

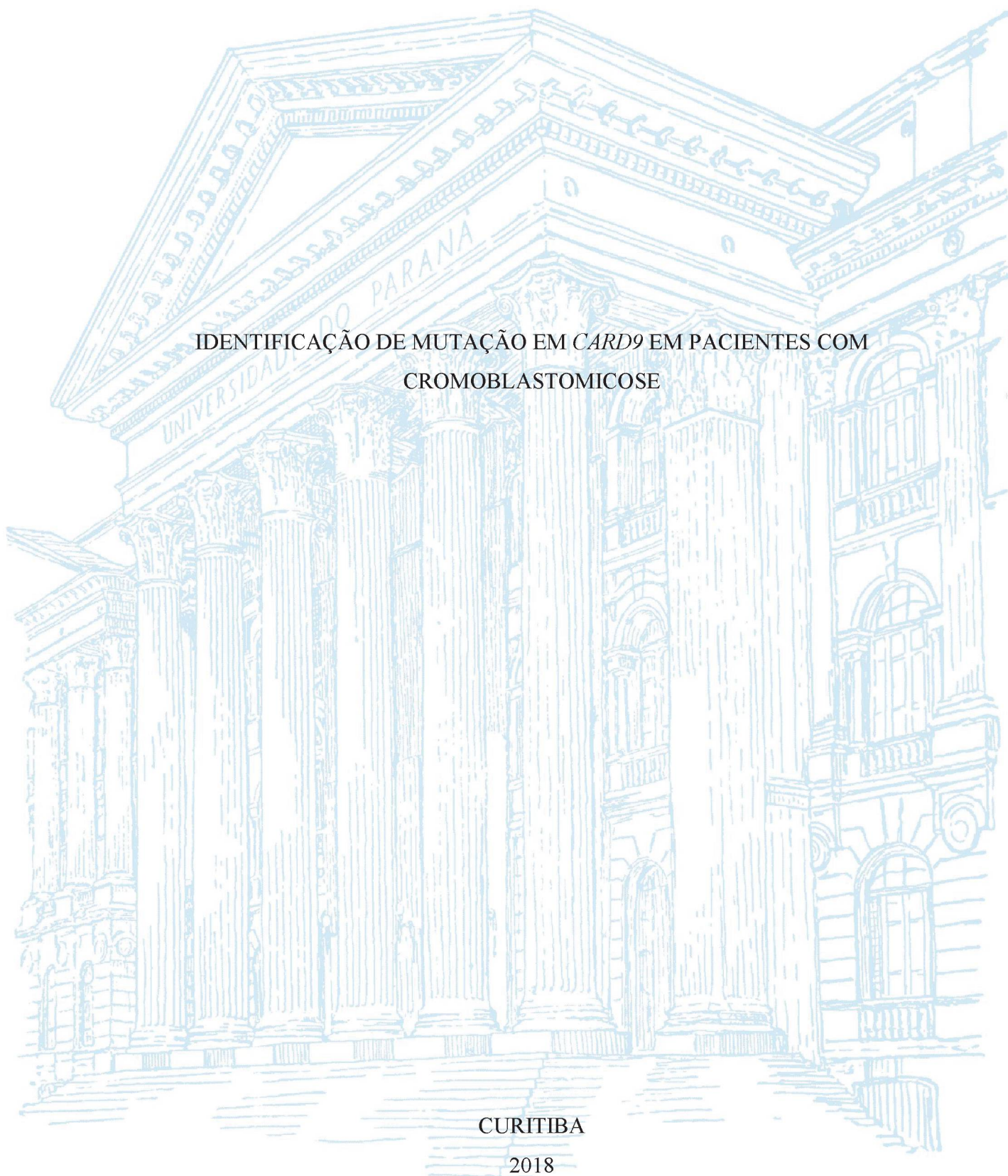
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA SOBIANSKI HERMAN

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO EM *CARD9* EM PACIENTES COM
CROMOBLASTOMICOSE

CURITIBA

2018



TATIANA SOBIANSKI HERMAN

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO EM *CARD9* EM PACIENTES COM
CROMOBLASTOMICOSE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Rodrigues Gomes.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Herman, Tatiana Sobianski

Identificação de mutação em *CARD9* em pacientes com cromoblastomicose. / Tatiana Sobianski Herman. – Curitiba, 2018.
86 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vania Aparecida Vicente

Coorientadora: Renata Rodrigues Gomes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Cromoblastomicose. 2. Fungos. 3. Resposta imune. I. Título II. Vicente, Vania Aparecida. III. Gomes, Renata Rodrigues. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Identificação de mutação em CARD9 em pacientes com cromoblastomicose”

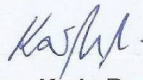
por

Tatiana Sobianski Herman

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente – Presidente


Profa. Dra. Marisol Dominguez Muro


Profa. Dra. Karin Braun Prado


Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo

Curitiba, 10 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me colocar nesse caminho e me dar forças nessa batalha.

A minha família, por sempre estar ao meu lado. A minha mãe, Alexandra, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de força e pelo colo, que sempre foi carinho e porto seguro. A minha irmã, Adriana, amiga e companheira de todas as horas, pro ouvir meus desabafos, me aconselhar e me apoiar. Ao meu pai, Zacarias por sempre estar presente e me ajudar em tudo que pode.

A minha orientadora, por confiar esse projeto, me lançar esse desafio. Por todos os ensinamentos e orientações nesse caminho.

A minha co-orientadora, por todos os ensinamentos, pelos dias dedicados a mim na bancada, por todo o bom humor que tornou essa jornada mais leve e por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei.

A família LabMicro, por dividir comigo todos os momentos nessa jornada, partilhar das alegrias e das tristezas. Pelas risadas arrancadas nos momentos mais inesperados, pelos abraços nos momentos necessários e pelas palavras cruzadas no horário de almoço.

A Germana e Gheniffer pelos conhecimentos passados.

A Juciliane, Bruna, Morgana, Flávia, Isabela, Andressa, Jason, Gabriela, Kassiele, Franciele e Giovana pela constante companhia, os conhecimentos compartilhados e os momentos de diversão.

A Cristina e Amanda pela amizade feita, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

A Ana, amiga e irmã que vida deu, por sempre me apoiar em meus sonhos e projetos e por acreditar em mim.

Aos Geraldos: Hugo, Lúcia e Edson, que foram minha segunda família.

A Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo, pelas amostras e dados cedidos. Também pela confiança depositada em meu trabalho e principalmente por toda a boa vontade e disposição.

Aos professores e funcionários Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR.

A UFMA e Capes pelo apoio financeiro.

Aos pacientes, sem os quais não seria possível realizar esse trabalho.

A todos que participaram dessa minha jornada, dentro e fora do laboratório, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A cromoblastomicose é uma doença cutânea e subcutânea causada por fungos da ordem *Caetothiriales*. A transmissão ocorre por inoculação traumática e a doença se desenvolve de maneira crônica. Diversos quadros são associados à cromoblastomicose, e tem-se demonstrado que a expressão das diferentes formas e a gravidade do quadro clínico é intimamente ligada à resposta imune celular apresentada pelo hospedeiro. Polarização para resposta Th1 é relacionada a formas leves da doença, e Th2 com as formas graves. Novos estudos também vêm correlacionando também a polarização de linfócitos TCD4 para Th17. Em outras infecções fúngicas, inclusive por leveduras negras, mutações em *CARD9* tem sido demonstradas como responsáveis pelo desequilíbrio da polarização de células T e aumento da susceptibilidade. O *CARD9* é uma proteína sinalizadora intracelular, envolvida na polarização de resposta Th1 e Th17. O objetivo principal do presente estudo foi identificar a presença de mutações em *CARD9* relacionadas a manifestação clínica da cromoblastomicose. Vinte e sete pacientes com a doença foram avaliados quanto à polarização da resposta imune celular, através da dosagem de citocinas em amostras de sangue. Nove pacientes com diferentes quadros foram selecionados para a triagem de mutações em *CARD9*, o sequenciamento de todos os éxons do gene foi realizado para esses pacientes. Para éxons que apresentaram mutações pontuais foi realizado o sequenciamento dos demais pacientes. Pacientes com a forma mais leve apresentaram menores níveis de interleucinas, picos de IL-6 e TNF- α foram identificados em pacientes com as formas moderada e grave. No sequenciamento foi identificada a mutação *CARD9*^{S12N}, a mutação, de forma heterozigota, foi observada em nove dos dezessete pacientes sequenciados. Não foram observadas relações entre gravidade do quadro, lesões apresentadas e/ou dosagem de citocinas, e a presença de mutações. O presente estudo contou com um pequeno número de pacientes, mas entre estes há alta presença da mutação podendo indicar relação entre a cromoblastomicose e a mutação *CARD9*^{S12N}.

PALAVRAS-CHAVE: Cromoblastomicose. *CARD9*. Resposta imune. Células T. Leveduras negras.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis is a cutaneous and subcutaneous disease caused by fungi of the *Caetothiriales* order. Transmission occurs by traumatic inoculation and the disease develops in a chronic progress. Several clinical types are associated with chromoblastomycosis, and it has been shown that the expression of the different forms and the severity of the clinical condition is closely linked to the cellular immune response presented by the host. Polarization for Th1 response is related to mild forms of the disease, and Th2 is associated with severe forms. New studies have also been correlating the polarization of TCD4 lymphocytes to Th17. In other fungal infections, including black yeasts, mutations in CARD9 have been shown to be responsible for the imbalance of T cell polarization and increased the susceptibility. CARD9 is an intracellular signaling protein, involved in the Th1 and Th17 response polarization. The main objective of the present study was to identify the presence of mutations in CARD9 related to the clinical manifestation of chromoblastomycosis. Twenty-seven patients with the disease were evaluated for polarization of the cellular immune response by cytokine dosing in blood samples. Nine patients with different clinical types were selected for screening for mutations in CARD9, sequencing of all gene exons was performed for these patients. For exons that presented point mutations, the sequencing of the other patients was performed. Patients with the mildest form had lower levels of interleukins, peaks of IL-6 and TNF- α were identified in patients with moderate and severe forms. In the sequencing the CARD9^{S12N} mutation was identified, the heterozygous mutation was observed in nine of the seventeen patients sequenced. No relationship was observed between the severity of the condition, lesions presented and / or cytokine dosage, and the presence of mutations. The present study had a small number of patients, but among them there is a high presence of the mutation, which may indicate a relationship between chromoblastomycosis and the CARD9^{S12N} mutation.

KEYWORDS: Chromoblastomycosis. CARD9. Immune response. T cells. Black yeasts.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

FIGURA 1 - FORMAS CLÍNICAS DE CROMOBLASTOMICOSE	15
FIGURA 2 - GRAUS DE SEVERIDADE DAS LESÕES DE CROMOBLASTOMICOSE..	16
FIGURA 3 - RESPOSTA IMUNE Á LEVEDURAS NEGRAS	22
FIGURA 4 - RECONHECIMENTO E SINALIZAÇÃO INTRACELULAR VIA MINCLE, DECTINA-2 E DECTINA-1.	27
FIGURA 5 - DOMÍNIOS PROTEICOS DA PROTEÍNA CARD9	28
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GENE <i>CARD9</i>	29

CAPÍTULO II:

FIGURA 1 - EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT PURELINK GENOMIC DNA (INVITROGEN).....	42
FIGURA 2 - ANÁLISE DE MUTAÇÃO NA PLATAFORMA POLYPHEN.....	45
FIGURA 3 - MAPA GENE <i>CARD9</i> CONTENDO OLIGOINUCLEOTIDEOS INICIADORES DESENHADOS	47
FIGURA 4 - SEQUENCIAMENTO DO ÉXON 02 DO GENE <i>CARD9</i> , INDICANDO REGIÃO DA MUTAÇÃO <i>CARD9</i> ^{S12N}	48
FIGURA 5- NÍVEIS DE CITOCINAS DETECTADAS NOS PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE, SEGUNDO GRAU DE SEVERIDADE DA DOENÇA	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA DIFERENTES REGIÕES DO GENE CARD9.....	43
TABELA 2 - DADOS IMUNOLÓGICOS DOS PACIENTES.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
BCL-10	Células de linfoma B 10
CRL	Receptores de Lecitina do Tipo-C
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
CARD9	Domínio de Recrutamento da Caspase 9
FCR γ	Receptor FC gamma (receptor para a fração cristalizável da IGG)
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFN- γ	Interferon-gama
IG	Imunoglobulina
IKKA	Inibidor de NF- κ B kinase alfa
IL	Interleucina
ITAM	Motivo de Ativação da Imunotirosina
MALT1	Proteína de translocação do linfoma do tecido linfoide associado à mucosa 1
MINCLE	Lectina do Tipo C Ativada por Macrófagos
NF-KB	Fator Nuclear-Kappa B
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO ₂	Óxido Nítrico
NOD	Domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PKC	Proteína Kinase C
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
Scr	Tirosina-Quinases da Família Scr
Syk	Tirosina Quinase Esplênica
Th	Célula T <i>helper</i> (auxiliar)
TLR	Receptores similares a Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: DELINEAMENTO DA DISSERTAÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. GERAIS	13
2.2. ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. CROMOBLASTOMICOSE	14
3.2. RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA CROMOBLASTOMICOSE	21
3.3. RECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS E PAPEL DA PROTEÍNA CARD9 NA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR	26
3.4. DOMÍNIO DE RECRUTAMENTO DA FAMÍLIA DAS CASPASES 9 (CARD9)	28
3.4.1. Mutações no gene <i>CARD9</i> e susceptibilidade a infecções fúngicas	29
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II: IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO EM <i>CARD9</i> EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	38
1. INTRODUÇÃO	39
2.1. AMOSTRAS	41
2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>CARD9</i>	41
2.2.1. Extração	41
2.2.2. Desenho dos oligonucleotídeos	42
2.2.3. Reação de amplificação e sequenciamento	44
2.2.4. Análise das sequências e da mutação	44
2.3. LEVANTAMENTO DOS DADOS CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA DOS PACIENTES	45
3. RESULTADOS	47
4. DISCUSSÃO	51
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
1. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS GERAIS	62

CAPÍTULO I: DELINEAMENTO DA DISSERTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cromoblastomicose é uma doença cutânea e subcutânea de caráter crônico, causada por fungos da ordem *Chaetothyriales*. A doença se caracteriza pela presença de corpos muriformes no tecido lesionado e atinge pessoas imunocompetentes (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). Os agentes etiológicos são encontrados naturalmente no ambiente, em solo, materiais vegetais em decomposição e madeira, possuindo como característica comum a capacidade de produção de melanina (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

A cromoblastomicose é uma doença recentemente classificada como doença de implantação e predominantemente em zonas rurais. Os trabalhadores desses ambientes tendem a se infectar através de lesões ocorridas no local de trabalho (MINOTTO et al., 2001, VICENTE et al., 2013, QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). A infecção se desenvolve a partir da lesão inicial, onde há inoculação do agente frequentemente associada a um trauma. Após tempo de incubação indeterminado são observadas lesões polimórficas (QUEIROZ-TELLES, 2015), que são classificadas atendendo os critérios de classificação estabelecido por Carrión (1950) tais como: nodular, verrucosa, tumoral (couve-flor), cicatricial e em placas. Com a evolução da doença o paciente pode apresentar mais de um tipo de lesão (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

Entre as complicações associadas à cromoblastomicose pode-se incluir edema da região afetada, infecções secundárias. Em casos extremos pode-se observar a perda de função do membro ou transformação maligna do tecido atingido (AZEVEDO et al., 2015). O quadro crônico de cromoblastomicose possui significativo impacto socioeconômico na vida dos pacientes, deteriorando a qualidade de vida e a capacidade de trabalho dos indivíduos (MINOTTO et al., 2001).

Não há um tratamento ‘padrão ouro’ para a doença recentemente reconhecida como negligenciada pela Organização Mundial de Saúde- WHO (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Quando descoberta nas fases iniciais, a doença é mais fácil de ser tratada podendo o tratamento ser realizado com métodos cirúrgicos. Se descoberta tardiamente, a cromoblastomicose requer tratamento com antifúngicos sistêmicos combinados ou não com tratamentos físicos. O tratamento com antifúngicos requer tempo e muitos casos recorrentes são relatados (QUEIROZ-TELLES, 2015).

