

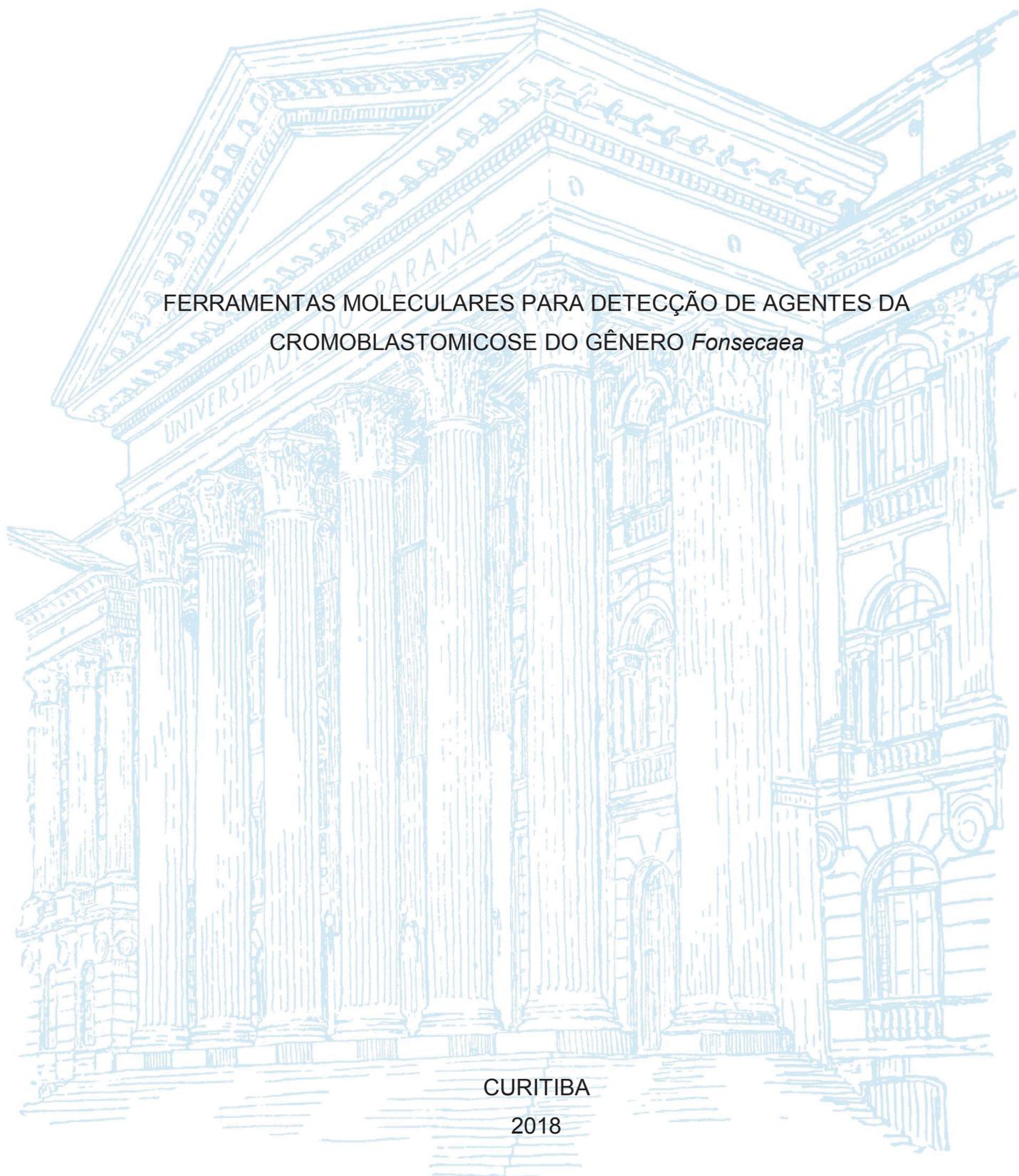
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA XAVIER SCHNEIDER

FERRAMENTAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE AGENTES DA  
CROMOBLASTOMICOSE DO GÊNERO *Fonsecaea*

CURITIBA

2018



GABRIELA XAVIER SCHNEIDER

FERRAMENTAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE AGENTES DA  
CROMOBLASTOMICOSE DO GÊNERO *Fonsecaea*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vânia Aparecida Vicente

Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a). Renata Rodrigues Gomes

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Schneider, Gabriela Xavier  
Ferramentas moleculares para detecção de agentes da  
cromoblastomicose do gênero *Fonsecaea*. / Gabriela Xavier Schneider. –  
Curitiba, 2018.

65 p.: il.

DOI:10.1007/s11046-019-00359-2

Orientadora: Vânia 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. Oligonucleotídeos 3. Diagnóstico molecular  
I. Título II. Vicente, Vânia 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.) 574.2326



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

**“Ferramentas moleculares para a detecção de agentes da cromoblastomicose do gênero *Fonsecaea*”**

por

**Gabriela Xavier Schneider**

**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. Vanessa Merlo Kava**

  
**Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen**

**Curitiba, 23 de outubro de 2018.**

À toda a minha família.  
Aos verdadeiros amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e a todos aqueles que me acompanham, por sempre estar a frente de todos os caminhos que trilhei, e que ainda irei trilhar, iluminando-os e me direcionando sempre para as melhores escolhas;

Aos meus pais, Tânia Mara e Oriel, gratidão pelo amor incondicional, pela educação, pela disposição e por ser o meu apoio, psicológico e emocional, me incentivando positivamente a cada novo desafio e/ou meta estabelecida;

Ao meu noivo, Vitor Hugo, por sempre estar ao meu lado e pacientemente me acompanhar durante todas as aventuras e desventuras da rotina acadêmica, buscando ser meu alicerce para todas as situações, pois não importando o momento, sempre me fez sorrir;

Aos meus tios, Carlos Eduardo e Cláudia, e aos meus primos, Beatryz, Gabriel e Thiago, gratidão por me acolherem em sua casa, me permitirem fazer parte de suas vidas e compartilhando momentos de convivência únicos, sendo sempre grandes girassóis em minha vida;

A toda a minha família, tios, tias, primos, primas e avó que me manteve em suas orações,

A minha melhor amiga Kassiely, gratidão pela amizade verdadeira, cuidado, companheirismo, paciência, sendo muito importante para mim e na minha vida, não apenas no período de antes e no de agora, mas para todo o sempre, pois quando se trata de amizade deve-se dar maior importância a qualidade daqueles que nos acompanham;

Aos meus queridos amigos de Paranaguá, Michelle, Fernando, Neide, Beatriz, Clodoaldo e André, gratidão por me acolherem como parte de suas famílias e estarem presentes em momentos muito especiais da minha vida, me estimulando a ser, ver, sentir, pensar e almejar sempre o melhor para o próximo, e acima de tudo, para mim;

A Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente, pela orientação, oportunidade, incentivo nesse período;

A Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes pelo enorme carinho, atenção, cuidado, amizade durante a realização deste trabalho, além da orientação, colaboração e apoio científico dedicado;

Aos amigos do LabMicro, pela amizade, companheirismo, auxílio nos experimentos e momentos de lazer.

Aos professores, a Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela formação e conhecimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Com toda certeza sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de conviver com vocês em uma das etapas da minha caminhada. Muito obrigada.

*“Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte e nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos”.*

*Carlos Drummond de Andrade*

## RESUMO

Leveduras negras pertencentes à ordem Chaetothyriales, família Herpotrichiellaceae, abrangem diversas espécies associadas a colonização de hospedeiros humanos e animais, tal como relatado nos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Capronia*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinocladiella*, *Veronea* e *Cyphellophora*, sendo que entre as principais micoses causadas por este grupo destacam-se a cromoblastomicose e a feoifomicose. Nesta família existem espécies proximamente relacionadas com características morfológicas muito semelhantes, assumidas como espécies crípticas com ecologia diferente, reunindo desde sapróbias a patógenas. Diante disto, o presente trabalho objetivou desenvolver novos métodos moleculares capazes de identificar ferramentas para diferenciação e detecção de espécies crípticas, agentes causais de cromoblastomicose, uma micose de implantação, com forte ligação ambiental, causada por várias espécies de leveduras negras. Logo, a utilização de técnicas moleculares com maior sensibilidade, especificidade e eficácia, como o uso de sondas cadeado aliado à técnica de amplificação em círculo rolante (RCA), pode influenciar intrinsecamente no diagnóstico, em estudos de virulência e epidemiologia molecular, assim como no entendimento de vias de infecção, levando a identificação da espécie mesmo sem estudos de sequenciamento genômico. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenhar oligonucleotídeos espécie específicos para as espécies de *Fonsecaea* patogênicas como *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pedrosoi* e *F. pugnacius* e a sonda cadeado baseada na amplificação de círculo rolante (RCA), para a espécie *F. pugnacius*. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para as espécies *F. pedrosoi* (FOPE), *F. monophora* (FOMO), *F. nubica* (FONU) e *F. pugnacius* (FOPU), utilizando como molde a região do gene CBF5 (centromere/microtubule-binding protein *cbf5*) e a sonda RCA cadeado para *F. pugnacius* (FPgP) utilizando como molde a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr, com 94pb. Estas ferramentas demonstraram especificidade quanto as espécies de *Fonsecaea* em ensaios *in silico* e *in vitro*, comparando espécies de origem clínica ou ambiental (*F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pugnacius*, *F. erecta* e *F. brasiliensis*), além das demais espécies associadas à cromoblastomicose como *Cladophialophora carrioni*, *C. samoensis*, *E. dermatitidis*, *P. verrucosa*, *R. aquaspersa*, *R. tropicalis* e *Cyphellophora ludoviensis*.

Palavras-chave: Cromoblastomicose. Detecção molecular. Oligonucleotídeos espécie-específico. Sonda cadeado RCA. *Fonsecaea pugnacius*.

## ABSTRACT

The black yeasts from the Herpotrichiellaceae family of the Chaetothyriales order belong to several genus such as *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Capronia*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella*, *Veronea* and *Cyphellophora* with related species associated to infection in human and animal hosts; as for instance the casual agents of Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. In the Herpotrichiellaceae family there are from saprobes to pathogens strains described as closely related species very similar in morphology but different in ecology. In this context, there is a necessity to develop new molecular methods capable to species discrimination and environmental and biological samples detection, especially for the causative agents of chromoblastomycosis, an implantation mycosis, with an important environmental link. Given that, the use of molecular techniques with high sensitivity, specificity and efficacy, such as the use of padlock probes associated to rolling circle amplification technique (RCA), represent a potential effective tool for diagnosis, virulence and molecular epidemiology studies. Likewise it could be useful for infection routes elucidation and species identification even without genomic sequencing. Therefore, this work aimed to design molecular markers species-specific for *Fonsecaea* pathogenic species as *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pedrosoi* and *F. pugnacius* and develop a padlock probe RCA for *F. pugnacius*. Species-specific primers were designed for *F. pedrosoi* (FOPE), *F. monophora* (FOMO), *F. nubica* (FONU) and *F. pugnacius* (FOPU) using CBF5 gene (centromere microtubule-binding protein *cbf5*) and the RCA padlock probe (FPgP), for *F. pugnacius* using region ITS1-5.8S-ITS2 of rDNA as template, with 94pb. These tools demonstrated specificity for *Fonsecaea* sibling species in the in silico and in vitro assays using the clinical and environmental species: *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pugnacius*, *F. erecta* and *F. brasiliensis* in comparison to other associated with chromoblastomycosis such as *C. carrioni*, *C. samoensis*, *E. dermatitidis*, *P. verrucosa*, *R. aquaspersa*, *R. tropicalis* and *Cyphellophora ludoviensis*.

Keywords: Chromoblastomycosis. Molecular detection. Species-specific primers. RCA padlock probe. *Fonsecaea pugnacius*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FILOGENIA DE ESPÉCIES REPRESENTATIVAS DA ORDEM Chaetothyriales. ....	20
FIGURA 2 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LEVEDURAS NEGRAS DA FAMÍLIA Herpotrichiellaceae.....	21
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CROMOBLASTOMICOSE. ....	23
FIGURA 4 – DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA CROMOBLASTOMICOSE, PRESENÇA DE CÉLULAS MURIFORMES. ....	24
FIGURA 5 – TIPOS DE LESÕES EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE .....	25
FIGURA 6 – ESPÉCIES CRÍPTICAS DO GÊNERO <i>Fonsecaea</i> . ....	27
FIGURA 7 – POPULAÇÃO COMUMENTE INFECTADA POR FUNGOS MELANIZADOS AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE. ....	29
FIGURA 8 – ESQUEMA DE SONDA CADEADO COM AMPLIFICAÇÃO EM CÍRCULO ROLANTE. ....	34
FIGURA 9 – REAÇÃO DE PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA NAS ESPÉCIES DE <i>Fonsecaea</i> AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE .....	42
FIGURA 10 – ENSAIO DE SENSIBILIDADE PARA AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPÉCIE-ESPECÍFICO em <i>Fonsecaea</i> spp. .....	43
FIGURA 11 – SONDA CADEADO COM INICIADORES RCA PARA A ESPÉCIE <i>Fonsecaea pugnacius</i> . ....	45
FIGURA 12 – PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO DA SONDA CADEADO FPgP POR RCA PARA AS ESPÉCIES DE <i>Fonsecaea</i> DE ORIGEM CLÍNICA E AMBIENTAL.....	46

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESPÉCIES DE <i>Fonsecaea</i> E OUTRAS ESPÉCIES FÚNGICAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AMBIENTAL UTILIZADAS NESTE ESTUDO (continua). .....	35
QUADRO 2 – ESPÉCIES DE <i>Fonsecaea</i> E OUTRAS ESPÉCIES FÚNGICAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AMBIENTAL UTILIZADAS NESTE ESTUDO (conclusão). .....	36
QUADRO 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS DELINEADOS NESTE ESTUDO. ....	41
QUADRO 4 – CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA REAÇÃO ESPÉCIE ESPECÍFICA DOS OLIGOS DESENHADOS NESTE ESTUDO. ....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
CBF5	- Centromere microtubule-binding protein <i>cbf5</i>
CBS	- Centraalbureau voor Schimmelcultures/Fungal Biodiversity Centre
CIA	- Clorofórmio álcool isoamílico
CMRP	- Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense
CTAB	- Brometo de cetil-trimetilamônio
DNA <sub>r</sub>	- Deoxyribonucleic acid ribosomal
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	- Ditioneitol
et al.	- Colaboradores
FOMO	- Iniciador espécie específico para <i>Fonsecaea monophora</i>
FONU	- Iniciador espécie específico para <i>Fonsecaea nubica</i>
FOPE	- Iniciador espécie específico para <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
FOPU	- Sonda cadeado RCA espécie específico para <i>Fonsecaea pugnacius</i>
FOPUG	- Iniciador espécie específico para <i>Fonsecaea pugnacius</i>
GC	- Guanina e Citosina
IDT	- Integrated DNA Technologies
<i>In silico</i>	- Simulação computacional que modela um processo natural ou de laboratório
<i>In vitro</i>	- Fora do organismo vivo, em tubo de ensaio.
ITS	- Internal Transcribed Spacer
MAFFT	- Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences
MEGA	- Molecular Evolutionary Genetics Analysis
M.O.	- Microscopia óptica
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
Oligo (s)	- Oligonucleotídeos ou iniciadores
pb	- Pares de base
PCR	- Polimerase Chain Reaction
PUA	- Domínio pseudouridina sintase e archaeosina transglicosilase
RCA	- Rolling circle amplification
RNA	- Ribonucleic acid
RPM	- Rotações por minute

SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SNP - Single Nucleotide Polymorphism  
T<sub>m</sub> - Temperatura de melting  
UFPR - Universidade Federal do Paraná  
UV - ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

spp	- Mais de uma espécie do mesmo gênero
%	- Porcentagem
cm	- Centímetro
mL	- Mililitro
μL	- Microlitro
CG	- Citosina e Guanina
μM	- Micromolar
ng	- Nanogramas
pmol	- Pico mol
mM	- Milimolar
pH	- Potencial hidrogeniônico
KCl	- Cloreto de potássio
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de magnésio
3'	- Extremidade final da fita de DNA
5'	- Extremidade inicial da fita de DNA
kb	- Kilobase
NaCl	- Cloreto de sódio
°C	- Graus Celsius
M	- Molar
®	- Marca registrada
U	- Unidades
Genbank	- Banco de dados de sequências genéticas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS .....	18
1.1.1	Objetivo geral .....	18
1.1.2	Objetivos específicos .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1	LEVEDURAS NEGRAS .....	19
2.2	CROMOBLASTOMICOSE E FEOIFOMICOSE .....	22
2.2.1	Cromoblastomicose .....	24
2.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE <i>Fonsecaea</i> ASSOCIADOS À CROMOBLASTOMICOSE .....	29
2.3.1	Sonda cadeado com amplificação em círculo rolante (RCA) .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	35
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA .....	36
3.3	PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA .....	36
3.3.1	Sequência gênica e desenho de oligonucleotídeos .....	36
3.3.2	Ensaio <i>in silico</i> .....	37
3.3.3	Otimização de amplificação .....	37
3.3.4	Ensaio de sensibilidade .....	38
3.4	SONDA CADEADO E AMPLIFICAÇÃO DE CÍRCULO ROLANTE (RCA) .....	38
3.4.1	Seleção de região gênica de anelamento da sonda de <i>F. pugnacius</i> .....	38
3.4.2	Desenho da sonda cadeado .....	38
3.4.3	Ensaio <i>in silico</i> e ensaio <i>in vitro</i> .....	39
3.4.4	Ligação da sonda .....	39
3.4.5	Exonucleólise .....	39
3.4.6	Reação de amplificação em círculo rolante .....	40
3.4.7	Ensaio de sensibilidade e limite de detecção .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>41</b>
4.1	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS E PCR ESPÉCIE- ESPECÍFICA <i>in vitro</i> .....	41
4.2	DESENHO DE SONDA CADEADO E RCA .....	44
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>

