



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

ELIAS EL-SHADDAI RIBEIRO

**Deleção e caracterização funcional do gene *pksA* codificador da
enzima Policetídeo Sintase Tipo I em *Fonsecaea pedrosoi***

BRASÍLIA/DF

2025

ELIAS EL-SHADDAI RIBEIRO

Deleção e caracterização funcional do gene *pksA* codificador da enzima Policetídeo Sintase Tipo I em *Fonsecaea pedrosoi*

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Larissa Fernandes Matos

Brasília/DF

2025

ELIAS EL-SHADDAI RIBEIRO

Deleção e caracterização funcional do gene *pkcA* codificador da enzima Policetídeo Sintase Tipo I em *Fonsecaea pedrosoi*

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Profa Larissa Fernandes Matos
Faculdade de Ciências e Tecnologias em Saúde - UnB

Membro titular interno: Hugo Costa Paes
Faculdade de Medicina - UnB

Membro titular externo: Mirelle Garcia Silva Bailão
Instituto de Ciências Biológicas - UFG

Suplente: Aldo Henrique Pacheco Tavares
Faculdade de Ciências e Tecnologias em Saúde - UnB

DEDICATÓRIA

"Dedico este trabalho à minha noiva, Jéssica Mariza, que ao longo de todo o processo, foi o meu refúgio, meu consolo e a minha companheira nos momentos mais difíceis, sendo também a razão de todos os meus esforços."

AGRADECIMENTOS

Sou grato ao Deus Trino, que me conduziu e protegeu, mediante a sua maravilhosa Graça ao longo destes dois anos de trabalho árduo.

Agradeço a minha noiva, Jéssica Mariza, que foi o meu principal ponto de apoio, sobretudo, nos momentos mais difíceis; ouvindo as minhas queixas, me dando seu ombro amigo e enxugando as minhas lágrimas nos momentos de frustração. Agradeço também por ter sido a minha companhia nos solitários finais de semana no laboratório e o meu auxílio na elaboração deste projeto escrito. Certamente, este trabalho não seria o mesmo sem o seu toque cuidadoso na elaboração do sumário, lista de abreviaturas e siglas, lista de figuras e de tabelas, também. Além disso, agradeço pelas madrugadas que empenhamos juntos no aprimoramento das figuras e edições de imagem em geral. O seu empenho e voluntariedade foram essenciais para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Filipe Timboni, Vitória Merçon, Luísa Coutinho, Nathalia Moraes, Raffael Castro, Clara Luna e Pedro Burgel que tornaram a minha jornada mais leve e descontraída, com agradáveis momentos de conversas que, por muitas vezes, tornaram-se ocasião para o meu aprimoramento acadêmico. Em especial, agradeço ao Filipe Timboni, pelo apoio e compreensão e que desde o meu primeiro dia de bancada me acolheu e me ensinou pacientemente uma diversidade de métodos e procedimentos que foram amplamente utilizados neste trabalho. Agradeço também a Luísa Coutinho, pela prontidão e gentileza em conduzir comigo os ensaios de fagocitose que ocorreram em um momento de extrema fadiga e sobrecarga emocional. Agradeço a Vitória Merçon e a Nathália Moraes, que sempre estiveram dispostas a me auxiliar na execução de experimentos, preparo de amostras, materiais e a me dar conselhos para o aprimoramento dos meus experimentos. Agradeço a cada gesto de gentileza e companheirismo da parte de cada um dos meus colegas, pois todos eles corroboraram para o bom desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao nosso técnico de laboratório, Francisco Erivan Alves — que chamamos carinhosamente de Chiquinho— por sempre alegrar os dias do nosso corredor, com o seu jeito carismático, amigável e prestativo.

Agradeço a Profa. Dra. Fabiana Alves Brandão, que na reta final deste trabalho surgiu como um verdadeiro ombro amigo, me aconselhando, torcendo por mim e me incentivando a continuar esta jornada da melhor maneira possível.

Agradeço a Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos, pela orientação e ensino de conhecimentos necessários para a elaboração deste projeto.

Agradeço a Profa. Dra Anamélia Lorenzetti Bocca pela colaboração no planejamento dos experimentos referentes à área de Imunologia contidos neste projeto.

Agradeço a Universidade de Brasília(UnB) por me receber como um aluno e me formar como cidadão apto ao bom uso dos conhecimentos adquiridos, visando o desenvolvimento de uma sociedade plural, justa e igualitária.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana(PPGBIOMICRO) e aos professores associados, por me proporcionaram todo conhecimentos fundamentais para a minha formação acadêmica.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES/CNPq e FapDF por proporcionarem condições materiais para a realização deste trabalho.

“Toda verdade é prática; a mais abstrata na aparência, a mais elevada, é também a mais prática. Toda verdade é vida, orientação e caminho para a finalidade do ser humano.”

A.D. Sertillanges

RESUMO

Fonsecaea pedrosoi é um fungo filamentoso melanizado e o principal agente causador da cromoblastomicose (CBM). CBM é uma micose subcutânea crônica e recalcitrante causada por implantação traumática e é considerada uma doença tropical negligenciada (DTN). A melanina é considerada um dos principais fatores de virulência conhecidos deste patógeno e é sintetizada pela via DHN-melanina (1,8-di-hidroxi-naftaleno) e pode ser caracterizada por propriedades como: alto peso molecular, muito estável, carregada negativamente, resistente à degradação por ácidos, suscetível à degradação por bases fortes, hidrofóbica e insolúvel em solventes orgânicos. Esta via começa com o policetídeo 1,3,6,8-tri-hidroxi-naftaleno (THN), seguido pela redução para scitalone, que é reduzida para vermelone e desidratada para DHN. Após esta etapa, a DHN é polimerizada para formar a melanina DHN. Para caracterizar os efeitos da melanina sintetizada via DHN-melanina em *F. pedrosoi*, o gene *pksA* da proteína policetídeo sintase tipo I, responsável pela primeira etapa da via biossintética da DHN, foi deletado por biolística. Cassetes de deleção foram construídos por reação em cadeia da polimerase de dupla junta (DJ-PCR) e vinte e cinco transformantes albinos foram obtidos, sendo oito confirmados para a deleção de *pksA*. Dois mutantes de diferentes transformações foram usados para avaliar o papel de *pksA* na biologia e patogenicidade de *F. pedrosoi*. Foi observado que o mutante Δpks possui crescimento e germinação significativamente atrasados, bem como apresenta menor taxa de viabilidade dos conídios. Dentre os ensaios com estressores, o mutante apresentou maior sensibilidade ao estresse osmótico (KCl e Sorbitol), Oxidativo (Menadiona) e estresse de parede celular (CFW). Curiosamente, não foi observado diferença significativa na viabilidade conidial frente ao estresse com exposição a diferentes doses de UV. A melanina conferiu maior resistência à atividade fungicida, mesmo com macrófagos estimulados com LPS e LPS+IFN γ . Por fim, notou-se que a melanina exerce importante papel no aumento da patogenicidade de *F. pedrosoi* *in vivo* com *Galleria mellonella*.