Os mecanismos envolvidos na resposta imune da cromoblastomicose ainda não estão completamente elucidados, mas aponta-se o envolvimento de ambas as repostas: humoral e celular nesta patologia (GIMENES et al., 2005). O perfil de resposta imune Th1, caracterizado

pela presença de IFN- γ e TNF- α , que estimulam atividade antifúngica de macrófagos, está associado a casos mais leves de cromoblastomicose e a maior remissão durante o tratamento. A polarização de linfócito TCD4 para Th1 vem sendo associada às formas mais brandas da doença e a melhores resposta aos tratamentos (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003; CRIADO; MARTINS; ROGE, 2006; ESPINOSA; RIVERA, 2012; VAN DE VEERDONK; NETEA, 2010). Em estudos recentes a polarização para resposta Th17 também tem sido associada na resposta imune eficiente aos agentes causadores da cromoblastomicose (DRUMMOND et al., 2011; SEYEDMOUSA et al., 2014; SILVA et al., 2014).

A resposta Th17 em hospedeiro humanos e animais oferece resistência à fungos, pois gera ativação de neutrófilos (VEERDONK et al, 2009). Para que haja a polarização dessa resposta, células apresentadoras de antígenos (APCs) necessitam fazer reconhecimento de antígenos específicos, no caso de fungos através de receptores de lecitinas do tipo C (CLR), o que desencadeia uma cascata intracelular. Como ponto comum das cascatas de sinalização de diversos CLRs encontra-se o Domínio de Recrutamento de Caspase 9 (CARD9) (GROSS et al., 2006; ROTH, ROLUND, 2013).

Mutações no gene *CARD9* têm sido associadas com o desenvolvimento espontâneo de infecções fúngicas persistentes e graves em humanos, principalmente em infecções de pele, tecido subcutâneo, superfícies de mucosa e sistema nervoso central (DRUMMOND; LIONASKIS, 2016). O gene *CARD9*, localizado no cromossomo 9, codifica uma proteína adaptadora presente em células mielóides responsável pela ativação do Fator Nuclear Kappa B e consequente secreção de citocinas que realizam polarização de células CD4. Deficiências na polarização da resposta imune são associadas a susceptibilidade a infecções fúngicas (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016; PAMPS et al., 2008; ZHONG et al., 2018).

Casos de feohifomicose causados por *P. verrucosa* foram associados à mutações em *CARD9*, células de pacientes afetados apresentavam menor atividade fungicida (LIANG et al., 2015). O melhor entendimento das mutações em *CARD9* também possibilita novas opções terapêuticas. Gavino et al. (2014) demonstraram a correlação entre caso de meningoencefalite causado por *Candida albicans* e mutações (T271C e Y91H) no éxon 03 do gene *CARD9*. O caso foi tratado com fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) obtendo sucesso no tratamento deste paciente.

Dentro deste contexto, o presente trabalho buscou avaliar a presença de mutação em *CARD9* em pacientes com cromoblastomicose. O capítulo I consiste da revisão de dados acerca da cromoblastomicose, da resposta imune envolvida nesta patologia e dos achados a respeito do *CARD9*. O capítulo II se baseia no trabalho realizado para identificação de mutação em

CARD9 em pacientes com cromoblastomicose. Considerações a respeito dos achados deste trabalho e perspectivas futuras são abordadas no capítulo III desta dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Avaliar a presença de mutações no gene *CARD9* e a correlação com a deficiência de resposta Th1 e Th17 em pacientes com cromoblastomicose.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar presença de mutações no gene *CARD9* em pacientes portadores de cromoblastomicose.
- ✓ Relacionar mutação em *CARD9* com polarização de resposta imune.
- ✓ Relacionar mutação em *CARD9* com quadros clínicos graves e de evolução crônica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose é a segunda micose de implantação mais comum no mundo (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b), caracterizada como uma doença traumática de evolução crônica, que atinge tecido cutâneo e subcutâneo de hospedeiros humanos e animais, causada por diversas espécies de fungos melanizados da ordem *Chaetothyriales* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009) os quais quando implantados no tecido subcutâneo do hospedeiro se transformam em estruturas acastanhadas e septadas denominadas de corpos muriformes (Figura 1G-H). A doença vem sendo estudada desde 1910 por Pedroso e Gomes no Brasil e descrita pela primeira vez por Max Rudolph em 1920 (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; QUEIROZ-TELLES, 2015; GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009).

O sítio de inoculação do agente é onde se dá a lesão primária (Figura 1A). O tempo de incubação ainda não pôde ser determinado, mas inicialmente a cromoblastomicose apresenta-se como um pápula lesão macular solitária, que progride para uma pápula elevada com uma superfície lisa rosa que gradualmente aumenta antes de se tornar escamosa, podendo apresentar diferentes formas e tamanhos (Figura 1 B-F). O paciente também pode apresentar prurido e/ou dor (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA et al., 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015).

A lesão pode progredir para diversos quadros e a forma de classificação mais aceita para a doença foi a estabelecida por Carrión em 1950, que descreve cinco formas clínicas: nodular, lesão tumoral, verrucosa, em placa e cicatricial (Figura 1 A-F). A forma nodular é característica de quadros recentes de cromoblastomicose; e apresenta-se com nódulos levemente elevados com coloração rósea, enquanto que a tumoral é também chamada de forma em couve-flor e diferencia-se pela presença de diversos nódulos granulares formando uma grande lesão tumoral. A forma verrucosa, conhecida como hiperqueratose, apresenta-se como uma superfície dura sólida, inelástica, amarelada, lesão hiperkeratótica e mais seca ao longo da região afetada e a cicatricial tem como característica lesões com cicatrizes na borda. A forma em placa apresenta-se com infiltração na cor avermelhada e ou violáceas, apresentando superfície escamosa (QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013; AVELAR-PIRES et al., 2013; GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009).

FIGURA 1 - FORMAS CLÍNICAS DE CROMOBLASTOMICOSE



FONTE: QUEIROZ-TELLES et al., (2017a)

LEGENDA: A – Lesão inicial; B – Lesão nodular; C- Lesão tumoral; D – Lesão cicatricial; E- Lesão verrucosa; F – Lesão em placa; G – Corpo muriforme em raspado de pele; H – Corpo muriforme em células humanas de Langerhans.

Pacientes podem apresentar mais de uma forma clínica em uma mesma lesão em casos mais graves ou com longo tempo de progressão (QUEIROZ-TELLES, 2015; D'ÁVILA; PAGLIARI; DUARTE, 2003). Sendo assim, as lesões presentes na cromoblastomicose podem ser classificadas conforme sua gravidade (figura 02). A forma leve corresponde à forma cicatricial ou nodular com até menos de cinco centímetro de diâmetro; enquanto que, a forma moderada consiste em lesões únicas ou múltiplas de forma verrucosa, tumoral ou em placa, em uma ou mais áreas do corpo, sendo as lesões com menos de 15 cm de diâmetro. A forma severa se caracteriza por extensas lesões de qualquer um dos tipos, e geralmente apresenta baixa resposta ao tratamento (KRZYŚCIAK; MAŁGORZATA; PIASZCZYŃSKI, 2014).

Ainda não estão claros os fatores que diferem nos múltiplos quadros da doença, mas como tem sido provado para outras micoses, acredita-se que esteja relacionado à relação parasito-hospedeiro, ao microambiente formado através da relação patógeno-resposta imune do hospedeiro. A apresentação clínica parece estar associada ao perfil de citocinas apresentado pelo hospedeiro, sendo maiores níveis de IL-10 e TNF- α detectados em casos graves (AVELAR-PIRES et al., 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

FIGURA 2 - GRAUS DE SEVERIDADE DAS LESÕES DE CROMOBLASTOMICOSE



Fonte: Adaptado de QUEIROZ-TELLES (2017a).

Legenda: A – Quadro leve: forma nodular ou cicatricial com até 5 cm de diâmetro; B – Quadro moderado: em lesões únicas ou múltiplas de forma verrucosa, tumoral ou em placa com até 15 cm de diâmetro; C – Quadro grave: lesões de qualquer um dos tipos, com baixa resposta ao tratamento.

A cromoblastomicose pode apresentar complicações como edema local e infecção por bactérias, e em casos com maior severidade tem sido observado o aparecimento de linfedema crônico ou imobilidade do membro. Devido à cronicidade da doença a cromoblastomicose tem como pior e mais debilitante prognóstico o câncer de células escamosas (QUEIROZ-TELLES, 2015; AZEVEDO et al., 2015; GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009).

O diagnóstico de cromoblastomicose é realizado por meio da demonstração do patógeno no tecido hospedeiro através da presença dos corpos muriformes na lesão, os quais podem ser observados na amostra clínica por exame direto com hidróxido de potássio a 10% ou através de exames histopatológicos corados com Hematoxilina-Eosina (Figura 01 G e H). A presença dessa estrutura é patognomônico, sendo os corpos muriformes a forma adaptativa do fungo ao ambiente hostil do tecido hospedeiro (QUEIROZ-TELLES, 2015; AZEVEDO et al., 2015).

Os corpos muriformes se apresentam com formato arredondado, com paredes espessa, coloração marrom com 2-4µm de diâmetro (Figura 02). Pode-se realizar cultura das espécies de fungos causadoras de cromoblastomicose em meios simples, como o ágar Sabouraud. A identificação de leveduras negras a nível de espécie não é obtida apenas pela morfologia, é necessário o sequenciamento dos genes espaçadores transcritos internos (ITS) do RNA ribossômico (RNAr) (CASTRO e ANDRADE, 2010; CALIGIORNE et al., 2005)

Quanto a etiologia, os agentes da doença estão acomodados taxonomicamente dentro da ordem *Chaetothyriales* na família *Herpotrichiellaceae*, a qual reúne diversas espécies associadas a infecção em hospedeiros humanos e animais, sendo a cromoblastomicose e a feohifomicose as principais infecções. A cromoblastomicose atinge tecidos cutâneos e subcutâneos, onde se observa a presença de corpos muriformes nas lesões acometendo principalmente pacientes imunocompetentes. Enquanto que a feohifomicose é uma doença também causada por fungos melanizados inclusive algumas espécies reportadas como agentes de cromoblastomicose. Porém como principal característica é o fato desta doença acometer desde tecidos superficiais até sistêmicos, sendo caracterizada pela presença de hifas e ou fragmento de estruturas fúngicas nos tecidos do hospedeiro e ocorrer principalmente em pacientes imunocomprometidos (GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Os gêneros acomodados dentro da família *Herpotrichiellaceae* são *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinocladiella*, *Capronia*, *Veronaea*, sendo que os principais agentes associados à cromoblastomicose pertencem ao gênero *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, mas há relatos de casos da doença causados por espécies dos gêneros *Phialophora*, *Rhinocladiella* e *Exophiala* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; TEIXEIRA et al., 2017).

Os agentes etiológicos mais frequentes são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA et al., 2014). Sendo que a espécie *F. pedrosoi* tem sido relatada principalmente em áreas tropicais enquanto que a *C. carrionii* em áreas áridas. Existem quatro espécies do gênero *Fonsecaea* causadoras de cromoblastomicose: *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, e *F. pugnacius*, sendo que as espécies *F. monophora* e *F. pugnacius* apresentam neurotropismo. Patógenos menos comuns de cromoblastomicose incluem: *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala jeanselmei*, *E. spinifera* e *E. dermatitidis* (GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009; GOMES et al., 2016; NAJAFZADEH et al., 2011; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

A diferenciação dos gêneros de agentes causadores de cromoblastomicose pode ser feita por micromorfologia de suas formas reprodutivas, mas a confirmação das espécies só é possível apenas por métodos moleculares (VICENTE et al., 2013). Com o avanço da taxonomia molecular houve aumento na diversidade de agentes causadores de cromoblastomicose sem correlação entre diversidade de quadros ou tratamento (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; RASAMOELINA et al., 2015). No ambiente esses agentes parecem ocupar microambientes muito específicos com baixa competitividade, acredita-se que eles apresentem a forma micelial, enquanto a forma parasitária é atribuída aos corpos muriformes, que apresentam forma ovalada e escura, com uma espessa parede e septação ou fissão binária (QUEIROZ-TELLES, 2015; TORRES-GUERRERO et al., 2012).

Os agentes de cromoblastomicose são apenas uma pequena fração da ordem *Caetothyriales*, sendo os membros dessa ordem oligotróficos e únicos no fato de que muitas espécies habitam ambientes extremos, pobres em nutrientes e ou tóxicos. Como ambientes ricos em compostos monoaromáticos, especialmente em nichos ocupados pelo homem, entre eles: lixo tóxico de minas ou solos contaminados com óleos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; DE HOOG, 2014; VICENTE et al., 2008).

A atual hipótese é de que a cromoblastomicose seja transmitida por inoculação traumática com material ambiental, a maioria dos pacientes apresentam histórico de lesão local da infecção sendo que agentes causadores da cromoblastomicose já foram isolados de amostras de solo, em plantas e em lascas de madeira (GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009). Salgado et al (2004) isolaram *F. pedrosoi* em amostra de *Mimosa pudica* identificada por paciente como fonte de infecção. Vicente et al (2013) realizaram o isolamento de espécies de *C. bantiana*, *F. pedrosoi* e *P. verrucosa* em material cortante nas proximidades da residência de pacientes com cromoblastomicose (VICENTE et al., 2001), assim como de *F. monophora* e *Exophiala* em amostras ambientais (VICENTE et al., 2008). Outra importante fonte de fungos dematiáceos foi identificada por Marques et al. (2006): o coco babaçu, fonte de renda na região do Maranhão, onde a cromoblastomicose é endêmica. Deste material foram isolados espécies do gênero *Fonsecaea* e *Exophiala*.

Devido ao hábitat dos agentes, a cromoblastomicose afeta principalmente trabalhadores de zonas rurais: agricultores, lenhadores, vendedores de produtos agrícolas, jardineiros. Observa-se perfil semelhante de pacientes em estudos ao redor do mundo: a maioria homens, com idade em torno de 30 a 60 anos, imunocompetentes. São infrequentes os casos em mulheres ou crianças até 15 anos. Não há uma etnia em que predomine a doença. Há hipóteses de interferência de hormônios femininos no desenvolvimento do fungo e também de

diferentes antígenos HLA (LU et al., 2013; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998; QUEIROZ-TELLES et al., 2011; AVELAR-PIRES et al., 2013; RASAMOELINA et al., 2017; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA et al., 2014; PURIM et al., 2017; QUEIROZ-TELLES, 2015).

A cromoblastomicose apresenta distribuição por todo o globo, sendo mais incidente em áreas tropicais ou subtropicais. Não é uma doença de notificação compulsória, sendo os dados epidemiológicos originários principalmente da literatura. A maioria dos casos tem sido descritos na América do Sul, Ásia África, Caribe e Austrália (QUEIROZ-TELLES, 2015).

Autores apontam México, Cuba, Venezuela, Republica Dominicana, Colômbia e Brasil como áreas de prevalência na América. Tem alta incidência em Madagascar na África, e na Ásia ocorrem diversos casos no Japão, Sri Lanka, Índia sendo muito comum na China. Observam-se também casos na Austrália, com raros casos reportados na Europa (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA et al., 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015) concentrados em países de clima Mediterrâneo como Portugal, Espanha, Itália e França (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA et al., 2014).

Na África e Ásia observa-se a maioria dos relatos vindos de Madagascar, Índia e Sul da China, sendo observada alta incidência de cromoblastomicose em Madagascar (RASAMOELINA et al., 2015; QUEIROZ-TELLES, 2015). Nas Américas observa-se grande número de casos no México, Venezuela, República Dominicana, Cuba, Colômbia e Brasil, com um pequeno número de casos registrados em Porto Rico, Peru, Equador e Argentina (QUEIROZ-TELLES et al., 2011).

No Brasil, a doença é considerada doença ocupacional pelo Ministério do Trabalho e atinge cerca de 163 mil habitantes sendo a incidência estimada em 3 caso/100.000 habitante (QUEIROZ-TELLES, 2015; RIBEIRO et al., 2006). Porém dados sobre esta infecção não requerem notificação compulsória, sendo assim, sua incidência e prevalência podem ser escassas e fragmentadas (QUEIROZ-TELLES et al., 2011). No Brasil também há ocorrência dessa doença nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Sendo que o agente mais frequentemente observado é *F. pedrosoi* (GOMES et al., 2016).

Acredita-se que a alta incidência de casos da região amazônica se deve as características geográficas da região consideradas propícias para o desenvolvimento dos fungos que incluem: alto índice pluviométrico, alta umidade relativa e temperatura média elevada. Além do alto desenvolvimento da atividade agrícola que leva a maior exposição dos indivíduos aos agentes causadores da cromoblastomicose (SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998; AVELAR-PIRES et al., 2013).

