

MOISES BATISTA DA SILVA

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA NATURAIS
PARA A INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS DE *Fonsecaea pedrosoi*.**

BELÉM

2003

MOISES BATISTA DA SILVA

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA NATURAIS
PARA A INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS DE *Fonsecaea pedrosoi*.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Colegiado do Curso de Licenciatura Plena em Biologia, da
Universidade Federal do Pará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Licenciado Pleno em Biologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.
Departamento de Patologia, Centro de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará**

BELÉM

2003

MOISES BATISTA DA SILVA

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA NATURAIS
PARA A INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS DE *Fonsecaea pedrosoi*.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Colegiado do Curso de Licenciatura Plena em Biologia, da
Universidade Federal do Pará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Licenciado Pleno em Biologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
Departamento de Patologia, Universidade Federal do Pará**

**Prof Dr. José Maria dos Santos Vieira
Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Pará**

**Profª Msc. Patricia Fagundes
Departamento de Patologia, Universidade Federal do Pará**

**BELÉM
2003**

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pai supremo, fonte de energia, por ter dado força e coragem na realização desta obra.

À FAMÍLIA, minha mãe Raimunda Maria Soares Batista, sempre apoiando, permitindo e facilitando a concretização dos meus sonhos, meu pai Alberto Oliveira, meus irmãos Rui, Poliana, Wladimir e Leonardo, Rivanice, Ticiane e Artur, por toda a estima, incentivo, apoio e incansável dedicação.

Ao corpo técnico do LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA, em especial ao amigo e orientador Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado, aos Prof. Msc. Jorge Pereira da Silva, Patricia Fagundes da Costa e Gionovaldo Lourenço, e às colegas de trabalho no laboratório Aline Leão, Suellen Pereira e Edna Costa, por todo o ensinamento recebido, e todos os incontáveis dias e noites de trabalho harmonioso. Agradeço ainda à técnica de laboratório Elaine Madalena de Araújo Reis e aos auxiliares Cleide Lima e Aloísio Barros.

Ao grupo da MICROSCOPIA ELETRÔNICA do Instituto Evandro Chagas, em especial o Prof. Msc. José Antonio Picanço Diniz, o amigo Marcelo Tanaka e a servidora Francinete Alves.

Aos AMIGOS, que estiveram a meu lado no decorrer, não só desta jornada, mas nos diferentes momentos da jornada, pelas companhias, apoio e atenção mesmo nos dias difíceis.

Aos PROFESSORES, coordenadores e demais funcionários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

À Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia”, ao Programa de Apoio a Pesquisa da Universidade do Estado do Pará, ao PROINT da Universidade Federal do Pará, à Secretaria Executiva de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente e à Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará.

A TODOS que de alguma forma contribuíram para tornar possível a realização desta obra.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
INTRODUÇÃO.....	08
METODOLOGIA.....	10
AMOSTRAS FÚNGICAS.....	10
CRITÉRIOS DE ESCOLHA PARA OS MEIOS.....	10
PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	10
ISOLAMENTO E CONTAGEM DE CONÍDIOS.....	11
INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS.....	11
COLORAÇÃO COM GIEMSA.....	11
FLUORESCÊNCIA PELO CALCOFLUOR.....	11
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO.....	14
CONCLUSÃO.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
ANEXO - I.....	19

LISTA DE FIGURAS

Fig 01. Lesões de cromoblastomicose no paciente atendido na URE Marcello Candia, em Marituba.....	20
Fig 02. Exame micológico Direto	21
Fig 03. Macroscopia da colônia de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	21
Fig 04. Microcultivo de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	22
Fig 05. Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-A	23
Fig 06. Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-A.....	23
Fig 07. Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-B.....	24
Fig 08. Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-B.....	24
Fig 09. Ensaios de Fluorescência.....	25
Fig 10. Células Escleróticas obtidas a partir de conídios cultivados em NAMES-B, Coradas com Giemsa	25
Fig 11. Microscopia Eletrônica de Varredura das células escleróticas obtidas a partir de conídios cultivados em NAMES-A.....	26
Fig 12. Células escleróticas obtidas com 45 dias por Silva J.P.....	26
Fig 13. <i>Yeast-cells</i> obtidas por Ibrainh-Granet O.....	27
Fig 14. Células escleróticas obtidas por Silva J.P.....	27
Fig 15. Células escleróticas obtidas por Silva J.P.....	27

RESUMO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea cosmopolita, em que o Brasil é o segundo foco mundial da doença. O principal agente etiológico é o fungo melânico *Fonsecaea pedrosoi*, a doença caracteriza-se clinicamente pela presença de placas verrucosas, atingindo principalmente os membros inferiores de trabalhadores rurais. O diagnóstico laboratorial é realizado através de exame micológico direto das lesões ou do pús ali encontrado e a presença das células escleróticas no tecido confirma a suspeita clínica. A obtenção das formas teciduais de *F. pedrosoi* é conseguida com a utilização de meios quimicamente definidos, somente após 12 a 45 dias necessitando ainda a adição de indutores como o propanolol, quelantes de cálcio ou com a adição de íons. O trabalho aqui apresentado objetiva primordialmente elaborar novos meios de cultura que possuam a capacidade de induzir a formação células escleróticas *in vitro* de maneira mais rápida e menos trabalhosa. Foram selecionados dois extratos vegetais que receberam o nome genérico de *Natural Medium for Sclerotics Induction*, e identificados pelas siglas NAMES-A e NAMES-B. Observou-se a transformação de conídios em escleróticas após 48 horas em NAMES-A e em 10 dias, quando cultivados em NAMES-B, sem a necessidade de acréscimo de qualquer outra substância. As características morfológicas das células obtidas são similares quando comparadas às células observadas *in vivo* e em trabalhos anteriores de outros autores, sendo estas características confirmadas por experimentos de fluorescência, coloração com Giemsa, microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.

1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea com distribuição cosmopolita, tendo sido descrita nas Américas, Europa, Ásia, Austrália, Oceania e África, causada principalmente pelo fungo *Fonsecaea pedrosoi* (McGinnis M.R., 1983). Caracteriza-se por apresentar aspectos clínicos variados, representados principalmente pela presença de placas verrucosas, únicas ou múltiplas, de limites nítidos e bordos bem definidos, associadas a nódulos que podem ulcerar. Estas úlceras podem tornar-se vegetantes, adquirindo aspecto papilomatoso semelhante a couve-flor (Lacaz e cols, 1991). As lesões estão localizadas principalmente nos membros inferiores, atingindo pessoas que têm contato com áreas de floresta como agricultores, lavradores e madeireiros (Campbell I. *apud* Zaitz C., 1998).