Palavras-chave: *Fonsecaea pedrosoi*; DHN-melanina; *pksA*; Biolística; DJ-PCR;

ABSTRACT

Fonsecaea pedrosoi is a melanized filamentous fungus and the main causative agent of chromoblastomycosis (CBM). CBM is a chronic and recalcitrant subcutaneous mycosis caused by traumatic implantation and is considered a neglected tropical disease (NTD). Melanin is considered one of the main known virulence factors of this pathogen and is synthesized by the DHN-melanin (1,8-dihydroxynaphthalene) pathway and can be characterized by properties such as: high molecular weight, very stable, negatively charged, resistant to degradation by acids, susceptible to degradation by strong bases, hydrophobic and insoluble in organic solvents. This pathway begins with the cop 1,3,6,8-trihydroxynaphthalene (THN), applied by reduction to scitalone, which is reduced to vermelone and dehydrated to DHN. After this step, DHN is polymerized to form DHN melanin. To characterize the effects of melanin synthesized via DHN-melanin in *F. pedrosoi*, the *pksA* gene of the type I polio protein synthase, responsible for the first step of the DHN biosynthetic pathway, was deleted by biolistics. Deletion cassettes were constructed by double-joint polymerase chain reaction (DJ-PCR) and twenty-five albino transformants were found, eight of which were confirmed for *pksA* deletion. Two mutants from different transformations were used to evaluate the role of *pksA* in the biology and pathogenicity of *F. pedrosoi*. It was observed that the Δpks mutant has significantly delayed growth and germination, as well as lower conidial production rates. Among the stressor assays, the mutant showed greater sensitivity to osmotic (KCl and Sorbitol), oxidative (Menadione) and cell wall stress (CFW). Interestingly, no significant difference was observed in the convenience of coping with stress with exposure to different doses of UV. Melanin conferred greater resistance to fungicidal activity, even with macrophages stimulated with LPS and LPS+IFN γ . Finally, it was noted that melanin plays an important role in increasing the pathogenicity of *F. pedrosoi* in vivo with *Galleria mellonella*.

Keywords: *Fonsecaea pedrosoi*; DHN-melanin; *pksA*; Biolistics; DJ-PCR;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta pksA$	Mutante deletado da proteína PKSA
AF	Atividade Fungicida
CB2D	Caldo Batata-2 · -Dextrose
CBM	Cromoblastomicose
CFW	Calcofluor White
CO ₂	Dióxido de Carbono
DHN	1,8-dihidroxinaftaleno
DJ-PCR	Double-Joint-PCR
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTN	Doença Tropical Negligenciada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ESR	Ressonância de Spin Eletrônico
Fp	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
gDNA	DNA genômico
GlcNAc	N-acetilglucosamina
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HygB	Higromicina B
Hz	Hertz
ID%	Porcentagem de Identidade
IF	Índice de Fagocitose
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAb-8D6	Anticorpo Monoclonal 8D6
MOI	Multiplicity of Infection
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOAc	Acetato de sódio
NCBI	National Library of Medicine
NO	Óxido Nítrico
NO ²⁻	Nitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde

pb	Pares de Bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PKSA	Policetídeo Sintase tipo 1
<i>pksA</i>	Gene codificador da enzima Policetídeo Sintase tipo 1
pSilent-1	Plasmídio Silent-1
RPMI-1640	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SDA	Sabouraud-Dextrose-Agar
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TC	Triciclazol
TENTS	Triton, EDTA, NaCl, Tris-HCl e SDS
THN	1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
WT	Wild-Type
°C	Graus Célsius
μ L	microlitro

Lista de Figuras

Figura 1: Manifestações clínicas da CBM.....	18
Figura 2: Distribuição geográfica de casos de cromoblastomicose de acordo com casos reportados – número absoluto de casos.....	21
Figura 3: Morfologia polimórfica de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	25
Figura 4: Células muriformes de <i>F. pedrosoi</i> obtidas de raspado de lesões de CBM.....	26
Figura 5: Via biossintética da 1,8-DHN-melanina.....	29
Figura 6: Triagem molecular dos transformantes de <i>pksA</i>	37
Figura 7: Domínios funcionais da proteína Z517_06418(PksA) de <i>F. pedrosoi</i>	44
Figura 8: Construção do cassete de deleção <i>pksA::hph</i> por DJ-PCR.....	45
Figura 9: Isolamento, estabilidade mitótica e extração de gDNA.....	46
Figura 10: Confiatório molecular dos mutantes $\Delta pksA$	47
Figura 11: Os mutantes $\Delta pksA$ apresentam uma menor taxa de crescimento do micélio.....	48
Figura 12: Taxa de germinação.....	50
Figura 13: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse osmótico induzido por KCl.....	51
Figura 14: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse osmótico induzido por Sorbitol.....	52
Figura 15: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse Oxidativo.....	53
Figura 16: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse da parede celular.....	54
Figura 17: Viabilidade de conídios irradiados com UV.	55
Figura 18: A melanina é um importante fator protetivo frente a atividade microbicida de macrófagos de linhagem RAW 264.7.....	56
Figura 19: Ensaio de sobrevivência com <i>Galleria mellonella</i>	57
Figura Suplementar I. Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos de PksA/Pks1 de diferentes espécies fúngicas.....	77
Figura Suplementar II. Confiatório molecular dos mutantes.....	92
Figura Suplementar III. Viabilidade conidial.....	93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	34
Tabela 2: Análise de similaridade e identidade.....	42

SUMÁRIO

1- Introdução	17
1.1- Cromoblastomicose e suas manifestações clínicas	17
1.2- Aspectos Epidemiológicos da Cromoblastomicose	19
1.3- Diagnóstico diferencial e tratamento para CBM	21
1.4- Etiologia e biologia dos patógenos causadores da CBM	24
1.5- Atributos de Virulência de <i>Fonsecaea sp.</i>	25
1.5.1- Células muriformes	25
1.5.2- Adesão e Hidrofobicidade	26
1.5.3- Enzimas proteolíticas	27
1.5.4- Melanina	28
2- Justificativa	31
3- Objetivos	32
3.1- Objetivo geral	32
3.2- Objetivos específicos	32
4- Metodologia	32
4.1- Linhagem e condições de cultivo de <i>F. pedrosoi</i>	32
4.2- Obtenção dos cassetes de deleção do gene <i>pksA</i>	33
4.2.1- Identificação do gene ortólogo em <i>F. pedrosoi</i>	33
4.2.2- Construção do cassete de deleção por DJ-PCR	34
4.2.3- Transformação Biolística	35
4.2.4- Avaliação da estabilidade mitótica e extração do DNA genômico dos transformantes	36
4.2.5- Triagem molecular dos transformantes de <i>pksA</i>	36
4.3- Análise de Crescimento do Diâmetro das Colônias	38
4.4- Análise do crescimento do micélio a partir da atividade metabólica	38
4.4- Avaliação da Taxa de Germinação	39
4.5- Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para determinar viabilidade dos conídios	40
4.6- Teste de resistência à agentes estressores	40
4.7- Ensaio de Fagocitose com Macrófagos (RAW 267.4)	40
4.8- Ensaio de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i>	41
5- Resultados	42
5.1- Análise <i>in silico</i> das sequências de genes que codificam a enzima PKSA	42
5.1.1- AYO21_03016 de <i>F. monophora</i> codifica a proteína hipotética Z517_06418 correspondente em <i>F. pedrosoi</i>	42
5.1.2- A transformação de conídios com cassete de deleção PKS::HPH	45
5.1.3- A substituição do gene <i>pksA</i> pelo cassete PKS::HPH gerou um mutante albino de <i>F. pedrosoi</i> resistente a Higromicina B	46
5.2- Os mutantes $\Delta pksA$ de <i>F. pedrosoi</i> apresentam déficit metabólico, impactando a germinação e a viabilidade celular	48