Entre as áreas endêmicas o estado do Maranhão tem apresentado aumento progressivo no número de casos. Neste estado realizou-se isolamento de espécies do gênero *Fonsecaea* e *Exophiala* do coco babaçu (*Orbignya phalerata*), importante fonte de renda para moradores do local. A atividade com o coco babaçu é exercida no chão e os trabalhadores costumam se sentar sobre restos do babaçu, que consiste de fibras duras que podem causar injúrias (AVELAR-PIRES et al., 2013; GOMES et al., 2016; MARQUES et al., 2006; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998).

A cromoblastomicose é difícil de ser diagnosticada em países não endêmicos, uma vez que os clínicos não suspeitam de micoses subcutâneas. Em áreas endêmicas pode ser clinicamente diagnosticada como esporotricose, paracoccidioidomicose, blastomicose, coccidioidomicose ou doenças parasitárias (leishmaniose cutânea, rinosporidiose). Ou com doenças não infecciosas como câncer de células escamosas ou psoríase (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA et al., 2014). O diagnóstico diferencial é confirmado portanto pelo acometimento do tecido cutâneo-subcutâneo e pela presença de corpos muriformes identificados por meio de exames laboratoriais (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

Mesmo sendo descrita pela primeira vez há mais de cem anos, a doença ainda apresenta-se como um desafio para terapêutica. Devido ao seu aspecto crônico, a doença é dificilmente curável, observa-se casos de falhas terapêuticas e casos de recorrência. O melhor tratamento para a cromoblastomicose é a extração cirúrgica da lesão. Porém esse método é utilizado apenas em lesões iniciais, bem delimitadas, que são pouco observadas na prática clínica. A cirurgia também pode ser utilizada em associação com o uso de antifúngicos (QUEIROZ-TELLES e SANTOS, 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; QUEIROZ-TELLES, 2015).

Entre os antifúngicos sistêmicos itraconazol tem sido a droga de escolha para tratamento de cromoblastomicose. Este apresenta ação contra a maioria dos agentes etiológicos. O tratamento dura cerca de 8 a 10 meses, até se atingir o critério de cura micológico ou até se observar a diminuição da lesão para extração por métodos físicos. Terbinafina apresenta taxas de cura semelhante ao itraconazol com efeitos fungicidas e fungistáticos, sendo a segunda droga de escolha. Ele apresenta menor interação com outras drogas, quando comparado ao itraconazol e ainda apresenta efeito antifibrótico (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; ARAIZA, 2005; UNGPAKORN; REANGCHAINAM, 2006).

A associação de drogas é usada em casos de micoses sistêmicas refratárias. Itraconazol e terbinafina em associação tem sido usados em casos refratários, com falha em alguns casos. Estudo demonstrou atividade *in vitro* de anfotericina B combinada com terbinafina em cultura

de cepas de pacientes com cromoblastomicose (DENG et al., 2018). Outras combinações tem se mostrado eficazes: flucitosina e itraconazol contra *P. verrucosa* e itraconazol com flucitocina contra *F. pedrosoi*. Contudo a combinação de antifúngicos ainda é considerada inadequada porque requer altas doses e ainda observa-se casos de falha terapêutica (DENG et al., 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

Novas drogas antifúngicas sistêmicas têm sido testadas para cromoblastomicose, a mais promissora é o posaconazol que apresenta melhor farmacodinâmica e farmacocinética do que o itraconazol. É uma droga efetiva no tratamento de cromoblastomicose e feohifomicose, sendo utilizada com sucesso também em casos refratários (NEGRONI et al., 2005; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

A associação de vários métodos sistêmicos e/ou físicos é a última opção em casos extensos ou refratários, porém não há evidências da superioridade de dois tratamentos sistêmicos combinados apresente melhor resultado contra a cromoblastomicose. Como métodos físicos vem-se utilizando a crioterapia, a termoterapia, a terapia fotodinâmica. Além disso, terapias auxiliares tem sido testados para casos refratários ou extensos, o glucan ou imiquimode tópico apresentaram resultados promissores (DE SOUSA et al., 2014; E SILVA AZEVEDO et al., 2008; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

Vários fatores interferem no sucesso do tratamento da cromoblastomicose, como a espécie do agente etiológico, duração e severidade da doença e resposta imune do hospedeiro. Devido a propensão de recorrências, o critério de cura da cromoblastomicose deve ser realizado com precaução (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013). Os critérios de cura para cromoblastomicose consistem em cura micológica (abstenção do parasita), histopatológico (abstenção do parasito, de micro abscessos, atrofia da epiderme, diminuição do infiltrado granulomatoso na derme) e clínico (remissão da lesão) (AZEVEDO et al., 2015).

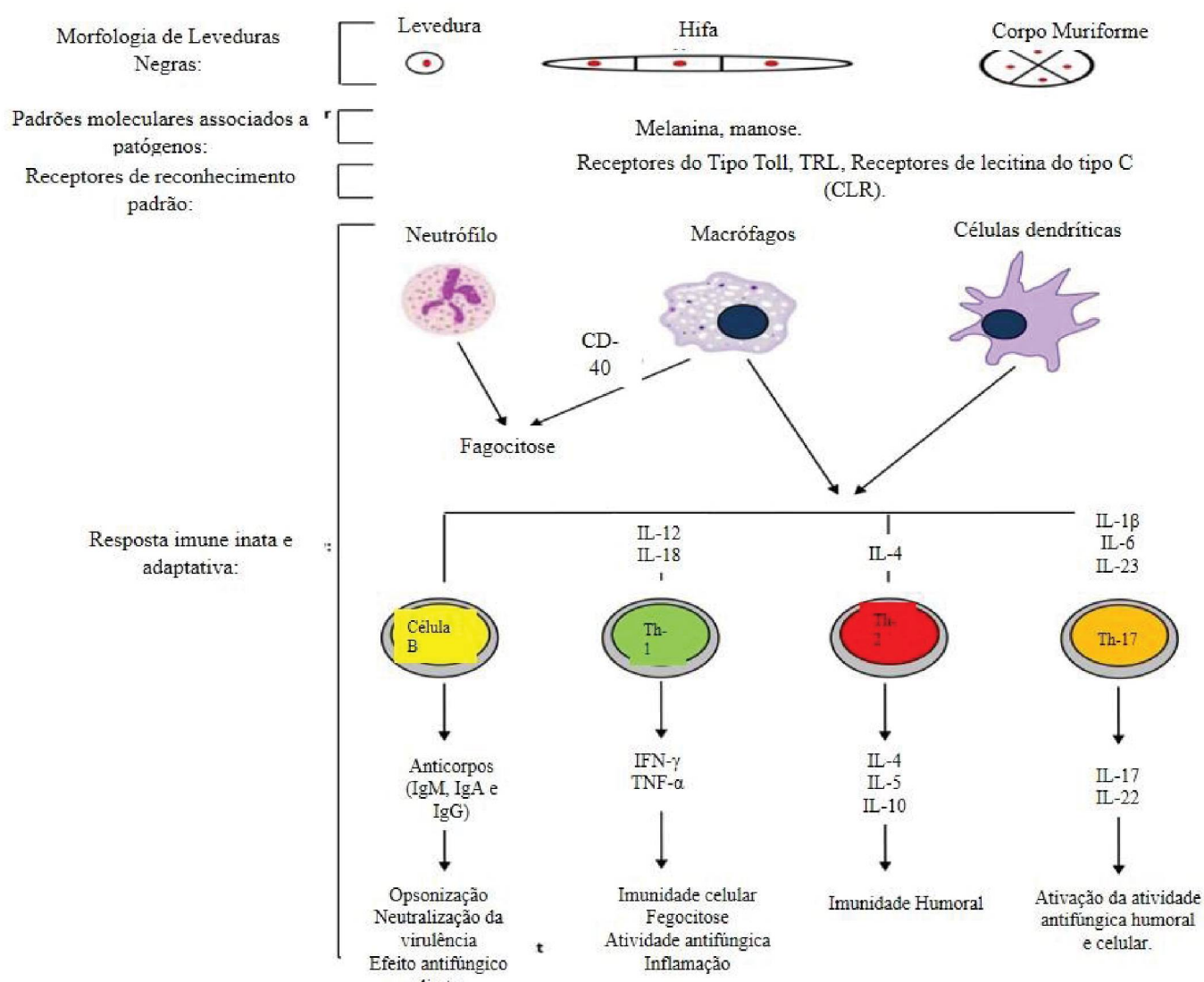
3.2. RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA CROMOBLASTOMICOSE

Os mecanismos envolvidos na resposta imune relacionado a doença cromoblastomicose ainda não são bem esclarecidos. A persistência do fungo no tecido é apontada como uma das principais causas de morbidade nessa infecção, e caráter recorrente da doença pode estar associado à resposta imune não eficiente. Além disso, não há tratamento preconizado, sendo de extrema importância o conhecimento da resposta imune para melhorar a terapêutica dos pacientes com cromoblastomicose (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE,

2003; CRIADO; MARTINS; ROGE, 2006; GIMENES et al., 2005; LEEYAPHAN et al., 2016).

Na resposta inata, primeira linha de defesa do organismo, contra fungos observa-se a presença de fagócitos (Figura 03). Macrófagos e neutrófilos participam da formação do granuloma característico dessa doença e também levam à ativação de células T por apresentação de antígenos (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003; MACHADO; REGIS SILVA; FISCHMAN, 2011). O sucesso dessas células em fagocitar os agentes infecciosos é associado a progressão da cromoblastomicose e à capacidade invasiva dos fungos (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003).

FIGURA 3 - RESPOSTA IMUNE À LEVEDURAS NEGRAS



Fonte: Adaptado de SEYEDMOUSAVI et al. (2014).

Ainda de acordo com a figura 3, a resposta imune celular apontada como a mais envolvida no quadros de cromoblastomicose se caracteriza pela diferenciação de células T em diferentes subpopulações, que possuem funções distintas e perfil de citocinas específicos (WEAVER et al., 2007); (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Esse processo é chamado de polarização, sendo que as células T *helper* (Th) são ativadas para Th1, Th2 ou Th17. A polarização de células T para Th1 é associada a defesa de patógenos intracelulares, sendo caracterizada pela presença de IFN- γ que estimula a fagocitose realizada por neutrófilos. Th2 é relacionada a presença de IL-4, a presença dessa subpopulação é associada a uma resposta deletéria em infecções fúngicas (VAN DE VEERDONK; NETEA, 2010). A presença de IL-17, é específico de células Th17 que recrutam neutrófilos (VAN DE VEERDONK et al., 2009).

Um estudo demonstrou que macrófagos não possuem atividade fungicida, nem fungistática contra *F. pedrosoi*, observou-se que macrófagos conseguem produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mas a presença de melanina leva à inibição de óxido nítrico (NO₂), importante substância para controle de infecção fúngica (BOCCA; BRITO; EDUARDO, 2006; ZHANG et al., 2013). Porém outro estudo evidenciou que a fagocitose depende da forma em que o parasita se encontra. Neste caso, células de Langerhans foram co-cultivadas com as formas de conídios e corpos muriformes de *F. pedrosoi* onde a fagocitose de conídios ocorreu com sucesso, não sendo observados dendritos, e não ocorreu a fagocitose de corpos muriformes (DA SILVA et al., 2007). Diferentes espécies causadoras de cromoblastomicose também geram respostas distintas em fagócitos. Analisando cepas de *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii* e *R. aquaspersa*, todas espécies foram fagocitadas, porém foram identificadas células fúngicas viáveis mesmo nos fagócitos. *F. pedrosoi* e *R. aquaspersa* foram mais fagocitadas e *R. aquaspersa* foi a mais susceptível, uma vez que observou-se diminuição de células viáveis (HAYAKAWA et al., 2006)

A persistência do patógeno no tecido gera a resposta imune que leva a formação de estruturas desorganizadas e fibróticas (SOTTO et al., 2004). Pacientes com formas mais brandas da doença com lesão mais delimitada, com aspecto menor e mais plano apresentam granuloma tuberculóide bem formado com presença de células epitelióides, células de Langerhans e linfócitos. Enquanto pacientes com lesões de aspecto verrucóide, que apresentavam maior tendência a recorrência, apresentavam presença intensa de vários tipos celulares: macrófago, neutrófilos, plasmócitos, eosinófilos, células epitelioides e células gigantes, sem formação de granuloma verdadeiro (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003).

Células dendríticas correspondem a grande número de leucócitos no tecido de pacientes com cromoblastomicose (SOTTO et al., 2004). Essas células apresentam papel importante no reconhecimento do patógeno, apresentação de antígenos e modulação da resposta imune através da polarização de linfócitos T. Células dendríticas imaturas têm sido associadas a resistência do patógeno no tecido (GIMENES et al., 2005; SOUSA et al., 2009).

Hayakawa et al. (2006) demonstraram que receptores de lecitina do tipo-C (CRL) são inibidos por manose, impossibilitando a fagocitose de *F. pedrosoi* e *R. aquaspersa*, indicando papel desses receptores no reconhecimento de agentes de cromoblastomicose (HAYAKAWA et al., 2006). Enquanto Sousa et al. (2011) demonstraram que o reconhecimento de *F. pedrosoi* é realizado pelos CLR's Dectina-1 e Mincle. Porém Wiithrich et al. (2015) evidenciaram que Dectina-2 é o receptor responsável pela sinalização mais intensa, enquanto receptor Mincle realizaria a polarização para resposta imune ineficaz.

Em modelo murino, onde há remissão completa da cromoblastomicose, houve resposta inflamatória intensa nos primeiros 7 dias, com melhora progressiva até a cura no dia 30. TNF- α aumentou até o sétimo dia e manteve seus níveis até o dia 30. Nos primeiros 7 dias observou-se um perfil compatível com polarização Th2 com altos níveis de IL-10, que decaiu após esse período. Esse perfil foi substituído por perfil Th1 com maior nível de TNF- α (WANG et al., 2013).

Na resposta imune à antígeno de *F. pedrosoi* em modelo animal foi observada a proliferação de linfócitos T, perfil Th1, com presença de IFN- γ . Ao se realizar knockout de células CD4⁺ houve aumento da contagem de células fúngicas no tecido e diminuição do IFN- γ , enquanto no knockout de células CD8⁺ não alterou a resposta imune (HAYAKAWA et al., 2006).

Em estudo sobre impacto da melanina na polarização de resposta imune celular observou-se maior nível de IL-10 e menor nível de TNF- α e IL-12 em sobrenadante de macrófagos estimulados com células melanizadas. A presença de perfil resposta Th2, que é associada à persistência do patógeno no tecido, indica que melanina inibe Th1 (ZHANG et al., 2013).

Análises de resposta imune de pacientes portadores de cromoblastomicose também demonstraram que pacientes com quadro mais graves apresentavam altos níveis de IL-10 e não apresentavam expressão de IFN- γ , níveis correspondentes à uma polarização para linfócitos Th2 (GIMENES et al., 2005). Em estudo, comparando formas clínicas de cromoblastomicose e resposta imune envolvida, constatou-se que formas mais graves apresentavam resposta celular

compatível com Th2, enquanto pacientes que respondiam melhor ao tratamento apresentavam polarização para células Th1 (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003).

O perfil de resposta imune apresenta mudanças durante o tratamento, onde pacientes demonstram grande evolução das lesões nos primeiros seis meses de tratamento e quase estagnação da melhora entre seis e dozes meses. A produção de citocinas por macrófagos dos pacientes estimulados *in vitro* mostrou aumento de IFN- γ com 6 meses de tratamento e diminuição após 12 meses, o perfil contrário foi observado para a IL-10, com diminuição em 6 meses e aumento em 12 (CRIADO; MARTINS; ROGE, 2006)

Em outro estudo, pacientes com cromoblastomicose a forma branda apresentaram maiores valores de IL-12 e TNF- α , enquanto pacientes com a forma severa apresentaram maiores valores de IL-10 e menores índices de proliferação de células T. O uso de agonistas de IL-12 apresentou-se como opção para aumento da linfoproliferação, assim como o uso de anticorpos anti-IL10 (SOUSA et al., 2008).