A patologia tem alta endemicidade no Estado do Pará, que possui a segunda maior prevalência no mundo, depois da República de Malgaxe (antiga República de Madagascar), no continente africano. Entre os anos de 1942 e 1997 foram registrados em nosso estado 325 casos de cromoblastomicose (Silva J.P. e cols, 1999), e mais recentemente, entre anos de 2001 e 2003 foram cadastrados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia (URE-Marcello Candia) mais de 40 casos novos de cromoblastomicose.

O diagnóstico laboratorial é feito através do exame micológico direto, onde são observadas células arredondadas de coloração acastanhada denominadas de células escleróticas, corpos fumagóides ou células muriformes (Matsumoto T., 1984), podendo ser observadas isoladamente ou em pequenos grumos a partir do raspado da lesão ou mesmo do pús ali encontrado (Odd F.C. *apud* Matte e cols, 1997). As células escleróticas no tecido apresentam divisão planária, caracterizada pela formação de septos em diferentes planos celulares (Rippon, 1988).

Como não há um esquema terapêutico padrão no tratamento desta doença, encontramos na literatura uma grande variedade deles, sendo descritos desde a exérese cirúrgica até a crioterapia, ou a utilização de drogas como o itraconazol e a terbinafina, empregadas com diferentes graus de sucesso em pequenos estudos, ressaltando-se que os tratamentos são longos e dispendiosos (Esterre P. e cols, 1996 e Bonifaz A. e cols, 1997).

Os agentes de cromoblastomicose são agrupados em quatro principais gêneros, que são *Cladosporium*, *Phialophora*, *Exophiala* (Arvind e cols, 1996; Barba-Gómez e cols, 1992) e *Fonsecaea*, sendo este considerado o principal agente (Silva J.P. e cols, 1999). Em alguns casos, podemos encontrar ainda o gênero *Rhinocladiella* (Arango M. e cols, 1998).

O gênero *Fonsecaea* está inserido taxonomicamente na divisão Mastigomycota, classe Hyphomycetes, onde estão agrupadas espécies pertencentes a duas outras classes: Ascomycetes e Basidiomycetes que apresentam a parte sexuada do seu ciclo, muito rara, desconhecida ou mesmo inexistente, sendo então os Hyphomycetes uma classificação artificial que incorpora os estados anamórficos das Ascomycetes e Basidiomycetes.

A macroscopia da colônia de *F. pedrosoi* é aveludada de anverso escuro que vai de verde oliva a negro, e reverso negro; apresentando uma conidiação do tipo holoblástica e simpodial, onde os conídios são formados com tempos diferentes pelas células conidiogênicas e não rompem a parede destas para exteriorizarem-se, sendo essa conidiação conhecida como do tipo Cladosporium (de Hoog e cols, 2002).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma importante ferramenta na análise ultraestrutural do fungo, seja em modo parasitário, analisado logo após a preparação do espécime retirado diretamente do tecido infectado ou após o cultivo do fungo em laboratório. Apesar de bem estudados e caracterizados morfológicamente, os fungos causadores de cromoblastomicose são ainda pouco conhecidos ultra-estruturalmente e imunologicamente, principalmente quanto a sua forma parasitária, o que se deve provavelmente a escassez de material clínico para o estudo nos países desenvolvidos, visto que a grande maioria dos casos encontra-se em países em desenvolvimento como o Brasil (Silva J.P. e cols, 1999).

Para maior segurança nas afirmações acerca da semelhança entre as estruturas das células escleróticas obtidas *in vivo* e *in vitro* dos agentes de cromoblastomicose, a microscopia eletrônica é utilizada, constituindo um importante recurso nas análises de estruturas fúngicas específicas presentes no fungo em cultura ou tecido (Silva J.P. e cols, 2002).

Para o maior conhecimento da biologia do principal agente de cromoblastomicose, *F. pedrosoi*, é de grande importância a indução *in vitro* das células escleróticas, o que é dificultado pela demora na obtenção dessas células. O presente trabalho tem como objetivo primordial elaborar novos meios de cultura para a indução de células escleróticas do principal agente causador da cromoblastomicose, o fungo melânico *F. pedrosoi*, de maneira mais rápida e menos trabalhosa.

2. METODOLOGIA

2.1.1. AMOSTRAS FÚNGICAS

A cepa de *F. pedrosoi* utilizada neste estudo foi cedida pelo Laboratório de Dermato-Imunologia/UEPA/UFPA/MC, sendo obtida através do raspado de lesão verrucosa localizada no membro inferior esquerdo de um dos pacientes (Fig. 01) atendidos na URE Marcello Candia, estando devidamente identificada com base em dados clínicos e laboratoriais, pela presença de células escleróticas (Fig. 02), macroscopia da colônia (Fig. 03) e microscopia ótica através do microcultivo (Fig.04) das colônias (Riddel, 1950) e catalogada no acervo da micoteca do referido laboratório sob a inscrição LDI-16.

2.1.2. CRITÉRIOS DE ESCOLHA PARA OS MEIOS

Para a escolha do material utilizado para a produção dos meios de cultura foram considerados os seguintes aspectos: 1) Viabilidade de obtenção, 2) Regionalidade, 3) Custo reduzido, 4) Facilidade técnica de manuseio e 5) Fornecimento dos nutrientes necessários.

Foram então selecionados dois extratos vegetais que receberam o nome genérico de *Natural Medium for Sclerotics Induction*, e identificados pelas siglas NAMES-A e NAMES-B (ambos em processo de solicitação de patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - INPI).

2.1.3. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Com a seleção dos extratos concluída, iniciou-se então o processo de escolha do modo de obtenção de um caldo nutritivo e de transparência que permitisse o acompanhamento dos experimentos com a utilização do microscópio invertido Coleman® modelo XDS-1. Procedeu-se então da seguinte forma: 150g da biomassa “B” foi triturada, sem a necessidade de acrescentar água, enquanto que para a trituração da mesma massa da biomassa “A” foi necessário acréscimo de 50ml de água destilada estéril; posteriormente, ambos foram diluídos em 1:3 com água destilada estéril, homogeneizados e centrifugados a 4000RPM por 5 minutos; em seguida foram retirados os sobrenadantes, que foram filtrados em membrana de 0,22µm e autoclavados a 120°C por 15 minutos. Para os experimentos foram separadas duas alíquotas de cada um dos meios, uma a 2,6 e outra de pH 6,0, sendo que o NAMES-B já possuía o pH natural de 2,6 e NAMES-A de 6,0.