5.2.1- A inibição da via da PksA impacta negativamente no crescimento do micélio de <i>F. pedrosoi</i>	48
5.2.2- A deleção do gene <i>pksA</i> interferiu negativamente na viabilidade e germinação dos conídios de <i>F. pedrosoi</i>	49
5.3- A 1,8-DHN-melanina é um fator protetivo frente aos estresses osmótico, oxidativo e de parede celular	51
5.3.1- Estresse osmótico	51
5.3.2- Estresse oxidativo	53
5.3.3- Estresse de parede celular	54
5.3.4- Tolerância a UV	55
5.4- Os mutantes $\Delta pksA$ são mais fagocitados e eliminados por células RAW 264.7	56
5.5- Mutantes $\Delta pksA$ são menos virulentos em modelo larval <i>G. mellonella</i>	57
6. Discussão	58
7. Conclusões e Perspectivas	61
8. Referências Bibliográficas	63
9. Figura Suplementar I	77
10. Figura Suplementar II	92
11. Figura Suplementar III	93

1- Introdução

1.1-Cromoblastomicose e suas manifestações clínicas

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, de evolução lenta e progressiva, causada por fungos melanizados, sobretudo *Fonsecaea pedrosoi*, que é considerada a principal espécie associada à doença nas regiões tropicais e subtropicais, como Brasil, Madagascar, partes da Ásia e África (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014). A infecção ocorre geralmente por inoculação traumática do patógeno a partir de materiais vegetais contaminados, atingindo com maior frequência homens adultos, trabalhadores rurais e residentes de áreas com cobertura vegetal densa e solos úmidos (BRITO; BITTENCOURT, 2018; LÓPEZ-MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007). Os membros inferiores, especialmente os pés, pernas e joelhos, constituem os sítios anatômicos mais acometidos, seguidos por mãos e, com menor frequência, o tronco e outras regiões corporais (LU et al., 2012; ELGART, 1996).

As lesões cutâneas iniciais costumam se apresentar como pápulas eritematosas ou róseas, de superfície lisa, podendo evoluir para placas escamosas, verrucosas, nodulares ou tumorais. As lesões nodulares manifestam-se como nódulos fibrosos de tonalidade violeta, com superfície que pode ser lisa, escamosa ou verrugosa, podendo evoluir para formas tumorais (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a). Essas lesões tumorais, também chamadas de tipo “couve-flor”, apresentam aspecto lobulado e geralmente são recobertas por crostas epidérmicas. Lesões do tipo cicatricial possuem uma área central de aspecto retraído, com bordas atróficas e evolução centrífuga, enquanto as verrucosas mostram hiperqueratose e superfície seca e irregular. As lesões em placa, por sua vez, apresentam coloração variável entre vermelho e violeta, com leve elevação e infiltração irregular. Em casos mais avançados, é comum observar múltiplos tipos de lesões no mesmo paciente, fenômeno conhecido como forma mista (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; BRITO; BITTENCOURT, 2018) (**Figura 1**).



Figura 1: Manifestações clínicas da CBM. Tipos de lesão. A – Lesão inicial de cromoblastomicose; B – Lesão nodular; C – Lesão tipo tumoral; D – Lesão do tipo cicatricial; E - Lesão verrucosa; F – Lesão em placa.

Fonte: Adaptado de QUEIROZ-TELLES et al., 2017

Essa diversidade morfológica confere à doença um aspecto polimórfico que frequentemente dificulta o diagnóstico clínico, levando à sua confusão com outras dermatoses infecciosas ou não infecciosas (SANTOS JÚNIOR; SOUZA; ROCHA, 2024; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A classificação proposta por Carrión, em 1950, continua válida, agrupando as manifestações clínicas em cinco formas principais: nodular, verrucosa, tumoral, cicatricial e em placa (BRANDT; WARNOCK, 2003). Além disso, também podem ocorrer formas eczematosas e pseudovasculares, especialmente em apresentações recentes e menos severas da doença (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001).

As lesões também podem ser classificadas quanto à gravidade: formas leves incluem lesões únicas menores que 5 cm, geralmente do tipo placa ou nodular; formas moderadas envolvem múltiplas lesões até 15 cm; e formas graves abrangem áreas extensas da pele, com presença de lesões tumorais ou cicatriciais (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). A disseminação local pode ocorrer por autoinoculação, geralmente associada ao ato de coçar as lesões pruriginosas, levando à formação de lesões satélites em torno da primária (ELGART, 1996; LÓPEZ-MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007). A CBM apresenta evolução insidiosa e prolongada, com curso clínico que pode se estender por anos, especialmente quando o diagnóstico é tardio ou o tratamento é inadequado. Fatores como o local da lesão, a higiene

do paciente, a resposta imune inata e a adesão ao tratamento influenciam diretamente na gravidade e prognóstico da infecção (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

O curso crônico da doença está frequentemente relacionado a complicações secundárias, entre as quais se destacam as infecções bacterianas, linfedema crônico e, em casos extremos, a elefantíase (GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009; QUEIROZ-TELLES; DE C L SANTOS, 2013). Há ainda relatos de transformação maligna das lesões crônicas em carcinoma epidermoide (AZEVEDO et al., 2015), embora esse desfecho seja raro. Em situações excepcionais, foram documentadas formas sistêmicas com envolvimento de órgãos internos, como pulmões e sistema nervoso central, hoje reclassificadas como feohifomicoses (McGINNIS, 1983; NÓBREGA et al., 2003).

1.2- Aspectos Epidemiológicos da Cromoblastomicose

Um estudo que avaliou a literatura disponível ao longo de 106 anos indicou que a maioria dos casos de CBM se encontra na América do Sul (2.619 casos), seguida pela África (1.875 casos), América Central e México (1.628 casos), Ásia (1.390 casos), Oceania (168 casos), Europa (35 casos) e Estados Unidos e Canadá (25 casos) (**Figura 2**) (SANTOS et al., 2021). Este estudo também revelou que a maior parte dos afetados são homens (81,7%), com uma idade média de 52,5 anos e um tempo médio de 9,2 anos entre a exposição inicial e o diagnóstico. No Brasil, uma avaliação em uma região endêmica mostrou um panorama semelhante, com a maioria dos casos também sendo homens, apresentando uma média de idade de 56,1 anos e um tempo médio para diagnóstico de 9,4 anos (SANTOS et al., 2021). Essa predominância masculina pode ser atribuída a uma maior exposição ambiental, embora haja estudos que salientam uma proteção hormonal para as mulheres por meio da progesterona, como em *Phialophora verrucosa*, um agente conhecido agente da CBM (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 1995).

O Brasil é considerado uma região endêmica para várias micoses da categoria das DTNs, incluindo paracoccidioidomicose, doença de Jorge Lobo, micetoma e esporotricose (BRITO & BITTENCOURT, 2018; BARBOSA et al., 2024). A CBM é observada em todos os estados brasileiros, com uma incidência estimada de um caso a cada 196 mil habitantes; no entanto, essa distribuição não é uniforme, sendo consideravelmente maior em regiões hiperendêmicas, como os estados do Pará, Rondônia e Amazônia (região Amazônica), Maranhão (Nordeste), Mato Grosso (Centro-Oeste), Rio Grande do Sul e Paraná (Sul) (SANTOS et al., 2021). Barbosa e colegas (2024) analisaram 450 casos de CBM publicados no Brasil e nesta análise foram levantados dados de relatos de casos de CBM em todas as

regiões, mas, sobretudo, nas regiões Sul(31,3%), Sudeste(12,2%) e Nordeste(49,7%). Em contraste, o Rio de Janeiro é uma zona de baixa ocorrência de CBM (COELHO, et al., 2018).

