

# Células fúngicas permanecem viáveis por até doze dias em lesões de cromomicose tratadas pela criocirurgia com nitrogênio líquido\*

## *Fungal cells remain viable for up to 12 days in chromomycosis lesions treated by cryosurgery with liquid nitrogen\**

Luiz G. M. Castro<sup>1</sup>Alberto Salebian<sup>2</sup>Carlos da Silva Lacaz<sup>3</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - A criocirurgia com nitrogênio líquido (C-N<sub>2</sub>L) é um método terapêutico que vem sendo usado com frequência crescente no tratamento da cromomicose. Acreditava-se anteriormente que as temperaturas baixas poderiam destruir o agente infectante, mas foi demonstrado que as culturas fúngicas em temperaturas tão baixas como -196°C não causaria a morte do mesmo. Apesar da comprovada eficácia, ainda não se conhece o exato mecanismo de cura.

OBJETIVO - Avaliar o período de persistência de fungos viáveis em lesões de cromomicose tratadas pela C-N<sub>2</sub>L.

PACIENTES E MÉTODOS - Cinco pacientes com cromomicose tiveram suas lesões tratadas pela C-N<sub>2</sub>L. Foram colhidos, em diferentes intervalos de tempo após a criocirurgia, fragmentos do tecido tratado. A coleta, realizada com *punch* de 4mm, foi feita em três períodos diferentes: de 0 a 48h, de cinco a sete dias e de 10 a 14 dias após a realização da criocirurgia. Os fragmentos obtidos foram inoculados em Agar Sabouraud para verificação de crescimento de colônias fúngicas. Cada paciente teve um total de três amostras colhidas, uma em cada um dos três períodos mencionados.

RESULTADOS - O crescimento de colônias foi maior nas coletas mais precoces, enquanto nas amostras colhidas entre o pós-operatório imediato e o quinto dia de pós-operatório o índice de viabilidade foi de 7/8 (87,5%), e naquelas colhidas a partir do sexto dia de pós-operatório foi de apenas 2/7 (28,5%). O maior período de pós-operatório que demonstrou positividade foi de 12 dias.

CONCLUSÃO - Os resultados confirmam os achados anteriores, os quais demonstraram que as baixas temperaturas alcançadas pela C-N<sub>2</sub>L não são responsáveis pela destruição dos fungos nas lesões de cromomicose. Os autores acreditam que fenômenos biológicos tardios, como necrose ou imunestimulação sejam os verdadeiros responsáveis pela erradicação dos fungos nas lesões de cromomicose.

Palavras-chave: criocirurgia; cromoblastomicose.

**Summary:** BACKGROUND - Several authors have reported on cryosurgery with liquid nitrogen (C-LN<sub>2</sub>) as an efficacious method to treat chromomycosis (CM). At first it was believed that low temperatures would destroy the infecting agents, but it was demonstrated that exposing fungal cultures to temperatures as low as -196°C did not cause fungal death. Cure mechanism has yet to be entirely understood.

OBJECTIVE - To study fungal cell viability in CM lesions treated with C-LN<sub>2</sub>.

METHOD - Specimens of CM lesions treated with C-LN<sub>2</sub> were obtained by punch biopsy and seeded in Sabouraud agar. Three specimens were obtained from each of the 5 patients at 3 different occasions: 0 to 48 h after C-LN<sub>2</sub>, 5 to 7 days and 10 to 14 days.

RESULTS - Colony growth was obtained with greater frequency when specimens were collected at earlier time intervals. While specimens obtained during the first 5 days after cryosurgery provided 7/8 colonies (87,5%), those obtained after the 6th post-op day were positive only in 2/7 cases (28,5%). The longest post-op time interval giving rise to a colony was 12 days.

CONCLUSION - The present study suggests that tissue changes induced by C-LN<sub>2</sub> are responsible for fungal eradication rather than low temperatures themselves. Fungal cells may be found in a viable state for up to 12 days after C-LN<sub>2</sub>.

Key-words: cryosurgery; chromoblastomycosis.