2.1.4. ISOLAMENTO E CONTAGEM DE CONÍDIOS

A massa fúngica da superfície da colônia cultivada por 15 dias em Ágar-Batata foi transferida para 10ml de água destilada estéril em tubo de ensaio com fundo cônico de 15ml (TPP, Suíça) e agitada em vortex por 1 minuto para a separação das hifas e conídios, que em seguida foram filtrados para outro tubo através de uma membrana de nylon, e centrifugados a 4000rpm por 5 minutos, tendo o volume reduzido à 1ml. Para a obtenção da concentração de conídios/ml foi realizada contagem em câmara de Newbauer.

2.1.5. INDUÇÃO DE ESCLERÓTICAS

Utilizando placas descartáveis de 24 e 96 poços para cultivo celular (TPP, Suíça) foram colocados os conídios isolados nos meios de cultura NAMES-A pH.2,6 e NAMES-B pH.2,6, acrescidos e 100µl de solução de Cloranfenicol 50%, em um volume total de 2,0ml mantidos a temperatura ambiente, por 48 e 240 horas respectivamente, mantendo em ambos, a proporção de 3.000conídios/ml.

2.1.6. COLORAÇÃO COM GIEMSA

As células escleróticas obtidas nos meios de cultura foram aderidas em lamínula recobertas com Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), fixadas em metanol durante 1 minuto, coradas com solução 5% de Giemsa diluída em água tamponada por 30 minutos e montadas sobre uma lâmina de vidro.

2.1.7. FLUORESCÊNCIA PELO CALCOFLUOR

Uma alíquota de cada um dos meios contendo células escleróticas oriundas de conídios, foi misturada na proporção de 1:1:1 com Calcofluor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e KOH 20%, sendo em seguida colocada entre lâmina e lamínula, e observada em 1000X no microscópio de Fluorescência Nikon Eclipse E400.

2.1.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para análise ultraestrutural, as células escleróticas obtidas após o cultivo nos meios NAMES-A e NAMES-B foram aspiradas dos poços, utilizando pipetas, colocadas em tubos eppendorf de 0,6ml e centrifugadas a 1000RPM por 3 minutos, para a formação do *pellet* que foi fixado por 2 horas a temperatura ambiente em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M e pH7,2. Após esse período, as células foram aderidas à uma lamínula previamente recoberta com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA), seguindo-se três lavagens no mesmo tampão, e a pós-fixação com solução de OsO₄ (Tetróxido de Ósmio) à 1%, 0,8% de Ferricianeto de potássio, 5mM CaCl₂ em tampão Cacodilato 0,1M pH 7,2 à temperatura ambiente por uma hora. Após este período, nova sequência de lavagem no mesmo tampão, passando para a desidratação com passagem em uma série de etanol em água a 20, 30, 50, 70, 90 e 100%, com tempo de 20 minutos para cada etapa e duas vezes de 20 minutos em etanol 100%, seguidas por um processo de secagem por ponto crítico de CO₂ no equipamento EMITECH-K850. A seguir as lâminas foram fixadas em suporte (*stub*) e recobertas com ouro no metalizador EMITECH-K550 e observadas no microscópio eletrônico de varredura de alta resolução LEO1450VP.

3. RESULTADOS

Os conídios quando colocados em cultura em NAMES-A, a temperatura ambiente, na proporção de 3000 conídios/ml, apresentaram após 24 horas um aumento significativo de volume passando de, em média, 4µm para 10µm de diâmetro e, após 48 horas (Fig.05) em cultura, foi observada a completa transformação dos conídios em células escleróticas clássicas, com divisão planária e coloração acastanhada, o que se manteve por cerca de 10 dias (Fig.06), sem que houvesse a necessidade de renovação do meio, iniciando após esse período a formação de hifas.

Em relação aos conídios em cultura de NAMES-B, conservando-se as mesmas condições anteriores utilizadas para NAMES-A, a transformação em células escleróticas ocorreu após 10 dias (Fig.07), não observando-se aumento significativo no volume dos conídios nesse período. Entretanto, o modo como se dá essa transformação difere da cultura em NAMES-A, visto que em NAMES-B parece haver uma abertura da parede com a exteriorização de uma nova célula, que apresenta características morfológicas similares às observadas nas células escleróticas obtidas em NAMES-A ou mesmo das escleróticas observadas *in vivo* (Fig. 02). As escleróticas obtidas em NAMES-B mantêm a estas características por cerca de 30 dias (Fig.08), sem que haja a necessidade de renovação do meio de cultura, iniciando-se após esse período a formação de hifas.

Para os experimentos de fluorescência, as células escleróticas cultivadas em NAMES-A por 48 horas apresentaram a parte interna com coloração avermelhada, enquanto as de NAMES-B a fluorescência é azulada e restrita à parede (Fig.09).

As células obtidas nos meios de cultura NAMES-A e NAMES-B, quando coradas com Giemsa apresentaram uma coloração esverdeada com a parede e os septos bem definidos. É interessante notar a presença de pequenas áreas escuras, algumas arredondadas, outras em forma de meia lua, que representam os conídios que deram origem às escleróticas (Fig.10).

A microscopia eletrônica de varredura realizada demonstra que as células escleróticas obtidas em NAMES-A (Fig.11), apresentam a divisão planária por septação, de forma similar as observadas em outros trabalhos (Fig.12) e das formas *in vivo* (Fig. 02).

4. DISCUSSÃO

Os trabalhos iniciais para a indução das células escleróticas, como o realizado por Ibrain-Granet (1985), eram baseados na utilização de técnicas trabalhosas, podendo ser resumidamente assim descritos: uma cepa isolada era repicada para Caldo Sabouraud com pH ajustado para 2,5 e colocadas em agitação constante a 20°C. Após 8 dias, o espécime era transferido para outro frasco nas mesmas condições e após 21 dias o cultivo apresentava células arredondadas denominadas pelo autor de *yeast-like* (Fig.13), que não apresentavam septação das escleróticas observadas *in vivo*.

Alviano C. (1992) e Silva J.P. (2002), utilizando o meio de cultura Butterfield a 37°C e em agitação constante, acrescido de propanolol, biotina e tiamina, obtiveram sucesso na indução de células escleróticas a partir de hifas e conídios (Fig.14), após um período de 45 dias.

Mendoza L. (1993), utilizando também um meio de cultura composto de 30g de glicose, 3g de NaNO₃, 1g de K₂HPO₄, 0,5g MgSO₄-7H₂O, 0,01g FeSO₄-7H₂O, 0,265g de NH₄Cl e 0,003g de Tiamina, com o pH ajustado para 2,5 em 1L de água deionizada, obteve sucesso no processo de transformação das hifas e conídios em células escleróticas após 21 dias, com a utilização de 0,1 mmol l⁻¹ Ca⁺², obtendo também resultado similar com a utilização de EGTA, 2 mmol l⁻¹, ambos cultivados a 25°C (Fig.15).