Ao avaliar o papel do linfócito Th17 em infecções fúngicas, notou-se que os linfócitos Th17 liberam IL-17 e IL-22 promovendo recrutamento de neutrófilos e maior proteção contra fungos. Para a indução de células Th17 ocorre a sinalização de IL-6, IL-1 β e TGF- β , e a manutenção da presença células depende da expressão de IL-23 (SMEEKENS et al., 2013). A sinalização da indução da resposta Th17 ocorre a partir de células mielóides que possuem em sua superfície externa diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem carboidratos específicos como antígenos e desencadeiam uma sinalização intracelular capaz de ativar o fator nuclear kappa-B (NF- κ B) que gera liberação de interleucinas responsáveis por mediar a resposta Th17 (DRUMMOND; BROWN, 2011). Em cromoblastomicose ainda não é elucidado o papel da resposta Th17. Mas já demonstrou-se que *F. pedrosoi* é reconhecida por CLR (SOUSA et al., 2011). No estímulo de linfócitos com *F. pedrosoi* foi observado aumento de células Th1 e Th17 (WIITHRICH et al., 2015).

Em estudo para estabelecer modelo murino de infecção de cromoblastomicose por *F. pedrosoi*, houve grande indução da resposta inflamatória por corpos muriformes, apresentando níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, característico de polarização para resposta Th17. Os camundongos infectados com corpo muriforme apresentaram progressiva melhora da lesão (SIQUEIRA et al., 2017).

Ainda não há modelo animal estabelecido para a forma crônica de cromoblastomicose, uma vez que modelos murinos apresentam cura sem a presença de corpos muriformes (SIQUEIRA et al., 2017). Em estudo recente Fornari et al. (2018) demonstraram a presença de corpos muriformes em *Tenebrio molitor*, sugerindo esse como modelo animal para a

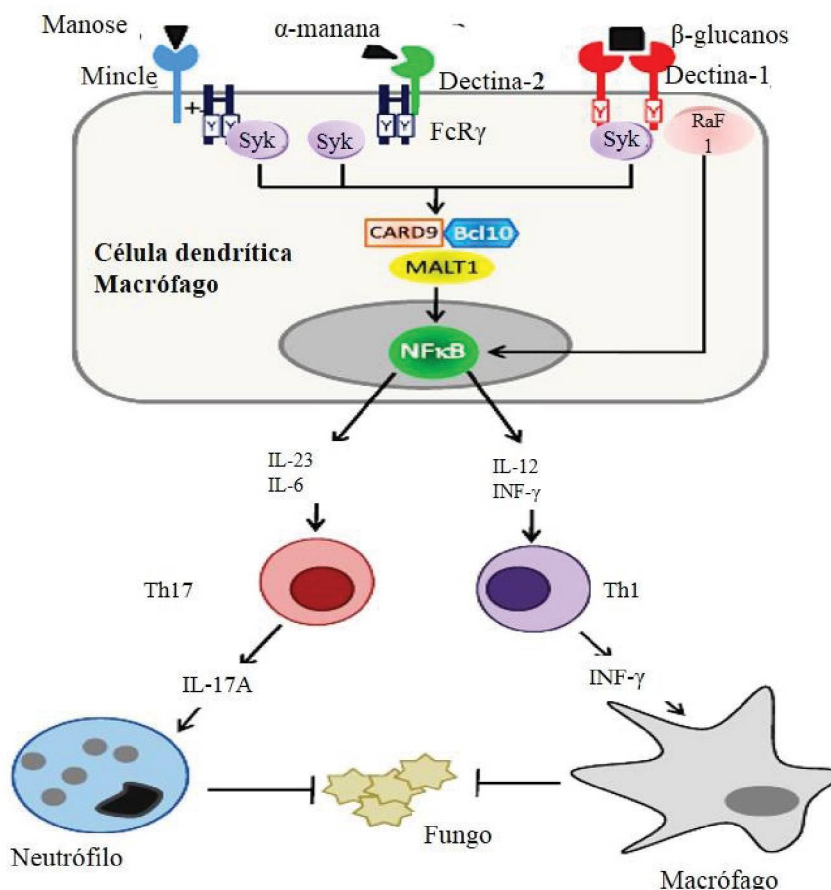
reprodução de fase crônica de cromoblastomicose. Estudos devem ser realizados para determinar o modelo de fase crônica e para maior entendimento da resposta imune associada.

3.3. RECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS E PAPEL DA PROTEÍNA CARD9 NA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

O reconhecimento de antígenos fúngicos por receptores de lecitinas do tipo C (CLR) de células apresentadoras de antígenos (APC) estimula a polarização de células TCD4⁺ para uma resposta Th17 (GROSS et al., 2006; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007). β -glucanos presentes em fungos são reconhecido pelo receptor Dectina-1, enquanto o reconhecimento de α -manose é realizado por Dectin-2 e Mincle (*Macrophage Inducible C-type Lectin*). O reconhecimento de antígenos por esses receptores gera ativação de Syk e CARD-9 e consequente ativação de NF- κ B e liberação de citocinas inflamatórias (GROSS et al., 2006; KINGETER; LIN, 2012; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007). A dectina-1 possui um domínio motivo de ativação da imunotirosina (ITAM), em sua porção citoplasmática (Figura 04). De acordo com a figura, após o comprometimento da Dectina-1, o ITAM é fosforilado pela tirosina-quinases da família Scr (Scr), recrutando e ativando Syk (Tirosina Quinase Esplênica) (DRUMMOND et al., 2011; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007). Os receptores Dectina-2 e Mincle, pertencem a mesma família de receptores e possuem um domínio citoplasmático curto, esse domínio pareia-se com uma cadeia FcR γ , mudando a carga e ativando o ITAM presente nesta cadeia. O syk é então, recrutado e ativado (LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007; ROTH; RULAND, 2013).

O Syk ativado é capaz de ativar Proteína Kinase C (PKC) δ , que fosforiliza o domínio de recrutamento de caspase 9 (CARD9) na posição Thr 23. O domínio CARD do CARD9 interage com CARD do BCL-10, e se associa com a paracaspase MALT1 formando o complexo CARD9 – BCL10 – MALT-1 (CBM) (BERTIN et al., 2000; DRUMMOND et al., 2011; ROTH; RULAND, 2013). O complexo CBM promove a fosforilação e degradação proteossomal do IKK α , que permite a translocação do NF- κ B para o núcleo (BI et al., 2010). O NF- κ B estimula a expressão de genes envolvidos na ativação de linfócitos e de citocinas pró-inflamatórias realizando a fagocitose das células fungicas (KINGETER; LIN, 2012).

FIGURA 4 - RECONHECIMENTO E SINALIZAÇÃO INTRACELULAR VIA MINCLE, DECTINA-2 E DECTINA-1.



FONTE: Adaptado de DRUMMOND et al. (2011).

No reconhecimento de antígenos fúngicos, pode-se observar a presença de outros receptores como PRRs e TLRs, mas apenas deficiências em CLR são associadas ao aumento da severidade da infecção. Muitas CLRs possuem via comum passando por ativação e desempenho do papel do CARD9. Diversos estudos têm sido realizados a cerca dessa proteína e do gene que codificam o CARD9 relacionando a deficiência deste à maior susceptibilidade a infecções fúngicas (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016).

Em estudo *in vivo*, com infecção de camundongos com *C. albicans*, foi observado que Dectina-1 possui papel redundante. Enquanto resposta Th17 é dependente de CARD9, Th1 é parcialmente dependente desta proteína adaptadora (LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007).

Em trabalho com camundongos CARD9 *knockout* (CARD9^{-/-}) infectados com *C. albicans*, observou-se menor sobrevivência e maior infiltrado de células fúngicas no fígado de knockout do que em animais controles (GROSS et al., 2006). Em outro estudo com

camundongos *CARD9*^{-/-} infectados com *P. verrucosa* de pacientes com feohifomicose, *CARD9* mostrou-se essencial para a sobrevivência dos camundongos. Enquanto observou-se regressão da lesão em camundongos controle, os camundongos *knockout* apresentaram diminuição da resposta Th17, sofreram infecção disseminada e foram a óbito (WU et al., 2016). Bishu et al. (2014) demonstraram que o papel de *CARD9* em infecção oral por *Candida* é totalmente dependente de Th17. Camundongos *CARD9*^{-/-} apresentavam maiores cargas fúngicas do que os animais controles.

3.4. DOMÍNIO DE RECRUTAMENTO DA FAMÍLIA DAS CASPASES 9 (*CARD9*)

O *CARD9* (Domínio de Recrutamento da Família das Caspases 9) é uma proteína adaptadora, presente em células mielóides que possui importância na resposta imune frente a fungos e bactérias intracelulares (BI et al., 2010). Moléculas de reconhecimento do tipo CLR, TLR e NOD (Domínio de Oligomerização Ligado a Nucleotídeo) parecerem convergir para o *CARD9* em reconhecimento de antígenos de microrganismos (ZHONG et al., 2018). Mutações nessa proteína em humanos tem sido relacionadas à quadros mais graves de infecções fúngicas (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016).

Em estudo sobre proteínas da família CARD, que atuam em interações CARD-CARD, foi identificada a proteína *CARD9* (BERTIN et al., 2000). O estudo identificou um c-DNA codificando uma proteína com 536 aminoácidos com 88% de similaridade em ratos e dois domínios funcionais: o domínio N-terminal possui um domínio de recrutamento da caspase e no C-terminal um domínio Coiled-coil (Figura - 5). O domínio CARD do *CARD9* interage com o CARD do BCL-10 e em associação com a paracaspase MALT1 ativa NF-κB. Através de análise de Southern blot foi identificada a expressão de *CARD9* em diversos tecidos: baço, fígado, placenta, pulmão, cérebro, leucócitos de sangue periférico (BERTIN et al., 2000).

FIGURA 5 - DOMÍNIOS PROTEICOS DA PROTEÍNA *CARD9*

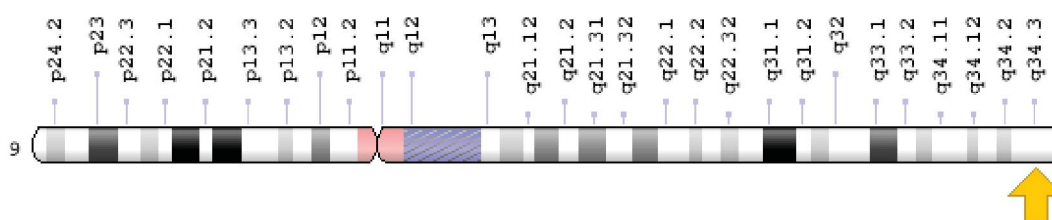


FONTE: Adaptado de ZHONG et al. (2018).

3.4.1. MUTAÇÕES NO GENE *CARD9* E SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÕES FÚNGICAS

A proteína *CARD9* é codificada pelo gene *CARD9*, que está localizado no cromossomo 9, posição 9q34.3 (Figura - 6), nos pares 136.363.956 a 136.373.681. O gene *CARD9* contém 11.779pb e 12 éxons, com oito variantes de *splicing* transcritos (Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12) (NCBI).

FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GENE *CARD9*



FONTE: Adaptado de ZHONG et al. (2018).

Legenda: Localização Gene *CARD9* no cromossomo 9, indicado pela seta em amarelo.

As mutações no gene *CARD9* podem gerar mudanças na estrutura, perda de função ou diminuição da expressão proteica (ZHONG et al., 2018). Observa-se que mutações no gene *CARD9* predispõe apenas a infecções fúngicas em mucosas ou tecidos profundos, não predispondo o indivíduo a infecções por outros tipos de patógenos. Mutações no gene *CARD9* são encontradas em região promotora, em domínios proteicos coiled-coil e CARD. Estudos têm mostrado também que a maioria das mutações são homocigotas recessivas e estão presentes em famílias consanguíneas. Tem-se observado que diferentes mutações geram diferentes quadros. Já foram observadas três síndromes: deficiência de *CARD9* em infecções de pele e subcutâneas, nas quais a resposta Th17 desenvolve papel crucial na resposta do hospedeiro, deficiência de *CARD9* em meningoencefalite e também em quadros de candidíase crônica subcutânea, que geralmente apresenta-se cedo em indivíduos acometidos (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016; LANTERNIER et al., 2014, 2015; GAVINO et al., 2014; LIANG et al., 2015). Diferenças nas manifestações dessas síndromes são geradas, pois há diferença na resposta gerada em cada tecido, em mucosas observa-se resposta com presença de Th17, células $T\gamma\delta$ e células linfóides inatas, enquanto em quadros sistêmicos a resposta é caracterizada pela presença de neutrófilos e fagócitos mononucleares (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016).

Estudo com 36 membros de uma família iraniana consanguínea, com membros que apresentavam quadro crônico de infecção por *Candida* identificou a mutação Q295X em *CARD9* em todos os pacientes afetados. Essa mutação de maneira homozigótica gera a troca de C por T no códon 295 do éxon 6 gerando um término prematuro no códon. Células transfectadas com *CARD9* Q295X estimuladas não apresentavam expressão de TNF- α e a proporção de células Th 17 era baixa (GLOCKER et al., 2009).

Drewniak et al. (2013) apresentam um caso de mutação no gene *CARD9* que leva a não expressão da proteína, gerando susceptibilidade do paciente, que apresentou quadro de meningoencefalite. Neste estudo é apontado que infecções invasivas de *Candida* em pacientes com essas mutações decorrem de defeitos seletivos em neutrófilos, que recebem estímulos de linfócitos Th17.

Drummond et al. (2015) apresentaram caso de garota de 11anos com pais consanguíneos. A paciente apresentava recorrente infecção na garganta desde cedo, sem outras condições médicas. Detectou-se a presença de *Candida albicans* em sistema nervoso central e através do sequenciamento do gene *CARD9* foi encontrada a mutação c.170G>A no éxon 3. E da mesma forma a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α do paciente era deficiente.

Grumach et al. (2015) apresentaram caso de paciente com quadros de infecções fúngicas recorrentes, desde a infância. Em exames foi detectada eosinofilia, altos níveis de IgG e IgE e baixo número de células NK. No sequenciamento do *CARD9* foi identificado a mutação c.302G>T variação do éxon 3. Da mesma forma, Alves de Medeiros et al. (2016) descrevem casos de mutação no gene *CARD9* que levou a susceptibilidade a infecções fúngicas em pacientes consanguíneos. Os pacientes apresentavam quadro de infecção mucocutânea crônica e invasiva, duas mutações foram identificadas e observou-se baixa expressão de IL-17. Lanternier et al. (2014) realizaram estudo com dezessete pacientes de oito famílias, sem risco conhecido para infecção fúngica, o primeiro quadro dos pacientes afetados apresentou-se entre a infância até a juventude, sempre ocorrendo reincidência das infecções. Nesses paciente foram identificadas as mutações c.C865T e c.C301T no gene *CARD9*.

Mutações no gene *CARD9* também tem sido associadas a susceptibilidade a infecções por leveduras negras. Kamemura et al. (2013) descreveram o caso de quatro pacientes com feohifomicose, com lesões persistentes na face, que não apresentavam imunodeficiência conhecida. Três mutações em *CARD9* foram identificadas, duas eram de características heterozigotos (c.191-192insTGCT e c.472C>T; p.L64fsX59 e p.Q158X) e outra componente homozigoto (c.819- 820insG), observando menor dosagem de citocinas IL-17 e IL-22 e menor contagem de células Th17. Em estímulo *in vitro* das células desses pacientes, Liang et al. (2014)

demonstraram menor expressão de IL-8, TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-6 em resposta a *Phialophora verrucosa*. Wang et al. (2017) também descreveram três casos de pacientes diagnosticados com feohifomicose com lesão persistente que apresentaram mutações em *CARD9*, em estimulação *in vitro*, houve menor dosagem de IL-1, IL-6 e TNF- α , quando comparado com o controle.

Lanternier et al. (2015) descrevem dois casos de feoifomicoses por *Exophiala* em pacientes com diferentes mutações em *CARD9* porém sem registro de queda do número de linfócitos Th17. Entretanto, Ruijun et al. (2017) identificaram mutação com componente heterozigotas que levou à diminuição de células Th1 e Th17 em pacientes quando comparados à controle em resposta a *P. verrucosa*.

Sendo assim, o conhecimento de mutações em *CARD9* e seu papel na susceptibilidade a infecções poderá propiciar novas abordagens terapêuticas nas infecções fúngicas. Em estudo com paciente com perda de expressão de *CARD9* e quadro recorrente de meningoencefalite utilizou-se tratamento com fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) associado a antifúngicos, mostrando melhora do quadro infeccioso (GAVINO et al., 2014). Jachiet et al. (2015) descreveram caso de paciente com mutação homozigota para *CARD9*, com quadro de infecção em pele e unhas, tratamentos múltiplos e prolongados foram realizados, mas paciente apenas apresentou remissão total do quadro com tratamento com posaconazol. Portanto, a elucidação do papel do gene *CARD9* na resposta imune relacionada a doença cromoblastomicose, propiciaria melhores critérios para a escolha de tratamentos já existentes e também o desenvolvimento de novas formas de tratamento.

REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.
- ALVES, A. et al. In Situ Immune Response in Human Chromoblastomycosis – A Possible Role for Regulatory and Th17 T Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. 14–16, 2014.
- ALVES DE MEDEIROS, A. K. et al. Chronic and Invasive Fungal Infections in a Family with CARD9 Deficiency. **Journal of Clinical Immunology**, v. 36, n. 3, p. 204–209, 2016.
- ARAIZA, J. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine : Experience with four cases. n. May 2004, p. 47–51, 2005.
- AVELAR-PIRES, C. et al. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the brazilian amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 302–306, 2013.
- AVILA, S. C. G. P. D'; PAGLIARI, C.; SEIXAS DUARTE, M. I. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia**, v. 156, n. 2, p. 51–60, 2003.
- AZEVEDO, C. M. P. S. et al. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1500–1504, 2015.
- BERTIN, J. et al. CARD9 Is a Novel Caspase Recruitment Domain-containing Protein That Interacts With BCL10 / CLAP and Activates NF- κ B *. v. 275, n. 52, p. 41082–41086, 2000.
- BI, L. et al. CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B α kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 34, p. 25969–25977, 2010.
- BISHU, S. et al. The adaptor CARD9 is required for adaptive but not innate immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1173–1180, 2014.
- BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M. S.; EDUARDO, C. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis : a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**, v. 161, p. 195–203, 2006.
- CALIGIORNE, R. B. et al. Internal Transcribed Spacer rRNA Gene-Based Phylogenetic Reconstruction Using Algorithms with Local and Global Sequence Alignment for Black Yeasts and Their Relatives. v. 43, n. 6, p. 2816–2823, 2005.
- CETINKAYA, P. G. et al. A young girl with severe cerebral fungal infection due to card 9 deficiency. **Clinical Immunology**, v. 191, n. 2017, p. 21–26, 2018.
- CRIADO, P. R.; MARTINS, E. C.; ROGE, S. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, p. 97–101, 2006.
- DA SILVA, J. P. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 104–111, 2007.
- DE HOOG, G. S. Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in

unexplored habitats. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 1–2, 2014.

DE SOUSA, M. D. G. T. et al. Topical application of imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1734–1737, 2014.

DENG, S. et al. Combination of amphotericin B and terbinafine against melanized fungi associated with chromoblastomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. March, p. AAC.00270-18, 2018.

DREWNIAK, A. et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2385–2392, 2013.

DRUMMOND, R. A. et al. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 276–281, 2011.

DRUMMOND, R. A. et al. CARD9-Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. **PLoS Pathogens**, 2015.

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 392–399, 2011.

DRUMMOND, R. A.; LIONAKIS, M. S. Mechanistic Insights into the Role of C-Type Lectin Receptor / CARD9 Signaling in Human Antifungal Immunity. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, n. April, 2016.

E SILVA AZEVEDO, C. D. M. P. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 341–344, 2008.

ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. **Cytokine**, v. 6, n. 1, p. 247–253, 2012.

FORNARI, G. et al. A Model for Trans-Kingdom Pathogenicity in *Fonsecaea* Agents of Human Chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–11, 2018.

GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: Advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 559–563, 2009.

GAVINO, C. et al. CARD9 deficiency and spontaneous central nervous system candidiasis: Complete clinical remission with GM-CSF therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 1, p. 81–84, 2014.

GIMENES, V. M. F. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 7, n. 4, p. 708–13, 2005.

GLOCKER, E.-O. et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Family with Susceptibility to Fungal Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1727–1735, 2009.

GOMES, R. R. et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. p. 1–20, 2016.

GROSS, O. et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. August, p. 651–656, 2006.

GRUMACH, A. S. et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Brazilian Patient with Deep Dermatophytosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, p. 486–490, 2015.

HAYAKAWA, M. et al. Phagocytosis , Production of Nitric Oxide and Pro-

inflammatory Cytokines by Macrophages in the Presence of Dematiaceous Fungi that Causes Chromoblastomycosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, p. 382–387, 2006.

INVITROGEN. PureLink Genomic DNA Kits. **User Manual**, n. February, p. 1–18, 2016.

JACHIET, M. et al. Posaconazole treatment of extensive skin and nail dermatophytosis due to autosomal recessive deficiency of CARD9. **JAMA dermatology**, v. 151, n. 2, p. 192–4, 2015.

KAMEMURA, N. et al. CARD9 mutations linked to subcutaneous phaeohyphomycosis and TH17 cell deficiencies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, 2013.

KINGETER, L. M.; LIN, X. C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. **Cellular & molecular immunology**, v. 9, n. 2, p. 105–12, 2012.

LANTERNIER, F. et al. Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. **N Engl J Med.**, v. 369, n. 18, p. 1704–1714, 2014.

LANTERNIER, F. et al. Inherited CARD9 deficiency in 2 unrelated patients with invasive exophiala infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 8, p. 1241–1250, 2015a.

LANTERNIER, F. et al. Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1558–1568e2, 2015b.

LEEYAPHAN, C. et al. Immune response in human chromoblastomycosis and eumycetoma – focusing on human interleukin-17A, interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and human beta-defensin-2. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 751–756, 2016.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Syk-and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 08, p. 630–638, 2007.

LIANG, P. et al. CARD9 Deficiencies Linked to Impaired Neutrophil Functions Against *Phialophora verrucosa*. **Mycopathologia**, v. 179, n. 5–6, p. 347–357, 2015.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 1–14, 2012.

LU, S. et al. Chromoblastomycosis in Mainland China: A Systematic Review on Clinical Characteristics. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 489–495, 2013.

MACHADO, A. P.; REGIS SILVA, M. R.; FISCHMAN, O. Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. **Mycoses**, v. 54, n. 3, p. 202–211, 2011.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–311, 2006.

MINOTTO, R. et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 585–592, 2001.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Molecular epidemiology of *fonsecaea* species. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 464–469, 2011.

NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339–346, 2005.

NÓBREGA, Y. K. DE M. et al. The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates production of different profiles of cytokines and nitric oxide by Murine peritoneal cells in vitro. **Mycopathologia**, v. 170, n. 2, p. 89–98, 2010.

PAMPS, T. et al. CARD9 Signaling in the Innate Immune Response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 44, p. 35–44, 2008.

PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M. et al. Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe: First confirmed case and review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 391–398, 2014.

PURIM, K. S. M. et al. Chromoblastomycosis: Tissue modifications during itraconazole treatment. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 4, p. 478–483, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. DE et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017a.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a Neglected Tropical Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 46–50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017b.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. DE C. L. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, 2013.

QUEIROZ FILHO, F. A Cromoblastomicose no Estado do Paraná: Etiologia, Epidemiologia, Clínica e Terapêutica com itaconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 345–346, 1997.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis in Madagascar: Epidemiology, molecular diagnostic and perspectives. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 99–100, 2015.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 3, p. 312–324, 2017.

RIBEIRO, E. L. et al. Chromoblastomycosis : present disease in brazilian population reality. **Rev Bras Anal Clin**, v. 38, n. 3, p. 189–192, 2006.

ROSENTUL, D. C. et al. Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1138–1145, 2011.

ROSENTUL, D. C. et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

ROTH, S.; RULAND, J. Caspase recruitment domain-containing protein 9 signaling in innate immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 243–250, 2013.

RUIJUN, Z. et al. CARD9 mutations and related immunological research of one case with disseminated phaeohyphomycosis. **Journal of Microbes and Infections**, v. 12, n. 1, p.

14–23, 2017.

SALGADO, C. G. et al. ISOLATION OF *Fonsecaea pedrosoi* FROM THORNS OF *Mimosa pudica*, A PROBABLE NATURAL SOURCE OF CHROMOBLASTOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33–36, 2004.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black yeasts and their filamentous relatives: Principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527–542, 2014.

SILVA, J. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171–175, 1998.

SIQUEIRA, I. M. et al. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–23, 2017.

SMEEKENS, S. P. et al. Genetic susceptibility to *Candida* infections species. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 805–813, 2013.

SOTTO, M. N. et al. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 31, n. 1, p. 14–18, 2004.

SOUSA, M. D. G.; GHOSN, E. E. B.; ALMEIDA, S. R. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 6, p. 595–600, 2006.

SOUSA, M. DA G. et al. Short Article Restoration of Pattern Recognition Receptor Costimulation to Treat Chromoblastomycosis, a Chronic Fungal Infection of the Skin. **Cell Host and Microbe**, v. 9, p. 436–443, 2011.

SOUSA, M. G. et al. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4+ T cell activation in vitro. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 117–125, 2009.

SOUSA, M. G. T. et al. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 3, p. 864–70, 2008.

TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 2017.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403–408, 2012.

UNGPAKORN, R.; REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. n. September 2005, p. 245–247, 2006.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: An overview. **BMB Reports**, v. 42, n. 12, p. 776–787, 2009.

VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G. T-cell subsets and antifungal host defenses. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 238–243, 2010.

VICENTE, V. A. et al. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 47–51, 2001.

VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2013.

WANG, H. et al. Cytokine Profile of a Self-Healing *Fonsecaea pedrosoi* Infection in Murine Model. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 2, p. 599–605, 2013.

WANG, X. et al. Impaired Specific Antifungal Immunity in CARD9-Deficient Patients with Phaeohyphomycosis. **Journal of Investigative Dermatology**, n. November, p. 1–11, 2017.

WEAVER, C. T. et al. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. 2007.

WEVERS, B. A. et al. Fungal engagement of the C-type lectin mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 4, p. 494–505, 2014.

WIITHRICH, M. et al. *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 2542–2552, 2015.

WU, W. et al. Impairment of Immune Response against Dematiaceous Fungi in Card9 Knockout Mice. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9–10, p. 631–642, 2016.

XU, X. et al. CARD9S12N facilitates the production of IL-5 by alveolar macrophages for the induction of type 2 immune responses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 6, p. 547–560, 2018.

YAN, X. X. et al. CARD9 mutation linked to *Corynespora cassiicola* infection in a Chinese patient. **British Journal of Dermatology**, 2016.

ZHANG, J. et al. Melanin in a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* Inhibits the Production of Nitric Oxide and Th1 Cytokines of Murine Macrophages. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 515–522, 2013.

ZHONG, X. et al. Molecular and physiological roles of the adaptor protein CARD9 in immunity review-article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.

CAPÍTULO II: IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO EM *CARD9* EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

1. INTRODUÇÃO

O CARD9 (Domínio de Recrutamento da Família das Caspases 9) é uma proteína adaptadora, presente em células mielóides que possui importância na resposta imune à fungos e bactérias intracelulares (BI et al., 2010). Essa proteína está presente na cascata intracelular de células apresentadoras de antígenos (APCs) que realizam o reconhecimento de antígenos fúngicos pelas moléculas de reconhecimento do tipo receptores de lecitina do tipo C (CLR). O CARD9 ativa fator nuclear Kappa B (NF- κ B), que estimula a polarização de células TCD4+ para uma resposta Th1 e Th17 (GROSS et al., 2006; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007; ZHONG et al., 2018).

A proteína é codificada pelo gene *CARD9*, mutações nesse gene tem sido associadas a defeitos na polarização de células T, aumentando a susceptibilidade e a gravidade dos quadros em infecções fúngicas (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016). Tem sido demonstrado aumento a susceptibilidade a infecções recorrentes ou invasiva por *Candida albicans* (CETINKAYA et al., 2018; DRUMMOND et al., 2015; GLOCKER et al., 2009; LANTERNIER et al., 2014) e em infecções por outras espécies de *Candida* (DREWNIK et al., 2013; LANTERNIER et al., 2015b). Também há relatos de casos de dermatofitoses e infecções invasivas como por *Trichophyton mentagrophytes* (GRUMACH et al., 2015), *Corynespora cassicola* (YAN et al., 2016), *Exophiala spp* (LANTERNIER et al., 2015a) e *Phialophora verrucosa* (LIANG et al., 2015).

Em relação as leveduras negras, mutações em *CARD9* foram observadas em pacientes com feohifomicose (LANTERNIER et al., 2015a; LIANG et al., 2015; YAN et al., 2016). Em estudo com *P. verrucosa* foi observada diminuição da capacidade fungicida, diminuição de citocinas associadas a polarização de células Th1 e Th17 (LIANG et al., 2015; RUIJUN et al., 2017). Ainda não há relatos na literatura sobre a relação da presença de mutações em *CARD9* em pacientes com cromoblastomicose.

A cromoblastomicose é uma doença cutânea e subcutânea causada por inoculação traumática do agente no tecido do hospedeiro e devido ao perfil da população atingida, a doença é considerada como ocupacional (QUEIROZ-TELLES et al., 2011), e recentemente foi reconhecida como negligenciada pela Organização Mundial de Saúde - WHO (QUEIROZ-TELLES et al. 2015)

Quanto a etiologia é causada por fungos da ordem *Chaetothyriales*, sendo as principais espécies associadas são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carionii*. após a implantação nos tecidos estes agentes se transformam em células acastanhadas e septadas no interior dos

tecidos denominada de corpos muriformes e é assumido como a principal característica da doença, que apresenta caráter crônico com evolução lenta (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

A resposta imune tem sido bastante associada ao quadro apresentado pelos pacientes, principalmente o papel da polarização de células T. Resposta do tipo Th1 vem sendo relacionada aos quadros mais brandos da doença, enquanto pacientes que apresentam resposta Th2 apresentam pior prognóstico (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003; GIMENES et al., 2005). Recentemente também vem-se estudando o papel da resposta Th17 nessa doença (WIITHRICH et al., 2015).

Em relação a cromoblastomicose, existe uma grande variedade de casos que tendem a cronicidade. Estudos tem relacionados a resposta imune do paciente a evolução da doença e a resposta ao tratamento (PURIM et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). A resposta imune em cromoblastomicose ainda não é completamente elucidada, por isso são necessários estudos sobre os mecanismos imunes associados à evolução clínica da doença. Neste cenário o objetivo principal deste capítulo foi a identificação de mutações em *CARD9* associada a resposta imune em pacientes com cromoblastomicose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

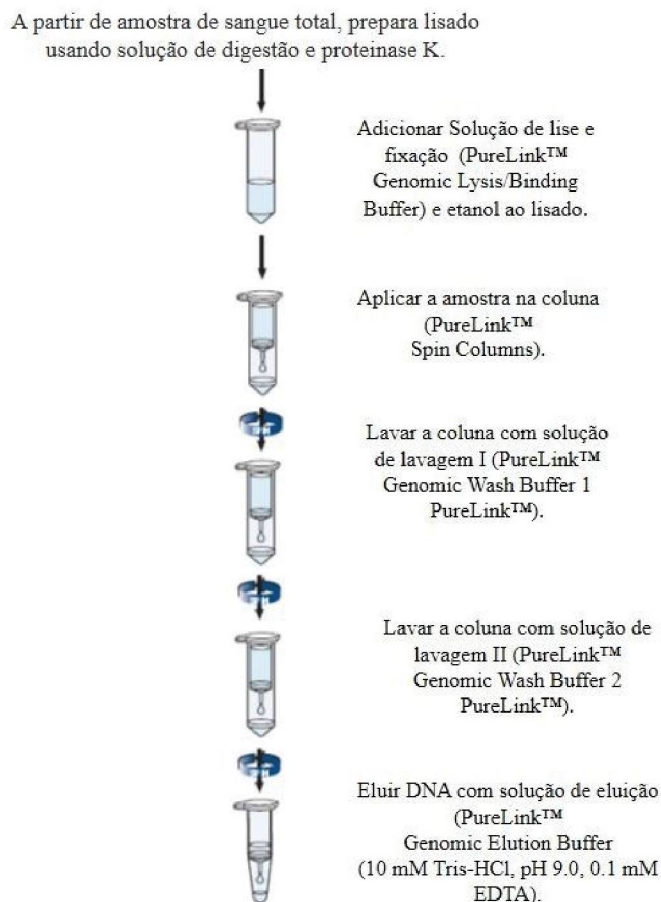
Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para este estudo foram cedidas amostras de sangue (n=27) coletadas de pacientes diagnosticados com cromoblastomicose no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias (CREDIP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pela pesquisadora Dr^a Conceição de Maria Pedrozo visando o suporte de dados para o desenvolvimento do Projeto de caracterização da resposta imune em pacientes portadores de cromoblastomicose no estado do Maranhão. O estudo foi submetido ao comitê de ética da UFMA, sendo aprovado pelo parecer: 1.276.342. Os pacientes que participam desta avaliação assinaram o termo de consentimento e as amostras foram enviadas à Universidade Federal do Paraná (UFPR).