## INTRODUÇÃO

Uma das características mais marcantes da cromomicose (CM) é a resistência que apresenta aos mais variados métodos terapêuticos existentes.<sup>1</sup> Essa resistência pode ser notada quando se observa o grande número de diferentes métodos tera-

## INTRODUCTION

One of the most striking characteristics of chromomycosis (CM) is the resistance it presents to most therapeutic methods available today. The recent introduction of itraconazole (ITZ) has led many authors

Recebido em 29.04.2002. / Received in April, 29<sup>th</sup> of 2002.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 13.11.2002. / Approved by the Consultive Council and accepted for publication in November, 13<sup>th</sup> of 2002.

\* Trabalho realizado na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. / Work done at Dermatology Department of "Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo".

<sup>1</sup> Médico Supervisor-Doutor, Divisão de Dermatologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. / Supervising Physician, Division of Dermatology, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School.

<sup>2</sup> Biólogo da Divisão de Dermatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. / Biologist, Division of Dermatology, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School and Tropical Medicine Institute, University of São Paulo Medical School.

<sup>3</sup> in memoriam - Instituto de Medicina Tropical, LIM 53, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. / LIM 53, Tropical Medicine Institute, University of São Paulo Medical School.

pêuticos existentes na literatura. A recente introdução do itraconazol (ITZ) no arsenal terapêutico dermatológico, fez com que muitos autores supusessem que essa droga seria eficaz no tratamento da CM. Infelizmente sua eficácia mostrou-se menor do que a esperada,<sup>1</sup> pois apesar de eficaz em muitos casos, é freqüente a observação de pacientes que não respondem ao tratamento com ITZ. Esse fato faz com que numerosos pesquisadores busquem novas modalidades terapêuticas para a CM.

Entre as várias modalidades cirúrgicas de tratamento da CM encontra-se a criocirurgia com nitrogênio líquido (C-N<sub>2</sub>L). Vários trabalhos publicados nos últimos anos têm demonstrado que a utilização da C-N<sub>2</sub>L é método eficaz, seguro e de baixo custo.<sup>2,3,4,5</sup> Ainda não se sabe ao certo o mecanismo por meio do qual a criocirurgia alcança esse resultado, mas sabe-se que a C-N<sub>2</sub>L, além de curar a CM, apresenta efeito duradouro, que pode chegar a até 15 anos.<sup>6</sup> Castro<sup>7</sup> demonstrou que as baixas temperaturas alcançadas pela criocirurgia não são diretamente responsáveis pela destruição dos fungos nas lesões de CM, pois, mesmo quando expostas a temperaturas de -196°C, as colônias de fungos causadores da CM permanecem viáveis. Naquele estudo o autor sugere que alterações teciduais induzidas pela necrose são o que levaria à destruição tardia dos fungos.

O presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar o período de persistência dos fungos em lesões de CM tratadas com C-N<sub>2</sub>L e, dessa forma, contribuir para a melhor compreensão dos fenômenos relacionados com a cura da doença pela C-N<sub>2</sub>L.

## Objetivo

Verificar a viabilidade de fungos causadores da CM em fragmentos de pele obtidos a partir de lesões de pacientes com CM tratados pela C-N<sub>2</sub>L, em intervalos de tempo variando de zero hora a 14 dias após a realização da criocirurgia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cinco pacientes portadores de CM, com diagnóstico confirmado mediante exame micológico direto e cultura, que tinham indicação de tratamento com C-N<sub>2</sub>L foram incluídos no estudo. Nenhum deles havia recebido antifúngicos ou qualquer outro tratamento específico para CM por um período de no mínimo 30 dias antes do estudo.

Das várias lesões que os pacientes apresentavam, foi escolhida uma específica, com diâmetro de cerca de 2cm, em cada um dos cinco pacientes ou, naqueles casos em que não houvesse lesões pequenas, porção isolada de uma placa maior. Todas as lesões eram do tipo placa. A C-N<sub>2</sub>L foi realizada conforme descrito por Pimentel *et al.*,<sup>2</sup> utilizando-se o método de *spray* aberto dirigido ao centro da lesão. A duração da aplicação baseava-se na expansão do halo de congelamento até 3mm além das bordas externas da lesão. Esse procedimento resultou em tempos de congelamento variáveis de 45 a 75 segundos. Após o descongelamento total da lesão, procedia-se a um segundo ciclo de congelamento nos mesmos moldes. Os cuidados pós-operatórios foram os mesmos que os descritos por Pimentel *et al.*,<sup>2</sup> ou seja, banhos com KmnO<sub>4</sub> 1:40.000, compressas levemente compressivas nas primeiras 24 horas e oclusivas daí em diante.