Comparativamente aos resultados dos trabalhos descritos acima, verificou-se a redução do período necessário para a indução de escleróticas de 21 a 45 dias, para 10 dias com a utilização de NAMES-B com o pH natural de 2,6 e para apenas 48 horas com o NAMES-A com o pH ajustado para 2,6, sem a necessidade de adição de outros componentes aos extratos. A diminuição do tempo de indução facilita e agiliza a obtenção de células escleróticas em grande número, semelhantes as formas observadas nas lesões encontradas em pacientes de cromoblastomicose.

Os testes de fluorescência e os resultados obtidos com a coloração de Giemsa permitem avaliar a similaridade morfológica existente entre as escleróticas obtidas *in vitro* com os meios NAMES-A e NAMES-B, com as observadas *in vivo*, principalmente no que se refere a divisão planária e a formação da parede fúngica espessa, características de cromoblastomicose.

Os resultados obtidos com a MEV, nos revelam a similaridade ultraestrutural entre as células escleróticas cultivadas em NAMES-B, com as oriundas do meio Butterfield

acrescido de propanolol, também pela presença da divisão planária e de septos bem evidentes, assim como nas formas encontradas *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Em razão dos resultados obtidos com o cultivo de *F. pedrosoi* nos novos meios de cultura aqui apresentados, podemos concluir que: 1) O tempo de transformação de conídios em células escleróticas foi reduzido de 21 a 45 dias para 48 horas com a utilização de NAMES-A e para 10 dias com NAMES-B; 2) Os meios aqui apresentados reduzem a carga de trabalhos técnicos e o custo operacional antes exigido pela adição de Propanolol, Biotina e Tiamina, além de outros reagentes aos meios convencionais e; 3) A manutenção das formas escleróticas obtidas se mantém até 10 e 30 dias em NAMES-A e NAMES-B respectivamente, sem a necessidade de renovação do meio de cultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ARVIND A. PADHYE, ARCHIBALD A. HAMPTON, MARTA T. HAMPTON, NANCY W. HUTTON, ELENA PRESVOST-SMITH, AND MIRIAN S. DAVIS. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. **Clinical Infection Disease**. **1996;22:331-5**.

ARANGO M, JARAMILLO C, CORTÉS A, RESTREPO A; Auricular cromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Med. Myc**, **1998**, **36**, **43-45**.

BARBA-GÓMEZ FJ, JESÚS MAYORGA, MICHAEL MCGINNIS AND GONZÁLES-MEMDOZA. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera* **Journal American Academi Dermatologie**, **1992;26:367-70**.

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

DE HOOG GS, GUARRO J, GENÉ J E FIGUEIRAS MJ, Atlas of clinical fungi, **2ª Edição, Universidade de Rovira i Virgili, Espanha, 2000**

ESTERRE P, ANDRIANTSIMAHAVANDY A, RAMARCEL ER, PECARRERE JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **Am.J.Trop.Med.Hyg**. **1996;55:45-7**.

IBRAIN-GRANET O; GUÉHO E E BIÉVRE C; Induction of *yeast-like* cells in a strain of *Fonsecaea pedrosoi* cultured under very acidic conditions. **Mycopathologia**,**1985,90**, **35-39**.

LACAZ CS; PORTO E e MARTINS JEC, Cromoblastomicose *In: Micologia médica-Fungos actinomicetos e algas de interesse médico*, **1991**, **8ª Edição, Ed.: Sarvier, São Paulo-SP**

LE GALL F; LULLIN J; COUATARMANAC'H A; COTTON F; CHEVRANT-BRETON J, RAMEE MP. Une parasitose cutanée rarement observée em France: La cromomycosis. **Ann. Pathol**. **1993; 13(2): 123-127**.

MATSUMOTO T. Critical review of human isolated of *Wangiella dermatidis*. **Mycologia**, **1984,76: 232-249**.

MATTE SMW, LOPES OJ, MELO IS, ESPADIM LER E PINTO MS, Cromoblastomicoses no Rio Grande do Sul: Relato de 12 casos, **Rev. Soc. Bra. Med. Trop**, **1997**, **30 (4): 309-311**.

MC GINNIS MR, Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **J Am Acad Dermatol** **1983; 8(1):1-16**.

MENDOZA L, KARUPPAYIL SM e SZANISZLO P J, Calcium regulates *in vitro* dimorphism im cromoblastomycotic fungi, **1993, Mycoses** **36**, **157-164**.

- RIDDEL RW, Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **1950, Mycologia, 42 pp.265-270**
- RIPPON JW. Chromoblastomycosis *In* Medical Mycology. WB **1988, Saunders Co.; Philadelphia, 276-296.**
- SILVA JP, SOUZA W. DE, ROZENTAL S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). **1999, Mycopathologia 143,171-175.**
- SILVA JP, ALVIANO DS, ALVIANO CS, SOUZA W DE, TRAVASSOS LR, DINIZ JAP, ROZENTAL S. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotics cells obtained in vivo and in vitro: Ultrastructure and antigenicity. **Imunology and Medical Microbiology, 33,63-69, 2002.**
- ZAITZ C, CAMPBELL I, MARQUES, RUIZ LRB e SOUZA VM DE. **Compêndio de micologia médica, 1ªEd. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 1998:167-79.**

ANEXO I



Fig 01. Lesões de cromoblastomicose no paciente atendido na URE Marcello Candia, em Marituba. Em A, verifica-se a presença de placas verrucosas, de limites nítidos e aspecto geográfico. Em B observam-se nódulos elevados (seta), verrucosos e não ulcerados no membro inferior esquerdo no paciente. Barras: A: 1cm, B: 2cm.

