses. A clinicopathologic review Int J Dermat 1977; 16:19-27.

MELLO E SILVA ACC, NETO AS, GALVÃO CES, MARQUES SG, SALDANHA ACR, SILVA CMP, FISCHMAN O, RR SILVA COSTA MRSR, COSTA JML. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I – Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1992; 25: 37-44.

MENEZES N, VARELA P, FURTADO A COUCEIRO A, CALHEIROS I. ROSADO, L MOTA G, BAPTISTA A. Cromoblastomycosis associated with *Fonsecaea pedrosoi* in a carpenter handling exotice woods. Dermatol online J 2008;145-9.

MINOTTO R. Resposta polares à infecção pela cromoblastomicose antes e após as terapias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tese de doutorado), 2009; 111. Disponível em:< <https://www.lume.ufrgs.br>>. Acesso em: 19/10/2017.

MINOTTO R, BERNARDI CD, MALLMANN LF, EDELWEISS MI, SCROFERNEKER ML. Cromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. J. Am. Acad. Dermatol 2001; 44: 585-92.

MORAES AMD, VELHO PENF, MAGALHÃES RF. Criocirurgia com nitrogênio líquido e as dermatoses infecciosas. An Bras Dermatol. 2008; 83: 285-98.

MOREIRA MIMCGA. Azóis: farmacologia e interações medicamentosas. Porto. Universidade Fernando Pessoa 2010: 1; 1-54.

MOORE M, ALMEIDA F. Etiologie agents of chromomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1922) of North and South America. Reviews of Biology and Higiene. 1935; 6: 94-97.

NAJAFZADEH MJ, SUN J, VICENTE V, XI L, GERRITS V, DEN E, AHG, DE HOOG GS. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. Medical Mycology 2010; 48: 800–806.

NEGRONI P. Estudio del primer caso argentino de cromomycosis, *Fonsecaea* (Negroni) *pedrosoi* (Brumpt) 1921. Revista del Instituto de Bacteriologia. 1939; 7: 419-426.

OKUDA C. Relationship between tissue reactions and morphological changes of fungi in chromoblastomycosis morphometry and electron microscopy. Archives of Dermatological Research 1992; 284: 9-10.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas. 2018.

PIRES CAA, XAVIER MB, QUARESMA JAS, MACEDO GM, SOUSA BRM, BRITO AC. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. Relato clínico, epidemiológico e micológico de 65 pacientes com cromoblastomicose procedentes da Amazônia oriental. Anais Bras. Dermatol 2012; 87: 555-60.

PIMENTEL ERA, LUIZ DM DO C, CUCÉ LC. SAMPAIO SAP. Tratamento da cromomicose por criocirurgia com nitrogênio líquido: um relato de onze casos. Journal of Dermatologic Surgery and Oncologic 1989; 15: 72-7.

QUEIROZ JRA, DOMINGOS FP, ANTONIO JR. Chromoblastomycosis: clinical experience and review of literature. International Journal of Dermatology 2018; 57; 1351-1355.

QUEIROZ-TELLES FF, PURIM KS, FILLUS JN, BORDIGNON GF, LAMEIRA RP, VAN CUTSEM J, CAWWENBERGH G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. International Journal of Dermatology 1992; 3: 805-812.

QUEIROZ-TELLES FF, PURIM KS, FILLUS JN, BORDIGNON GF, LAMEIRA RP, VAN CUTSEM J, CAWWENBERGH G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. International Journal of Dermatology 1992; 31: 805-812

QUEIROZ-TELLES F, MCGINNIS M R, SALKIN I, GRAYBILL J R. Subcutaneous mycoses. Infectious Disease Clinics of North American, 2003; 17; 59-85.

QUEIROZ-TELLES F; ESTERRE P; PEREZ-BLANCO M; VITALE R G; C G SALGADO; A BONIFAZ. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. Medical Mycology. 2009;47:1,3-15.

QUEIROZ-TELLES F, SANTOS DW DE, AZEVEDO CMPS. Fungal Infections of Implantation (Chromoblastomycosis, Mycetoma, Entomophthoromycosis and Lacaziosis.) 2015; 261-276.

QUEIROZ-TELLES F, DE HOOG S, SANTOS DW L, SALGADO CG, VICENTE VA, BONIFAZ A, ROILIDES E, XI L, AZEVEDO CMPS, SILVA M B DA, PANA Z D, COLOMBO AL, WALSH TJ. Clinical Microbiology Reviews 2017; 1: 233-276.