<b>6</b>	<b>ARTIGO SUBMETIDO .....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
	<b>APÊNDICE 1 – SEQUÊNCIAS DO GENE CBF5 DE ESPÉCIES DE ORIGEM CLÍNICA E AMBIENTAL ASSOCIADAS A CROMOBLASTOMICOSE USADAS PARA O DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPÉCIE-ESPECÍFICO.....</b>	<b>62</b>
	<b>APÊNDICE 2 – NÚMERO DE ACESSO DE SEQUÊNCIAS ITS DOS AGENTES ASSOCIADOS À CROMOBLASTOMICOSE USADOS COMO REFERÊNCIA PARA O DESENHO DA Sonda CADEADO RCA .....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Leveduras negras, também chamadas de fungos dematiáceos são fungos de ampla distribuição geográfica com a maioria das espécies pertencentes as ordens Dothideales e Chaetothyriales (VICENTE et al., 2008; NAJAFZADEH et al., 2011). Na ordem Dothideales observa-se espécies de crescimento rápido com ampla ocorrência ambiental sendo frequentemente associadas à colonização de hospedeiros vegetais. Enquanto que na ordem Chaetothyriales, especialmente a família Herpotrichiellaceae, abrigam numerosos agentes de infecção humana e animal com predisposição significativa para o crescimento no tecido animal como por exemplo, espécies dos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella*, *Veronea* e *Cyphellophora* (HOOG et al., 2000; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b), associadas a um amplo espectro de quadros clínicos (VICENTE et al., 2013). No ambiente, devido às características oligotróficas, estas espécies parecem sobreviver em baixa densidade em substratos adversos, ocupando micro-habitats específicos, onde sapróbios comuns estão ausentes. Muitas espécies têm ciclos de vida compostos, indicando nichos dinâmicos ou transmissão vetorial e assim, justificando o potencial de patogenicidade de algumas espécies.

Dentre as principais micoses causadas por este grupo destacam-se a cromoblastomicose e a feoifomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b), as quais representam dois pólos de um espectro de doenças causadas por fungos melanizados (HOOG et al., 2000). A feoifomicose é caracterizada por infecções que ocorrem de forma superficial até sistêmicas, observando necrose tecidual e presença de hifas nos tecidos, geralmente relacionada a distúrbios imunológicos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Em contrapartida, cromoblastomicose é uma doença cutânea e subcutânea, resultante da implantação traumática de propágulos originários de diversas espécies de fungos melanizados termotolerantes, promovendo uma infecção de curso crônico e manifestações clínicas polimórficas caracterizadas pela presença de estruturas globosas septadas de parede espessa e acastanhadas no tecido do hospedeiro, denominadas de corpos muriformes (VICENTE et al., 2013).

A cromoblastomicose ocorre principalmente em regiões tropicais sendo predominante na América do Sul, principalmente no Brasil. As espécies

classicamente envolvidas na etiologia da doença são *Fonsecaea pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa* e *Rhinoctadiella aquaspersa* (IWATSU et al., 1982; MCGINNIS, 1983; HOOG et al. 1993; MOUCHALOUAT et al., 2011), visto que estudos da epidemiologia molecular da doença revelaram que o gênero *Fonsecaea* é o mais prevalente no Brasil.

O gênero *Fonsecaea* epidemiologicamente reúne espécies crípticas relacionadas à doença denominadas de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* (NAJAFZADEH et al., 2010), e a espécie *F. pugnacius* (AZEVEDO et al., 2015a) descrita recentemente como um novo agente. Enquanto, as espécies *F. pedrosoi* e *F. nubica* são estritamente associadas à cromoblastomicose e formação de corpos muriformes no tecido do hospedeiro, *F. monophora* e *F. pugnacius* também têm sido relatadas em infecções cerebrais e outros órgãos (LI; HOOG, 2009).

A cromoblastomicose tem sido epidemiologicamente associada à infecção traumática principalmente por plantas. Diversos estudos têm reportado o isolamento destes agentes de fontes ambientais, porém em baixa frequência e normalmente recuperado de plantas em decomposição (MARQUES et al., 2006; SALGADO, 2010; VICENTE et al., 2013).

Embora o Brasil seja considerado uma das regiões endêmicas com altos recordes da doença tendo incidência média anual de casos de CBM relatadas no Brasil de 6,4/ano sendo 4,3/ano (13 casos/3 anos) para o Maranhão (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). A epidemiologia desta ainda não foi totalmente elucidada e nem tão menos as rotas de infecção esclarecidas. A doença representa um problema de saúde pública para a população de determinadas regiões brasileiras e do continente americano. Recentemente, a doença foi assumida como negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a), e em função deste cenário, é uma demanda emergencial organizar os dados de registros epidemiológicos, protocolos de tratamento.

A necessidade de identificação rápida e precisa de fungos patogênicos está aumentando, uma vez que tais informações podem influenciar o diagnóstico de doenças (ABLIZ et al., 2003). Métodos tradicionais de identificação com base em características morfológicas e detecção de antígenos têm sido utilizados clinicamente para a identificação dos mesmos, no entanto, estes métodos são demorados e possuem baixa especificidade (ABLIZ et al., 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

Recentemente, o uso de sondas cadeado aliado à técnica de RCA tem auxiliado significativamente no diagnóstico de diferentes tipos de micoses e tem boa reprodutibilidade e sensibilidade (LACKNER et al., 2012; ZOU et al., 2012; FENG et al., 2013; HAMZEHEI et al., 2013; NAJAFZADEH et al., 2013, 2018). Embora a maioria dos estudos seja direcionada a *Candida*, *Aspergillus*, *Scedosporium* (ZHOU et al. 2008), *Penicillium marneffeii* (SUN et al. 2011), *Cryptococcus* e *Trichophyton* (TEHRANI et al., 2014), Najafzadeh et al. (2011, 2013, 2018) e Hamzehei et al. (2013) propuseram, a técnica de RCA, aliado à sonda cadeado, para os agentes de cromoblastomicoses: *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pedrosoi* e diversas espécies de *Cladophialophora*, respectivamente.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver marcadores moleculares adicionais para detecção das espécies patogênicas do gênero *Fonsecaea* associadas a cromoblastomicose envolvendo métodos baseados na amplificação de fragmentos específicos de DNA e o desenvolvimento de uma sonda cadeado RCA com base na amplificação em círculo rolante para a espécie *F. pugnacius*, propondo novos marcadores espécie específico para distinguir espécies de agentes causais da doença e, futuramente, oferecer novas ferramentas para a detecção destes patógenos em amostras biológicas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver oligonucleotídeos espécie-específicos dentro do gênero *Fonsecaea*, baseados em sequências das regiões CBF5, assim como desenhar uma sonda específica modelo cadeado para espécies *F. pugnacius* baseada na região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr, visando estudos epidemiológicos clínicos, ambientais e futura aplicação em diagnóstico.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Desenhar oligonucleotídeos espécie-específicos, utilizando o gene CBF5, para leveduras negras patogênicas do gênero *Fonsecaea*;

- Desenhar sonda cadeado baseado na técnica de amplificação em círculo rolante (RCA) para a *Fonsecaea pugnacius* com base em sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr;
- Testar *in silico* a sonda cadeado e oligonucleotídeos no DNA de amostras clínicas associadas a cromoblastomicose e espécies de importância clínica e ambiental pertencentes ao gênero *Fonsecaea* e entre outros gêneros;
- Testar *in vitro* a sonda cadeado e oligonucleotídeos no DNA de amostras clínicas associadas a cromoblastomicose e espécies de importância clínica e ambiental pertencentes ao gênero *Fonsecaea* e entre outros gêneros;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

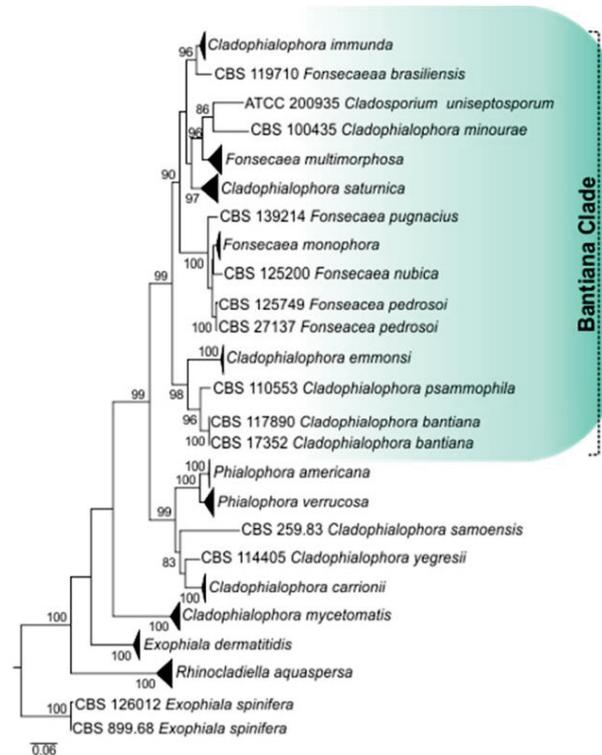
### 2.1 LEVEDURAS NEGRAS

Leveduras negras apresentam diversas ecologias e morfologia e são capazes de produzir células melanizadas de características leveduriforme em pelo menos um período de seu ciclo de vida (NAJAFZADEH et al., 2011; VICENTE et al., 2012). Também chamados de fungos dematiáceos, são distribuídos em diferentes ordens e famílias, com um grande número de espécies relatadas nas ordens Chaetothyriales e Dothideales.

As leveduras negras são microrganismos extremamente relevantes do ponto de vista clínico e ecológico, sendo encontradas regularmente como agentes causadores de feohifomicose em animais vertebrados (SILVA; SOUZA; ROZENTAL, 1998; HOOG et al., 2007; NAJAFZADEH et al., 2009). Em humanos, as infecções variam de superficiais, cutâneas/subcutâneas à neurotropismo fatal, com mutilações graves que ocorrem em pacientes sem doença imune e ou portadores de doença metabólica subjacente. Dentro da ordem Chaetothyriales, encontra – se a família Herpotrichiellaceae que abrange patógenos e oportunistas de humanos e animais, causadores, por exemplo, da cromoblastomicose, micetoma e feoifomicose (FIGURA 1) (QUEIROZ-TELLEZ et al, 2017b). As leveduras desta família são de crescimento lento, inicialmente leveduriforme, e com o tempo, a textura da colônia pode se tornar aveludada apresentando microscopicamente hifas mononucleadas e talo regular e uniformemente pigmentado (DIXON; POLAK-WYSS, 1991), com predominância de estruturas leveduriforme, sendo os principais gêneros que compõe essa família

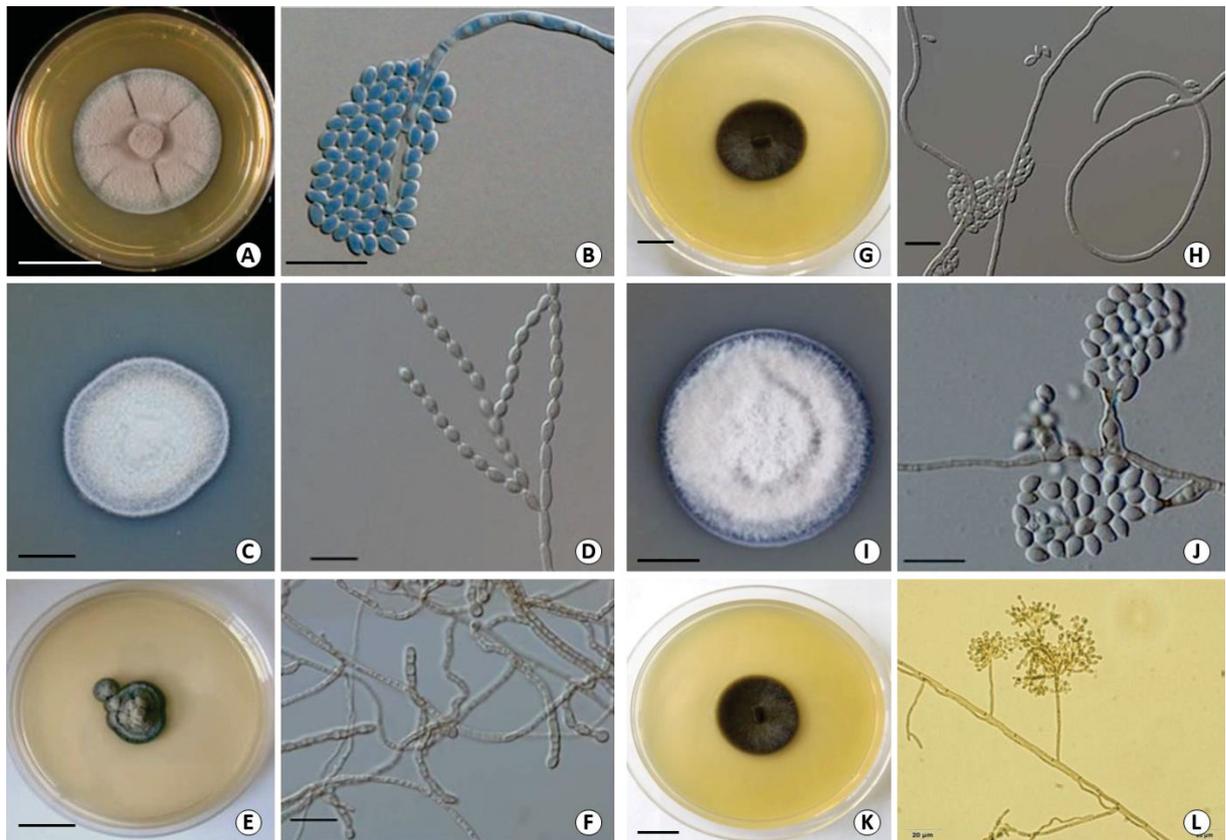
*Exophiala*, *Cladophialophora*, *Capronia*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella*, *Veronea* e *Cyphellophora* (HOOG et al., 2000) (FIGURA 2).

FIGURA 1 – FILOGENIA DE ESPÉCIES REPRESENTATIVAS DA ORDEM Chaetothyriales.



Filogenia de uma seleção representativa de espécies da ordem Chaetothyriales, baseada nos domínios de LSU rDNA D1-D2 sendo que seqüências de LSU foram alinhadas pelo método de máxima verossimilhança implementado no programa MEGA 5.10. Valores de bootstrap de 80% de 500 conjuntos de dados reamostrados são mostrados com ramificações. *Exophiala spinifera* foi usada como grupo externo. Sendo em cor azul, representado o clado Bantiana. FONTE: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (2017b).

FIGURA 2 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LEVEDURAS NEGRAS DA FAMÍLIA Herpotrichiellaceae.



**A e B:** Macromorfologia e micromorfologia de *E. cancerae*: colônia em MEA com crescimento lento, aspecto aveludado, cinza oliváceo, reverso negro oliváceo e conidióforo curto, ereto, cilíndrico e multicelular, respectivamente; **C e D:** Macromorfologia e micromorfologia de *Cladophialophora carrionii*: colônia em MEA com crescimento pulverulento, verde oliváceo, reverso negro oliváceo e conidióforo oliváceo, conídios com produção acropetal, dispostos em longas cadeias ramificadas tendo paredes lisas ou ligeiramente verrucosas; **E e F:** Macromorfologia e micromorfologia de *Cyphellophora ludoviensis*: colônia em MEA com crescimento lento, cinza oliváceo a negro oliváceo, reverso negro oliváceo e conidióforo castanho claro com anastomoses frequentes; **G e H:** Macromorfologia e micromorfologia de *R. tropicalis*: colônia em MEA com crescimento moderadamente rápido, compacta, aveludada, elevada, negro oliváceo, reverso negro e conidióforo ereto, reto, de paredes espessas, marrom a marrom escuro, com denticulos pequenos e pigmentados e conídios com produção simpodial; **I e J:** Macromorfologia e micromorfologia *P. verrucosa*: colônia em CMA com crescimento moderadamente rápido, bem aderidas ao meio, cinza olivácea, reverso negro com fiálide em forma de vaso e conídios em forma de balão; **K e L:** Macromorfologia e micromorfologia de *F. pugnacius*: colônia em SGA compacta, aveludada a lanosa, cinza oliváceo, reverso negro oliváceo e conidióforo ereto, marrom oliváceo e densamente ramificado na região apical; Barras de escala de 10 µm e M.O. em aumento de 400X. FONTE: Adaptado de Hoog et al. (1995), Hoog et al. (2011), Azevedo et al. (2015a), Gomes et al. (2016) e Queiroz-Telles et al. (2017b).