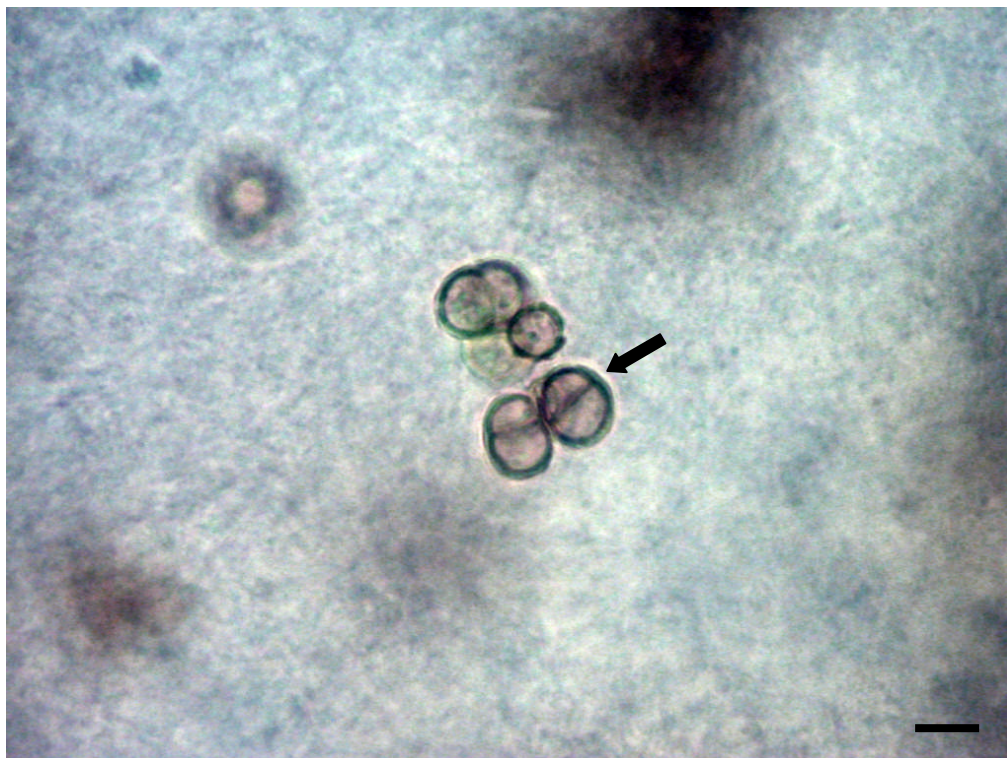


Fig 02. **Exame micológico Direto.** Raspado de lesão clarificado com KOH 20%, demonstrando as células escleróticas com divisão planária (seta) e coloração acastanhada, características de Cromoblastomicose. Barra: 10 μ m.

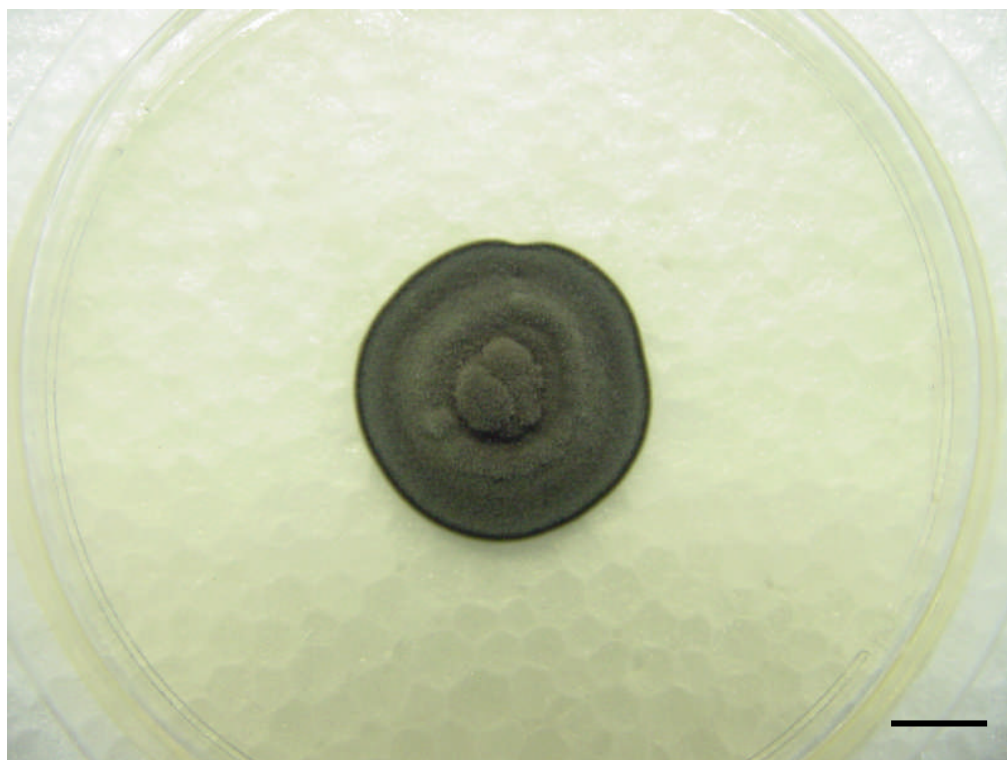


Fig 03. **Macroscopia da colônia de *Fonsecaea pedrosoi*.** O cultivo do material obtido das lesões do paciente em Micosel apresenta-se após 15 dias em cultivo com a superfície aveludada e anverso escuro e coloração próxima ao verde-oliva. Barra: 1cm.



Fig 04. **Microcultivo de *Fonsecaea pedrosoi***. A colônia obtida foi cultivada em um bloco de 1x1cm de Ágar-Batata entre lâmina e lamínula. Após 15 dias verificou-se a presença de conidação holoblástica e simpodial característica do tipo Clasdosporium. Barra: 3 μ m.