RESTREPO A, GONZALEZ A, GÓMEZ I, ARANGO M, DE BEDOUT C. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. Ann. N. Y. Acad. Sci 1988; 544: 504-516.

RIDDELL RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycology. 1950; 42: 265-270.

RIVAS GAM, CARDONA-CASTRO N. Antimicóticos de uso sistémicos: ¿Con que opciones terapêuticas contamos? Systemic antifungals: wich therapeutic options do we have? Revista CES Medicina 2009; 23: 61-76.

ROZENTAL S, ALVIANO CS, SOUZA W DE. 1994. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. Mycopathologia 1994; 126: 85-91.

RUDOLPH, M. Uber die die brasilianische "Figueira" Vorläufige Mitteilung . Archiev Schiffs Und Tropen Higyene 1914;18: 498-499.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host relationships. *Mycopathologia* 1982, 79; 159-184.

SARKAR M, DIPANWITA DAS, ANINDITA S. Chromoblastomycosis as a mimicker of neoplastic lesion: A case report 2017; 6: 659-661.

SELFE J, ALEXANDER J, COSTELLO JT, MAY K, GARRATT N, ATKINS S, DILLON S, HURST H, DAVISON M, PRZYBYLA D, COLEY A, BITCON M, LITTLER G, RICHARDS J. The Effect of Three Different (-1356C) Whole Body Cryotherapy Exposure Durations on Elite Rugby League Players. *PLOS ONE* 2014; 9: 01-09.

SEISHIMA M, OYAMA Z, ODA M, ISHIGO S. Distribution of an antifungal drug, itraconazole, in pathological and non-pathological tissues. *European Journal of Dermatology* 2004; 14: 24-27.

SILVA C, EKIZLERIAN SM. Granulomatous reactions induced by lipid extracts from *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Cladosporium carrioni* and *Phialophora verrucosa*. *Journal of General Microbiology* 1983; 185: 187-194.

SILVA ACM, SERRA NETO A, GALVÃO CE, MARQUES JG, SALDANHA ACR, SILVA CMP, FISCHMAN O, SILVA RR, COSTA JML. Cromomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I - Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1992, 25; 1; 37-44.

SILVA CMP. Estudo Clínico e Epidemiológico da Cromoblastomicose no Estado do Maranhão- Brasil. 1998. 105f. Tese (Mestrado) - Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1998.

SILVA CMP, MARQUES SG, SILVA RR, SOUSA JRSS, MENEZES JR DRT, COSTA JML. Cromoblastomicose tratada com Itraconazol sistêmico, associado a Anfotericina B intra lesional. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1999; 74 :1.

SILVA CL, FAZIOLI RA. Role of the fungal cell wall in granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *Journal Medical of Microbiology* 1985; 20; 299-305.

SOTTO MN, DE BRITO T, SILVA AM, VIDAL M, CASTRO LG. 2004. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*. 2004; 31: 14–18.

SOUSA MGT, JUNIOR BELDA WJ, SPINA R, LOTA PR, VALENTE NS, BROWN GD, CRIADO PR, BENARD G. Topical Application of Imiquimod as a Treatment for Chromoblastomycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2014; 58: 1734–1737.

SOUSA MDA, REID DM, SCHWEIGHOFFER E, TYBULEWICZ V, RULAND J, LANGHORNE J, YAMASAKI S, TAYLOR PR, ALMEIDA SR, BROWN GD. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. *Cell Host Microbe* 2011; 1: 436–443.

STOIANOFF MA DE. Association of IgG immunoglobulin and subclasses level with the severity of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and therapeutic response to itraconazol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33:1791–1797.

SYED TA. Uma revisão das aplicações do imiquimode: um novo modificador da resposta imune. *Expert Opin Pharmacother*. 2001; 2: 877-82.

TERRA F, TORRES M, FONSECA FILHO O, ARÉA LEÃO AE. Novo tipo de dermatite verrucosa, micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Brasil Médico* 1922; 36: 363-368.

URIBE-J F, ZULUAGA AI, LEON W, RESTREPO A. Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 1989; 105: 1-6.

URIBE F, LEON W, VELASQUEZ JP. Modificaciones tisulares a nivel de la piel en algunas micosis. *Acta Medica Colombiana* 1982; 7:171-179.

WALTER P, GARIN Y, RICHARD-LENOBLE D. Chromoblastomycosis. A morphological investigation of the host-parasite interaction. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1982; 397: 203–214.

WLHALEN K, FINKEL R, PAVANELIL TA. *Farmacologia Ilustrada*. Porto Alegre: ARTMED, 2016.