A Amazônia é considerada uma região endêmica para a CBM, onde características locais, como alta precipitação, umidade relativa elevada, temperaturas médias altas e intensa atividade agrícola, favorecem o habitat fúngico e aumentam a exposição da população. No Maranhão, por exemplo, os agentes causadores da cromoblastomicose foram isolados do coco babaçu (*Orbignya phalerata Martius*), uma importante fonte de renda para os moradores, elevando o risco de contaminação na região (MARQUES et al, 2006; AVELAR-PIRES et al., 2013; SILVA, DE SOUZA E ROZENTAL, 1998). A infecção está frequentemente associada a lesões causadas pelo contato com plantas e espinhos, além da exposição de ferimentos ao solo, resultando na inoculação traumática transcutânea de propágulos (BRITO & BITTENCOURT, 2018; SANTOS et al, 2007).

Descrições de casos raros associando a CBM a outras DTNs, como micetoma, hanseníase, filariose e leishmaniose, indicam a existência de áreas de coendemismo, onde populações carentes estão expostas a esses patógenos ambientais e enfrentam agravantes como desnutrição, más práticas de higiene e falta de acesso a equipamentos de proteção individual (EPI) em seus trabalhos (SANTOS et al., 2021; AGARWAL et al., 2017).

O *F. pedrosoi* é um fungo cuja forma natural é sapróbia, sendo encontrado disperso na natureza. Apesar das dificuldades em isolá-lo, estudos já identificaram esses agentes em diversas amostras ambientais, incluindo materiais em decomposição e vegetais e espinhos de *Mimosa pudica* (MARQUES et al, 2006; SALGADO et al, 2004). A CBM afeta principalmente trabalhadores agrícolas, colhedores de palma e coco babaçu, lenhadores, mineiros e comerciantes de produtos agrícolas, especialmente aqueles que utilizam métodos convencionais sem proteção individual, tornando-se uma doença ocupacional que impacta negativamente a produtividade e frequentemente leva à abstenção do trabalho (BRITO & BITTENCOURT, 2018; QUEIROZ-TELLES, 2009; 2017b).

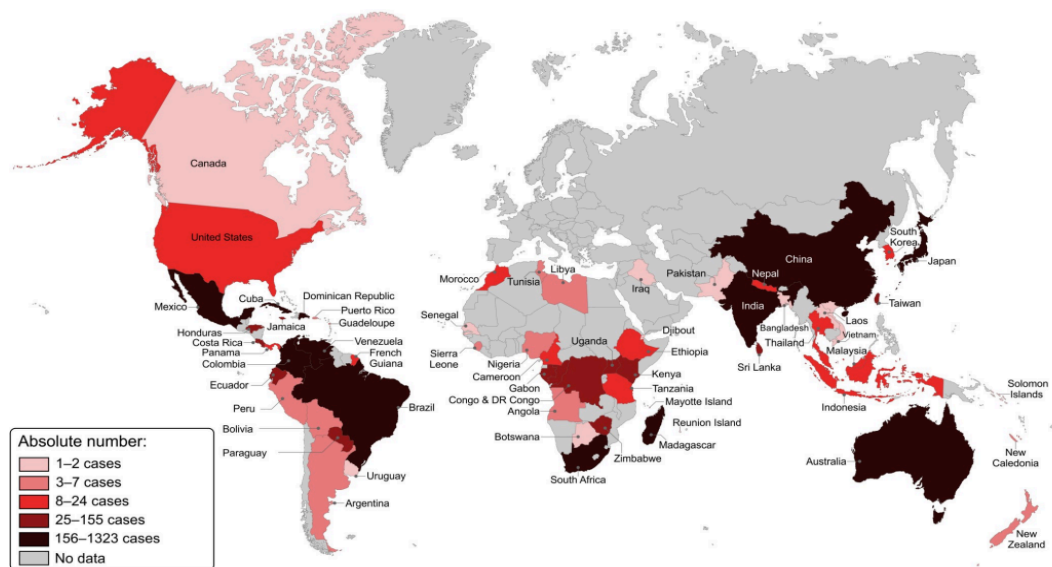


Figura 2: Distribuição geográfica de casos de cromoblastomicose de acordo com casos reportados – número absoluto de casos. Fonte: Adaptado de SANTOS *et al.*, 2021

1.3- Diagnóstico diferencial e tratamento para CBM

O diagnóstico da CBM é realizado, na maioria das vezes, de forma direta, a partir da identificação dos corpos muriformes em raspados cutâneos tratados com KOH ou em cortes histológicos corados com H&E (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; BONIFAZ *et al.*, 2001). O diagnóstico diferencial é essencial, considerando que a CBM pode se assemelhar clinicamente a diversas infecções fúngicas, como paracoccidioidomicose, esporotricose, lobomicose, além de doenças bacterianas, como tuberculose verrucosa e hanseníase, e até condições não infecciosas como carcinoma, psoríase, lúpus eritematoso e sarcoidose (SILVA *et al.*, 1994; RENAN MINOTTO *et al.*, 2001; BRITO; BITTENCOURT, 2018). Embora não existam testes sorológicos padronizados para o diagnóstico laboratorial, técnicas moleculares baseadas na amplificação de DNA ribossômico vêm sendo utilizadas com sucesso para diferenciação de espécies causadoras da CBM para análises filogenéticas, auxiliando na diferenciação de gênero e espécies (CALIGIORNE *et al.*, 1999; DE HOOG *et al.*, 1993). Diante das dificuldades inerentes ao diagnóstico clínico e da natureza resistente da infecção, sobretudo em casos avançados, a padronização de critérios clínicos e a ampliação do uso de métodos moleculares constituem ferramentas valiosas para o manejo adequado da CBM. O reconhecimento precoce da doença é essencial para evitar seu agravamento e reduzir as complicações que comprometem significativamente a qualidade de vida dos pacientes afetados (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; BRANDT; WARNOCK, 2003).

Apesar de o diagnóstico da CBM não exigir técnicas laboratoriais avançadas e caras, os sistemas de saúde em todo o mundo carecem de preparo e informação, o que resulta em um tempo de diagnóstico prolongado e agrava a possibilidade de tratamento e cura (SANTOS et al, 2020). Se as lesões não forem diagnosticadas e tratadas, a cronicidade pode ocorrer, levando à fibrose tecidual e comprometimento da circulação linfática. Além disso, existe o risco de perda da capacidade funcional dos membros, desenvolvimento de tumores malignos da pele.

No tocante aos métodos laboratoriais, a CBM pode ser diagnosticada por meio do exame de microscopia direta com o Scotch[®], a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Imunoensaio Enzimático (ELISA). O método Scotch[®] utiliza fita adesiva para coletar o estrato córneo, que por sua vez é colocado em lâmina com adição de KOH+DMSO, permitindo a visualização de células muriformes e hifas (MIRANDA, et al., 2005). Outra variação possível do diagnóstico por microscopia direta é o histopatológico, que consiste na coleta de raspados das lesões de CBM e após tratamento com KOH+DMSO de 10-20% as lâminas são coradas com H&E e então submetidas a análise sob microscopia de luz para pesquisa de Células muriformes (BONIFAZ et al, 2001; HAMZA et al, 2005). A PCR também pode ser utilizada para o diagnóstico diferencial de CBM, pois a mesma é mais sensível e específica, contudo menos acessível, sobretudo nos países endêmicos para esta doença. Para a realização da mesma, utiliza-se oligonucleotídeos específicos para a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal, característica do gênero *Fonsecaea* (ANDRADE et al, 2006). Por fim, outra forma de diagnóstico diferencial de CBM para *F. pedrosoi* é o ELISA. Este método é empregado para a detecção de antígenos ou anticorpos em doenças infecciosas. Estudos realizados por Vidal e colaboradores (2003) analisaram 60 amostras de soro de pacientes acometidos pela CBM, eles utilizaram antígenos somáticos extraídos de *F. pedrosoi* com a técnica de ELISA-indireto, na qual obteve uma taxa de 78% sensibilidade e 83% de especificidade, demonstrando assim a aplicabilidade desta metodologia para o diagnóstico diferencial da CBM ocasionada por *F. pedrosoi*.