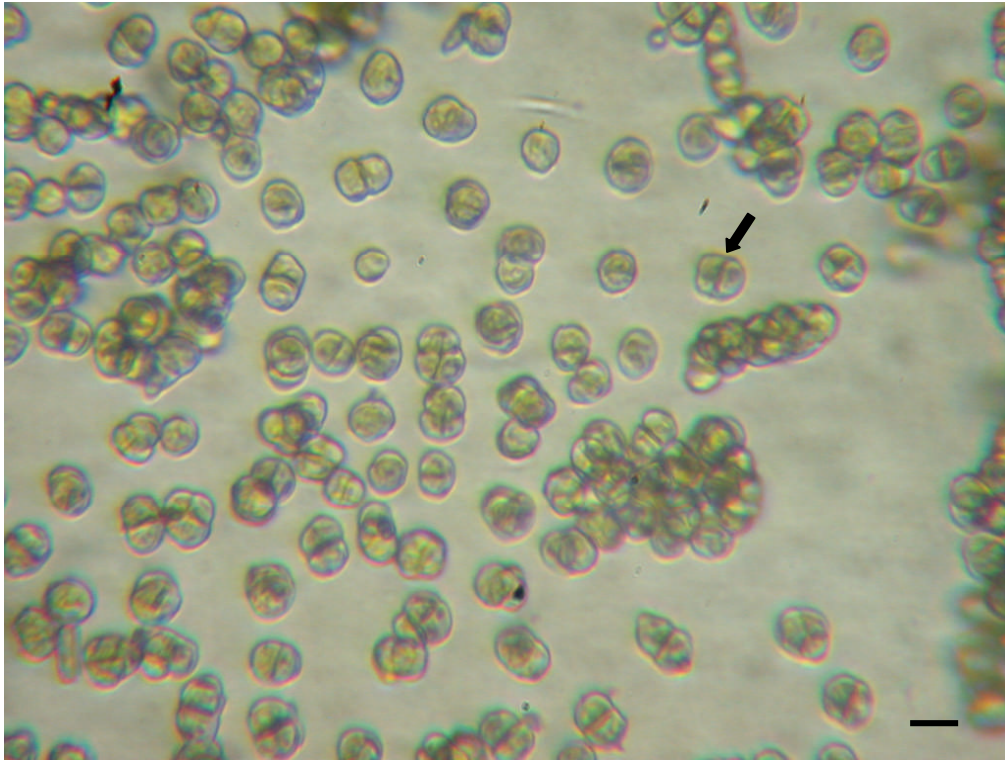


Fig 05. **Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-A.** As escleróticas foram obtidas após 48 horas de cultivo em temperatura ambiente e pH 2,6, evidenciando septos e a divisão planária (seta). Barra: 10 μ m.

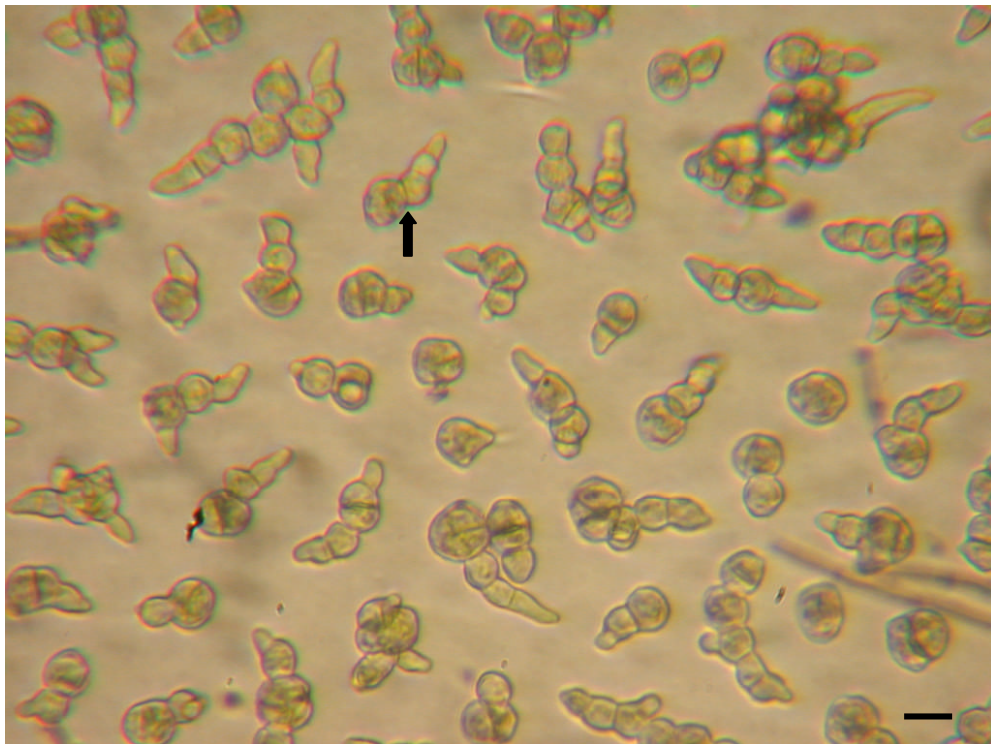


Fig 06. **Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-A.** Após 10 dias de cultivo em temperatura ambiente e pH 2,6, observa-se a presença de hifas originadas a partir das escleróticas pré-existentes (seta). Barra: 10 μ m.

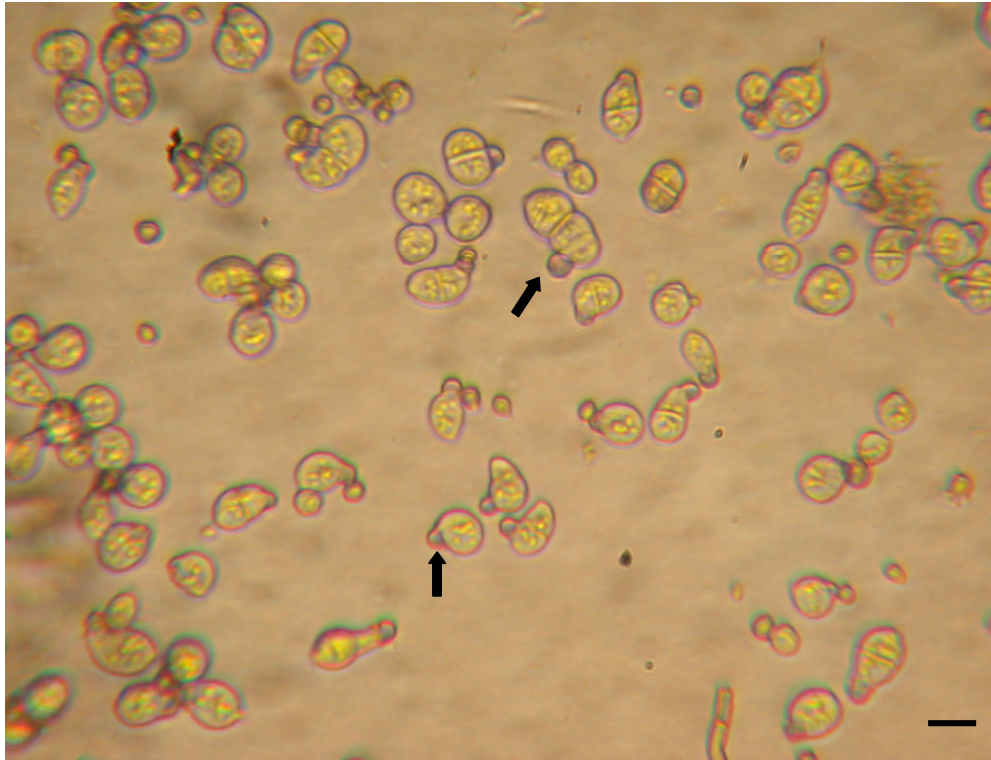


Fig 07. **Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-B.** As escleróticas foram obtidas após 10 dias de cultivo em temperatura ambiente e pH 2,6, evidenciando a abertura da parede e a exteriorização das novas células (setas) que passam a apresentar septos e divisão planária. Barra: 10 μ m.