ZHU CY, YANG YP, SHENG P, LI W, HUANG WM, FAN YM. Cutaneous chromoblastomycosis caused by *Veronaea botryosa* in a Patient with *Pamphigus Vulgaris* and review of published Reports. *Mycopathologia* 2015; 180: 123-129.

ANEXOS

ANEXO A- Ficha de leitura de lâmina de dados histopatológicos

Cromoplastomicose: associação entre as alterações histopatológica, formas clínicas e tratamento realizado no Estado do Maranhão

**Ficha de dados histopatológicos
- Leitura de Lâmina -**

Identificação			
NÚMERO DO ID:	<input style="width: 100%; height: 15px;" type="text"/>	ETAPA: _____	DATA: _____
MUNICÍPIO:	_____		
NOME DO PACIENTE:	_____		
MATERIAL ANALISADO/SÍTIO ANATÔMICO:	_____		
MEDICAMENTO EM USO:	_____		

Instruções:
 Nas colunas **AUSENTE** e **PRESENTE** marcar com um “X” os achados histopatológicos observados.
 Na coluna **ESCORE** preencher com o código correspondente ao resultado do exame:
Ausente (0), Raros (1), Frequentes (2) e Numerosos (3) ;

Área hot spot em aumento 400	Ausente	Presente	Escore
Carga de Fungo (corpúsculos muriformes)			
Coloração Hematoxilina Eosina (HE)			
Hiperplasia pseudoepiteliomatosa			
Granuloma tipo epitelióide			
Granuloma tipo células de Langerhans			
Agregados histiocitários			
Microabscesso			
Proliferação vascular			
Linfócitos			
PMN (Polimorfonuclear)			

Observações:

Avaliar o grau de confiança do diagnóstico pela HE (Coloração Hematoxilina Eosina) em 3 níveis de corte de 5 micrometros.

Referência:

MINOTTO, R. Resposta polares à infecção pela cromoblastomicose antes e após as terapias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tese de doutorado), 2009.

ANEXO B - Ficha de avaliação microbiológica dos pacientes portadores de cromoblastomicose no Maranhão-Brasil

Exame micológico direto e cultura para fungos

Nome do paciente:
Material analisado/sítio anatômico:
Número do ID:
Exame micológico direto:

Data ____/____/____

Data da semeadura: ____/____/____

Temperatura de incubação:
1 – 28°C 2 – 37°C 3 – 40°C
Tempo de crescimento do fungo:
1 – 10 dias 2 – 20 dias 3 – 30 dias
Fungo isolado:
1 – <i>Fonsecaea pedrosoi</i> 2 – <i>Phialophora verrucosa</i> 3 – <i>Rhinochrysiella aquaspera</i> 4 – <i>Cladophialophora sp</i> 5 – <i>Exophiala sp.</i> 6 – <i>Veronaea sp.</i> 7- <i>Cyphellophora sp.</i> 8 - <i>Outros</i>

ANEXO C - Ficha de Protocolo

Ficha protocolo

1. Identificação

Nome: _____ Sexo: 1 – Mas 2 - Fem
Idade: _____ Cor: _____ Naturalidade: _____
Cidade: _____ Estado: _____
Local onde adoeceu: cidade _____; Estado _____.
Profissão atual: _____ Profissão quando adoeceu: _____.

2. Hábitos de Vida

Lida com terra ou vegetais? _____ Há quanto tempo? _____
Sofre microtraumatismos? _____ Usa proteção local? _____
Anda descalço? _____

3. Exame clínico específico

Localização da lesão: _____ Número de lesões: _____
Evolução em anos: _____ Dimensão da maior lesão (no maior diâmetro): _____

4. Sinais e Sintomas:

Prurido? _____ Descamação? _____ Linfedema? _____
Dor? _____ Odor? _____
Adenomegalias? _____ Secreção? _____

Forma Clínica:

5. Gravidade:

1 – Leve () 2 – Moderado () 3 – Grave ()

6. Diagnóstico:

Exame Micológico Direto: _____ Cultura: _____
Fungo isolado: _____ Exame Histopatológico: _____

DESCRIÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

1º _____

2º _____

7. Tratamento:

Tratamentos anteriores: _____
Tratamento atual: _____

8. Evolução:

(Anotar tempo de início da terapia, presença de sintomas associados descritos anteriormente, perguntar se houve melhora do quadro clínico e anotar a gravidade atual da doença e outras informações que julgar necessário).

ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido

TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: **CROMOBLASTOMICOSE: Associação entre alterações histopatológicas, formas clínicas e tratamento realizado.**

O Sr(a). está sendo convidado(a) pela Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo (CRM-MA: 2415), médica pesquisadora da Universidade Federal do Maranhão, a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto visa investigar o quadro clínico, alterações laboratoriais e evolução após o início do tratamento da cromoblastomicose. A Cromoblastomicose é uma doença causada por um fungo filamentosso ocasionada frequentemente após por uma implantação traumática. E sua evolução é insidiosa crônica podendo desencadear complicações. Essas complicações levam a incapacidade para o trabalho e cronicidade da doença. Dessa maneira solicitamos que você responda a algumas perguntas relacionadas a doença e também a seus dados pessoais (idade, sexo, profissão, nível de escolaridade, cidade de nascimento e de residência). Também acompanharei sua evolução, durante o tratamento e após término do tratamento, por um período de 2 (dois) anos. Coletarei os dados de exame físico e exames laboratoriais que estão no seu prontuário. Compreenda que o objetivo principal desta pesquisa é avaliar CBM, analisar a forma clínica, gravidade da doença e se está ocorrendo uma melhora no seu quadro clínico a partir do tratamento que você utilizará e se manterá cura após 2 anos do tratamento da CBM. Os principais benefícios esperados são entender a apresentação clínica e as prováveis evoluções o que pode vir a reduzir as complicações, comuns a estas doenças. Também se espera que com a avaliação das apresentações clínicas, da resposta terapêutica e evolução pós tratamento, bem como todas as alterações de exames laboratoriais, pode-se aumentar o conhecimento e melhorar o tratamento da doença. Esta pesquisa não oferece nenhum risco para sua saúde, visto que não irei interferir em seu tratamento, apenas irei acompanhá-lo, durante o período previsto. Os riscos a que estará sujeito serão com relação a quebra de sigilo ou sentir-se constrangido em responder a questionamentos sobre sua doença, mas asseguro o sigilo do seu diagnóstico e tudo será feito de acordo com sua vontade para que se sinta bem durante a entrevista.

Afirmo que você não é obrigado a participar do estudo e que isso não trará nenhum prejuízo ao Sr(a). ou seus familiares. Explico que não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa, e que se participar, tem o direito de desistir a qualquer momento. Garantimos que as informações dadas ao projeto permanecerão em sigilo durante todas as etapas desta pesquisa, inclusive na publicação dos resultados da mesma.

Também afirmo que poderá solicitar qualquer esclarecimento ou fazer qualquer reclamação com a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo ou outro membro de sua equipe, pessoalmente ou pelos telefones (98) 30821193 e (98) 88036918. Também forneço o telefone do CEP (Comitê de Ética na Pesquisa), para que possa fazer qualquer reclamação ou tirar dúvidas sobre questões éticas relacionadas à pesquisa. Tel: (98)21091250.

Este documento estará em duas vias, assinadas e rubricadas pelo pesquisador responsável e pelos voluntários da pesquisa, ficando uma via com o pesquisador e a outra com o voluntário.

Por fim, após ler esse documento, pode solicitar qualquer explicação que deseje da equipe, e caso não possua mais dúvidas, concorda em participar como voluntário do projeto e estudo agora proposto, o que fica confirmado pela sua assinatura abaixo.

(Local), de de 201__

NOME:

Assinatura: _____

IMPRESSÃO DATILOSCÓPICA (quando se aplicar)

TESTEMUNHAS:

1. NOME:

Assinatura: _____

1. NOME:

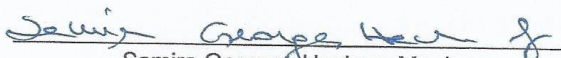
Assinatura: _____

ANEXO E – Termo de Anuência.

TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que o Laboratório Cedro autoriza a realização do projeto de pesquisa intitulado **Cromoblastomicose: Associação entre alterações histopatológicas, formas clínicas e tratamento**, de autoria da aluna Yankee Costa Magalhães Diniz, coordenado pela pesquisadora Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo Silva de Azevedo e a co-orientadora Dra. Sirlei Garcia Marques, que será apresentado ao **Mestrado de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão**, e assume o compromisso de apoiar o desenvolvimento da referida pesquisa nesta instituição durante a realização da mesma. Declaramos conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução 466/2012 do CNS.

São Luís, 22 de dezembro de 2016



Samira Georges Hachem Muniz
Diretora Administrativa/Financeira
Laboratório Cedro
CNPJ 10.445.344/001-68

Samira Georges Hachem Muniz
Laboratório Cedro Ltda.
Diretora Administrativa

Samira Georges Hachem Muniz
Laboratório Cedro Ltda.
Diretora Administrativa