*to consider this drug as the choice treatment for CM. Unfortunately its effectiveness has proved to be less than expected. Despite being effective in many cases, patients have been frequently observed not to respond to treatment with this drug.<sup>1</sup> This fact has led researchers to search for novel therapeutic modalities for CM.*

*Cryosurgery with liquid nitrogen (C-LN<sub>2</sub>) is among the various surgical modalities available for treating CM. A number of studies published in recent years have demonstrated that C-LN<sub>2</sub> is an effective, safe and low-cost method.<sup>2,3,4,5,6</sup> Although cure mechanism has yet to be entirely understood, reports of patients cured for periods longer than 15 years have appeared in literature.<sup>6</sup> Castro<sup>7</sup> has demonstrated that the low temperatures reached by C-LN<sub>2</sub> are not directly responsible for fungal destruction in CM lesions. Even when exposed to temperatures as low as -196° C colonies survived. In that study the author suggested that tissue changes induced by necrosis were the leading factor towards fungal eradication.*

*The present study was carried out to study fungal cell viability in CM lesions treated with C-LN<sub>2</sub> and contribute to a better understanding of the phenomena involved in fungal eradication in CM lesions.*

## Objective

*To study fungal cell viability in skin fragments of CM lesions treated with C-LN<sub>2</sub>, obtained by skin biopsy, in time intervals varying from 0 h to 14 days post treatment.*

## MATERIAL AND METHODS

*Five CM patients, with diagnosis confirmed by direct mycological examination and culture, presenting lesions amenable to treatment with C-LN<sub>2</sub> were included in the study. No antifungal nor other specific treatment for CM was used for at least 30 days prior to the study period.*

*Each of the five patients had a specific lesion, roughly 2-cm in diameter, chosen for treatment with C-LN<sub>2</sub>. When small lesions were not present, an isolated portion of a larger plaque was chosen. All lesions were of plaque-type. Cryosurgery was carried out according to Pimentel *et al.*<sup>2</sup> The open spray was aimed at the centre of the lesion. The duration of the application was based on the expansion of the ice front until 3mm beyond the external borders of the lesion. This procedure resulted in freezing times varying from 45 to 75 seconds. Double freeze-thaw cycles were used. Post-operative care was based on Pimentel *et al.*'s<sup>2</sup> paper, i.e.: 1:40,000 KmnO<sub>4</sub> soaks daily, slightly compressive bandages for the first 24 hours and occlusive from then onwards.*

Cada um dos cinco pacientes teve três amostras colhidas em momentos variados durante o período compreendido entre o pós-operatório imediato e 14 dias de pós-operatório, conforme aparece na Tabela 1.

Cada uma das três amostras de cada paciente foi colhida obrigatoriamente em um dos três intervalos de tempo seguintes: 0 a 48 horas, cinco a sete dias e 10 a 14 dias após a realização da C-N<sub>2</sub>L. As amostras foram colhidas sempre na porção mais central da lesão tratada, usando-se *punch* de 4mm. Tendo em vista tratar-se de tecido necrosado, não era necessária anestesia. O sangramento subsequente era controlado com curativos compressivos. O material obtido foi inoculado segundo as normas habituais, em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud com cicloheximida e mantidos em temperatura ambiente. Nas coletas subsequentes as amostras foram colhidas em um ponto central da lesão, imediatamente vizinho ao da última coleta, e processadas da mesma maneira.

Após quatro semanas da inoculação todos os cultivos foram analisados quanto ao crescimento ou não de colônias enegrecidas, típicas dos agentes da CM. As colônias foram identificadas mediante microcultivo para confirmar que se tratava do mesmo fungo isolado antes da C-N<sub>2</sub>L (*Fonsecaea pedrosoi*).