No que diz respeito a CBM, sabe-se que ela é uma doença infecciosa de difícil manejo terapêutico, sobretudo nas formas clínicas avançadas, em virtude da refratariedade ao tratamento e da elevada taxa de recidivas (QUEIROZ-TELLES et al., 2009; 2018). As modalidades terapêuticas atualmente disponíveis englobam intervenções farmacológicas, métodos físicos e abordagens combinadas, cuja escolha depende de múltiplos fatores, como o agente etiológico, a extensão e tipo de lesão, bem como a resposta individual ao tratamento

(YANG et al., 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2018). Dentre os antifúngicos que agem de maneira sistêmica, o Itraconazol constitui a principal opção terapêutica, sendo amplamente utilizado como monoterapia ou em associação. A dose habitual varia de 200 a 400 mg por dia, por períodos que podem estender-se de três meses até dois anos ou mais, a depender da gravidade das lesões. Estudos clínicos demonstram que pacientes com formas leves da doença apresentam cura clínica e micológica média após 10,9 meses de tratamento, ao passo que casos moderados e graves requerem, respectivamente, 12,9 e até 30 meses de terapia contínua (QUEIROZ-TELLES et al., 2009; YANG et al., 2012). A terbinafina, utilizada em doses de 250 a 500 mg/dia, representa alternativa eficaz, com taxas de cura que podem atingir 74,2% após 12 meses de uso, especialmente em lesões de menor extensão (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). A 5-fluorocitosina, administrada por via oral na dose de 100 a 150 mg/kg/dia, tem aplicação mais restrita, mas pode ser considerada em protocolos combinados, inclusive por via tópica a 10%, em curativos oclusivos (QUEIROZ-TELLES et al., 2009; 2018). No contexto de terapias adjuvantes, destaca-se o uso do imiquimode, imunomodulador de aplicação tópica, com resultados promissores em pacientes refratários ao tratamento convencional. Estudos recentes relatam regressão completa de lesões verrucosas após sete meses de aplicação do fármaco, cinco vezes por semana, evidenciando seu potencial na modulação da resposta imune local por meio da ativação de receptores Toll-like (BELDA JR. et al., 2020). Adicionalmente, métodos físicos como a criocirurgia com nitrogênio líquido têm sido empregados com sucesso em associação ao tratamento antifúngico oral, especialmente em lesões espessas e fibrosas. O protocolo mais comum consiste em sessões mensais com ciclos de congelamento-descongelamento, utilizando aplicação direta com cotonete embebido em nitrogênio líquido, sem necessidade de anestesia local. Tal abordagem mostrou-se capaz de abreviar o tempo de resposta clínica e de aumentar a taxa de cura em comparação ao uso exclusivo de antifúngicos (KULLAVANIJAYA & ROJANAVANICH, 1995). Outras estratégias incluem a termoterapia tópica, eficaz em regiões periféricas, e a terapia fotodinâmica, com relatos favoráveis em casos refratários (QUEIROZ-TELLES ET AL., 2018).

Quanto à eficácia global das terapias disponíveis, o itraconazol apresenta taxas de cura amplamente variáveis, entre 15% e 80%, influenciadas por fatores como a espécie fúngica envolvida, duração da doença e severidade das lesões (QUEIROZ-TELLES ET AL., 2018). A combinação de antifúngicos, como itraconazol e 5-fluorocitosina, tem sido recomendada em casos graves ou de difícil resposta terapêutica, com relatos de sinergismo in

vitro e resultados clínicos satisfatórios (QUEIROZ-TELLES et al., 2018). Por outro lado, fármacos como anfotericina B, fluconazol e equinocandinas (caso da caspofungina e anidulafungina) demonstraram concentrações inibitórias mínimas elevadas frente aos agentes etiológicos, sugerindo baixa eficácia terapêutica (BADALI et al., 2013). Apesar da diversidade de abordagens disponíveis, o itraconazol, isoladamente ou associado a métodos físicos, permanece como a modalidade terapêutica de escolha, em virtude de sua eficácia consolidada, disponibilidade e perfil de segurança (QUEIROZ-TELLES ET AL., 2018). A ausência de ensaios clínicos randomizados, no entanto, impõe limitações à padronização terapêutica, exigindo que a conduta seja individualizada e guiada por critérios clínicos, micológicos e histopatológicos. A suspensão do tratamento deve ocorrer somente após resolução clínica completa, ausência de elementos fúngicos nas avaliações micológicas diretas e culturas negativas por, no mínimo, três meses consecutivos. Lesões cicatríciais com atrofia epitelial e ausência de células muriformes no exame histopatológico são critérios indispensáveis para atestar a cura definitiva (QUEIROZ-TELLES ET AL., 2009; 2018).

1.4- Etiologia e biologia dos patógenos causadores da CBM

A CBM é uma infecção fúngica subcutânea, crônica e progressiva, que foi classificada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2017 (WHO, 2017). Os principais agentes da CBM pertencem, sobretudo, ao “clado bantiana”, dentro da ordem dos *Chaetothyriales* (SUN et al., 2012). A ordem *Chaetothyriales*, pertencente à classe *Eurotiomycetes* e do filo *Ascomycota*, compreende fungos melanizados predominantemente saprobiontes, alguns dos quais possuem capacidade oportunística em humanos. Nesta ordem, a família *Herpotrichiellaceae* inclui o gênero *Fonsecaea* cujas espécies representam relevância clínica por serem causadores da CBM. Dentre as quatro espécies pertencentes ao gênero—*F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. pugnacious* e *F. nubica*— *F. pedrosoi* constitui o principal agente etiológico da CBM. Esta espécie é tipicamente isolada de fragmentos vegetais e substratos orgânicos em decomposição, sendo a infecção humana decorrente, via de regra, de inoculação traumática (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; COELHO, et al., 2018). A classificação taxonômica inicial de *F. pedrosoi*, então designada *Hormodendrum pedrosoi*, foi proposta por Brumpt em 1922 e, posteriormente, Negroni (1936) a alocou no gênero *Fonsecaea*, com base em caracteres morfológicos reprodutivos (DE HOOG et al., 2010). *F. pedrosoi* é um fungo filamentosso polimórfico, ou seja, que possui mais de um morfotipo podendo apresentar três formas

diferentes: hifas, conídios(**Figura 3**) e de células muriformes(**Figura 4**). Em estado sapróbio *F. pedrosoi* apresenta-se na forma de micélios, contendo hifas e conídios (formas de dispersão e infectante). Entretanto, no tecido infectado é possível observar a presença de células muriformes e também de hifas (formas patogênicas). Todos os morfotipos celulares podem se diferenciar umas nas outras, exceto na transição de muriformes para conídios. Vários fatores, como temperatura, pH, condições aeróbicas e disponibilidade de nutrientes, influenciam as modificações morfológicas desse fungo. A transição para células muriformes é um evento morfogenético crucial para a CBM, embora os mecanismos moleculares e os fatores do hospedeiro que promovem a diferenciação celular ainda não sejam totalmente compreendidos (SANTOS et al., 2007;QUEIROZ-TELLES, 2017).