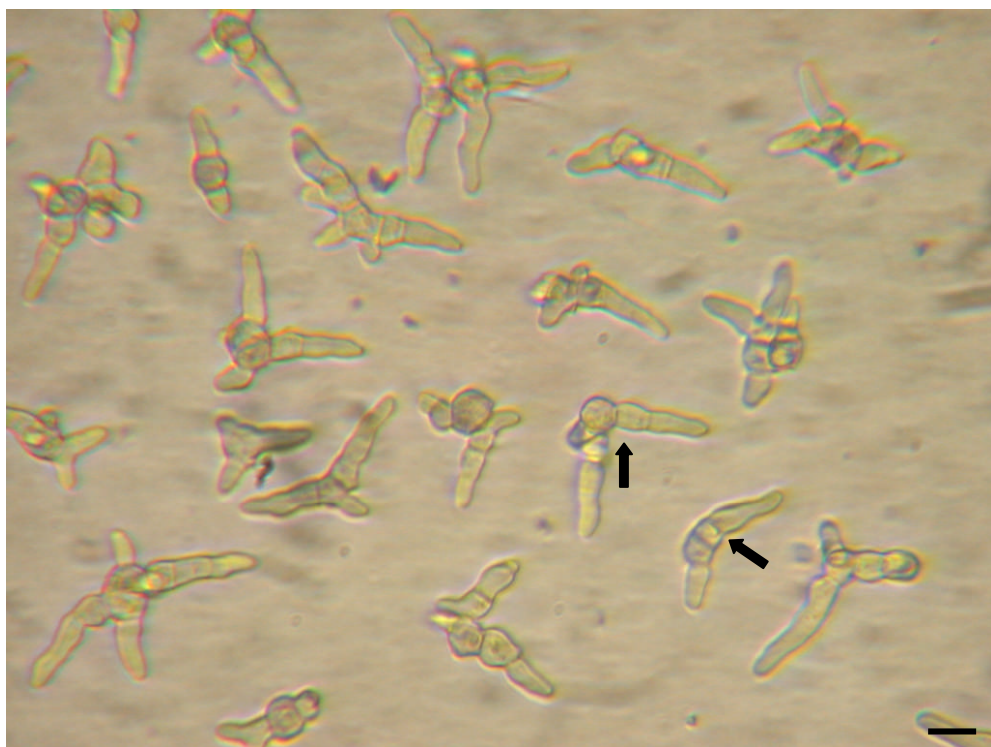


Fig 08. **Células escleróticas obtidas através de cultivo em NAMES-B.** As escleróticas foram obtidas após 10 dias de cultivo em temperatura ambiente e pH 2,6, originando hifas (setas) após 30 dias. Barra 10 μ m.

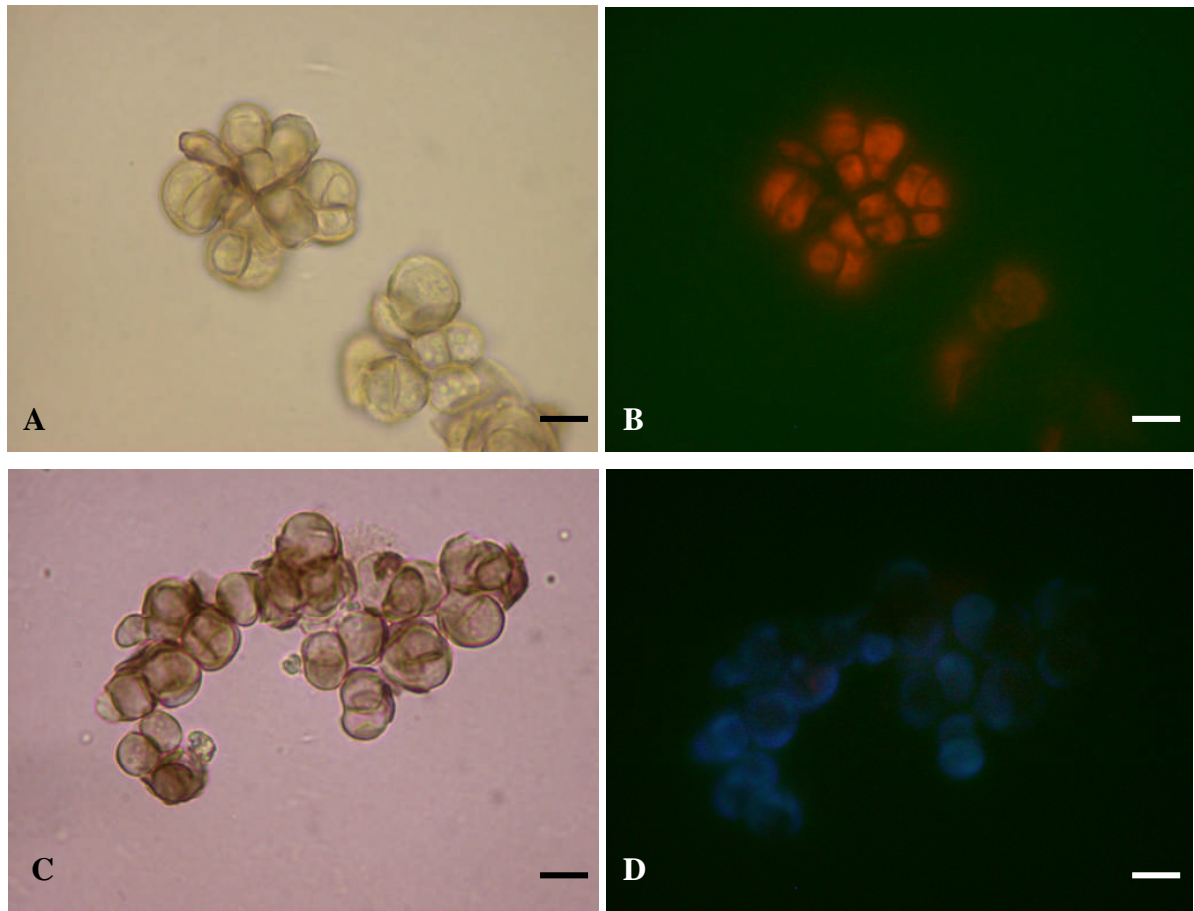


Fig 09. **Ensaio de Fluorescência.** A) Células escleróticas obtidas em NAMES-B, B) As mesmas células submetidas a fluorescência pelo calcofluor. C) Células escleróticas obtidas em NAMES-A, D) As mesmas células submetidas a fluorescência pelo calcofluor. Barra: 10µm.