Na natureza, estes agentes podem colonizar diversos ambientes, os quais vêm sendo comumente isolados de substratos vegetais, madeira, solo e matéria orgânica em decomposição (NASCIMENTO, 2013), havendo relatos também de sua presença em ambientes tóxicos e extremos, uma vez que isso se deve a sua

capacidade de adaptação atribuída principalmente ao seu metabolismo oligotrófico (HOOG et al., 2011; VICENTE et al., 2012). Embora o hábitat destas seja diverso, as mesmas podem requerer condições típicas para seu crescimento como pouca disponibilidade de nutrientes, presença de compostos aromáticos, temperaturas elevadas, radiação ultravioleta (UV), estresse osmótico ou combinações desses fatores (STERFLINGER, 2006).

Os fatores de virulência presentes nos membros da ordem Chaetothyriales, como termotolerância, presença de melanina, assimilação de hidrocarbonetos aromáticos, osmotolerância, hidrofobicidade e fases semelhantes a leveduras, desempenham um papel importante na virulência e patogenicidade (DIXON; POLAK-WYSS, 1991; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

## 2.2 CROMOBLASTOMICOSE E FEOIFOMICOSE

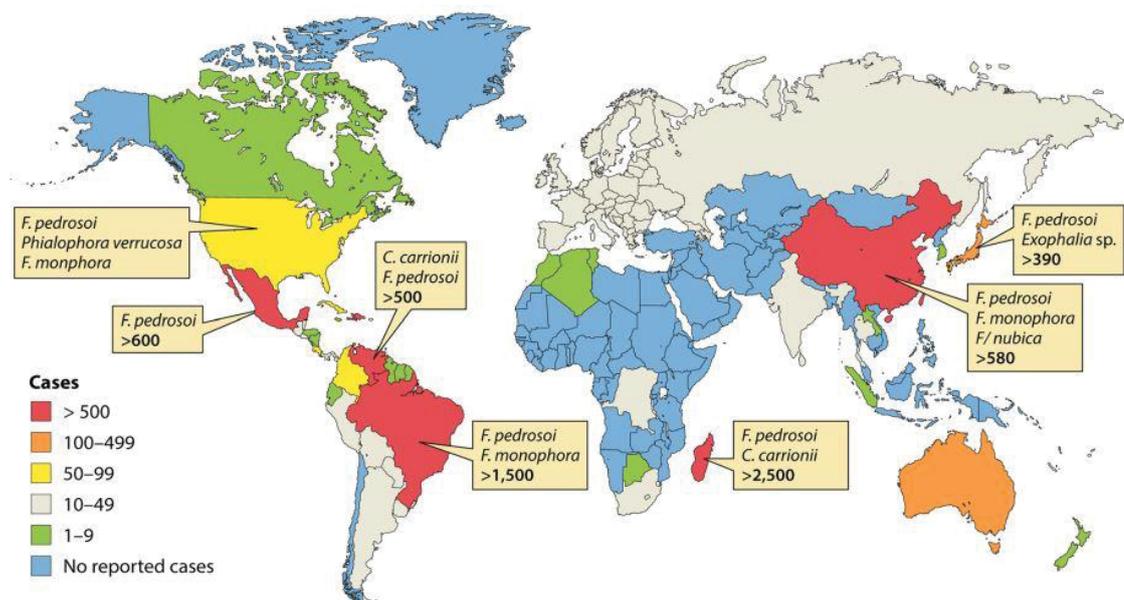
A cromoblastomicose e a feoifomicose representam dois pólos de um espectro clínico de doenças causadas por fungos melanizados. Clinicamente, seus limites não são claros, pois ambas as infecções podem ser causadas pelos mesmos agentes etiológicos, porém apresentam características distintas quanto as estruturas de virulência dos agentes nos tecidos do hospedeiro (BONIFAZ et al., 2013; ZHU et al., 2015). Embora os hospedeiros imunocompetentes e imunossuprimidos possam apresentar ambos os tipos de infecções, a cromoblastomicose normalmente é observada geralmente em hospedeiros imunocompetentes e a feoifomicose não. Sendo assim, o estado imunitário do hospedeiro pode desempenhar um papel importante em estudos para evolução clínica destas doenças (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Tanto a cromoblastomicose quanto a feoifomicose compõem o grupo de infecções negligenciadas em regiões tropicais e subtropicais as quais são endêmicas em populações de baixa renda de regiões em desenvolvimento de África, Ásia e América Latina (QUEIROZ-TELLES, 2015) (FIGURA 3), uma vez que no Brasil, a taxa de incidência estimada para cromoblastomicose é de 3/100.000, sendo que o estado do Maranhão é considerado uma região endêmica para esta infecção tendo taxa de incidência de 4,3/ano (13 casos/3 anos) (AZEVEDO et al., 2015a).

O espectro clínico de infecções humanas causadas por fungos melanizados é amplo, incluindo feoifomicose superficial, cutânea, subcutânea e sistêmica, fungemia, sinusite, micetoma e cromoblastomicose, sendo que juntamente à

esporotricose e micetoma, a cromoblastomicose é uma das micoses subcutâneas mais frequentes (QUEIROZ-TELLES et al., 2009, 2017b).

Diversos fatores de patogenicidade estão potencialmente envolvidos tanto na infecção subcutânea quanto nas disseminadas, incluindo modificações da superfície celular, hidrofobicidade, remodelação da parede celular fúngica, secreção de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, moléculas de adesão, incorporação de hidrocarbonetos aromáticos, montagem de sideróforos e especialmente a presença de melanina, sendo que dentre estes, os fatores mais relevantes são: presença de melanina e células muriforme, moléculas de adesão e hidrofobicidade (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Alguns fatores de virulência, como termotolerância e composição da parede celular fúngica, podem ser determinantes quanto a sua diferenciação, crescimento, adaptação aos microhabitats do hospedeiro e disseminação. Pode-se citar como exemplo *F. pedrosoi* e *C. bantiana*, agentes etiológicos de cromoblastomicose e feofomicose, respectivamente. A espécie *F. pedrosoi* é considerada o agente causal mais comum de cromoblastomicose no mundo, apresenta temperatura ótima de crescimento e temperatura máxima de crescimento entre 33 °C e 37 °C. Enquanto que a espécie *C. bantiana*, a qual infecta o sistema nervoso central e o sistema respiratório de humanos podem crescer em temperaturas de até 40 °C (SALGADO, 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

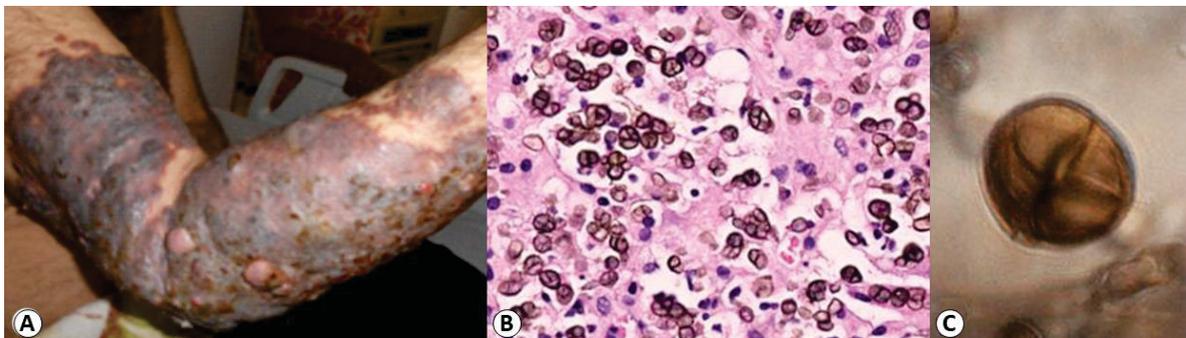
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CROMOBLASTOMICOSE.



FONTE: Queiroz-Telles et al. (2017b).

Entretanto, a capacidade de formar “célula muriforme” é restrito a algumas espécies pertencentes a ordem Chaetothyriales. De maneira geral as espécies desta ordem apresentam crescimento meristemático e invasivo em tecidos vivos, tais como em hospedeiros humano e/ou vegetal (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b), sendo considerado um mecanismo de adaptação evolutiva associada a sobrevivência dentro do tecido do hospedeiro. Neste contexto, as células muriformes tem sido diretamente relacionadas a respostas granulomatosas intensas, bem como à evasão de mecanismos imunológicos em hospedeiros animais, sinalizando assim o início da cromoblastomicose, uma doença crônica, cutânea e subcutânea de hospedeiros humanos e animais (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Desta forma, as células muriformes (FIGURA 4) permanecem como uma estrutura fundamental para o diagnóstico diferencial e significativo para distinção entre cromoblastomicose e feohifomicose. Uma vez que na feohifomicose os elementos muriformes não são detectados (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

FIGURA 4 – DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA CROMOBLASTOMICOSE, PRESENÇA DE CÉLULAS MURIFORMES.



**A.** Lesão cutânea verrucosa hiperqueratosa; **B.** Presença de células acastanhadas em corte histológico; **C.** Célula muriforme. FONTE: Adaptado de Badali et al. (2008), Queiroz-Telles et al. (2017b) e Dong et al. (2018).

### 2.2.1 Cromoblastomicose

A cromoblastomicose humana é uma infecção crônica cutânea e subcutânea causada por fungos melanizados e é caracterizada por lesões cutâneas verrucosas que, eventualmente, levam a erupções emergentes semelhantes à couve-flor, as quais apresentam por células muriformes (NAJAFZADEH et al., 2009). Segundo Queiroz-Telles et al. (2017b), as lesões iniciais podem começar como lesão cutânea

eritematosa e progredir para lesão papular. Com o tempo, pode se manifestar como lesão papuloescamosa e evoluir com aspectos polimórficos, podendo ser confundida com várias doenças infecciosas e não infecciosas. A lesão inicial pode se espalhar localmente e produzir lesões satélites, considerando o prurido como manifestação clínica da doença. As lesões iniciais podem progredir assumindo vários tipos de formas clínicas com diferentes graus de severidade, sendo que em casos com evolução clínica de cromoblastomicose mais grave, mais de um tipo de lesão pode ser observado no mesmo paciente (CARRIÓN 1950; MCGINNIS, 1983; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b) (FIGURA 5).

FIGURA 5 – TIPOS DE LESÕES EM PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE



**A.** Lesão cutânea inicial; **B.** Lesão nodular; **C.** Lesão tumoral (couve-flor); **D.** Lesão cicatricial; **E.** Lesão verrucosa hiperqueratosa; **F.** Lesão violácea em placas. FONTE: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (2017b).

A cromoblastomicose afeta principalmente a pele e o tecido subcutâneo, sendo que a disseminação para outros órgãos é extremamente rara, uma vez que está relacionada a infecções tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com comprometimento imune, e a forma de infecção depende de fatores como a quantidade de inóculo, a resistência do hospedeiro e a virulência do fungo

(ALVIANO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2006; CAMARA-LEMARROY et al., 2013; AZEVEDO et al., 2015b). Segundo Queiroz-Telles et al. (2017b), a disseminação contínua pode ocorrer lentamente e gerar novas “lesões satélites”, enquanto que disseminações não contínuas podem gerar lesões remotas as quais são resultado da autoinoculação devido ao prurido existente na área lesionada. Além disso, algumas espécies de leveduras negras podem causar infecções disseminadas com neurotropismo, causando a disseminação para o cérebro (HOOG et al., 2004; NAJAFZADEH et al., 2010; AZEVEDO et al., 2015b).

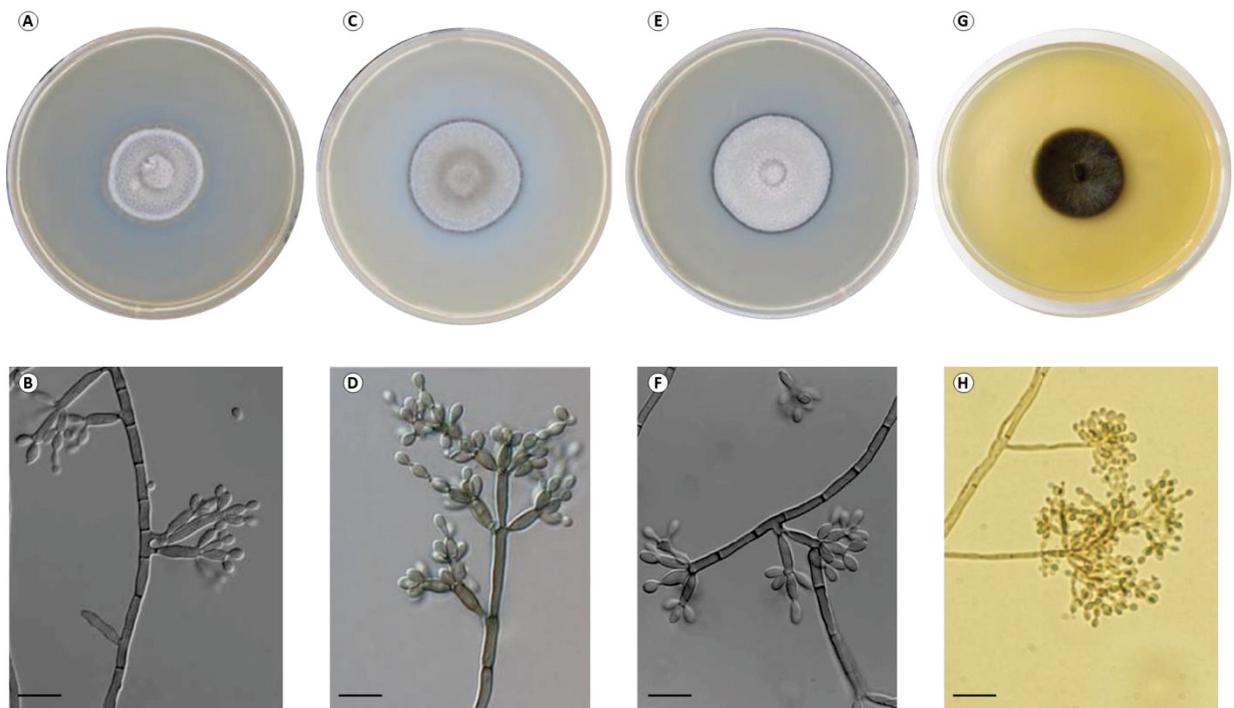
Esta doença é causada pela inoculação traumática de agentes etiológicos encontrados no ambiente, mas nem todas as espécies são igualmente eficientes na causa da doença (NAJAFZADEH et al., 2010), como exemplo pode-se citar a *F. pedrosoi* como principal agente etiológico em casos de cromoblastomicose em regiões tropicais e, em contrapartida, em regiões semiáridas observa-se a predominância de *C. carrionii* como agente causador desta doença (MINOTTO et al., 2001; CORREIA et al., 2010). As espécies frequentemente associadas à cromoblastomicose pertencem aos gêneros *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, já infecções atribuídas ao gênero *Rhinoctadiella* são menos frequentes quando comparado ao número de casos associados a membros do gênero *Phialophora* e/ou *Exophiala* (QUEIROZ-TELLES et al., 2011; GOMES et al., 2016).

O diagnóstico desta micose pode ser definido por exame micológico direto com a observação de células fúngicas de parede espessa acastanhadas, chamadas células escleróticas ou muriformes, de onde podem surgir hifas escuras septadas (SALGADO, 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b), e por histopatologia, através da presença dessas células escleróticas no tecido infectado (REVANKAR; SUTTON, 2010). Embora a visualização em lâmina de células muriformes seja obrigatória para a confirmação do diagnóstico de cromoblastomicose, a mesma não é suficiente para identificação do agente causador da infecção. Segundo Salgado (2010), para que o agente etiológico da doença seja identificado há a necessidade de ser feito o isolamento e cultivo do mesmo. Devido a isso, é importante desenvolver novas metodologias para o diagnóstico rápido da patologia e do tipo de agente etiológico com o intuito de que o tratamento seja iniciado durante o estágio de desenvolvimento inicial da doença.

As espécies de *Fonsecaea* tem sido consideradas o principal agente causal de cromoblastomicose em regiões tropicais como América do Central e América do

Sul (GUARRO, 2012), uma vez que o estado do Maranhão é considerado o terceiro estado com maior número de registros de cromoblastomicose no Brasil (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Estes fungos são semelhantes quanto à pigmentação, morfologia, estrutura antigênica, propriedades fisiológicas e formação de conídios (ARAÚJO, 2008; ALVES, 2015), possuindo três espécies crípticas que podem causar cromoblastomicose, sendo elas *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* (FIGURA 6), sendo que recentemente foi descrita uma nova espécie *F. pugnacius* proximamente relacionada.