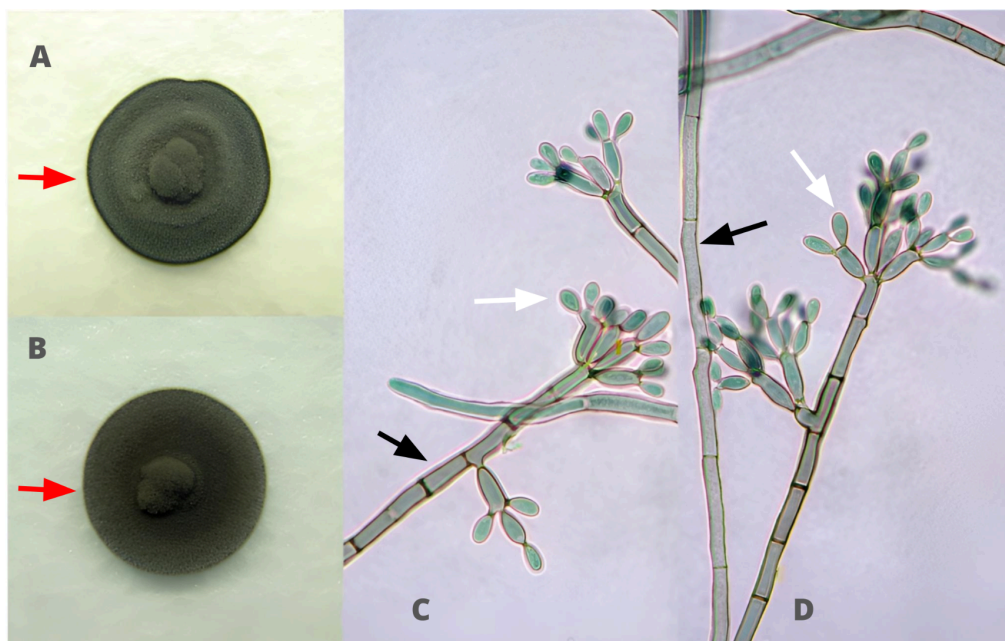


Figura 3: Morfologia polimórfica de *Fonsecaea pedrosoi*. Cultivo e microcultivo de *F. pedrosoi* isolado de *Mimosa pudica*(A e C) e lesão de paciente(B e D). Micélio, Hifas e conídios apontados em vermelho, preto e branco, respectivamente. Fonte: adaptado de SALGADO et al., 2004.

1.5- Atributos de Virulência de *Fonsecaea sp.*

1.5.1- Células muriformes

A morfologia e arquitetura celular, além de serem aspectos importantes para a sobrevivência do fungo em seu estado sapróbio, também contribuem para a patogenicidade do mesmo, sendo um importante atributo de virulência (ESTERRE et al, 1992). As células muriformes são consideradas um morfotipo de resistência, pois nesta conformação a célula

fúngica assume uma forma poliédrica com septações cruzadas (BONIFAZ et al, 2001; SILVA et al, 2008) (**Figura 4**), adquirindo uma estrutura espessa e resistente capaz de suportar condições extremas de pH, temperatura e até mesmo de resistir ao ataque do sistema imune do hospedeiro, contribuindo assim para a cronicidade da doença (HOGG,1993;DONG et al, 2020;MACHADO et al, 2019). Em laboratório, os achados histopatológicos de células muriformes podem ser observados, mediante clarificação com 10-20% de Hidróxido de Potássio(KOH) e coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E), apresentando tamanhos que variam de $4 \pm 12 \mu\text{m}$ de diâmetro (BONIFAZ et al, 2001; HAMZA et al, 2005). A maneira como se refere a este arranjo morfológico pode variar conforme à literatura consultada, podendo ser chamado de: células muriformes ou escleróticas ou corpos fumagoides. A terminologia “células muriformes” é utilizada para se referir especificamente aos membros pertencentes à ordem dos *Chaetothyriales* cujo arranjo morfológico se dá mediante o crescimento meristemático e que serve como uma forma invasiva e parasitária do fungo (QUEIROZ-TELLES et al, 2017;HOOG, 1993). Por outro lado, o termo células escleróticas também pode ser empregado referindo-se a estas células como um conjunto de hifas latentes compactadas formando uma superfície espessa, rígida, assemelhando-se a um aglomerado de hifas (DONG et al, 2020; BONIFAZ et al, 2001).

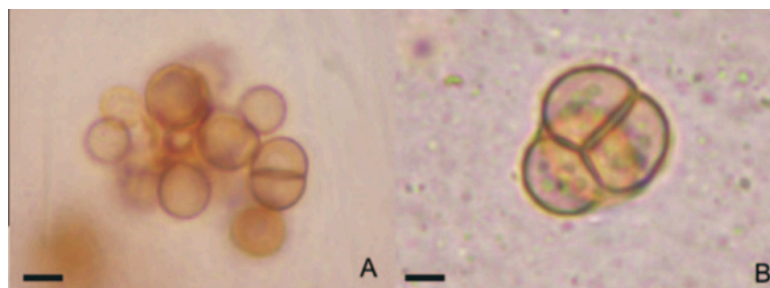


Figura 4: Células muriformes de *F. pedrosoi* obtidas de raspado de lesões de CBM. Barras de escala demonstrando o tamanho celular. (a) $4\mu\text{m}$ e (b) $3\mu\text{m}$. Fonte: Adaptado de BATISTA et al., 2008

1.5.2- Adesão e Hidrofobicidade

A adesão às células do hospedeiro e a hidrofobicidade da parede celular são reconhecidamente dois dos principais determinantes da patogênese em fungos melanizados, dos gêneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora* e *Exophiala* (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Em estudos realizados com fungos patógenos, agentes etiológicos da CBM, Satow e colegas (2008), observaram que o grau de hidrofobicidade varia entre os gêneros, sendo as espécies

de *Cladophialophora* mais hidrofóbicas que as espécies do gênero *Exophiala*. Segundo Seyedmousavi e colegas (2014) o fenômeno da transição para células muriformes pode ser potencializado por conta do relativo caráter hidrofóbico dos fungos negros, contribuindo assim para o aumento da patogenicidade. Na CBM, a interação inicial entre formas infecciosas e o epitélio hospedeiro desencadeia na diferenciação em células muriformes, estruturas especializadas que apresentam elevada resistência à atividade microbicida das células efetoras do sistema imune (SANTOS et al, 2007; QUEIROZ-TELES, 2017a; SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Essa transição favorece o desenvolvimento de um quadro inflamatório granulomatoso crônico, que é característica típica das formas avançadas da infecção (SZANISZLO, 2002; CARCAMO; SCHWALB; SEAS, 2020).

Além disso, *F. pedrosoi* é expressa adesinas do tipo lectina na superfície dos conídios com afinidade específica por resíduos de manose e N-acetilglucosamina (GlcNAc), sendo a ligação nos resíduos de manose a etapa inicial, que por sua vez, é sucedida pela internalização no hospedeiro que é mediada pela ligação com GlcNAc (FARBIARZ et al., 1990; LIMONGI et al., 1997, 2001). Notou-se em análises experimentais conduzidas por Limongi e colegas(2001) que a taxa de ligação de conídios de *F. pedrosoi* em manose era maior em 37°C, em comparação com 28°C. Santos e colegas(2007) sugeriram que estes achados demonstram que existe uma maior produção de adesinas no momento de infecções cujos hospedeiros apresentam temperatura corporal próximas às de 37°C. Ademais, o caráter hidrofóbico das células do microrganismo invasor, pode conferir ao mesmo uma afinidade neurotrópica observadas em diversos fungos, como: *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Exophiala dermatitidis* e *Exophiala spinifera* (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