Fig 10. **Células Escleróticas obtidas a partir de conídios cultivados em NAMES-B, Coradas com Giemsa.** Após 10 dias em cultura, observa-se a presença de células escleróticas com a septação clássica da divisão planária (seta vazada). As setas escuras identificam parte dos conídios que originaram as escleróticas. Barra: 10µm.

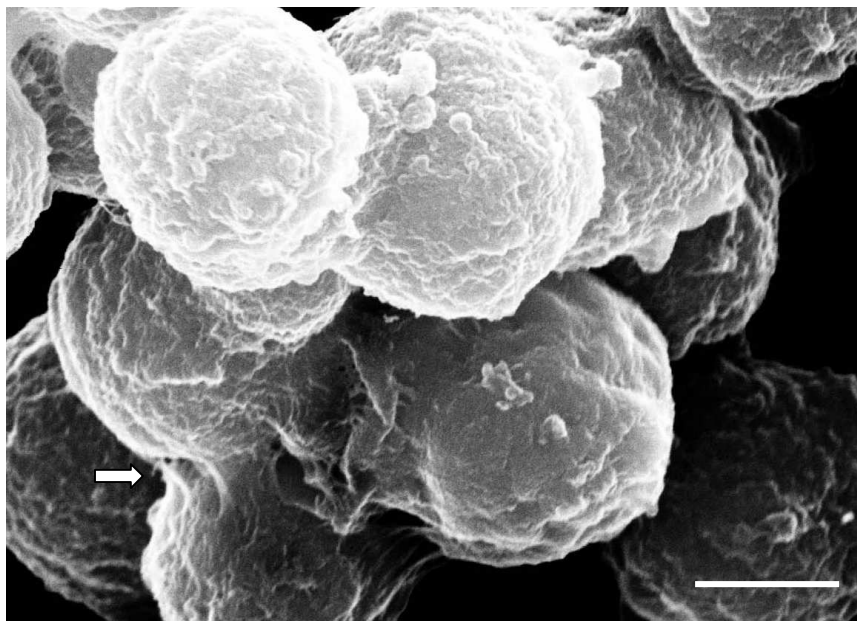


Fig 11. Microscopia Eletrônica de Varredura das células escleróticas obtidas a partir de conídios cultivados em NAMES-A. Após 48 horas em cultura, verifica-se a presença de células escleróticas com divisão planária (seta). Barra: 5 μ m.



Fig 12. Células escleróticas obtidas com 45 dias por Silva J.P. Observa-se a presença de divisão planária clássica (Fonte: Silva J.P., 2002).

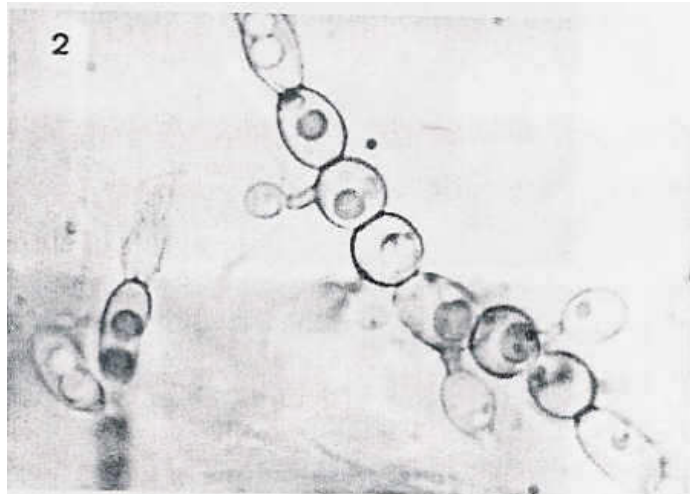


Fig 13. **Yeast-cells obtidas por Ibraihn-Granet O.** Microscopia ótica de células leveduriformes obtidas após 21 dias de cultivo (Fonte: Ibraihn-Granet O., 1985).

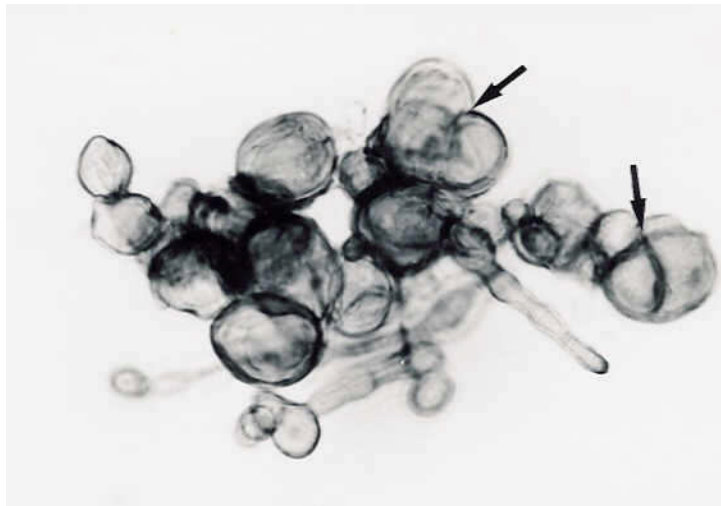


Fig 14. **Células escleróticas obtidas por Silva J.P.** Microscopia ótica de células escleróticas obtidas após 45 dias de cultivo utilizando propranolol. As setas indicam os septos da divisão planária (Fonte: Silva J P, 2002).

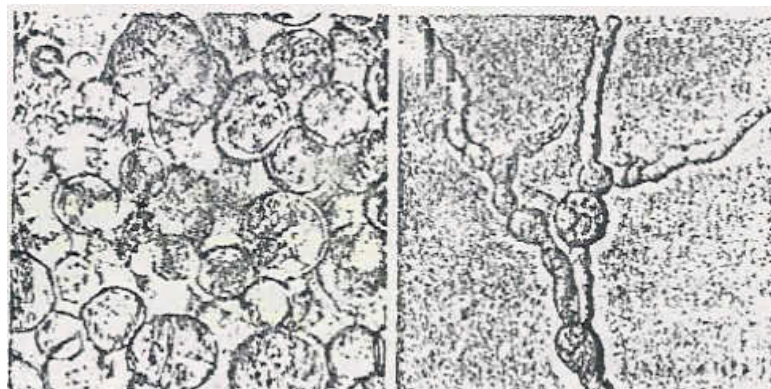


Fig 15. **Células escleróticas obtidas por Mendoza L.** Microscopia ótica de células escleróticas obtidas após 21 dias de cultivo com quelantes de cálcio e concentrações diversas de Ca^{+2} (Fonte: Mendoza L. 1993).