FIGURA 6 – ESPÉCIES CRÍPTICAS DO GÊNERO *Fonsecaea*.



**A e B.** Macromorfologia e micromorfologia de *F. monophora*: colônia em MEA compactas, oliváceas escuras, aveludadas a texturas e têm um reverso oliváceo-preto, ausência de células em brotamento, presença de conidiogênese simpodial com dentículos sem corte, com conídios isolados ou em cadeias curtas; **C e D.** Macromorfologia e micromorfologia de *F. nubica*: colônia em MEA compactas, oliváceas escuras, aveludadas a texturas e têm um reverso oliváceo-preto, ausência de células em brotamento, presença de conidiogênese simpodial com dentículos sem corte, com conídios isolados ou em cadeias curtas; **E e F.** Macromorfologia e micromorfologia de *F. pedrosoi*: colônia em MEA compactas, oliváceas escuras, aveludadas a texturas e têm um reverso oliváceo-preto, ausência de células em brotamento, presença de conidiogênese simpodial com dentículos sem corte, com conídios isolados ou em cadeias curtas; **G e H:** Macromorfologia e micromorfologia de *Fonsecaea pugnacius*: colônia em SGA compacta, aveludada a lanosa, cinza oliváceo, reverso negro oliváceo e conidióforo ereto, marrom oliváceo e densamente ramificado na região apical. Barras de escala de 10 µm e M.O. em aumento de 400X. FONTE: Adaptado de Xi et al. (2009), Azevedo et al. (2015a) e Feng e Hoog (2017).

Para se definir o agente etiológico da doença é preciso realizar o isolamento do fungo em meio de cultura e microcultivo em meios de cultura apropriados além de

se realizar a identificação molecular através do sequenciamento de vários genes tais como regiões interespaçadoras ITS do DNAr, genes que codificam as proteínas  $\beta$ -tubulina e actina (VICENTE et al., 2013). Sendo assim, observa-se que para a confirmação de espécies ainda faz se necessário disponibilizar outras metodologias, visando garantir um processo efetivo e mais rápido com aplicabilidade prática. Neste contexto nos últimos anos tem sido relatado para estes agentes a busca por novas metodologias de identificação e detecção específica a fim de auxiliar na detecção em amostras biológicas e ambientais e, futuramente, em estudos de diagnóstico e epidemiológico da doença (TSUI et al., 2011), como por exemplo, marcadores para PCR espécie-específica (ABLIZ et al., 2003), sonda cadeado RCA (NAJAFZADEH et al., 2011, 2013, 2018), amplificação isotérmica mediada por *Loop* (LAMP) (NAJAFZADEH, 2011), hibridização in situ por fluorescência (FISH) (LAU et al., 2009) e comprimento de fragmento polimórfico amplificado (AFLP) de espécies crípticas de fungos dematiáceos (NAJAFZADEH, 2011).

A espécie *F. pugnacius* foi recentemente descrita como novo agente causal de cromoblastomicose (AZEVEDO et al., 2015a, 2015b) uma vez que sua etimologia dá-se a agressividade da infecção em humanos. A cromoblastomicose geralmente ocorre na pele e no tecido subcutâneo, uma vez que os fungos raramente se disseminam para outros órgãos (CARRIÓN, 1975; NÓBREGA et al., 2003). O potencial invasivo das espécies crípticas de *Fonsecaea* difere significativamente entre elas (BADALI et al., 2008; SEYEDMOUSAVI et al., 2011), uma vez que *F. pedrosoi* e *F. nubica* encontram-se restritamente associadas à cromoblastomicose, *F. monophora* também está envolvida na feohifomicose do cérebro e de outros órgãos (NAJAFZADEH et al., 2010). Entretanto, *Fonsecaea pugnacius* se comporta de maneira diferente novamente.

Em estudo desenvolvido por Azevedo et al. (2015b) observou-se que a infecção gerada por *F. pugnacius*, ocasionou um caso clínico crônico de cromoblastomicose em um paciente aparentemente imunocompetente, causando cerebrite secundária por disseminação para o cérebro. Além disso, as análises histopatológicas demonstraram que as infecções cutâneas e a cerebral apresentam características diferentes, onde as células muriformes são produzidas na pele, mas as hifas são produzidas no cérebro. Este tipo de disseminação e a aparente conversão para a morfologia invasiva não foi descrita ainda em *F. monophora*, levando o questionamento se este novo agente tem como peculiaridade grande

virulência. Devido ao fato de a espécie parece ser única, são necessários mais estudos em modelos animais pré-estabelecidos para abordar estas questões.

A cromoblastomicose é uma doença negligenciada, endêmica de regiões tropicais e subtropicais cosmopolita que afeta principalmente populações de baixa renda, em áreas remotas e rurais, favelas urbanas ou em zonas de conflito (QUEIROZ-TELLES, 2015). A doença está fortemente ligada à atividade ocupacional agrícola, jardineiros, lenhadores, vendedores de produtos agrícolas, que desenvolvem suas atividades sem sapatos de proteção, luvas ou roupas, fatores que favorecem a infecção por implantação (WALKER; MCGINNIS, 2014; MARQUES et al., 2015). No Brasil, os pacientes com cromoblastomicose são principalmente homens, entre 30-50 anos, trabalhadores rurais tendo como principais fatores de risco a falta de sapatos, luvas ou vestuários de proteção, má nutrição e hábitos higiênico (QUEIROZ-TELLES et al., 2009, 2015). As regiões comumente infectadas são os membros inferiores, como glúteos, pernas e pés, e com menor frequência membros superiores, como mãos e braços (FIGURA 7). Estas são lesionadas por espinhos contaminados ou lascas de madeira (NAJAFZADEH et al., 2009; QUEIROZ-TELLES et al., 2009; CORREIA et al., 2010) estando associado principalmente a espécies de leveduras negras dos gêneros *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Fonsecaea* (BRUN et al., 2015; CHAABANE et al., 2015).

FIGURA 7 – POPULAÇÃO COMUMENTE INFECTADA POR FUNGOS MELANIZADOS AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE.



**A.** Extrativismo do coco babaçu em Tocantinópolis; **B.** Lesão cutânea verrucosa disseminada; **C.** Macromorfologia de *F. pedrosoi* em Sabouraud, principal agente causal de cromoblastomicose no Brasil. FONTE: Adaptado de Correia et al. (2010) e Hoffmann et al. (2011).

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Fonsecaea* ASSOCIADOS À CROMOBLASTOMICOSE

A necessidade de identificação rápida e precisa de fungos patogênicos está aumentando, uma vez que tais informações podem influenciar diretamente no diagnóstico de doenças como a cromoblastomicose (ABLIZ et al., 2003; MOUCHALOUAT et al., 2011). Da mesma forma, a identificação das espécies do gênero *Fonsecaea* pode ser utilizada como metodologia complementar para a rápida caracterização de agentes etiológicos e assim inferir dados principalmente para estudos epidemiológicos.

Os agentes etiológicos da cromoblastomicose reconhecidos mundialmente são *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii*, *R. aquaspersa*, *F. monophora* e *F. nubica*. (ABLIZ et al., 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). O diagnóstico laboratorial da cromoblastomicose baseia-se no reconhecimento das células muriformes na preparação do tecido e na raspagem da pele, utilizando-se o exame histopatológico e/ou micológico direto (ANDRADE et al., 2007). Métodos tradicionais de identificação com base em características morfológicas e detecção de antígenos têm sido utilizados clinicamente para a identificação dos mesmos, no entanto, estes métodos são demorados e possuem baixa especificidade.

Um dos problemas estabelecidos entre a maioria dos fungos negros é a sua caracterização em nível de gênero ou espécie. Atualmente dados morfológicos não são suficientemente precisos e eficazes a fim de suprir todos os caracteres de identificação específica. Além disso, algumas espécies de leveduras negras patogênicas, como espécies de *Fonsecaea*, são crípticas, e embora apresentem fenótipos similares podem causar doenças distintas. Geralmente o sequenciamento da região ITS do DNAr e dos genes de ciclo de divisão celular (*cdc42*), fator de alongamento da tradução (*EF-1 $\alpha$* ) e  $\beta$ -tubulina (*BT2*) são utilizados para identificação das espécies (GOMES et al., 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b), entretanto na prática clínica métodos mais rápidos e sensíveis são necessários.

A fim de elaborar métodos de detecção alternativos para distinção de agentes etiológicos de cromoblastomicose pertencentes ao gênero *Fonsecaea*, Abliz et al., (2003), Andrade et al., (2007), desenvolveram oligonucleotídeos espécie específicos baseados na região gênica ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr para espécie *F. pedrosoi*. Esta região é considerada conservada dentro do filo Ascomycota e é muito utilizada na identificação de espécies de microrganismos fúngicos, empregando oligonucleotídeos que são aplicáveis para o grupo taxonômico mais amplo possível (SCHOCH et al., 2012; IRINYI; MEYER, 2015). Entretanto, para o desenho dos

oligonucleotídeos espécie específicos, a região supracitada não poderia ser utilizada como modelo para a elaboração dos mesmos devido ao fato de apresentar pouco polimorfismo. Além disso, tem-se o fato de se tratar de espécies de *Fonsecaea* patogênicas, as quais são filogeneticamente muito próximas e crípticas, delimitando ainda mais a escolha da região alvo de especificidade. Uma alternativa para usar a região ITS1-5,8S-ITS2 como molde para reações de amplificação é a utilização de metodologias capazes de detectar polimorfismos de ponto único, como exemplo a sonda cadeado aliado a amplificação em círculo rolante (RCA).

Devido a isso, torna-se necessário a busca por outro genes que contenham maior polimorfismo entre as espécies em questão. Pode-se citar como exemplo o estudo desenvolvido por Rodrigues et al., (2015) cujo utilizou a região gênica calmodulina (CAL) de espécies de *Sporothrix* de importância clínica, como *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida*, para a elaboração de primer específicos, levando a amplificação de diferentes tamanhos de fragmentos e a especificidade e sensibilidade dos iniciadores quanto ao patógeno. Neste estudo, para o desenho dos oligonucleotídeos específicos para as espécies de *Fonsecaea* agentes causais da cromoblastomicose foi utilizada a região responsável pela produção da proteína centromere/microtubule-binding *cbf5* (CBF5 (IPR020103)).

A proteína *cbf5*, ainda tem função não muito estabelecida, mas faz parte do domínio pseudouridina sintase e archaeosina transglicosilase (PUA) a qual é altamente conservado e difundido em ligações entre RNA e diversos tipos de proteínas. Sua arquitetura tridimensional está bem estabelecida, e as estruturas de vários complexos PUA-RNA revelam uma superfície de reconhecimento de RNA, mas ampla versatilidade na maneira pela qual o motivo se liga ao RNA. O domínio PUA é muitas vezes parte de enzimas de modificação de RNA e ribonucleoproteínas, mas também foi inesperadamente encontrado fundido a enzimas envolvidas na biossíntese de prolina, onde desempenha um papel desconhecido (PÉREZ-ARELLANO; GALLEGOS; CERVENA, 2007). Além disso, compõe o complexo proteico multisubunidade 240-kDa (CBF3) e acredita-se que o mesmo seja absolutamente essencial para a função do centrômero e do cinetocoro, um complexo estrutural multimolecular localizado no centrômero, o qual fornece regiões de fixação para os microtúbulos durante o fuso e contém moleculares motoras as quais movem os cromossomos nos microtúbulos durante a pro-metáfase

e a anáfase, sendo assim considerado essencial para o crescimento celular (JIANG et al. 1993).

### 2.3.1 Sonda cadeado com amplificação em círculo rolante (RCA)

Diferentemente da PCR diagnóstica convencional ou reação em cadeia polimerase quantitativa (qPCR), métodos de amplificação de sondas dependentes de ligase, como amplificação por círculo de rolamento (RCA) e reação dependente de ligase (LDR) permitem a identificação de espécies que não contêm uma sequência alvo apropriada, pouco polimórfica, a qual é especificamente visada por iniciadores convencionais (NILSSON, 2006).

A metodologia de amplificação em círculo rolante (RCA) é um método isotérmico de síntese de hibridização enzimática por DNA polimerases que resulta em centenas de bilhões de pequenas cópias lineares únicas, de sondas de DNA circular. Assim, obtêm-se repetidas sequências de DNA que podem servir como um amplificador de sinal para detecção de determinados ácidos nucleicos e outras moléculas biologicamente importantes em diagnósticos de genômica e proteômica (NAJAFZADEH et al., 2011). A alta sensibilidade da técnica torna possível quantificar com precisão e confiabilidade o número de cópias do gene, bem como detectar genes de cópia única, complexos antígeno-anticorpo e níveis de expressão de RNAm em células individuais (ZHOU et al., 2008). Esta técnica permite a detecção de uma única alteração nucleotídica e previne uma amplificação não específica. Desta forma, a amplificação pela técnica RCA é particularmente útil para discriminar espécies proximamente relacionadas ou genótipos dentro da mesma espécie (SUN et al., 2011; FURUIE et al., 2015).

A sonda cadeado é um oligonucleotídeo circularizável que consiste de dois segmentos complementares terminais à região 3' e 5' da sequência alvo, através de uma região genética vinculadora. Quando as regiões terminais dos oligonucleotídeos da sonda são justapostas à sequência de interesse, as extremidades da sonda podem ser ligados pela ação de uma DNA ligase, para formar uma molécula de DNA circular a ser amplificada (NILSSON et al., 1994) (FIGURA 8). As sondas cadeado apresentam estabilidade de ligação garantida por estabilizações topológicas, aumentando o rigor da hibridização e permitindo que diferenciem de forma mais eficiente sequências de base única variante (SNP). O resultado é uma ligação

altamente localizada, específica e uma amplificação de sinal retida a informação posicional (FURUIE, 2015).

A técnica conhecida como amplificação em círculo rolante (RCA), vem sendo utilizada em associação com a sonda cadeado com a finalidade de ampliar sua especificidade e sensibilidade nas reações. Na literatura, há muitas pesquisas direcionadas a detecção de alguns microrganismos fúngicos e bacterianos mais conhecidos como *Candida*, *Aspergillus*, *Scedosporium* (ZHOU et al., 2008), *Pseudallescheria* (LACKNER et al., 2012), *Penicillium marneffeii* (SUN et al., 2011), *Cryptococcus* e *Trichophyton* (TEHRANI et al., 2014) e *Streptococcus mutans* (MOREIRA et al., 2015), tendo boa reprodutibilidade e sensibilidade.

Recentemente, alguns autores tem conduzido seus estudos na busca de sondas cadeado RCA específicas com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr para espécies da família Herpotrichiellaceae associadas a doenças negligenciadas como a cromoblastomicose, *Exophiala* (NAJAFZADEH et al., 2013, 2018), *Cyphellophora* (FENG et al., 2013), *Cladophialophora* (HAMZEHEI et al., 2013) e *Fonsecaea* (NAJAFZADEH et al., 2011) e a feohifomicose, *Veronaea botryosa* (BONIFAZ et al. 2013). Além do mais, Dolatabadi, Najafzadeh e Hoog (2014) desenvolveram um estudo mais restrito dentro da ordem Mucorales, a fim de detectar por meio de sonda cadeado RCA microrganismos patógenos de humanos. Neste estudo, será dada continuidade ao trabalho iniciado por Najafzadeh et al. (2011), o qual desenvolveu sondas cadeado RCA para as espécies *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pedrosoi*, desenvolvendo uma sonda cadeado RCA para a espécie *F. pugnacius*, uma nova espécie do gênero que foi descrita recentemente como novo agente causal de cromoblastomicose no Brasil.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Neste estudo foram utilizadas linhagens clínicas e ambientais pertencentes à Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP/UFPR) as quais se encontram associadas à cromoblastomicose geneticamente próximas ou pertencentes a diferentes gêneros, como *Fonsecaea monophora* (CBS 269.37), *F. nubica* (CBS 269.64), *F. pedrosoi* (CBS 271.37), *F. pugnacius* (CBS 139214), *Cladophialophora carrioni* (CBS 160.54), *Exophiala dermatitidis* (CMRP 2768) e *Cyphellophora ludoviensis* (CMRP 1317); espécies de leveduras negras de origem ambiental como *C. imunda* (CMRP2693); agentes causais de infecção sistêmica em animais tais como *F. erecta* (CMRP1635) e *F. brasiliensis* (CMRP2382); assim como, agentes de infecção cutânea e sistêmica como *Sporotrix brasiliensis* (CMRP2354), *Histoplasma capsulatum* e *Candida albicans* (CMRP 3416) e fungos sapróbios isolados com alta frequência a partir de amostras ambientais, como *Penicillium* sp (CMRP 2968) e *Cladosporium halotolerans* (CMRP 2959) (QUADRO 1).

QUADRO 1 – ESPÉCIES DE *Fonsecaea* E OUTRAS ESPÉCIES FÚNGICAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AMBIENTAL UTILIZADAS NESTE ESTUDO (continua).