1.5.3- Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas produzidas por *Fonsecaea pedrosoi* representam um importante fator de virulência, desempenhando papel central na patogênese da cromoblastomicose. Essas enzimas, como as peptidases, exercem múltiplas funções durante a interação patógeno-hospedeiro, promovendo a evasão das defesas imunes e a degradação de componentes estruturais do hospedeiro (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Estudos demonstram que *F. pedrosoi* secreta diferentes classes de proteases, incluindo metaloproteinasas e serino proteases, capazes de clivar proteínas do plasma humano como imunoglobulinas, albumina e fibronectina (PALMEIRA et al., 2006a; PALMEIRA et al., 2006b; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A ação dessas enzimas contribui para o escape

imunológico e a persistência do fungo no tecido infectado. Além disso, a produção de proteases é modulada pelo estado morfológico do fungo. Estudos realizados com cepas Mage de *F. pedrosoi* relatam que a produção de enzimas proteolíticas do tipo aspartil podem ser estimuladas mediante interação com o hospedeiro. A rápida diferenciação de conídio para hifa mediante interação com células epiteliais do ovário de hamster (CHO) com concomitante produção de fosfolipases e esterases sugerem certo tipo de mecanismo de virulência adaptativo, fazendo com que haja uma maior quantidade do morfotipo celular que produz mais proteases, facilitando assim a sobrevivência do patógeno dentro do hospedeiro (PALMEIRA et al., 2010). Também há evidências de que substratos como colágeno e albumina induzem o aumento da atividade proteolítica *in vitro*, evidenciando a adaptação do patógeno ao ambiente do hospedeiro (PALMEIRA et al., 2006a). Outras enzimas hidrolíticas, como ecto-fosfatases e ecto-ATPases, também contribuem para a virulência. Essas enzimas, mais ativas em pH ácido e inibidas por compostos específicos, favorecem a adesão às células do hospedeiro e podem desempenhar papel importante na resistência do fungo a condições adversas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Notavelmente, inibidores de aspartil-peptidases utilizados no tratamento do HIV reduziram significativamente a atividade enzimática e aumentaram a suscetibilidade de *F. pedrosoi* à ação de macrófagos, sugerindo um possível uso terapêutico contra a cromoblastomicose (PALMEIRA et al., 2006b). Dessa forma, as enzimas proteolíticas de *Fonsecaea pedrosoi* atuam em diversos níveis da infecção, desde a adesão inicial até a modulação da resposta imune, constituindo alvos promissores para novas abordagens terapêuticas e diagnóstico da doença.

1.5.4- Melanina

A melanina é um polímero fenólico de alto peso molecular, hidrofóbico e negativamente carregado, amplamente distribuído na natureza (SOLANO, 2014). O nome “melanina” deriva do grego ‘*melanos*’, que significa “escuro”, tendo sido atribuído pelo cientista sueco Jöns Jacob Berzelius no século XIX (RILEY, 1997). Embora não essencial para o crescimento celular, a melanina desempenha papéis vitais na sobrevivência de organismos vivos, conferindo-lhes resistência a condições extremas, como radiação UV, desidratação, altas temperaturas e agentes oxidantes (WHEELER; BELL, 1988; RILEY, 1997; CHAMILOS; CARVALHO, 2020). A sua estrutura é composta por polímeros derivados da oxidação de compostos fenólicos ou indólicos, sendo insolúvel em água e altamente resistente a ácidos e solventes orgânicos (ALVIANO et al., 1991). Nos fungos, destacam-se dois tipos principais de melanina: a DOPA-melanina, derivada da

L-3,4-dihidroxiifenilalanina (L-DOPA) e a DHN-melanina, formada a partir do 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), esta última predominante em espécies demáceas como *Fonsecaea pedrosoi* (LANGFELDER et al., 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A via biossintética da DHN-melanina, inicia-se com a conversão de Malonil ou acetil-CoA em 1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno (THN) pela enzima Policetídeo Sintase (Pks). Seguido disso, ocorre um conjunto de reações de redução e desidratação, levando a formação de scitalona, 1,3,6-Trihidroxi-naftaleno, vermelona, até a formação do monômero 1,8-Dihidroxi-naftaleno, o monômero formador da DHN-melanina (**Figura 2**) (SINGH et al., 2021; KOEHLER et al., 2020).

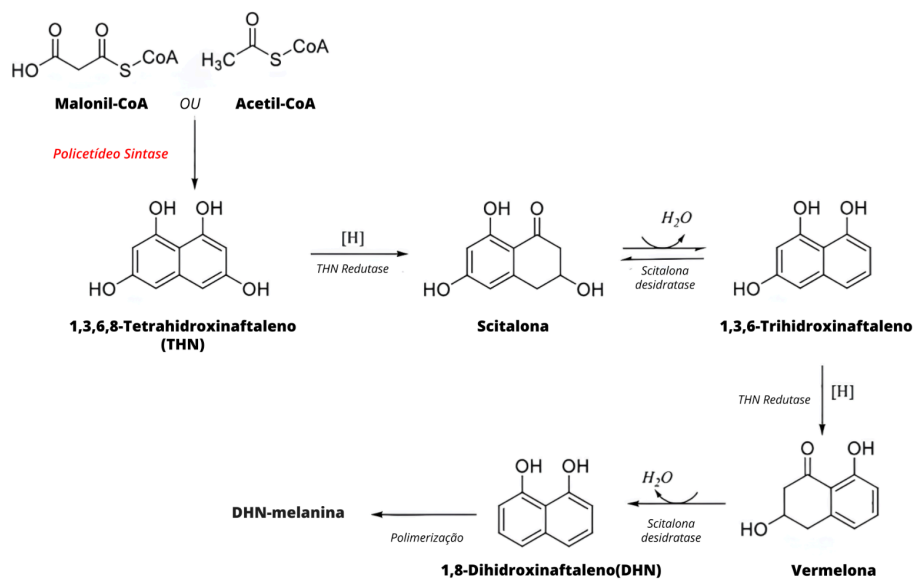


Figura 5: Via biossintética da 1,8-DHN-melanina. Fonte: Adaptado de SINGH *et al.*, 2021

Em *F. pedrosoi*, a melanina é um importante atributo de virulência, facilitando a evasão da resposta imune por mecanismos que incluem a proteção contra enzimas hidrolíticas, neutralização de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e inibição da fagocitose (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CUNHA et al., 2005). A inibição da melanogênese por triciclazol(TC), um bloqueador da via do DHN, aumenta a vulnerabilidade fúngica à resposta imune (FRANZEN et al., 2006), e estudos com mutantes deficientes em melanina mostraram redução significativa na sobrevivência frente à ação de macrófagos (ZHONG et al., 2024). Microscopicamente, a melanina se deposita em vesículas denominadas melanossomos e pode também ser secretada como piomelanina(FRANZEN et

al., 1999; RAPOSO; MARKS, 2002). Quando isolada, a melanina mantém a estrutura da célula original, originando os chamados “fantasmas de melanina” (ROSAS et al., 2000). Estudos funcionais revelaram que a melanina atua como um escudo físico e químico. Dados recentes mostram que macrófagos submetidos a interação com o mutante de *F. monophora* deficientes em melanina, promovem maior fagocitose, maior produção de NO e citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), possivelmente resultado da maior exposição de β -glucanos da parede celular, normalmente mascarados pela melanina (ZHONG et al., 2024). Esse efeito está intimamente ligado à ativação do receptor Dectina-1, cujo silenciamento gênico aboliu as diferenças observadas entre cepas melanizadas e não melanizadas. Em outros estudos Chongkae e colegas (2019) demonstraram que o anticorpo monoclonal MAb-8D6 contra melanina, reage fortemente com conídios e hifas de *F. pedrosoi*, inclusive em tecidos humanos infectados. Isso reforça o caráter constitutivo da melanina e seu papel durante a infecção *in vivo*. A análise por ressonância de spin eletrônico (ESR) identificou radicais livres estáveis característicos das melaninas, sugerindo seu papel como sequestrador de espécies oxidativas (CHONGKAE et al., 2019).