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DO GENE *CARD9*

2.2.1. Extração

A partir das amostras de sangue total com anticoagulante (EDTA) foi realizado a extração de DNA genômico através da utilização do kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen) segundo instruções do fabricante (Figura 01), a verificação da qualidade da extração foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Spectrophotometer Thermo Scientific) e por eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen).

FIGURA 1 - EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT PURELINK GENOMIC DNA (INVITROGEN)



FONTE: Adaptado de Invitrogen (2016).

2.2.2. Desenho dos oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos iniciadores (*Primers* específicos) para o gene *CARD9* foram construídos a partir de sequência genética disponível na base de dados Ensembl (Ensembl number: ENSG00000187796), com o auxílio do programa SnapGene Viewer, seguindo os seguintes parâmetros: a) tamanho dos primers entre 18 e 24 pares de base; b) relação entre bases purinas e pirimidinas entre 40 e 60%, c) temperatura de anelamento de até 72°C (LORENZ, 2012).

Após a construção de possíveis conjuntos de primers, foi verificada a complementariedade inter e intramolecular utilizando a plataforma dos sites IDT (Integrated DNA Technologies - <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) e PCR Primer Stats (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) e avaliação da especificidade através do Primer BLAST – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para o Éxon 06 não foi possível obter um par específico, por isso desenhou-se um Primer Reverse

extra para obter-se especificidade no sequenciamento. As sequencias dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento, assim como, as condições específicas de anelamento estão utilizados foram sumarizadas na tabela 1.

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA DIFERENTES REGIÕES DO GENE CARD9

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento	Concentração de MgCl	Temperatura de anelamento	
Éxon 01	F - AGAAAGCAGGTCACCAGGGA	368pb	1,5	60°C	
	R - AAATGAACACATCTCCGCCCA				
Éxon 02	F - TCGTATCTGGGTGACATGGAT	987pb	1,5	55°C	
	R - CTCTCGAGGAAGGCCACGTA				
Éxon 03	F - CGCAGGGTACCTCATCCAA	690pb	2,0	56°C	
	R - GGTCGTAGTTCTCCTCCTTGC				
Éxon 04-05	F - ACACGGCACCATCTGACAC	739pb	2,0	55°C	
	R - AAGGGGGCAAAGGCAATG				
Éxon 06	F - GCAAGGAGGAGAACTACGAC	1273pb	2,5	67,5°C	
	R - ATCCTCTGACAACTGCCCTCA				792pb
	SEQ - ATCCTCTGACAACTGCCCTCA				
Éxon 07	F - TCTGGAAGTGCAGGGCTGGTA	374pb	1,5	60°C	
	R - ATCCTCTGACAACTGCCCTCA				
Éxon 08	F - AAGGGCAGCAGGGACAAGT	800pb	1,5	62°C	
	R - CCATCTTCCAGGTCGGAGCT				
Éxon 09-10	F - AGGGCACACGAGCAGTTCA	789pb	1,5	54°C	
	R - GTTGACACAGGCATTGCGGC				
Éxon 11	F - GAAAGCAGAGTCTACACTGGA	766pb	1,5	55°C	
	R - TGAGGGAACCCGTCCTTCT				
Éxon 12	F - AGAAGGACGGGTTCCCTCA	836pb	1,5	56°C	
	R - GCGGAAGCGGCGTTCTT				

FONTE: A autora (2018)

2.2.3 Reação de amplificação e sequenciamento

Após a extração de DNA e construção dos primers (Tabela 01), foi realizada a padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das regiões codificantes do gene *CARD9*.

A reação foi testada em diversas condições, utilizando as enzimas Taq DNA Polymerase recombinant (Invitrogen, EUA) e Taq Platinum (Invitrogen, EUA), observando amplificação somente com a enzima Taq Platinum. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 4,8 µL de água ultrapura esterilizada, 1,25 µL de tampão 1x, 1,25µL (1µM) de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 µL de dNTP (0,25mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase e 2 µL de amostra (20 ng/µL). A concentração de cloreto de magnésio variou para cada primer (Tabela 01). Realizou-se a PCR de cada primer no termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler programado com condição inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com temperatura de 94°C por 35 segundos, temperatura de anelamento variável (tabela 01) por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, fase de extensão a 72°C por 7 minutos e condição final de espera a 4°C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,6% e foram tratados com polietilenoglicol (PEG) para sua purificação.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando BigDye Terminator Cycle Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando as seguintes condições: 8µL de água ultrapura, 0,75µL de BigDye, 0,75µL de tampão de sequenciamento 5X, 0,5µL de iniciador e 2µL da reação de PCR amplificada. A reação ocorreu nas seguintes condições: 96°C por 2 minutos, 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 10 segundos, 62°C por 4 minutos. Os produtos de sequenciamento foram purificados com acetato de amônio e sequenciados no Sequenciador de DNA *ABI Prism 3700DNA Sequencer* (Perkin-Elmer, Norwalk, Foster City, CA, USA).

2.2.4. Análise das sequências e da mutação

A edição e análises das sequências obtidas foram realizadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999) e MEGA versão 7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2015). Em seguida realizou-se a comparação das sequências obtidas com a sequência do gene *CARD9* tipo selvagem (Ensemb number: ENSG00000187796) e as sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Com o auxílio do programa MAFFT

(MISAWA; MIYATA, 2002) foi realizado o alinhamento e a inspeção visual com auxílio do programa MEGA versão 7. A análise das sequências teve como objetivo observar a presença das mutações pontuais. Para cada éxon foram sequenciadas amostras de nove pacientes, com diferentes quadros clínicos, com o objetivo de rastrear mutações.

Para avaliar o potencial patogênico dos polimorfismos encontrados, foi utilizada a plataforma PolyPhen2 (ADZHUBEI et al., 2010). A plataforma prediz danos de mutações *missense*, a partir de dados obtidos em outras bases. O resultado é informado através de uma pontuação que varia de 0,0 a 1,0. o resultado entre 0,0 a 0,15 indica mutações preditas como benignas, entre 0,16 a 1,0 são possivelmente danosas e entre 0,85 e 1,0 são mais confiantes como danosas. Essa pontuação também é ilustrada pela plataforma em sistema de cores, onde o verde representa resultado predito como benigno e em vermelho como danoso (figura 2).

FIGURA 2 - ANÁLISE DE MUTAÇÃO NA PLATAFORMA POLYPHEN2



FONTE: PolyPhen2

2.3. LEVANTAMENTO DOS DADOS CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA DOS PACIENTES

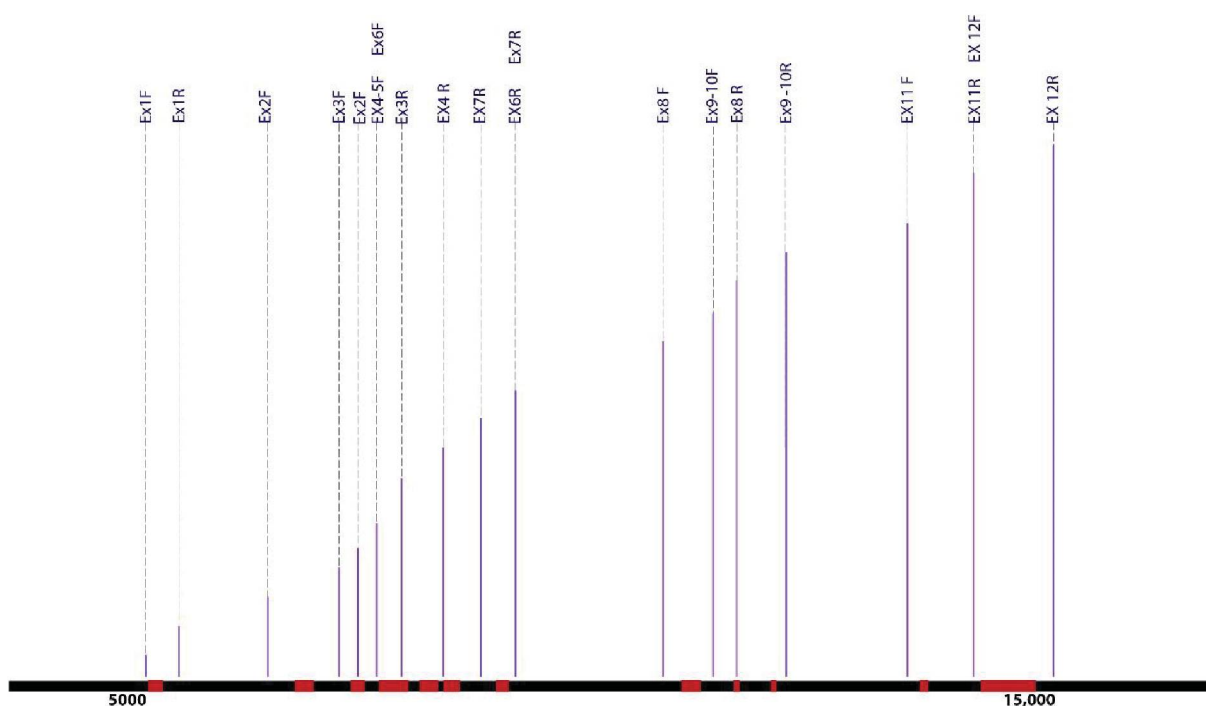
Os dados clínicos foram gentilmente cedido pela equipe do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. Para o levantamento dos dados clínicos adotou-se o critério de classificação de lesão descrito por Carrion (1950) e de gravidade do quadro levando em consideração número, extensão e disseminação das lesões como leve, moderada ou grave descrito por Queiroz Filho (1997).

Para a caracterização das respostas Th1/Th2/Th17 foram quantificadas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17, com o kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine, utilizando amostra de plasma. O kit baseia-se na captura dos analitos solúveis por anticorpos marcados, tornando possível a detecção de diferentes picos fluorescentes por citometria de fluxo. A dosagem de citocinas foi realizada antes do início do tratamento.

3. RESULTADOS

Um total de 10 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados para os éxons do gene *CARD9* a partir da inspeção visual no programa SnapGene Viwer. A Figura 03 representa o gene *CARD9* com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados em relação a cada éxon do gene.

FIGURA 3 - MAPA GENE *CARD9* CONTENDO OLIGOINUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS



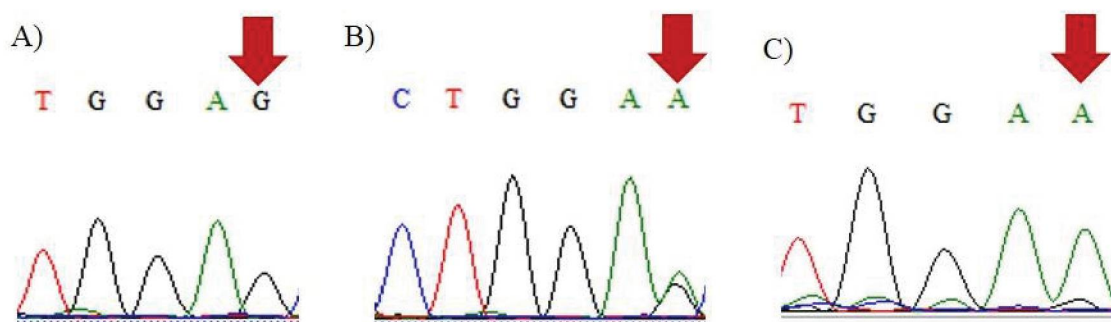
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Em preto gene *CARD9*, marcado em vermelho éxons do gene, linhas representam oligonucleotídeos iniciadores desenhados.

Para o estudo foram selecionadas um total de nove amostras (n=09) procedentes de pacientes com diferentes quadros clínicos considerando os grupos leve, grave e moderado (tabela 2). Realizou-se o sequenciamento de todos os éxons para esses pacientes, nos éxons que apresentaram mutações pontuais foi realizado o sequenciamento dos demais pacientes.

Dos 12 éxons presentes no gene *CARD9*, mudanças na sequência foram observadas apenas do éxon 2. De dezete pacientes sequenciados, em nove pacientes observou-se a troca do nucleotídeo guanina por uma adenina na posição 1638 do gene (figura 4), localizado no éxon 02. No paciente 24 (Tabela 2) foi observada mutação homozigota e heterozigota nos pacientes 05, 07, 09, 11, 14, 18, 25 e 26.

FIGURA 4 - SEQUENCIAMENTO DO ÉXON 02 DO GENE CARD9, INDICANDO REGIÃO DA MUTAÇÃO CARD9^{S12N}



FONTE: o autor (2018).

LEGENDA: Flecha em vermelho indica local da mutação CARD9^{S12N}, sendo que em A está representado a sequência do gene sem mutação; B –Paciente que apresentava a mutação heterozigota e em C –Paciente homozigoto.

A mutação encontrada no éxon 02, posição 1638 do gene e 201 do cDNA, se expressa por uma mudança *missense*, com substituição do aminoácido serina por aspargina na posição 12 da cadeia protéica. A referida mutação encontra-se depositada no NCBI com a referência rs4077515, sendo denominada de CARD9^{S12N}. Tal mutação tem sido encontrada com uma frequência de 16,7% na população caucasiana e de 9,7% na população Afro-americana. *In silico*, utilizando o *software* PolyPhen2, a mutação é prevista para ser benigna, com score de 0,002.

Dos 27 pacientes, 09 apresentavam a forma leve da doença, 09 a forma moderada e 09 a forma grave. Não foram detectadas as expressões de IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- γ . Porém o TNF- α foi detectado em dois pacientes com a forma leve, 5 pacientes com a forma moderada e 5 pacientes com a forma grave (figura - 5). IL-6 foi detectada em 26 amostras, os maiores valores foram encontrados em pacientes coma forma moderada e grave, pacientes com a forma leve apresentaram em sua maioria dosagem abaixo de 50ng/mL. Sete pacientes apresentaram doses detectáveis de IL-10, sendo dois com a forma leve, com pico abaixo de 1pg/mL, três pacientes com a forma moderada e picos de até 15pg/mL e dois pacientes com a forma grave, sendo um pico maior que 100 pg/mL.