CMRP	CBS	Espécie	Origem	Localização	Referências
CMRP3416	-	<i>C. albicans</i>	Ambiental	Brasil/PR	Zamarchi, 2019
CMRP2383	160.54 <sup>I</sup>	<i>C. carrionii</i>	Humano	Austrália	Hoog et al., 2007
CMRP2959	-	<i>C. halotolerans</i>	Ambiental	Brasil/PR	Zamarchi, 2019
CMRP1724	126869	<i>C. imunda</i>	Ambiental	Brasil/MA	Vicente et al., 2014
CMRP1317 <sup>T</sup>	-	<i>C. ludoviensis</i>	Humano	Brasil/MA	Gomes et al., 2016
CMRP2768	207.35 <sup>I</sup>	<i>E. dermatitidis</i>	Humano	Japão	Untereiner and Naveau, 1999
CMRP2382	119710 <sup>T</sup>	<i>F. brasiliensis</i>	Animal	Brasil/SE	Vicente et al., 2012
CMRP1635	125763 <sup>T</sup>	<i>F. erecta</i>	Ambiental	Brasil/MA	Vicente et al., 2014
CMRP1655	269.37 <sup>T</sup>	<i>F. monophora</i>	Humano	África do Sul	Prenafeta-Boldú et al., 2006
CMRP1640	980.96 <sup>I</sup>	<i>F. multimorphosa</i>	Animal	Austrália	Sun et al., 2010
CMRP1657	269.64 <sup>T</sup>	<i>F. nubica</i>	Ambiental	Camarões	Najafzadeh et al., 2010
CMRP1654	271.37 <sup>T</sup>	<i>F. pedrosoi</i>	Humano	África do Sul	Hoog et al., 2004
CMRP 1343	139214 <sup>T</sup>	<i>F. pugnacius</i>	Humano	Brasil/MA	Azevedo et al., 2015
24A	-	<i>H. capsulatum</i>	Humano	Brasil/PR	Furuie et al., 2015
CMRP2968	-	<i>Penicillium</i> sp	Ambiental	Brasil/PR	Zamarchi, 2019

QUADRO 2 – ESPÉCIES DE *Fonsecaea* E OUTRAS ESPÉCIES FÚNGICAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AMBIENTAL UTILIZADAS NESTE ESTUDO (conclusão).

CMRP	CBS	Espécie	Origem	Localização	Referências
CMRP1171	-	<i>S. brasiliensis</i>	Animal	Brasil/PR	Fernandes et al., 2018

T – linhagem referencia

FONTE: O autor (2018).

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Vicente et al., 2013. Aproximadamente, 1 cm<sup>2</sup> de cultura com 14 a 21 dias de crescimento foi transferida para um tubo tipo Eppendorf® de 2 mL contendo 400 µL de tampão de extração e *beads* de vidro. O material fúngico foi homogeneizado em vórtex durante 1 minuto. Subsequentemente foram adicionados 120 µL de SDS a 10% e 10 µL de proteinase K e incubados durante 30 minutos a 55 °C e na sequência a amostra foi agitada em vórtex durante 3 minutos. Após a adição de 120 µL de NaCl 5 M e 1/10 volumes de tampão CTAB a 10%, a amostra foi incubado durante 60 minutos a 55 °C. Subsequentemente, a mistura foi agitada em vórtex durante 3 minutos e na sequência misturada cuidadosamente 800 uL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) a 24:1, sendo posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 16000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo Eppendorf® de volume de 2 mL com 225 µL de acetato de amônio 5 M, misturado cuidadosamente por inversão, incubado overnight em freezer. Em seguida, foi centrifugado durante 10 minutos a 16000 g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo Eppendorf®, sendo posteriormente adicionado delicadamente com 500 µL álcool 96% e centrifugado durante 10 minutos a 16000 g. Por fim, o pellet foi lavado com 500 µL de etanol a 70% gelado e após período de secagem à temperatura ambiente, foi ressuspenso em 100 µL de água Ultrapura.

### 3.3 PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA

#### 3.3.1 Sequência gênica e desenho de oligonucleotídeos

As sequências nucleotídicas do gene CBF5 dos isolados referência, de isolados clínicos associadas à cromoblastomicose ou filogeneticamente próximas

que simulem a manifestação clínica da cromoblastomicose e isolados ambientais no banco de dados do CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures/Fungal Biodiversity Centre) e Genbank, foram utilizadas para seleção de regiões gênicas específicas de cada espécie e para o desenho dos oligonucleotídeos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (APÊNDICE 1). As sequências nucleotídicas foram alinhadas com o software MAFFT Versão 7 (KATO; STANDLEY, 2013), e os alinhamentos da sequência do gene CBF5 foram corrigidos manualmente com o software, MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

As sequências foram utilizadas para ensaios *in silico* cuja finalidade foi identificar sítios conservados ou divergentes intraespecificamente com base no previamente descrito por (RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2015). Com base em polimorfismos nucleotídicos, foram escolhidas manualmente regiões com variações de 18 a 25 nucleotídeos. O software, PRIMER3 (UNTERGASSER et al., 2012), foi utilizado para avaliar temperaturas de fusão, percentual de conteúdos de CG, sequências de dímeros e erros nas sequências escolhidas. Em seguida, os oligonucleotídeos escolhidos foram avaliados no software MFOLD (ZUKER, 2003) para possível formação de estruturas secundárias. Por fim, foram selecionados os oligonucleotídeos.

### 3.3.2 Ensaios *in silico*

Os oligonucleotídeos ainda foram avaliados com PCR *in silico*, e os mesmos selecionados para especificidade por meio do programa Primer de acordo com Rodrigues, Hoog e Camargo (2015).

### 3.3.3 Otimização de amplificação

O DNA total das espécies de *Fonsecaea* e das cepas controle foram utilizados como molde nas reações de PCR para cada par de oligonucleotídeos específicos. As reações foram realizadas num volume final de 25 µL, incluindo 10 µL de tampão PCR Master Mix, constituído por 2 - 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 400 mM cada e Taq Polimerase 50 U/mL; 5,6 µL de água, 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos universal e reverso (10 pmol/µL) e 2 µL de DNA alvo (30 ng/µL). As condições de PCR foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 1 minuto a 95

°C, 1 minuto à temperatura de anelamento a ser definida pelo programa Primer3 (específica para cada conjunto de oligonucleotídeos) e 1 minuto a 72 °C; extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,6%.

#### 3.3.4 Ensaio de sensibilidade

A sensibilidade de cada par de oligonucleotídeos foi avaliada por meio de PCR específica utilizando diluições em série de 10 vezes do DNA foram realizadas, a partir da concentração de 30 ng/μL até 0,03 fg/μL a fim de assegurar a amplificação confiável em baixos níveis do DNA alvo.

### 3.4 SONDA CADEADO E AMPLIFICAÇÃO DE CÍRCULO ROLANTE (RCA)

#### 3.4.1 Seleção de região gênica de anelamento da sonda de *F. pugnacius*

Para a seleção da região de anelamento da sonda, foram utilizadas as sequências disponíveis no GenBank da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr de duas linhagens de *F. pugnacius* (APÊNDICE 2) (GOMES et al., 2016). Além dessas, foram analisadas sequências nucleotídicas de outras espécies fúngicas relacionadas a cromblastomicose e outras doenças de implantação, ou que simulem a manifestação clínica da cromblastomicose, a fim de garantir a especificidade do alvo.

#### 3.4.2 Desenho da sonda cadeado

As sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr de duas linhagens de *Fonsecaea pugnacius* foram alinhadas e ajustadas manualmente usando MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) com a finalidade de identificar posições de polimorfismo único potenciais nucleotídeos chave para o fechamento da sonda a ser construída. A fim de aumentar a eficiência ao DNA alvo, a sonda cadeado foi desenhada com estrutura secundária mínima e com temperatura de melting (T<sub>m</sub>) da extremidade 5' perto ou acima da temperatura de ligação (63 °C). Para melhorar a especificidade, a extremidade 3' foi desenhada com T<sub>m</sub> de 10-15 °C abaixo da temperatura de ligação conforme recomendado por Najafzadeh et al. (2018).

### 3.4.3 Ensaio *in silico* e ensaios *in vitro*

A sonda foi avaliada por meio de PCR *in silico*, uma vez que as mesmas foram selecionadas para especificidade com o programa Primer-BLAST (YE et al., 2012; RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2015). Para os ensaios *in vitro* o DNA das amostras de *F. pugnacius* e das amostras controle (TABELA 1) foi amplificado por meio dos oligonucleotídeos V9G e LS266 com base no previamente relatado por (SUN et al., 2010). A PCR será realizada num volume de 12,5 µL de uma mistura reacional contendo Tampão de PCR 1x, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 µM dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de BioTaq DNA polimerase e 30 ng de DNA genômico (GOMES et al., 2016). A amplificação será realizada nas seguintes condições: 95°C por 4 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; e 72°C por 7 minutos.

### 3.4.4 Ligação da sonda

A reação de ligação da sonda cadeado à sequência alvo foi realizada utilizando um volume de 1 µL do produto da reação de PCR e em seguida adicionado a 2 U de pfu DNA ligase e 0.1 µM da sonda cadeado em 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 1mM DTT num volume total de reação de 10 µL. A ligação de múltiplo ciclo foi conduzida com um ciclo de 5 minutos a 95 °C seguido de 5 ciclos de 95 °C durante 30 segundos e 4 minutos de ligação a 63 °C (NAJAFZADEH et al., 2013; TEHRANI et al., 2014). A verificação da ligação da sonda foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (VOIDALESKI, 2018).

### 3.4.5 Exonucleólise

Os resíduos de sonda não ligada e o produto de PCR molde foram removidos por exonucleólise realizando uma reação com volume final de 10 µL contendo 10 U de exonuclease I e III por reação, tendo como condições de incubação 37 °C por 30 minutos, seguido por 94 °C por 3 minutos a fim de inativar a reação.

#### 3.4.6 Reação de amplificação em círculo rolante

Dois microlitros do produto de ligação foram usados como molde para a reação de RCA. As reações foram realizadas em um volume de 12  $\mu\text{L}$ , contendo 8 U de Bst DNA polimerase, 400  $\mu\text{M}$  da mistura de dNTP e 10 pmoL de cada iniciador do RCA em água destilada. A circularização da sonda foi amplificada através de incubação a 65 °C por 60 minutos, seguidos de 2 minutos a 85 °C. A acumulação dos produtos de DNA dupla fita foi visualizada por eletroforese em gel de agarose a 1,6%. Reações positivas eram detectadas pela visualização de um padrão de banda “em escada” semelhante ao Ladder.

#### 3.4.7 Ensaio de sensibilidade e limite de detecção

A sensibilidade da sonda foi avaliada a fim de assegurar a amplificação em baixos níveis de DNA alvo. Diluições em série de 10 vezes do DNA amplificado foram realizadas, iniciando a partir de concentrações de 2 ng/ $\mu\text{L}$  até 0,02 fg/ $\mu\text{L}$ . O protocolo para reação de ligação foi descrito no item 4.5.5. O número de cópias de DNA foi calculado com base no número de Avogadro usando a equação:  $(\text{ng}/\mu\text{L} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{pb} \times 1 \times 10^9 \times 650)$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS E PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA *in vitro*

Para o desenho dos oligonucleotídeos FOMO, FONU, FOPE, FOPU foi utilizado uma região do gene CBF5 (Centromere microtubule-binding protein) do DNA responsável pela produção da proteína centromere/microtubule-binding *cbf5* (CBF5). A mesma foi escolhida com base em análise de transcriptoma da espécie *F. monophora* desenvolvidos por Gomes e Vicente (2018).

A partir do desenho dos oligonucleotídeos com bases na região CBF5 (Centromere/microtubule-binding protein *cbf5*) do gene DNA foram obtidos os oligonucleotídeos iniciadores FOMO, FONU, FOPE e FOPU para as espécies *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pedrosoi* e *F. pugnacius*, respectivamente. A sequência e características destes marcadores foram apresentados na tabela 2.

Ensaio *in silico* foram realizados para a avaliação da existência de dímeros, *harpin* e percentual de guanina e citosina utilizando a plataforma Primer-BLAST (YE et al., 2012), no National Center for Biotechnology Information (NCBI), PCR Primer Stats (STOTHARD, 2000) e IDT (Integrated DNA Technologies), e os resultados demonstraram que cada conjunto de primer apresentava especificidade a nível de espécie (QUADRO 1).

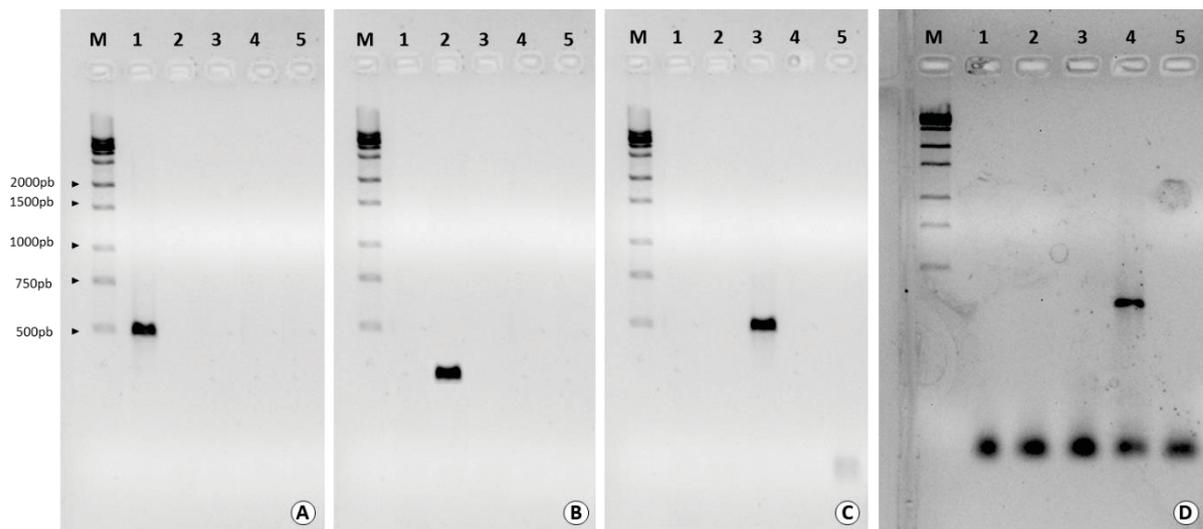
QUADRO 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS DELINEADOS NESTE ESTUDO.

Oligos	Sequência (5' – 3')	Tm (°C)	%GC	Fragmento	Espécie alvo
FOMO_F	TAAGCGCATATTGCGGGTAGAGAA	62,3	45,8	907 pb	<i>F. monophora</i>
FOMO_R	AAAGCGGATGAGAGGAAGTGG	60	52,3		
FONU_F	AAGTCCCCAAACGGAACACT	59,4	50	363 pb	<i>F. nubica</i>
FONU_R	CAGCAGCAATCCCAGGTGTA	60,0	50		
FOPE_F	AGCTCCAATTAACGTGACAATTC	57,7	40	500 pb	<i>F. pedrosoi</i>
FOPE_R	TGACCCAGAAAACGCCAAGA	59,8	50		
FOPU_F	CGATTCCTGTTGGTTGCAC	57,2	52,2	351 pb	<i>F. pugnacius</i>
FOPU_R	TGAGAGGAGGTCGTTGAAATAGT	58,9	43,4		

FONTE: O autor (2018).

Para padronização de ensaios *in vitro*, foram testadas diferentes condições para as reações de PCR específica como gradiente de temperatura (50 – 65 °C) e diferentes concentrações de DNA, oligonucleotídeos e MgCl<sub>2</sub> (Cloroeto de Magnésio). Cada par de oligonucleotídeos apresentou características específicas sendo elas apresentadas na figura 9 (A-D) e sumarizadas e no quadro 3.

FIGURA 9 – REAÇÃO DE PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA NAS ESPÉCIES DE *Fonsecaea* AGENTES DE CROMOBLASTOMICOSE



**A.** Produto da reação de PCR específica: **A.** *F. monophora*; **B.** *F. nubica*; **C.** *F. pedrosoi*. **D.** *F. pugnacius*. Sendo M – Ladder 1kB; 1 – *F. monophora*; 2 – *F. nubica*; 3 – *F. pedrosoi*; 4 – *F. pugnacius*; 5 – branco; FONTE: O autor (2018).

QUADRO 4 – CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA REAÇÃO ESPÉCIE ESPECÍFICA DOS OLIGOS DESENHADOS NESTE ESTUDO.