## RESULTADOS

A análise dos microcultivos demonstrou que todos os pacientes apresentavam CM causada por *Fonsecaea pedrosoi*. O mesmo fungo foi identificado em todas as nove culturas que apresentaram crescimento.

A viabilidade das amostras aparece na Tabela 1.

## DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados, nota-se claramente, como seria de esperar, que quanto mais tardia a coleta da amostra menor a possibilidade de crescimento dos fungos. Em nove (60%) das 15 amostras semeadas houve crescimento de colônias de *F. pedrosoi*. Enquanto entre as amostras colhidas no período compreendido entre o pós-operatório imediato e o quinto dia o índice de viabilidade foi de 7/8 (87,5%), naquelas coletadas a partir do sexto dia de pós-operatório foi de apenas 2/7 (28,5%).

Também é interessante notar que houve um caso em que a

Each of the five patients had three lesion samples obtained at different moments along the study period (immediate post-operative until 14th day PO) as shown in Table 1.

Each of the three tissue samples was obtained within one of the following three intervals: 0 to 48 hours, five to seven days, and 10 to 14 days after cryosurgery was carried out. The samples were always obtained from the centremost portion of the lesion treated, using a 4mm punch biopsy. Anesthesia was not used because the biopsied tissue was necrotic. Compressive bandages controlled bleeding. The specimen obtained was inoculated according to regular mycology technique in test tubes containing Sabouraud agar with cycloheximide and kept at room temperature. In subsequent samplings the specimens were taken from a point immediately contiguous to the previous one and processed in the same way.

All cultures were analysed after four weeks. Black colonies, suggestive of dematiaceous fungi were identified microscopically to confirm if the isolate was *Fonsecaea pedrosoi*.

## RESULTS

Pre treatment cultures and microcultures demonstrated that all patients had CM caused by *F. pedrosoi*. The same fungus was identified in all cultures grown after therapy.

Viability of samples appears in Table 1.

## DISCUSSION

Colony growth was observed in nine (60%) of the 15 samples seeded. As expected, growth was more commonly observed among the specimens collected at earlier moments. While among samples collected from the immediate PO to the fifth day viability index was 7/8 (87,5%), among those collected from the sixth to the 14th day, it was 2/7 (28,5%).

It is also interesting to note that there was a case in which culture was initially negative (on the second

Tabela 1: Presença ou não de fungos viáveis nas diferentes amostras de tecido obtidas a partir de lesões de cromomicose tratadas pela criocirurgia com nitrogênio líquido. / Table 1: Presence of viable fungi in different tissue samples obtained from chromomycosis lesions treated by cryosurgery with liquid nitrogen.

| Dia da coleta / Day of collection | P.O. imediato / Immediate P.O. | 1 d | 2 d | 5 d | 6 d | 7 d | 10 | 12 | 14 d |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|------|
| Paciente / Patient                |                                |     |     |     |     |     |    |    |      |
| 1                                 | +                              |     |     | +   |     |     |    | -  |      |
| 2                                 |                                |     | -   | +   |     |     | +  |    |      |
| 3                                 |                                |     | +   |     | -   |     | -  |    |      |
| 4                                 |                                | +   |     |     |     | -   |    |    | -    |
| 5                                 | +                              |     |     | +   |     |     |    | +  |      |

Legenda: +: crescimento de colônia de *F. pedrosoi* / Legend: +: *F. pedrosoi* colony growth

-: Ausência de crescimento / Absence of growth

d: dias/days

cultura, inicialmente negativa (no segundo dia), se apresentou positiva nos dias posteriores. Isso indica que um resultado negativo não significa necessariamente que todos os fungos tenham sido eliminados da lesão, mas apenas que a amostra analisada não deu origem a uma cultura viável. Esse dado é importante, pois demonstra que é possível os fungos persistirem viáveis nas lesões tratadas pela C-N<sub>2</sub>L por períodos ainda maiores do que os identificados no presente estudo. Nota-se, no entanto, a clara tendência à negatificação com o passar do tempo.