TABELA 2 - DADOS IMUNOLÓGICOS DOS PACIENTES

ID Paciente	Lesão	Classificação	TNF- α	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	Mutação CARD9 ^{S12N}
03	Polimórfica	Grave	23,54	0	0	0	264,67	0,26	GG
04	Infiltrativa	Leve	0	0	0	0	1,73	0	GG
05	Infiltrativa	Moderada	0	0	0	0	0,98	0	GA
07	Vegetante	Moderada	1287,27	0	0	0	12605,71	13,11	GA
09	Placa Vegetante	Leve	2,11	0	0	0	26,58	0	GA
11	Infiltrativa	Moderada	33,17	0	0	0	711,76	0	GA
12	Vegetante	Moderada	0,05	0	0	0	99,58	0	GG
13	Polimórfica	Grave	1692,78	0,46	0	0	13652,52	189,88	GG
14	Polimórfica	Grave	0,69	0	0	0	4,9	0	GA
16	Placa infiltrativa	Leve	0	0	0	0	3,04	0	GG
18	*	Leve	0	0	0	0	32,48	0	GA
22	Vegetante, cicatricial	Leve	0	0	0	0	5,33	0	GG
23	Placa Vegetante	Moderada	5,7	0	0	0	83,72	0	GG
24	Polimórfica	Grave	0	0	0	0	0,79	0	AA
25	Placa infiltrativa e cicatricial	Moderada	0	0	0	0	3,47	0	GA
26	Polimórfica	Grave	0	0	0	0	67,01	0	GA
28	Vegetante, úlcera	Leve	0	0	0	0	5,33	0	GG
TOTAL n = 16		MUTAÇÃO: 8-GA; 7-GG; 1-AA							

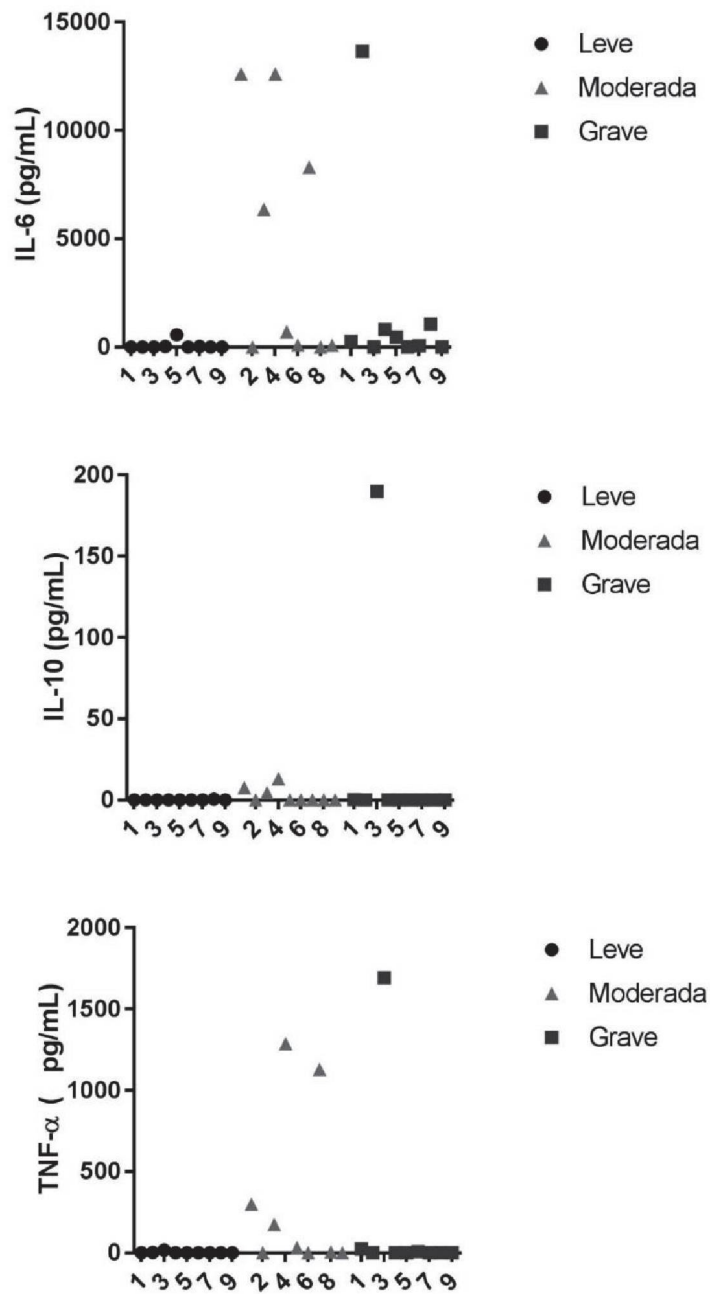
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: GG – mutação ausente; AA – Homozigoto; GA – Heterozigoto.

Pacientes com a forma leve da doença apresentaram baixa expressão de citocinas (figura 05). Pacientes com a forma moderada e grave expressaram principalmente TNF- α e IL-6, sendo maiores valores de TNF- α dosados em pacientes com a forma moderada, enquanto os com a forma grave apresentaram maiores proporções de IL-6.

Em relação aos pacientes com a mutação encontrada, na posição 1638 do gene, no éxon 02, não foi possível observar a relação entre gravidade do quadro, lesões apresentadas e/ou dosagem de citocinas, e a presença de mutações. Porém foi observada grande prevalência (53%) da mutação na população estudada.

FIGURA 5- NÍVEIS DE CITOCINAS DETECTADAS NOS PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE, SEGUNDO GRAU DE SEVERIDADE DA DOENÇA



FONTE: o autor (2018).

4. DISCUSSÃO

Ainda não são claros os mecanismos envolvidos na resposta imune na cromoblastomicose, mas sugere-se que a resposta imune pode refletir o quadro apresentado pelo paciente com cromoblastomicose (AVELAR-PIRES et al., 2013). Vários autores vêm demonstrando que a polarização da células T é de extrema importância para a severidade do quadro apresentado. A resposta Th1 tem sido apontada como a que corresponde ao melhor prognóstico em pacientes e também em camundongos, modelo em que há cura para cromoblastomicose (GIMENES et al., 2005; NÓBREGA et al., 2010; SOUSA; GHOSH; ALMEIDA, 2006; WANG et al., 2013)

Na literatura a presença de TNF- α tem sido associada à uma resposta imune mais eficiente em cromoblastomicose, assim como sua presença foi observada em período de maior regressão da lesão durante o tratamento (CRIADO; MARTINS; ROGE, 2006; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2007). Altos níveis de TNF- α também são observados em camundongos (WANG et al., 2013). No presente estudo os maiores níveis dessa citocina foram encontrados em pacientes com a forma moderada e grave, sendo detectados níveis baixos ou não detectados níveis de TNF- α na forma leve. O resultado aqui encontrado foi compatível com o demonstrado por Gimenes et al. (2005), em que níveis de TNF- α eram semelhantes em pacientes com a forma grave e leve da doença.

Nos pacientes desse estudo não foram observados níveis de IFN- γ , Gimenes et al. (2005) encontraram maiores níveis dessa citocina em pacientes com a forma leve da doença, sendo que as células T apresentavam perfil compatível com polarização para Th1. Avila; Pagliari; Seixas Duarte (2003) também observaram essa polarização em pacientes com melhores quadros, porém poucas células expressavam IFN- γ .

A polarização para Th2, caracterizada por maiores níveis de IL-10 são observados em casos mais severos (AVILA; PAGLIARI; SEIXAS DUARTE, 2003; GIMENES et al., 2005; SOUSA et al., 2011). Nos pacientes do presente estudos foram identificados poucos picos de IL-10, sendo os maiores identificados em casos moderados e graves.

As menores dosagens de citocina foram encontradas em pacientes com quadros leves e pacientes com forma moderada ou grave chegaram a apresentar picos muito elevados de mais de uma citocina. Siqueira et al. (2017) apontam que respostas imunes exacerbadas podem ser relacionadas à persistência de fungos no tecido hospedeiro, inoculação de corpos muriformes levou à maior expressão de IL-6 e TNF- α . Dado semelhante foi encontrado nos pacientes estudados, houve maior expressão dessas citocinas em pacientes com quadros moderados e

graves. Os maiores picos de IL-6 e TNF- α ocorreram em um único paciente, que apresentava a forma grave da doença.

Siqueira et al. (2017) também demonstraram papel de Th17 e supressão de Th1 em camundongos infectados com corpos muriformes. IL-6 havia sido detectado neste trabalho, assim como nos soro dos pacientes do presente estudo. Essa citocina foi a que foi identificada na maioria do pacientes, principalmente naqueles com quadros moderados e graves.

A expressão de IL-17 não foi observada em nenhum paciente. Avelar-Pires et al. (2013) descreveram que no tecido observa-se predominância de marcadores de IL-23, IL-17 e TGF- β em pacientes com cromoblastomicose. Apesar dessa predominância, os níveis expressos eram menores que em tecido de pacientes com paracoccidioidomicose e mesmo em tecido de pacientes sadios. Entretanto, Alves et al. (2014) demonstraram índices de IL-17 em amostras de pacientes com cromoblastomicose.

Wiithrich et al. (2015) demonstraram a presenças predominante de células Th1 e Th17 por estímulo *in vitro* e *in vivo* com *F. pedrosoi*, sendo essa resposta reduzida em células *CARD9*^{-/-}. Em estimulação de células dendríticas humanas com *F. monophora* observou-se a expressão de IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-12p40 mediados pelo reconhecimento de antígenos fúngicos por Dectina-1 e Mincle. Porém o receptor Mincle suprime a indução da expressão de IL-12p35 pela Dectina-1, através da remodelação do nucleossoma, gerando a polarização para Th2 (WEVERS et al., 2014).

Estudos vêm apontando cada vez mais a relação entre mutações no *CARD9* e deficiências na resposta imune a fungos (DRUMMOND; LIONAKIS, 2016). Porém, ainda não foi demonstrada a relação entre mutações em *CARD9* e quadros mais graves de cromoblastomicose. Em estudo sobre reconhecimento de *F. pedrosoi*, Sousa et al., (2011) foi demonstrado papel de CLRs e Knockout de *CARD9* gerou aumento da carga fúngica em camundongos.

Liang et al. (2015) demonstraram *in vitro*, que células com mutações em *CARD9* tiveram a atividade fungicida diminuída quando expostas a conídeos de *P. verrucosa* isolada de pacientes com feohifomicose. Em pacientes foi observada que mutações em *CARD9* estão associadas ao desenvolvimento de feohifomicose em infecções por *Phialophora verrucosa* (KAMEMURA et al., 2013) e por *Exophiala spp* (LANTERNIER et al., 2015a).

Em trabalho com células estimuladas com isolado de *P. verrucosa* paciente com feohifomicose, foi observado que células de pacientes com defeitos em *CARD9* apresentavam menor propriedade fungicida do que células de pacientes controles no controle de infecção por

conídios. Não foram observadas diferenças em estímulo com hifas. Na dosagem de citocinas IL-6, TNF- α e IL-8 pacientes apresentavam menores níveis que controles.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo foi encontrada mutação no éxon 02 do gene *CARD9*, a mutação já havia sido descrita na literatura, denominada de *CARD9*^{S12N}. Esta apresenta frequência de 16,7% na população caucasiana e de 9,7% na população Afro-americana e é predita como benigna pelo software PolyPhen2. Entretanto, autores apontam que serina e aspargina, os dois aminoácidos envolvidos na substituição, apresentam diferentes propriedades, como tamanho, hidrofobicidade e potencial de fosforilação, e isso influenciaria na função da proteína *CARD9* (ROSENTUL et al., 2011; XU et al., 2018).

Rosentul et al., (2011) buscaram relacionar essa mutação com quadros de infecção por *Candida spp.* Os autores não encontraram co-relações entre presença da mutação com pacientes infectados, com características clínicas específicas ou com dosagens *in vitro* ou *in vivo* de citocinas dosadas. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Rosentul et al. (2014) em estudo sobre candidíase vulvovaginal, que apontaram que a mutação *CARD9*^{S12N} apresentava prevalência semelhante em pacientes e no grupo controle. Porém em estudo de infecção em células e em camundongos *knockin CARD9*^{S12N} com *Aspergillus fumigatus*, Xu et al. (2018) observaram que a mutação em *CARD9* induz resposta Th2 em macrófagos broncoalveolares. Em camundongos com a mutação foi observado aumento de IL-4, IL-5 e IgE, diminuição de citocinas Th1 (IL-12p40 e IFN- γ) e níveis semelhantes de citocinas Th17. No presente estudo não foram detectados níveis de IL-4 nos pacientes e IL-5 e IgE não foram dosados.

A alta presença da mutação em pacientes com cromblastomicose pode ser indício de sua relação com quadros de cromblastomicose. Mas não foi possível estabelecer com os dados até o momento obtidos uma correlação entre a gravidade do quadro e a presença da mutação.

REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.
- ALVES, A. et al. In Situ Immune Response in Human Chromoblastomycosis – A Possible Role for Regulatory and Th17 T Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. 14–16, 2014.
- ALVES DE MEDEIROS, A. K. et al. Chronic and Invasive Fungal Infections in a Family with CARD9 Deficiency. **Journal of Clinical Immunology**, v. 36, n. 3, p. 204–209, 2016.
- ARAIZA, J. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine : Experience with four cases. n. May 2004, p. 47–51, 2005.
- AVELAR-PIRES, C. et al. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the brazilian amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 302–306, 2013.
- AVILA, S. C. G. P. D'; PAGLIARI, C.; SEIXAS DUARTE, M. I. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia**, v. 156, n. 2, p. 51–60, 2003.
- AZEVEDO, C. M. P. S. et al. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1500–1504, 2015.
- BERTIN, J. et al. CARD9 Is a Novel Caspase Recruitment Domain-containing Protein That Interacts With BCL10 / CLAP and Activates NF- κ B *. v. 275, n. 52, p. 41082–41086, 2000.
- BI, L. et al. CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B α kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 34, p. 25969–25977, 2010.
- BISHU, S. et al. The adaptor CARD9 is required for adaptive but not innate immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1173–1180, 2014.
- BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M. S.; EDUARDO, C. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis : a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**, v. 161, p. 195–203, 2006.
- CALIGIORNE, R. B. et al. Internal Transcribed Spacer rRNA Gene-Based Phylogenetic Reconstruction Using Algorithms with Local and Global Sequence Alignment for Black Yeasts and Their Relatives. v. 43, n. 6, p. 2816–2823, 2005.
- CETINKAYA, P. G. et al. A young girl with severe cerebral fungal infection due to card 9 deficiency. **Clinical Immunology**, v. 191, n. 2017, p. 21–26, 2018.
- CRIADO, P. R.; MARTINS, E. C.; ROGE, S. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, p. 97–101, 2006.
- DA SILVA, J. P. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 104–111, 2007.
- DE HOOG, G. S. Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in

unexplored habitats. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 1–2, 2014.

DE SOUSA, M. D. G. T. et al. Topical application of imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1734–1737, 2014.

DENG, S. et al. Combination of amphotericin B and terbinafine against melanized fungi associated with chromoblastomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. March, p. AAC.00270-18, 2018.

DREWNIAK, A. et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2385–2392, 2013.

DRUMMOND, R. A. et al. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 276–281, 2011.

DRUMMOND, R. A. et al. CARD9-Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. **PLoS Pathogens**, 2015.

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 392–399, 2011.

DRUMMOND, R. A.; LIONAKIS, M. S. Mechanistic Insights into the Role of C-Type Lectin Receptor / CARD9 Signaling in Human Antifungal Immunity. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, n. April, 2016.

E SILVA AZEVEDO, C. D. M. P. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 341–344, 2008.

ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. **Cytokine**, v. 6, n. 1, p. 247–253, 2012.

FORNARI, G. et al. A Model for Trans-Kingdom Pathogenicity in *Fonsecaea* Agents of Human Chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–11, 2018.

GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: Advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 559–563, 2009.

GAVINO, C. et al. CARD9 deficiency and spontaneous central nervous system candidiasis: Complete clinical remission with GM-CSF therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 1, p. 81–84, 2014.

GIMENES, V. M. F. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 7, n. 4, p. 708–13, 2005.

GLOCKER, E.-O. et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Family with Susceptibility to Fungal Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1727–1735, 2009.

GOMES, R. R. et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. p. 1–20, 2016.

GROSS, O. et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. August, p. 651–656, 2006.

GRUMACH, A. S. et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Brazilian Patient with Deep Dermatophytosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, p. 486–490, 2015.

HAYAKAWA, M. et al. Phagocytosis , Production of Nitric Oxide and Pro-

inflammatory Cytokines by Macrophages in the Presence of Dematiaceus Fungi that Causes Chromoblastomycosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, p. 382–387, 2006.

INVITROGEN. PureLink Genomic DNA Kits. **User Manual**, n. February, p. 1–18, 2016.

JACHIET, M. et al. Posaconazole treatment of extensive skin and nail dermatophytosis due to autosomal recessive deficiency of CARD9. **JAMA dermatology**, v. 151, n. 2, p. 192–4, 2015.

KAMEMURA, N. et al. CARD9 mutations linked to subcutaneous phaeohyphomycosis and TH17 cell deficiencies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, 2013.

KINGETER, L. M.; LIN, X. C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. **Cellular & molecular immunology**, v. 9, n. 2, p. 105–12, 2012.

LANTERNIER, F. et al. Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. **N Engl J Med.**, v. 369, n. 18, p. 1704–1714, 2014.

LANTERNIER, F. et al. Inherited CARD9 deficiency in 2 unrelated patients with invasive exophiala infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 8, p. 1241–1250, 2015a.

LANTERNIER, F. et al. Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1558–1568e2, 2015b.

LEEYAPHAN, C. et al. Immune response in human chromoblastomycosis and eumycetoma – focusing on human interleukin-17A, interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and human beta-defensin-2. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 751–756, 2016.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 08, p. 630–638, 2007.

LIANG, P. et al. CARD9 Deficiencies Linked to Impaired Neutrophil Functions Against *Phialophora verrucosa*. **Mycopathologia**, v. 179, n. 5–6, p. 347–357, 2015.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 1–14, 2012.

LU, S. et al. Chromoblastomycosis in Mainland China: A Systematic Review on Clinical Characteristics. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 489–495, 2013.

MACHADO, A. P.; REGIS SILVA, M. R.; FISCHMAN, O. Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. **Mycoses**, v. 54, n. 3, p. 202–211, 2011.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–311, 2006.

MINOTTO, R. et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 585–592, 2001.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Molecular epidemiology of *fonsecaea* species. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 464–469, 2011.

NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339–346, 2005.

NÓBREGA, Y. K. DE M. et al. The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates production of different profiles of cytokines and nitric oxide by Murine peritoneal cells in vitro. **Mycopathologia**, v. 170, n. 2, p. 89–98, 2010.

PAMPS, T. et al. CARD9 Signaling in the Innate Immune Response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 44, p. 35–44, 2008.

PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M. et al. Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe: First confirmed case and review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 391–398, 2014.

PURIM, K. S. M. et al. Chromoblastomycosis: Tissue modifications during itraconazole treatment. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 4, p. 478–483, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. DE et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017a.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a Neglected Tropical Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 46–50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017b.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. DE C. L. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, 2013.

QUEIROZ FILHO, F. A Cromoblastomicose no Estado do Paraná: Etiologia, Epidemiologia, Clínica e Terapêutica com itaconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 345–346, 1997.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis in Madagascar: Epidemiology, molecular diagnostic and perspectives. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 99–100, 2015.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 3, p. 312–324, 2017.

RIBEIRO, E. L. et al. Chromoblastomycosis : present disease in brazilian population reality. **Rev Bras Anal Clin**, v. 38, n. 3, p. 189–192, 2006.

ROSENTUL, D. C. et al. Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1138–1145, 2011.

ROSENTUL, D. C. et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

ROTH, S.; RULAND, J. Caspase recruitment domain-containing protein 9 signaling in innate immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 243–250, 2013.

RUIJUN, Z. et al. CARD9 mutations and related immunological research of one case with disseminated phaeohyphomycosis. **Journal of Microbes and Infections**, v. 12, n. 1, p.

14–23, 2017.

SALGADO, C. G. et al. ISOLATION OF *Fonsecaea pedrosoi* FROM THORNS OF *Mimosa pudica*, A PROBABLE NATURAL SOURCE OF CHROMOBLASTOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33–36, 2004.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black yeasts and their filamentous relatives: Principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527–542, 2014.

SILVA, J. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171–175, 1998.

SIQUEIRA, I. M. et al. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–23, 2017.

SMEEKENS, S. P. et al. Genetic susceptibility to *Candida* infections species. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 805–813, 2013.

SOTTO, M. N. et al. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 31, n. 1, p. 14–18, 2004.

SOUSA, M. D. G.; GHOSN, E. E. B.; ALMEIDA, S. R. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 6, p. 595–600, 2006.

SOUSA, M. DA G. et al. Short Article Restoration of Pattern Recognition Receptor Costimulation to Treat Chromoblastomycosis, a Chronic Fungal Infection of the Skin. **Cell Host and Microbe**, v. 9, p. 436–443, 2011.

SOUSA, M. G. et al. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4+ T cell activation in vitro. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 117–125, 2009.

SOUSA, M. G. T. et al. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 3, p. 864–70, 2008.

TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 2017.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403–408, 2012.

UNGPAKORN, R.; REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. n. September 2005, p. 245–247, 2006.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: An overview. **BMB Reports**, v. 42, n. 12, p. 776–787, 2009.

VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G. T-cell subsets and antifungal host defenses. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 238–243, 2010.

VICENTE, V. A. et al. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 47–51, 2001.

VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2013.

WANG, H. et al. Cytokine Profile of a Self-Healing *Fonsecaea pedrosoi* Infection in Murine Model. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 2, p. 599–605, 2013.

WANG, X. et al. Impaired Specific Antifungal Immunity in CARD9-Deficient Patients with Phaeohyphomycosis. **Journal of Investigative Dermatology**, n. November, p. 1–11, 2017.

WEAVER, C. T. et al. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. 2007.

WEVERS, B. A. et al. Fungal engagement of the C-type lectin mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 4, p. 494–505, 2014.

WIITHRICH, M. et al. *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 2542–2552, 2015.

WU, W. et al. Impairment of Immune Response against Dematiaceous Fungi in Card9 Knockout Mice. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9–10, p. 631–642, 2016.

XU, X. et al. CARD9S12N facilitates the production of IL-5 by alveolar macrophages for the induction of type 2 immune responses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 6, p. 547–560, 2018.

YAN, X. X. et al. CARD9 mutation linked to *Corynespora cassiicola* infection in a Chinese patient. **British Journal of Dermatology**, 2016.

ZHANG, J. et al. Melanin in a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* Inhibits the Production of Nitric Oxide and Th1 Cytokines of Murine Macrophages. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 515–522, 2013.

ZHONG, X. et al. Molecular and physiological roles of the adaptor protein CARD9 in immunity review-article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.

CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

No presente estudo, foram construídos oligonucleotídeos para amplificação de todos éxons do gene *CARD9* com a identificação mutação somente no Éxon 02, não sendo encontradas para os pacientes portadores de cromoblastomicose selecionados para este estudo (n= 27) as demais mutações descritas na literatura.

A mutação encontrada nesse estudo corresponde a troca do nucleotídeo guanina por uma adenina na posição 1.638 do gene e 201 do cDNA. Essa se traduz na troca do aminoácido serina por uma aspargina na posição 12 da cadeia proteica. Já identificada como *CARD9*^{S12N} na literatura, a mutação apresenta maior presença na população estudada em relação a população sadia já descrita na literatura. Mas é prevista como benigna por software que prediz impacto de mudanças de aminoácidos. Não foi observada associação entre polarização da resposta imune, tipo de lesão ou gravidade do quadro apresentado pelos pacientes e a presença da mutação. Não sendo possível a partir destes dados relacionar a presença da mutação com deficiência da resposta celular em pacientes com cromoblastomicose. O presente estudo contou com um pequeno número de pacientes, mas entre estes há alta presença da mutação, sendo maior que em outras populações estudadas, podendo ser indício de sua relação com quadros de cromoblastomicose

O trabalho requer continuidade para identificação da mutação nos demais pacientes. Ampliando o estudo em região endêmica de cromoblastomicose englobando um maior número de pacientes, incluindo a população sadia, afim de observar distribuição do genótipo nessa população e correlacionar relação da presença da mutação com quadros de cromoblastomicose. Estudos futuros devem englobar modelos *in vitro* e *in vivo* para a determinação do impacto da mutação em hospedeiros com cromoblastomicose.

REFERÊNCIAS GERAIS

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.

ALVES, A. et al. In Situ Immune Response in Human Chromoblastomycosis – A Possible Role for Regulatory and Th17 T Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. 14–16, 2014.

ALVES DE MEDEIROS, A. K. et al. Chronic and Invasive Fungal Infections in a Family with CARD9 Deficiency. **Journal of Clinical Immunology**, v. 36, n. 3, p. 204–209, 2016.

ARAIZA, J. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine : Experience with four cases. n. May 2004, p. 47–51, 2005.

AVELAR-PIRES, C. et al. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the brazilian amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 4, p. 302–306, 2013.

AVILA, S. C. G. P. D'; PAGLIARI, C.; SEIXAS DUARTE, M. I. The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of Chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia**, v. 156, n. 2, p. 51–60, 2003.

AZEVEDO, C. M. P. S. et al. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1500–1504, 2015.

BERTIN, J. et al. CARD9 Is a Novel Caspase Recruitment Domain-containing Protein That Interacts With BCL10 / CLAP and Activates NF- κ B *. v. 275, n. 52, p. 41082–41086, 2000.

BI, L. et al. CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B α kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 34, p. 25969–25977, 2010.

BISHU, S. et al. The adaptor CARD9 is required for adaptive but not innate immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1173–1180, 2014.

BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M. S.; EDUARDO, C. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis : a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**, v. 161, p. 195–203, 2006.

CALIGIORNE, R. B. et al. Internal Transcribed Spacer rRNA Gene-Based Phylogenetic Reconstruction Using Algorithms with Local and Global Sequence Alignment for Black Yeasts and Their Relatives. v. 43, n. 6, p. 2816–2823, 2005.

CETINKAYA, P. G. et al. A young girl with severe cerebral fungal infection due to card 9 deficiency. **Clinical Immunology**, v. 191, n. 2017, p. 21–26, 2018.

CRIADO, P. R.; MARTINS, E. C.; ROGE, S. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, p. 97–101, 2006.

DA SILVA, J. P. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 104–111, 2007.

DE HOOG, G. S. Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in unexplored habitats. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 1–2, 2014.

DE SOUSA, M. D. G. T. et al. Topical application of imiquimod as a treatment for chromoblastomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1734–1737, 2014.

DENG, S. et al. Combination of amphotericin B and terbinafine against melanized fungi associated with chromoblastomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. March, p. AAC.00270-18, 2018.

DREWNIK, A. et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in

human CARD9 deficiency. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2385–2392, 2013.

DRUMMOND, R. A. et al. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 276–281, 2011.

DRUMMOND, R. A. et al. CARD9-Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. **PLoS Pathogens**, 2015.

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 392–399, 2011.

DRUMMOND, R. A.; LIONAKIS, M. S. Mechanistic Insights into the Role of C-Type Lectin Receptor / CARD9 Signaling in Human Antifungal Immunity. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, n. April, 2016.

E SILVA AZEVEDO, C. D. M. P. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 341–344, 2008.

ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. **Cytokine**, v. 6, n. 1, p. 247–253, 2012.

FORNARI, G. et al. A Model for Trans-Kingdom Pathogenicity in *Fonsecaea* Agents of Human Chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–11, 2018.

GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: Advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 559–563, 2009.

GAVINO, C. et al. CARD9 deficiency and spontaneous central nervous system candidiasis: Complete clinical remission with GM-CSF therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 1, p. 81–84, 2014.

GIMENES, V. M. F. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 7, n. 4, p. 708–13, 2005.

GLOCKER, E.-O. et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Family with Susceptibility to Fungal Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1727–1735, 2009.

GOMES, R. R. et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. p. 1–20, 2016.

GROSS, O. et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. August, p. 651–656, 2006.

GRUMACH, A. S. et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Brazilian Patient with Deep Dermatophytosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, p. 486–490, 2015.

HAYAKAWA, M. et al. Phagocytosis, Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines by Macrophages in the Presence of Dematiaceous Fungi that Causes Chromoblastomycosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, p. 382–387, 2006.

INVITROGEN. PureLink Genomic DNA Kits. **User Manual**, n. February, p. 1–18, 2016.

JACHIET, M. et al. Posaconazole treatment of extensive skin and nail dermatophytosis due to autosomal recessive deficiency of CARD9. **JAMA dermatology**, v. 151, n. 2, p. 192–4, 2015.

KAMEMURA, N. et al. CARD9 mutations linked to subcutaneous phaeohyphomycosis and TH17 cell deficiencies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 3, 2013.

KINGETER, L. M.; LIN, X. C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. **Cellular & molecular immunology**, v. 9, n. 2, p. 105–12, 2012.

LANTERNIER, F. et al. Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. **N Engl J Med.**, v. 369, n. 18, p. 1704–1714, 2014.

LANTERNIER, F. et al. Inherited CARD9 deficiency in 2 unrelated patients with

invasive exophiala infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 8, p. 1241–1250, 2015a.

LANTERNIER, F. et al. Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1558–1568e2, 2015b.

LEEYAPHAN, C. et al. Immune response in human chromoblastomycosis and eumycetoma – focusing on human interleukin-17A, interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and human beta-defensin-2. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 751–756, 2016.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Syk-and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 08, p. 630–638, 2007.

LIANG, P. et al. CARD9 Deficiencies Linked to Impaired Neutrophil Functions Against *Phialophora verrucosa*. **Mycopathologia**, v. 179, n. 5–6, p. 347–357, 2015.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 1–14, 2012.

LU, S. et al. Chromoblastomycosis in Mainland China: A Systematic Review on Clinical Characteristics. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 489–495, 2013.

MACHADO, A. P.; REGIS SILVA, M. R.; FISCHMAN, O. Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. **Mycoses**, v. 54, n. 3, p. 202–211, 2011.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–311, 2006.

MINOTTO, R. et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 585–592, 2001.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 464–469, 2011.

NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339–346, 2005.

NÓBREGA, Y. K. DE M. et al. The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates production of different profiles of cytokines and nitric oxide by Murine peritoneal cells in vitro. **Mycopathologia**, v. 170, n. 2, p. 89–98, 2010.

PAMPS, T. et al. CARD9 Signaling in the Innate Immune Response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 44, p. 35–44, 2008.

PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M. et al. Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe: First confirmed case and review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 391–398, 2014.

PURIM, K. S. M. et al. Chromoblastomycosis: Tissue modifications during itraconazole treatment. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 4, p. 478–483, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. DE et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017a.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a Neglected Tropical Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 46–50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017b.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. DE C. L. Challenges in the Therapy of

Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, 2013.

QUEIROZ FILHO, F. A. Cromoblastomicose no Estado do Paraná: Etiologia, Epidemiologia, Clínica e Terapêutica com itaconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 345–346, 1997.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis in Madagascar: Epidemiology, molecular diagnostic and perspectives. **Mycoses**, v. 58, n. 2, p. 99–100, 2015.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 3, p. 312–324, 2017.

RIBEIRO, E. L. et al. Chromoblastomycosis : present disease in brazilian population reality. **Rev Bras Anal Clin**, v. 38, n. 3, p. 189–192, 2006.

ROSENTUL, D. C. et al. Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1138–1145, 2011.

ROSENTUL, D. C. et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

ROTH, S.; RULAND, J. Caspase recruitment domain-containing protein 9 signaling in innate immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 243–250, 2013.

RUIJUN, Z. et al. CARD9 mutations and related immunological research of one case with disseminated phaeohyphomycosis. **Journal of Microbes and Infections**, v. 12, n. 1, p. 14–23, 2017.

SALGADO, C. G. et al. ISOLATION OF *Fonsecaea pedrosoi* FROM THORNS OF *Mimosa pudica* , A PROBABLE NATURAL SOURCE OF CHROMOBLASTOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33–36, 2004.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black yeasts and their filamentous relatives: Principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527–542, 2014.

SILVA, J. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171–175, 1998.

SIQUEIRA, I. M. et al. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–23, 2017.

SMEEKENS, S. P. et al. Genetic susceptibility to *Candida* infections species. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 805–813, 2013.

SOTTO, M. N. et al. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 31, n. 1, p. 14–18, 2004.

SOUSA, M. D. G.; GHOSN, E. E. B.; ALMEIDA, S. R. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 6, p. 595–600, 2006.

SOUSA, M. DA G. et al. Short Article Restoration of Pattern Recognition Receptor Costimulation to Treat Chromoblastomycosis , a Chronic Fungal Infection of the Skin. **Cell Host and Microbe**, v. 9, p. 436–443, 2011.

SOUSA, M. G. et al. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4+ T cell activation in vitro. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 117–125, 2009.

SOUSA, M. G. T. et al. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 3, p. 864–70, 2008.

- TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 2017.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403–408, 2012.
- UNGPAKORN, R.; REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. n. September 2005, p. 245–247, 2006.
- VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: An overview. **BMB Reports**, v. 42, n. 12, p. 776–787, 2009.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G. T-cell subsets and antifungal host defenses. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 238–243, 2010.
- VICENTE, V. A. et al. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 47–51, 2001.
- VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.
- VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2013.
- WANG, H. et al. Cytokine Profile of a Self-Healing *Fonsecaea pedrosoi* Infection in Murine Model. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 2, p. 599–605, 2013.
- WANG, X. et al. Impaired Specific Antifungal Immunity in CARD9-Deficient Patients with Phaeohiphomycosis. **Journal of Investigative Dermatology**, n. November, p. 1–11, 2017.
- WEAVER, C. T. et al. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. 2007.
- WEVERS, B. A. et al. Fungal engagement of the C-type lectin mIncle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 4, p. 494–505, 2014.
- WIITHRICH, M. et al. *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by MIncle recognition. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 2542–2552, 2015.
- WU, W. et al. Impairment of Immune Response against Dematiaceous Fungi in Card9 Knockout Mice. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9–10, p. 631–642, 2016.
- XU, X. et al. CARD9S12N facilitates the production of IL-5 by alveolar macrophages for the induction of type 2 immune responses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 6, p. 547–560, 2018.
- YAN, X. X. et al. CARD9 mutation linked to *Corynespora cassicola* infection in a Chinese patient. **British Journal of Dermatology**, 2016.
- ZHANG, J. et al. Melanin in a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* Inhibits the Production of Nitric Oxide and Th1 Cytokines of Murine Macrophages. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 515–522, 2013.
- ZHONG, X. et al. Molecular and physiological roles of the adaptor protein CARD9 in immunity review-article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.