Oligos	Sequência (5' – 3')	DNA	MgCl <sub>2</sub>	Anelamento	Fragmento
FOMO_F	TAAGCGCATATTGCGGGTAGAGAA	30ng	2mM	60 °C	970 pb
FOMO_R	AAAGCGGATGAGAGGAAGTGG				
FONU_F	AAGTCCCCAAACGGAACACT	30ng	2,5mM	58 °C	363 pb
FONU_R	CAGCAGCAATCCCAGGTGTA				
FOPE_F	AGCTCCAATTAACGTGACAATTC	15ng	2mM	62 °C	500pb
FOPE_R	TGACCCAGAAAACGCCAAGA				
FOPU_F	CGATTCTGTTGGTTGCAC	30ng	2mM	58° C	351 pb
FOPU_R	TGAGAGGAGGTCGTTGAAATAGT				

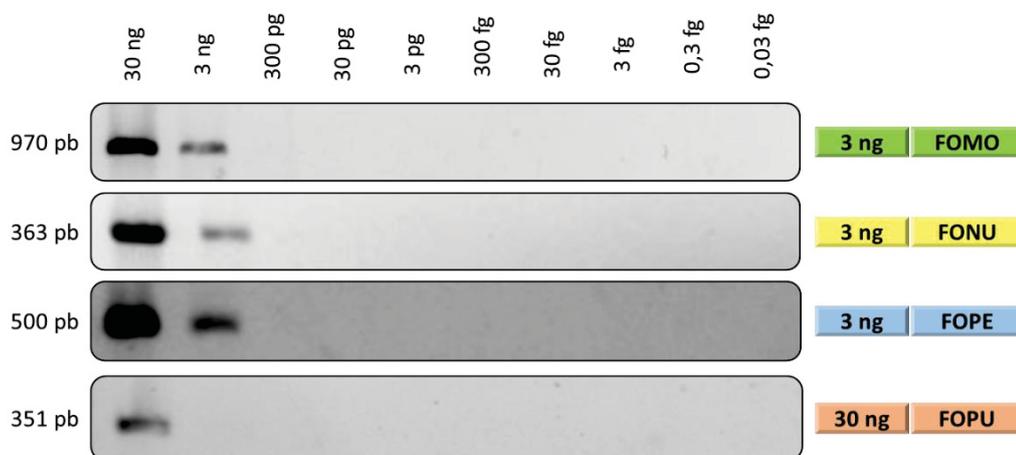
F – universal; R – reverso; FOMO – *F. monophora*; FONU – *F. nubica*; FOPE – *F. pedrosoi*; FOPU – *F. pugnacius*. FONTE: O autor (2018).

Embora as espécies *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pedrosoi* e *F. pugnacius* sejam consideradas crípticas, e muito próximas considerando a variabilidade

genética da região ITS, para a região do gene CBF5 observou-se que os primers específicos desenhados geraram fragmentos de tamanho diferentes o que possibilita a identificação efetiva das espécies. Os ensaios *in vitro* demonstram que o oligonucleotídeo específico de *F. monophora* apresentava tamanho de fragmento menor do que o tamanho de fragmento esperado. Como relatado por (NOCKER; BURR; CAMPER, 2007), o diferencial existente no produto de amplificação esperado e o amplificado não é relatado na literatura, uma vez que, dependendo do iniciador, há a possibilidade de promover a amplificação de fragmentos de até 5kB. Logo, entende-se que esta variação é própria do par de iniciadores desenhado neste estudo, levando em consideração aspectos como formação de grande quantidade de dímeros e *harpin* e diferenças na temperatura de *melting* ( $T_m$ ) das extremidades 3' e 5' (WANG; SEED, 2006).

No entanto, como houve diferença disparidade entre o tamanho de fragmentos esperados e obtidos, os produtos das reações de PCR foram submetidas a sequenciamento e assim, confirmadas quanto à especificidade e região alvo. Além disso, os ensaios de sensibilidade demonstraram que o oligonucleotídeo espécie-específicos FOPUG é capaz de detectar até 30ng de DNA por  $\mu\text{L}$  de amostra e os oligonucleotídeo espécie-específicos FOM, FON E FOPE de detectar até 3ng de DNA por  $\mu\text{L}$  de amostra (FIGURA 10).

FIGURA 10 – ENSAIO DE SENSIBILIDADE PARA AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPÉCIE-ESPECÍFICO em *Fonsecaea* spp.



Oligonucleotídeos específicos: FOMO (*F. monophora*), FONU (*F. nubica*), FOPE (*F. pedrosoi*), FOPU (*F. pugnacius*) testados em diluição seriada de 10x. FONTE: O autor (2018).

Estudos relacionados à identificação específica em nível de gênero destes patógenos tem sido desenvolvidos com a finalidade de distinguir agentes etiológicos de cromoblastomicose pertencentes ao gênero *Fonsecaea* de outros gêneros agentes causais da doença. Uma das metodologias utilizadas para caracterização a nível de espécie que pode ser citada é a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos (ABLIZ et al., 2003). Abliz et al., (2003), Andrade et al., (2007), desenvolveram oligonucleotídeos espécie específicos baseados na região gênica ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr para a espécie *F. pedrosoi* e espécies do gênero *Fonsecaea*, respectivamente. A região espaçador interno transcrito (ITS) é conservada e pouco polimórfica dentro do filo Ascomycota sendo muito utilizada para a diferenciação filogenética entre espécies fúngicas (HADZIAVDIC et al., 2014). Entretanto, os agentes causais de cromoblastomicose pertencentes ao gênero *Fonsecaea* são considerada espécies crípticas muito próximas filogeneticamente, o que faz da região supracitada um local com grandes limitações para o desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos. Sendo assim, neste estudo, a partir de dados transcriptômicos ainda não publicados (GOMES;VICENTE, 2018), foi possível buscar genes com importância significativa no processo infeccioso causado por *F. monophora*.

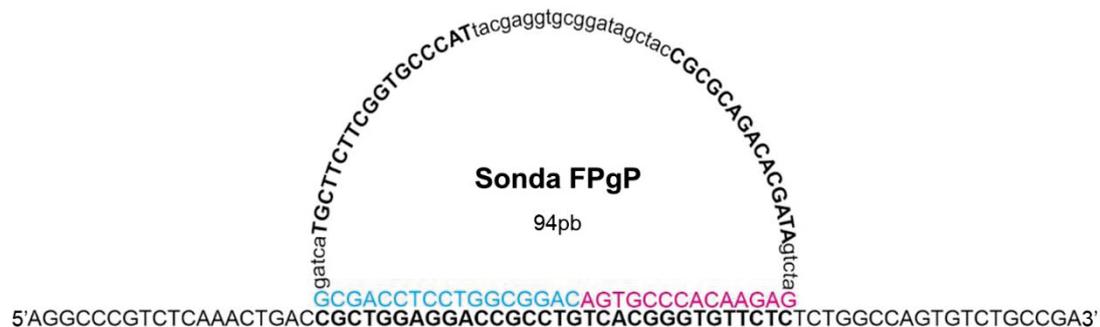
A reação de PCR constitui-se em um instrumento diagnóstico valioso, notadamente no caso de doenças infecciosas, devido à sua capacidade em detectar agentes com maior sensibilidade e especificidade (NOCKER; BURR; CAMPER, 2007). A identificação morfológico de colônias nem sempre se correlaciona com ensaios moleculares para alguns isolados de *Fonsecaea*, provavelmente devido ao alto pleomorfismo dos fungos dematiáceos (HOOG et al., 2004). Portanto, métodos baseados em PCR com marcadores espécie específicos e outros métodos moleculares são procedimentos mais precisos e com maior acuracidade para a identificação do gênero *Fonsecaea*, particularmente para isolados com baixa conidiogênese (ANDRADE et al., 2007).

#### 4.2 DESENHO DE SONDA CADEADO E RCA

Para o desenho da sonda cadeado FPgP foi utilizado a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr com base no descrito previamente por Najafzadeh (2011) para *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*. A partir desta metodologia empregada obteve-

se uma sonda cadeado com 94 pb de sequência (5'P – cagggcggctctccagcggatca **TGCTTCTTCGGTGCCCAT**tacgaggtgcggatagctac**CGCGCAGACACGATA**gtctagaga acacccgtga3') e com temperatura das extremidades 3' e 5' igual a 47,4 °C e 62,4 °C, respectivamente (FIGURA 11). A fim de avaliar e confirmar a especificidade da mesma foi realizado ensaios *in silico* uma vez que esta foi submetida à plataforma Primer-BLAST (YE et al., 2012), no National Center for Biotechnology Information (NCBI), e testada perante diferentes banco de dados como, Ref-Seq mRNA, Genome (reference assembly from selected organisms and chromosomes from all organisms), e non-redundant, incluindo Eukarya (taxid:2759), Fungi (taxid:4751), Bacteria (taxid:2), and Viruses (taxid:10239) e os resultados demonstraram que a sonda desenhada era específica para a espécie *Fonsecaea pugnacius*. Atualmente, sondas para diferentes espécies de fungos dematiáceos tem sido testadas para *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pedrosoi* (NAJAFZADEH et al., 2011), *E. angulospora*, *E. aquamarina*, *E. castellanii*, *E. equina*, *E. dermatitidis*, *E. jeanselmei*, *E. oligosperma*, *E. opportunistica*, *E. pisciphila*, *E. salmonis*, *E. spinifera* e *E. xenobiotica* (NAJAFZADEH et al., 2013, 2018).

FIGURA 11 – SONDA CADEADO COM INICIADORES RCA PARA A ESPÉCIE *Fonsecaea pugnacius*.



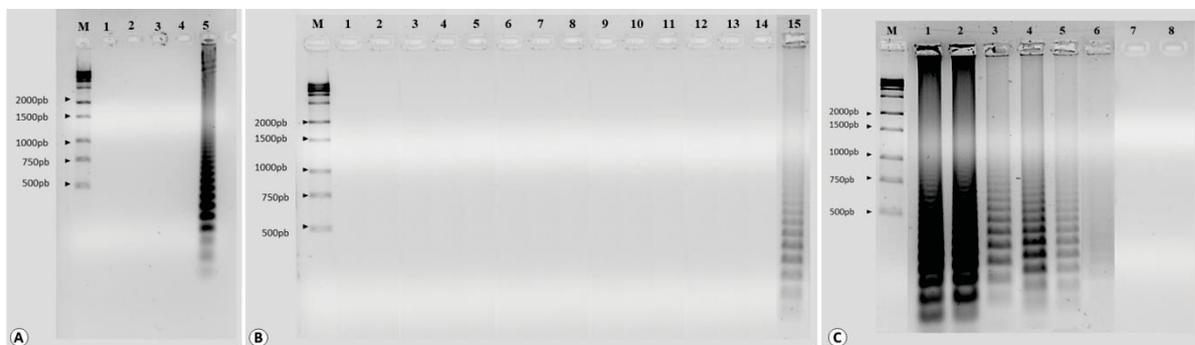
Nucleotídeos sinalizados correspondem ao local de anelamento na região ITS1-5,8s-ITS2 do DNAr.  
FONTE: O autor (2018).

Os produtos de PCR das mesmas foram avaliados quali-quantitativamente e com base em testes previamente realizados por Voidaleski (2018), os mesmos foram diluídos em concentrações de 2, 1,5, 1 e 0,5 ng/μL com o intuito de encontrar a concentração padrão de melhor eficácia da sonda FOPG. O melhor resultado nas reações de ligação para especificidade da mesma foi encontrado quando utilizado

sonda em concentração de  $10^{-5}$   $\mu$ M e produtos de PCR diluído a 2 ng/ $\mu$ L (Figura 12A e 12B), quando comparado as demais condições testadas.

Uma vez que se estabeleceu o “padrão ouro” de amplificação da sonda, deu-se a avaliação do nível de sensibilidade da mesma, realizando diluições em série de 10 vezes do DNA amplificado, começando com 2ng/ $\mu$ L e terminando com 0,02fg/ $\mu$ L. Submetendo as diluições as condições da reação de ligação e RCA descritas nos itens 4.5.5 e 4.5.7, respectivamente, obteve-se padrão de amplificação em escada até a diluição  $10^{-5}$  (Figura 12C). Logo, o número de cópias por reação se deu a partir do cálculo com base no número de Avogadro resultando em  $2,87 \times 10^9$  cópias de DNA. O resultado obtido indica que a sonda FOPG é mais sensível do que as sondas HcPL2 e FOP padronizada em estudos realizados por Furuie et al. (2015) e Voidaleski (2018), respectivamente, pois é capaz de diagnosticar e reconhecer fragmentos menores quando equiparado à sensibilidade das sondas cadeado supracitadas.

FIGURA 12 – PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO DA SONDA CADEADO FPgP POR RCA PARA AS ESPÉCIES DE *Fonsecaea* DE ORIGEM CLÍNICA E AMBIENTAL



(A) M – Ladder 1Kb; 1 – *F. erecta*; 2 – *F. pedrosoi*; 3 – *F. monophora*; 4 – *F. nubica*; 5 – *F. pugnacius*; (B) M – Ladder 1Kb; 1 – *F. brasiliensis*; 2 – *F. monophora*; 3 – *F. multimorphosa*; 4 – *F. nubica*; 5 – *F. pedrosoi*; 6 – *Cladophialophora immunda*; 7 – *C. carrionii*; 8 – *Cladosporium halotoleran*; 9 – *Candida albicans*; 10 – *Penicillium* sp; 11 – *Cyphellophora ludoviensis*; 12 – *Exophiala dermatitidis*; 13 – *Sporothrix brasiliensis*; ao 14 – *Histoplasma capsulatum*; 15 – *Fonsecaea pugnacius*; (C) Ensaios de sensibilidade da sonda RCA FPgP usando amplicons da região ITS de *F. pugnacius* conforme mostrado nas faixas M – Ladder 1Kb; 1 –  $2,87 \times 10^9$ ; 2 –  $2,87 \times 10^8$ ; 3 –  $2,87 \times 10^7$ ; 4 –  $2,87 \times 10^6$ ; 5 –  $2,87 \times 10^5$ ; 6 –  $2,8 \times 10^4$ ; 7 –  $2,8 \times 10^3$ ; 8 –  $2,8 \times 10^2$ . FONTE: O autor (2018).

A amplificação em círculo de rolamento é um processo enzimático isotérmico onde um oligonucleotídeo pequeno de DNA/RNA é amplificado para formar um DNA/RNA de fita longa usando um molde circular (ALI et al., 2014). Ao desenhar um molde para a reação de RCA, como exemplo a sonda cadeado, o molde pode ser

personalizados para incluir sequências funcionais como aptâmeros de DNA (ZHANG et al., 2013), DNAzimas (DONG et al., 2013), domínios espaçadores (ZHANG et al., 2013) e enzimas de restrição (ZHAO et al., 2006). Além disso, materiais multifuncionais com diversas propriedades, incluindo bioreconhecimento, sensoriamento e imagem podem ser facilmente elaborados por hibridação de produtos RCA com oligonucleotídeos complementares associados a porções funcionais, incluindo fluoróforos, biotina, anticorpos e nanopartículas (LINCK et al., 2012).

A amplificação em círculo rolante (RCA) pode amplificar um fragmento de ligação mais de mil vezes, tornando-o ideal para inúmeras aplicações que exigem detecção ultrasensível. A natureza isotérmica desta técnica fornece novas possibilidades para diagnósticos em pronto-atendimentos, quando comparado a outras técnicas, como a PCR, que necessita de instrumentos sofisticados e caros, como exemplo o termociclador. Devido a estas características atraentes, uma variedade de plataformas baseadas em RCA foram desenvolvidas para detectar uma ampla diversidade de alvos, incluindo DNA, RNA, SNP, proteínas, patógenos e células doentes (ALI et al., 2014).

A detecção de sequências específicas de DNA ou RNA e a análise de variações de ponto único no DNA, por exemplo, SNPs, são de grande interesse para a área médica, identificando variações genéticas e direcionando o diagnóstico. Existem dois métodos comuns de RCA usados para detectar ácidos nucleicos. No primeiro, os ácidos nucleicos alvo podem servir como iniciador para induzir a formação de produtos de RCA através de um molde de DNA circular pré-fabricado (MASHIMO et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2010). Na segunda metodologia, a qual foi empregada neste trabalho, os ácidos nucleicos alvos são usados como um *link* para conectar as extremidades de um oligonucleotídeo de DNA circularizável ("sonda cadeado") seguido por oligonucleotídeos de RCA, utilizando o mesmo alvo que o iniciador ou adicionando um iniciador de DNA curto externo. Para circularizar a sonda cadeado a ser utilizada no processo RCA, é essencial que ambas as extremidades da mesma sejam totalmente hibridizadas com os ácidos nucleicos alvos, proporcionando assim seletividade extremamente alta (ALI et al., 2014).

Um dos objetivos do presente estudo foi iniciar uma técnica de identificação baseada em RCA para detecção altamente específica e rápida da espécie *Fonsecaea pugnacius*, descrito como novo agente causal de cromoblastomicose por

Azevedo et al. (2015). O método RCA teve bom desempenho e reprodutibilidade relatados em diversos estudos realizados dentro do filo Ascomycota, como por exemplo, em *Candida*, *Aspergillus*, *Scedosporium* (ZHOU et al., 2008), *Cryptococcus* (TRILLES et al., 2014), *Trichophyton* (KONG et al., 2008), *Fusarium* (DAVARI et al., 2012), *Exophiala* patogênico em humanos (NAJAFZADEH et al., 2013), *Talaromyces marneffeii* (SUN et al., 2011), *Scedosporium* (LACKNER et al., 2012), *Rhizopus* (DOLATABADI; NAJAFZADEH; HOOG, 2014) e *Fonsecaea* (NAJAFZADEH et al., 2011). Uma alternativa de baixo custo à RCA pode ser a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). Esta técnica utiliza um conjunto de seis iniciadores oligonucleotídicos com oito locais de união que se hibridizam particularmente com várias partes de um gene alvo (SUN et al., 2010). Najafzadeh et al. (2011) compararam a detecção de RCA e LAMP para espécies de *Fonsecaea* patogênicas humanas e constataram que o LAMP era extremamente sensível, mas o RCA se tornou mais específico.