Ao analisar a variação de temperatura numa lesão tratada pela C-N<sub>2</sub>L, nota-se que a porção central da área tratada é a que alcança as menores temperaturas, assim como as porções mais superficiais alcançam temperaturas mais baixas do que as porções mais profundas.<sup>8</sup> Seria de esperar, portanto, que fragmentos recolhidos em áreas mais profundas ou mais periféricas apresentassem maior probabilidade de obtenção de amostras viáveis do que fragmentos coletados em áreas mais superficiais e as centrais, já que naquelas áreas os danos teciduais seriam menores do que os observados nas áreas centrais. Para tentar minimizar essas variáveis relativas ao ponto de coleta da amostra, optou-se por realizar a biópsia sempre na porção mais central da lesão, procurando manter a mesma profundidade em todos os fragmentos. Os dados encontrados sugerem que os fragmentos representaram as lesões e os fenômenos nelas ocorridos de forma homogênea e fidedigna.

## CONCLUSÃO

Os presentes dados demonstram que a erradicação dos fungos das lesões de CM começa a ocorrer, de forma mais notável, por volta do sexto dia de pós-operatório, e que por volta do décimo quarto dia a viabilidade dos fungos é pouco provável.

Esses achados corroboram os estudos de Castro<sup>6</sup> que demonstrou em estudos laboratoriais que colônias de fungos causadores da CM não são destruídas pelas baixas temperaturas alcançadas pela C-N<sub>2</sub>L. É provável que as alterações teciduais induzidas pelo frio, como necrose, inflamação ou mesmo um possível papel de adjuvância imunológica, já descrito por Ablin<sup>9</sup> em casos de câncer da próstata tratados pela C-N<sub>2</sub>L, sejam os responsáveis pela destruição tardia dos fungos nas lesões de CM. □

## REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Castro LGM. Chromomycosis: a therapeutic challenge (letter). *Clin Infect Dis*, 15:553, 1992.
2. Pimentel ERA, Castro LGM, Cucé LC, Sampaio SAP. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen. *J Dermatol Surg Oncol*, 1989; 15:72-7.
3. Sittart JAS, Valente NYS. Tratamento da cromomicose pelo nitrogênio líquido. *Med Cut ILA*, 14:227-32, 1986.
4. Graham GF, Torre D. New indications for cryosurgery in infected patients. In: Roenigk RK, Roenigk HH, ed. *Surgical dermatology. Advances in current practice*. St. Louis, Mosby, 1993. p 61-9.
5. Kullavanijaya P, Rojanavanich V. Successful treatment of Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. *Int J Dermatol*, 34(11):804-7, 1995.
6. Castro LGM, Pimentel Era, Lacaz. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen. Fifteen years experience. In Press (*Int. J. Dermatol*)
7. Castro LGM. Mecanismo de cura da cromomicose pela criocir-

urgica com nitrogênio líquido. *An bras Dermatol*, 4:297-300, 1989.

8. Zacarian SA. Cryogenics: the cryolesion and the pathogenesis of cryonecrosis. In: Zacarian SA, ed: *Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders*. St Louis, Mosby, 1985. pp 1-30.

9. Ablin RJ. Current concepts in cryoimmunology. In: Zacarian AS, ed. *Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders*. St Louis, Mosby, 1985. p 306-12.

## CONCLUSION

The present data demonstrate that the eradication of fungi from CM lesions begins to occur more evidently around the sixth day post-operation, and that around the fourteenth day the viability of the fungi was quite improbable.

These findings confirm the studies made by Castro<sup>6</sup> who demonstrated that colonies of CM-causing fungi are not destroyed by the low temperatures reached by C-LN<sub>2</sub>. It is probable that cold induced tissue changes, such as necrosis, inflammation or even a possible role of immunological adjuvancy, already described by Ablin<sup>9</sup> in C-LN<sub>2</sub> - treated cases of prostate cancer, would be responsible for the late destruction of fungi in CM lesions. □

## ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Luiz G. M. Castro  
Rua Mato Grosso, 128/34  
São Paulo SP 01239-040  
Tel/Fax: (11) 3159-5303 / 3259-0352  
E-mail: guiga@dermamail.com.br