Resultados parciais para avaliação de carga fúngica indicam a capacidade invasiva e de disseminação do patógeno, uma vez pode-se encontrar os mesmos em amostras de sangue e coxim plantar. Ainda assim, análises histopatológicas estão em andamento. Embora haja um gasto considerável para a confecção da sonda cadeado, sabe-se ainda que toda a técnica de RCA é susceptível a adaptação, o que contribui para que essa metodologia possa ser implementada como exame laboratorial de rotina para doenças fúngicas.

Acredita-se que estes marcadores moleculares específicos podem ser utilizados com a finalidade de detecção molecular, estudos epidemiológicos e, aliados a avaliação de carga fúngica e análise de citocinas pró-inflamatórias, caracterizar a evolução clínica. Sendo assim, espera-se que sejam desenvolvidos estudos direcionados a aplicação desses marcadores em amostras biológicas sendo elas provenientes de material animal como, camundongos (BALB/c e C57/BL6), ratos Wistar e larvas de *Tenebrio molitor*; e provenientes de tecido humano como biópsia de lesão cutânea humana e/ou animal e abscessos cerebrais.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo, os oligonucleotídeos específicos FOMO, FONU, FOPE e FOPU e a sonda FPgP demonstraram-se eficientes perante análises, *in silico* e *in vitro*, sendo passível de utilização para identificação e detecção rápida e específica de agentes de cromoblastomicose causada por espécies de *Fonsecaea*, permitindo as seguintes conclusões:

- O gene CBF5 se demonstrou suficientemente polimórfico para que fosse possível o desenvolvimento de iniciadores espécie específico utilizando o mesmo como molde.
- Apesar de a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr apresentar pouca variação interespecífica para as espécies de *Fonsecaea*, foi possível o desenvolvimento de uma sonda cadeado RCA para a espécies *Fonsecaea pugnacius*.
- Os ensaios *in silico* e *in vitro* realizados demonstraram que tanto os oligonucleotídeos espécie específicos FOMO, FONU, FOPE e FOPU e quanto a sonda cadeado RCA, FPgP, são específicos quanto as espécies alvos respectivas, agentes de cromoblastomicose.
- Ensaio de especificidade e sensibilidade para os marcadores demonstraram resultados promissores para que futuramente seja feita a detecção destes patógenos em amostras biológicas, contribuindo intrinsecamente para avanços em estudos epidemiológicos e diagnósticos.

Mycopathologia (2019) 184:493–504  
<https://doi.org/10.1007/s11046-019-00359-2>



ORIGINAL ARTICLE

## **New Molecular Markers Distinguishing *Fonsecaea* Agents of Chromoblastomycosis**

**Gabriela X. Schneider · Renata R. Gomes · Amanda Bombassaro ·  
Kassielly Zamarchi · Morgana F. Voidaleski · Flávia F. Costa · Aniele C. R. Leão ·  
Bruna J. F. S. Lima · Bruna S. Soley · Israela R. Colombo · Giovanna Z. Cândido ·  
Mohammad J. Najafzadeh · Jiufeng Sun · Conceição M. P. S. de Azevedo ·  
Sirlei G. Marques · G. Sybren de Hoog · Vânia A. Vicente**

Received: 11 April 2019 / Accepted: 1 July 2019 / Published online: 17 July 2019  
© The Author(s) 2019

## REFERÊNCIAS

ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NIEDA, N.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 873-876, 2003. doi: 10.1128/JCM.41.2.873-876.2003.

ALI, M. M.; LI, F.; ZHANG, Z.; ZHANG, K.; KANG, D. K.; ANKRUM, J. A.; LE, X. C.; ZHAO, W. Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 10, p. 3324-3341, 2014. doi: 10.1039/c3cs60439j.

ALVES, M. J. **Estudo de fungos melanizados em amostras ambientais de áreas rurais do Amazonas e avaliação da sua relação com os fungos melanizados causadores de micose**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

ALVIANO, D. S.; KNEIPP, L. F.; LOPES, A. H.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 689-695, 2003. doi: 10.1016/j.resmic.2003.09.002.

ANDRADE, T. S.; CURY, A. E.; CASTRO, L. G. M.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 3, p. 267-272, 2007. doi: 10.1016/j.diagmicro bio.2006.08.024.

ARAÚJO, D. P. **Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de Itraconazol em pacientes com cromoblastomicose**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Da Saúde, Belém, 2008.

AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; NASCIMENTO, M. M. F.; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; HOOG, G. S. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2674-2685, 2015a. doi: 10.1128/JCM.00637-15.

AZEVEDO, C. M. P. S.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; SILVA, R. R.; SILVA, N. F.; SANTOS, D. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1500-1504, 2015b. doi: 10.1093/cid/civ104.

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; HOOG, G. S. de. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 175-91, 2008. doi: 10.3114/sim.2008.61.18.

BITTENCOURT, A. L.; LONDERO, A. T.; ANDRADE, J. A. Cromoblastomicose

auricular: Relato de um caso. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 36, n. 4, p. 381-383, 1994.

BONIFAZ, A.; DAVOUDI, M. M.; HOOG, G. S. de; PADILLA-DESGARENNES, C.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; NAVARRETE, G.; MEIS, J. F.; BADALI, H. Severe disseminated phaeohyphomycosis in an Immunocompetent patient caused by *Veronaea botryosa*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 497-503, 2013. doi: 10.1007/s11046-013-9632-5.

BRUN, S.; ZUMELZU, C.; HOANGANH, M. B.; LEVY, A.; GARCIA-HERMOSO, D.; LAROCHE, L.; IZRI, A. First case of chromoblastomycosis from Bangladesh. **Medical Mycology Case Reports**, v. 10, p. 1-3, 2015. doi: 10.1016/j.mmcr.2015.08.001.

CAMARA-LEMARROY, C. R.; SOTO-GARCIA, A. J.; PRECIADO-YEPEZ, C. I.; MORENO-HOYOS, F.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, P. A.; GALARZA-DELGADO, D. A. Case of chromoblastomycosis with pulmonary involvement. **Journal of Dermatology**, v. 40, n. 9, p. 746-748, 2013. doi: 10.1111/1346-8138.12216.

CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis and related infections: new concepts, differential diagnosis, and nomenclatorial implications. **International Journal of Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 27-32, 1975. doi: 10.1111/j.1365-4362.1975.tb00074.x.

CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1255-1282, 1950. doi: 10.1111/j.1749-6632.1950.tb39826.x.

CHAABANE, H.; MSEDDE, M.; CHARFI, S.; CHAARI, I.; BOUDAWARA, T.; TURKI, H. Chromoblastomycose: lésion solitaire du sein. **La Presse Médicale**, v. 44, n. 7-8, p. 842-843, 2015. doi: 10.1016/j.lpm.2015.04.027.

CORREIA, R. T. M.; VALENTE, N. Y. S.; CRIADO, P. R.; MARTINS, J. E. D. C. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 448-454, 2010. doi: 10.1590/S0365-05962010000400005.

DAVARI, M.; DIEPENINGEN, A. D. V.; BABAI-AHARI, A.; ARZANLOU, M.; NAJAFZADEH, M. J.; VAN DER LEE, T. A. J.; HOOG, G. S. de. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 1, p. 63-70, 2012. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.017.

DEMIDOV, V. V. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 2, n. 6, p. 542-548, 2002. doi: 10.1586/14737159.2.6.542.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, v. 34, n. 1-2, p. 1-18, 1991. doi: /10.1111/j.1439-0507.1991.tb00613.x.

DOLATABADI, S.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S. de. Rapid screening for

human-pathogenic Mucorales using Rolling Circle Amplification. **Mycoses**, v. 57, p. 67-72, 2014. doi: 10.1111/myc.12245.

DONG, B.; TONG, Z.; LI, R.; CHEN, S. C. A.; LIU, W.; LIU, W.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; DUAN, Y.; LI, D.; CHEN, L. Transformation of *Fonsecaea pedrosoi* into sclerotic cells links to the refractoriness of experimental chromoblastomycosis in BALB/c mice via a mechanism involving a chitin-induced impairment of IFN- $\gamma$  production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 1-31, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006237.

DONG, H.; WANG, C.; XIONG, Y.; LU, H.; JU, H.; ZHANG, X. Highly sensitive and selective chemiluminescent imaging for DNA detection by ligation-mediated rolling circle amplified synthesis of DNAzyme. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 348-353, 2013. doi: 10.1016/j.bios.2012.08.050.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 148-152, 2006. doi: 10.1097/01.qco.0000216625.28692.67.

FENG, P.; HOOG, S. G. de. *Fonsecaea* and chromoblastomycosis. **Current Progress in Medical Mycology**, p. 333-353, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-64113-3\_11.

FENG, P.; KLAASEN, C. H. W.; MEIS, J. F.; NAJAFZADEH, M. J.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; XI, L.; HOOG, G. S. Identification and typing of isolates of *Cyphellophora* and relatives by use of amplified fragment length polymorphism and rolling circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 931-937, 2013. doi: 10.1128/JCM.02898-12.

FERNANDES, B.; CALIGIORNE, R. B.; COUTINHO, D. M.; GOMES, R. R.; ROCHA-SILVA, F.; MACHADO, A. S.; SANTRER, E. F. R.; ASSUNÇÃO, C. B.; GUIMARÃES, C. F.; LABORNE, M. S.; NUNES, M. B.; VICENTE, V. A.; HOOG, S. G. de. A case of disseminated Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 21, p. 34-36, 2018. doi: 10.1016/j.mmcr.2018.03.006.

FURUIE, J. L.; SUN, J.; NASCIMENTO, M. M. F.; GOMES, R. R.; WACULICZ-ANDRADE, C. E.; SESSEGOLO, G. C.; RODRIGUES, A. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; CAMARGO, Z. P.; QUEIROZ-TELLES, F.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, S. G.; VICENTE, V. A. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. v. 59, n. 1, p. 12-19, **Mycoses**, 2015. doi: 10.1111/myc.12426.

GOMES, R. R.; VICENTE, V. A. **Diversidade genética de leveduras negras potencialmente patogênicas de hospedeiros humanos e animais.** Dados não publicados/ Projeto PNPD/CAPES, PPGMPP, 2014/2018.

GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SALGADO, C. G.; SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; CRUZ, K. S.; FORNANI, G.; HAHN, R. C.; SCROFERNEKER, M. L.; CALIGINE, R. B.; RAMIREZ-CASTRILLON, M.; ARAÚJO, D. P.; HEIDRICH, D.; COLOMBO, A. L.; HOOG, G. S. Molecular epidemiology of agents of human

chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 1-20, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0005102.

GUARRO, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 1, p. 33-39, 2012. doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.006.

HADZIAVDIC, K.; LEKANG, K.; LANZEN, A.; JONASSEN, I.; THOMPSON, E. M.; TROEDSSON, C. Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087624.

HAMZEHEI, H.; YAZDANPARAST, S. A.; MOHAMMAD-DAVOUDI, M.; KHODAVAISY, S.; GOLEHKEYLI, M.; ANSARI, S.; HOOG, G. S.; BADALI, H. Use of rolling circle amplification to rapidly identify species of *Cladophialophora* potentially causing human infection. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5-6, p. 431-438, 2013. doi: 10.1007/s11046-013-9630-7.

HERNÁNDEZ-NEUTA, I.; MEZGER, A.; MOENS, L.; LARSSON, C.; STENBERG, J.; GÖRANSSON, J.; GRUNDBERG, I.; ISAKSSON, M.; CONZE, T.; HENRIKSSON, S.; NILSSON, M. Application of padlock and selector probes in molecular medicine. **Molecular Diagnostics: Third Edition**, p. 173-196, 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-802971-8.00010-9.

HOFFMANN, C. C.; DANUCALOV, I. P.; PURIM, K. S. M.; QUEIROZ-TELLES, F. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138-41, 2011.

HOOG, G. S.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v. 42, n. 5, p. 405-416, 2004. doi: 10.1080/13693780410001661464.

HOOG, G. S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; ATTILI-ANGELIS, D.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; MATOS, T.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; RAINER, J.; RICHARD-YEGRES, N.; VICENTE, V. A.; YEGRES, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**, 38, p. 243-250, 2000. doi: 10.1080/mmy.38.s1.243.250.

HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGUER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; ENDE, A. H. G. G. V. D. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 219-234, 2007. doi: 10.3114/sim.2007.58.08.

HOOG, G. S. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105-109, 1993. doi: 10.1007/BF00872386.

HOOG, G. S.; VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; HARRAK, M. J.; BADALI, H.; SEYEDMOUSAVI, S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 27, p. 46-72, 2011. doi: 10.3767/003158511X614258.

HOOG, G. S. de.; GUÉRO, E.; MASCLAUX, F.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; KWON-CHUNG, K. J.; MCGINNIS, M. R. Nutritional physiology and taxonomy of humanpathogenic *Cladosporium-Xylohypha* species. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 33, n. 5, p. 339-347, 1995. doi: 10.1080/02681219580000661.

IRINYI, L.; MEYER, W. DNA barcoding of human and animal pathogenic fungi: The ISHAM-ITS database. **Microbiology Australia**, v. 36, n. 2, p. 44-48, 2015. doi: 10.1071/MA15017.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; TAGUCHI, H.; OKAMOTO, S. Evaluation of skin test for chromoblastomycosis using antigens prepared from culture filtrates of *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* and *Exophiala jeanselmei*. **Mycopathologia**, v. 77, n. 1, p. 59-64, 1982. doi: 10.1007/BF00588659.

JIANG, W.; MIDDLETON, K.; YOON, H. J.; FOUQUET, C.; CARBON, J. An essential yeast protein, *cbf5p*, binds in vitro to centromeres and microtubules. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 8, p. 4884-4893, 1993. doi: 10.1128/MCB.13.8.4884.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013. doi: 10.1093/molbev/mst010.

KONG, F.; TONG, Z.; CHEN, X.; SORRELL, T.; WANG, B.; WU, Q.; ELLIS, D.; CHEN, S. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by Rolling-Circle Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1192-1199, 2008. doi: 10.1128/JCM.02235-07.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. doi: 10.1093/molbev/msw054.

LACKNER, M.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; LU, Q.; HOOG, G. S. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 126-133, 2012. doi: 10.1128/AEM.05280-11.

LAU, A.; CHEN, S.; SLEIMAN, S.; SORRELL, T. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. **Future Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1185-1222, 2009. doi: 10.2217/fmb.09.70.

LI, D. M.; HOOG, S. G. de. Cerebral phaeohyphomycosis - a cure at what lengths?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 376-383, 2009. doi: 10.1016/S1473-

3099(09)70131-8.

LIM, S. W.; SUH, M. K.; KANG, G. S.; HA, G. Y.; KIM, H.; CHOI, J. S.; KIM, Y. S. Molecular phylogenetics of *Fonsecaea* strains isolated from chromoblastomycosis patients in South Korea. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p.415-420, 2010. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01937.x.

LINCK, L.; REIß, E.; BIER, F.; RESCH-GENGER, U. Direct labeling rolling circle amplification as a straightforward signal amplification technique for biodetection formats. **Analytical Methods**, v. 4, n. 5, p. 1215-1220, 2012. doi: 10.1039/C2AY05760C.

MARQUES, G. F.; BARRETO, J. A.; MASUDA, P. Y.; WACHHOLZ, P. A.; SOUSA, J. M. P. Clinical and demographic profile of chromoblastomycosis in a referral service in the midwest of São Paulo state (Brazil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 1, p. 140-142, 2015. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153252.

MARQUES, S. G.; SILVA, C. M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. 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. doi: 10.3314/jjmm.47.305.

MASHIMO, Y.; MIE, M.; SUZUKI, S.; KOBATAKE, E. Detection of small RNA molecules by a combination of branched rolling circle amplification and bioluminescent pyrophosphate assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 1, p. 221-227, 2011. doi: 10.1007/s00216-011-5083-3.

MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. **Medical Mycology**, v. 36, n. 4, p. 243-246, 1998. doi: 10.1080/02681219880000371.

MCGINNIS, M. R.; RINALDI, M. G.; WINN, R. E. Emerging agents of phaeohyphomycosis: Pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 250-259, 1986.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1983. doi: 10.1016/S0190-9622(83)70001-0.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C. D. V.; MALLMANN, L. F.; EDELWEISS, M. I. A.; SCROFERNEKER, M. L. 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. doi: 10.1067/mjd.2001.112220.

MOREIRA, M.; ADAMOSKI, D.; SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; NASCIMENTO, M. M. F. N.; GOMES, R. R.; BARBIERI, D. S.; GLIENKE, C.; KLISIEWICZ, D. R.; VICENTE, V. A. Detection of *Streptococcus mutans* using padlock probe based on Rolling Circle Amplification (RCA). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 54-60, 2015. doi: 10.1590/S1516-8913201502762.

MOUCHALOUAT, M. F.; GALHARDO, M. C. G.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; FIALHO, P. C. M.; COELHO, J. M. C. O.; TAVARES, P. M. S.; VALLE, A. C. F. Chromoblastomycosis : a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro , Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 8, p. 981-986, 2011. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04729.x.

NAJAFZADEH, M. J.; DOLATABADI, S.; SARADEGHI-KEISARI, M.; NASERI, A.; FENG, P.; HOOG, G. S. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 3, p. 338-342, 2013. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.026.

NAJAFZADEH, M. J.; GUEIDAN, C.; BADALI, H.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; XI, L.; HOOG, G. S. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2009. doi: 10.1080/13693780802527178.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; HOOG, G. S. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 577-582, 2011. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01995.x.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; XI, L.; ENDE, A. H. G. G. V. D.; HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, n. 6, p. 800-806, 2010. doi: 10.3109/13693780903503081.

NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V. A.; FENG, P.; NASERI, A.; SUN, J.; REZAEIMATEHKOLAEI, A.; HOOG, G. S. Rapid identification of seven waterborne *Exophiala* species by RCA DNA padlock probes. **Mycopathologia**, v. 183, n. 4, p. 669-677, 2018. doi: 10.1007/s11046-018-0256-7.

NAJAFZADEH, M. J. Biodiversity , pathogenicity , antifungal susceptibility and rapid identification of *Fonsecaea* and relatives. **Universiteit van Amsterdam [Host]**, v. 47, p. 1-129, 2011.

NASCIMENTO, M. M. F. **Ecologia molecular de leveduras negras**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NILSSON, M. Lock and roll: Single-molecule genotyping in situ using padlock probes and rolling-circle amplification. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 126, n. 2, p. 159-164, 2006. doi: 10.1007/s00418-006-0213-2.

NILSSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B. P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2085-2088, 1994. doi: 10.1126/science.7522346.

NÓBREGA, J. P. S.; ROSEMBERG, S.; ADAMI, A. M.; HEINS-VACCARI, E. M.;

LACAZ, C. S.; BRITO, T. *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis (“chromoblastomycosis”). First human culture – proven case reported in Brazil. **Revista Inst. Med. Tropical**, v. 45, n. 4, p. 217-220, 2003. doi: 10.1590/S0036-46652003000400008.

NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A. K. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 2, p. 276-289, 2007. doi: 10.1007/s00248-006-9199-5.

PÉREZ-ARELLANO, I.; GALLEGO, J.; CERVERA, J. The PUA domain - A structural and functional overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 19, p. 4972-4984, 2007. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06031.x

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; SUMMERBELL, R.; HOOG, G. S. de. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: Biotechnology’s unexpected encounter with biohazard? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 109-130, 2006. doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x.

QUEIROZ-TELLES, F.; HOOG, G. S.; SANTOS, D. W. C. L.; SALGADO, C. G.; VICENTE, V. A.; BONIFAZ, A.; ROILIDES, E.; XI, L.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SILVA, M. B.; PANA, Z. D.; COLOMBO, A. L.; WALSH, T. J. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233-276, 2017b. doi: 10.1128/CMR.00032-16.

QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no estado do Paraná: Etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1997.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 46-50, 2015. doi: 10.1590/S0036-46652015000700009.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R. G.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 3-15, 2009. doi: 10.1080/13693780802538001.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; FALCI, D. R.; CACERES, D. H.; CHILLER, T.; PASQUALOTTO, A. C. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 367-377, 2017a. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30306-7.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. 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. doi: 10.3109/13693786.2010.539631.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. C. L. Chromoblastomycosis in the clinical practice. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 312-319, 2012. doi: 10.1007/s12281-012-0116-8.

RIBEIRO, E. L.; SOARES, A. J.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; NAVES, P.

L. F.; DIAS, S. M. D. S. Cromoblastomicose: doença presente na realidade populacional brasileira. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 3, p. 189-192, 2006.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1-22, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0004190.

SALGADO, C. G. Fungal x host interactions in Chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. **Virulence**, v. 1, n. 1, p. 3-5, 2010. doi: 10.4161/viru.1.1.10169.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; CONSORTIUM, F. B. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA Barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012. doi: 10.1073/pnas.1117018109.

SEYEDMOUSAVI, S.; BADALI, H.; CHLEBICKI, A.; ZHAO, J.; PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; HOOG, G. S. *Exophiala sideris*, a novel black yeast isolated from environments polluted with toxic alkyl benzenes and arsenic. **Fungal Biology**, v. 115, n. 10, p. 1030-1037, 2011. doi: 10.1016/j.funbio.2011.06.004.

SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, M. G.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; HOOG, G. S. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527-542, 2014. doi: 10.1128/CMR.00093-13.

SILVA, J. P.; SOUZA, W. de.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171-175, 1998. doi: 10.1023/A:1006957415346.

STERFLINGER, K. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, p. 501-514, 2006. doi: 10.1007/3-540-30985-3\_20.

STOTHARD, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **BioTechniques**, v. 28, n. 6, p. 1102-1104, 2000. doi: 10.2144/00286ir01.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V. A.; HOOG, S. G. de. Rapid detection of pathogenic fungi using Loop-Mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. **Journal Microbiol Methods**, v. 80, n. 1, p. 19-24, 2010. doi: 10.1016/j.mimet.2009.10.002.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; ZHANG, J.; VICENTE, V. A.; XI, L.; HOOG, G. S. Molecular identification of *Penicillium marneffe* using rolling circle amplification. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. 751-e59, 2011. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02017.x.

TAKAHASHI, H.; MATSUMOTO, A.; SUGIYAMA, S.; KOBORI, T. Direct detection of green fluorescent protein messenger RNA expressed in *Escherichia coli* by rolling circle amplification. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 242-249, 2010. doi: 10.1016/j.ab.2010.03.011.

TEHRANI, S. J.; ALIABADIAN, M.; FATA, A.; NAJAFZADEH, M. J. Rolling Circle Amplification (RCA): an approach for quick detection and identification of fungal species. **Journal of Mycology Research**, v. 1, n. 1, p. 55-62, 2014.

TRILLES, L.; WANG, B.; FIRACATIVE, C.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; MEYER, W. Identification of the major molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* by hyperbranched rolling circle amplification. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-8, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0094648.

TSUI, C. K. M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LÉVESQUE, C. A.; LAU, A.; SCHOEN, C. D.; BASCHIEN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, S. G. de. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. **IMA Fungus**, v. 2, n. 2, p. 177-189, 2011. doi: v. 2, n. 2, p. 177-189.

UNTEREINER, W. A.; NAVEAU, F. Molecular systematics of the Herpotrichiellaceae with an assessment of the and *Phialophara americana* positions of *Exophiala dermatitidis* phylogenetic. **Mycological Society of America**, v. 91, n. 1, p. 67-83, 1999. doi: 10.2307/3761194.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 115-126, 2012. doi: 10.1093/nar/gks596.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137-144, 2008. doi: 10.3114/sim.2008.61.14.

VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GOMES, R. R.; ROBL, D.; MARQUES, S. G.; AZEVEDO, C. M. P. S.; HOOG, G. S. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 47-63, 2013. doi: 10.1007/s13225-013-0246-5.

VICENTE, V. A.; ORÉLIS-RIBEIRO, L.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GUERRA, R. S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; HOOG, G. S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangroveland crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 1-2, p. 109-122, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.031.

VOIDALESKI, M. F. **Bioprospeção de *Fonsecaea pedrosoi* em amostras ambientais por amplificação em círculo rolante (RCA)**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

WANG, X.; SEED, B. High-throughput primer and probe design. **Real-time PCR**, v.

1, p. 93-106, 2006.

WALKER, D.H.; MCGINNIS, M.R. Diseases caused by fungi. **Pathobiology of Human Disease**, 2014.

XI, L.; SUN, J.; LU, C.; LIU, H.; XIE, Z.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S. de. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in Southern China. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 27-33, 2009. doi: 10.1080/13693780802468209.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

ZAMARCHI, K. **Biodiversidade e bioprospecção de fungos lignolíticos isolados de manguezais da Baía de Paranaguá**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

ZHANG, Z.; ALI, M. M.; ECKERT, M. A.; KANG, D. K.; CHEN, Y. Y.; SENDER, L. S.; FRUMAN, D. A.; ZHAO, W. A polyvalent aptamer system for targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p. 9728-9735, 2013. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.079.

ZHAO, W.; GAO, Y.; KANDADAI, S. A.; BROOK, M. A.; LI, Y. DNA polymerization on gold nanoparticles through rolling circle amplification: Towards novel scaffolds for threedimensional periodic nanoassemblies. **Angewandte Chemie**, v. 118, n. 15, p. 2469-2473, 2006. doi: 10.1002/ange.200600061.

ZHOU, X.; KONG, F.; SORRELL, T. C.; WANG, H.; DUAN, Y.; CHEN, S. C. A. Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. by use of rolling-circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2423-2427, 2008. doi: 10.1128/JCM.00420-08.

ZHU, C. Y.; YANG, Y. P.; SHENG, P.; LI, W.; HUANG, W. M.; FAN, Y. M. Cutaneous chromoblastomycosis caused by *Veronaea botryosa* in a patient with pemphigus vulgaris and review of published reports. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 123-129, 2015. doi: 10.1007/s11046-015-9887-0.

ZOU, B.; MA, Y.; WU, H.; ZHOU, G. Signal amplification by rolling circle amplification on universal flaps yielded from target-specific invasive reaction. **The Analyst**, v. 137, n. 3, p. 729-734, 2012. doi: 10.1039/C1AN15886D.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, 2003. doi: 10.1093/nar/gkg595.

**APÊNDICE 1 – SEQUÊNCIAS DO GENE CBF5 DE ESPÉCIES DE ORIGEM CLÍNICA E AMBIENTAL ASSOCIADAS A CROMOBLASTOMICOSE USADAS PARA O DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPÉCIE-ESPECÍFICO.**

Isolado	Espécie	Fonte	Acesso (Genbank)
CBS 606.96 <sup>T</sup>	<i>Capronia epimyces</i>	Ambiental	XM_007734719
CBS 617.96 <sup>T</sup>	<i>Capronia coronata</i>	Ambiental	XM_007728249
CBS 834.96 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora immunda</i>	Humano	XM_016394234
CBS 110553 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora psammophila</i>	Ambiental	XM_007745529
NIH/UT8656	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Humano	XM_009159246
AYL99_03479	<i>Fonsecaea erecta</i>	Ambiental	XM_018834995
CBS 271.37 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Humano	XM_013424470
CBS 139214 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea pugnacius</i>	Humano	In progress
AYO21_02649	<i>Fonsecaea monophora</i>	Humano	XM_022652626
CBS 102226 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea multimorphosa</i>	Animal	XM_016778015
AYO20_08612	<i>Fonsecaea nubica</i>	Humano	XM_022646888
Pb01	<i>Paracoccidioides lutzii</i>	Humano	XM_002790795
CBS 650.93 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella mackenziei</i>	Humano	XM_013421578

FONTE: O autor (2018).

APÊNDICE 2 – NÚMERO DE ACESSO DE SEQUÊNCIAS ITS DOS AGENTES ASSOCIADOS À CROMOBLASTOMICOSE  
USADOS COMO REFERÊNCIA PARA O DESENHO DA SONDA CADEADO RCA

Isolado	Espécie	Amostra	Fonte	Localização	Acesso (Genbank)
CBS 617.96 <sup>T</sup>	<i>Capronia coronata</i>	Madeira	Vegetal	Condado de Westland	JF747040
CBS 101541 <sup>T</sup>	<i>Capronia epimyces</i>	Casca de árvore	Vegetal	Massachusetts	AY156968
CBS 614.96 <sup>T</sup>	<i>Capronia fungicola</i>	Madeira	Vegetal	Brasil	KY484990
CBS 122671 <sup>T</sup>	<i>Capronia kleimondensis</i>	Galho	Vegetal	África do Sul	EU552107
CBS 122672 <sup>T</sup>	<i>Capronia leucadendri</i>	Galho	Vegetal	África do Sul	EU552108
CBS 173.52 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora bantiana</i>	Abscesso cerebral	Humano	Estados Unidos	EU103989
CBS 160.54 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora carrionii</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Venezuela	EU137266
CBS 147.84 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Infecção disseminada	Humano	Estados Unidos	EU103985
CBS 834.96 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora immunda</i>	Feohifomicose subcutânea	Humano	Estados Unidos	EU137318
CBS 987.96 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora minourae</i>	Madeira em decomposição	Vegetal	Japão	EU103988
CBS 259.83 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora samoensis</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Estados Unidos	EU137291
CBS 118724 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora saturnica</i>	Lesão epitelial (pé)	Humano	Brazil	EU103984
CBS 350.83 <sup>T</sup>	<i>Cladophialophora sylvestris</i>	Espinho de <i>Pinus</i>	Vegetal	Holanda	EU137330
CBS 130291 <sup>T</sup>	<i>Cyphellophora fusarioides</i>	Lavado bronquial	Humano	Israel	JQ766439
CBS 124764 <sup>T</sup>	<i>Cyphellophora guyanensis</i>	Planta	Vegetal	Austrália	JQ766432

CMRP1317 <sup>T</sup>	<i>Cyphellophora ludoviensis</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Brasil	KX434722
CBS 284.85 <sup>T</sup>	<i>Cyphellophora pauciseptata</i>	Lesão epitelial (mão)	Humano	Holanda	JQ766470
CBS 449.91 <sup>T</sup>	<i>Cyphellophora suttonii</i>	Lesão subcutânea	Animal	Estados Unidos	JQ766465
CBS 207.35 <sup>T</sup>	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Cromomicose facial	Humano	Japão	AF050269
CBS 668.76 <sup>T</sup>	<i>Exophiala exophialae</i>	Palha (toca de tatu)	Ambiental	Uruguai	AY156973
CBS 507.90 <sup>T</sup>	<i>Exophiala jeanselmei</i>	Lesão epitelial	Humano	Uruguai	MH862234
CBS 101538 <sup>T</sup>	<i>Exophiala nishimurae</i>	Casca de árvore	Vegetal	Venezuela	JX473274
CBS 121828 <sup>T</sup>	<i>Exophiala sideris</i>	Solo poluído	Ambiental	Holanda	HQ452325
CBS 718.76 <sup>T</sup>	<i>Exophiala xenobiotica</i>	Lesão epitelial (pé)	Humano	Canadá	KP132167
CBS 119710 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea brasiliensis</i>	Caranguejo	Animal	Brasil	JN173784
CBS 125763 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea erecta</i>	Espinho de <i>Smilax</i>	Vegetal	Brasil	KC886414
CBS 125760 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea minima</i>	Folha de <i>Orbignya speciosa</i>	Vegetal	Brasil	KC886416
CBS 269.37 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea monophora</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	África do Sul	AY857511
CBS 980.96 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea multimorphosa</i>	Feohifomicose	Animal	Austrália	JF267657
CBS 269.64 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea nubica</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Camarões	EU938592
CBS 271.37 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	América do Sul	AY366914
CBS 139214 <sup>T</sup>	<i>Fonsecaea pugnacius</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Brasil	KR706553
CBS 400.67 <sup>T</sup>	<i>Phialophora americana</i>	Solo	Ambiental	Brasil	EU514695

CBS 166.42 <sup>T</sup>	<i>Phialophora cyclaminis</i>	<i>Cyclamen persicum</i>	Vegetal	Holanda	HQ713776
CBS 635.88 <sup>T</sup>	<i>Phialophora intermedia</i>	Poeira	Ambiental	Japão	JQ766431
CBS 140325 <sup>T</sup>	<i>Phialophora verrucosa</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	China	NR_146242
CBS 313.73 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Brasil	GU017733
CBS 264.49 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	Farpa de madeira	Vegetal	Suécia	EU041812
CBS 101460 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella basitona</i>	Lesão subcutânea	Humano	Japão	AY163561
CBS 132.86 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella fasciculata</i>	Madeira em decomposição	Vegetal	India	EU041807
CBS 650.93 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella mackenziei</i>	Feohifomicose	Humano	Arábia Saudita	AY857540
CBS 496.78 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella phaeophora</i>	Solo	Ambiental	Colômbia	MH861169
CBS 111763 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella similis</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Brasil	EF551461
CMRP1307 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella tropicalis</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	Brasil	KX434724
IMT776 <sup>T</sup>	<i>Rhinocladiella tropicalis</i>	Lesão de cromoblastomicose	Humano	-	KU854928

<sup>T</sup> – linhagem referência

FONTE: O autor (2018).