Resultados paralelos obtidos por Cunha e colegas (2010) mostram que conídios tratados com TC tornam-se altamente suscetíveis ao NO e H₂O₂, com aumento expressivo da concentração de nitrito (NO²⁻) no sobrenadante de cultivos de macrófagos. Notavelmente, a melanina de *F. pedrosoi* atua sequestrando diretamente NO, sem inibir a expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), conforme revelado por imunofluorescência. Além disso, o ESR revelou que a DHN-melanina do grupo não tratado com TC apresenta maior densidade de centros paramagnéticos em comparação com a melanina obtida sob inibição da via DHN, sugerindo uma estrutura polimérica, mais compacta e funcional na defesa fúngica. A melanina ainda contribui para o mascaramento antigênico, reduzindo o reconhecimento de estruturas imunogênicas, como os glicolipídios da parede celular, e a ativação da via de reconhecimento por receptores do tipo lectina (Dectin-1, Dectin-2, Mincle), além disso, a melanina atua no armazenamento de íons cálcio (Ca²⁺) e ferro (Fe^{III}), reduzindo assim a biodisponibilidade dos mesmos para interagirem com i-NOS, impedindo a conversão de L-arginina em NO (CUNHA et al., 2010). Um estudo robusto de deleção gênica conduzido por Xiao e colegas (2021) confirmou que o gene *pksA* é o principal regulador da melanogênese em *F. monophora*, espécie filogeneticamente próxima de *F. pedrosoi*. A deleção desse gene resultou não apenas na perda de pigmentação, mas também na redução da taxa de crescimento, esporulação, e aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo, a

condições extremas de pH e aos antifúngicos como itraconazol, terbinafina e anfotericina B. Os mutantes *ΔpksA* também apresentaram virulência atenuada em modelo in vivo com *Galleria mellonella*, enquanto a reintrodução do gene restaurou completamente o fenótipo selvagem, confirmando a associação direta entre melanina, resistência ambiental e patogenicidade.

No tocante a função biológica da 1,8-DHN melanina, sintetizada fungos do gênero *Fonsecaea sp.*, sabe-se que ela tem papel relevante como atributo de virulência, na proteção contra a fagocitose de macrófagos, resistência a antifúngicos, proteção contra o estresse oxidativo, estresse osmótico e salino (FRANZEN *et al*, 2006; CUNHA *et al*, 2005; ALVIANO *et al*, 2003; CUNHA *et al*, 2010; LI *et al*, 2022). Além destes fenótipos, foram observadas alterações importantes na morfogênese, conformação do micélio e na taxa de produção de conídios em *F. monophora* (LI *et al*, 2022; XIAO *et al*, 2020).

Vários estudos funcionais do gene *pksA* de uma das proteínas precursoras da via de síntese da 1,8-DHN-melanina foram publicados nos últimos anos para *F. monophora*. No entanto, até o momento, não se encontram na literatura estudos com linhagens de *F. pedrosoi*. Assim, este trabalho se propôs a estudar os efeitos da deleção de *pksA* no *F. pedrosoi* que é o principal agente causador da CBM. A melhor compreensão dos mecanismos microbianos de virulência de *F. pedrosoi* pode auxiliar no melhor entendimento da doença.

2- Justificativa

A compreensão dos fatores ambientais, das características do fungo e das condições que favorecem a infecção é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, controle e diagnóstico, com o intuito de facilitar a identificação precoce da doença, bem como reduzir a incidência da mesma, protegendo a saúde dos trabalhadores expostos. Em suma, a cromoblastomicose, causada principalmente por *F. pedrosoi*, representa um desafio significativo para a saúde pública, especialmente em áreas rurais e agrícolas, demandando atenção contínua e esforços colaborativos para mitigar seu impacto. Posto isto, a melanina apresenta-se como um importante atributo de virulência que já foi estudada em outros gêneros e espécies de agentes causadores ou não da CBM. Em *F. monophora* o estudo funcional da enzima PKS já realizado com mutantes com a via de biossíntese da DHN-melanina silenciada. Contudo, em *F. pedrosoi* ainda não existem estudos funcionais com mutantes albinos.

3- Objetivos

3.1- Objetivo geral

Avaliar o papel do gene *pksA* responsável pela iniciação da via de síntese da DHN-melanina.

3.2- Objetivos específicos

1. Construção do cassete de deleção para o gene *pksA*;
2. Obtenção do mutante para o gene *pksA* de *F. pedrosoi*;
3. Caracterização de fenótipos relacionados morfogênese do mutante $\Delta pksA$;
4. Caracterização de fenótipos de $\Delta pksA$ relacionados à resistência a estresse oxidativo, osmótico, de temperatura, de parede celular e tolerância a UV ;
5. Investigação *in vitro* da suscetibilidade do mutante $\Delta pksA$ ao ataque fagocítico de macrófagos de linhagem RAW 264.7;
6. Ensaio de sobrevivência de *G. mellonella* após infecção com o mutante $\Delta pksA$ *in vivo*.

4- Metodologia

4.1- Linhagem e condições de cultivo de *F. pedrosoi*

Neste trabalho foi utilizada a linhagem CBS 271.37 de *F. pedrosoi* (ATCC 18658), cedida gentilmente pela Prof. Dra. Vânia Aparecida Vicente da Universidade Federal do Paraná (UFPR-PR), que foi congelada a -80°C em glicerol 50% e repicada em Sabouraud-dextrose-agar (para 1 L: 10 g de peptona, 40 g de glicose, 15 g de agar pH: 5,6, autoclavado a $120^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$), incubada a 25°C durante 7 dias. Para obter os conídios, *F. pedrosoi* foi cultivado em Caldo batata (Para 1L: caldo de 100 g de batata inglesa(*Solanum tuberosum*) picada, com tamanho de $\sim 1\text{ cm}^3$, sem casca e cozida no microondas por 30 minutos, na potência 70 , 10 g de dextrose, 1 mL de Cloranfenicol 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH: 5,6, autoclavado a $120^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$) durante 7 dias a 28°C , sob agitação de 144-150 rpm. Em virtude do crescimento lento e da baixa taxa de produção de conídios, por parte do mutante $\Delta pksA$, a composição do Caldo Batata-dextrose foi adaptada, dobrando-se a concentração da infusão de batata, o que gerou um novo meio de cultivo o “Caldo Batata-2 \times -Dextrose (CB2D)” (Para 1L: caldo de 200 g de batata inglesa(*Solanum tuberosum*) picada, com tamanho de $\sim 1\text{ cm}^3$, sem casca e cozida no microondas por 30 minutos, na potência 70 , 10 g

de dextrose, 1 mL de Cloranfenicol 25 µg/ mL, pH: 5,6, autoclavado a 120° C/15 min) durante 7-10 dias a 28 °C, sob agitação de 144-150 rpm. Os conídios foram purificados com o uso de filtro produzidos com lã de vidro estéreis. Para o processo de purificação, vertia-se a cultura nos filtros, coletando o eluído em um novo falcon estéril. Os conídios foram centrifugados a 3005 g por 5 minutos. Após este processo lavava-se o pellet por duas vezes com Salina (NaCl 0,9%).

4.2- Obtenção dos cassetes de deleção do gene *pksA*

4.2.1- Identificação do gene ortólogo em *F. pedrosoi*

Inicialmente, foi realizada uma busca por sequências de aminoácidos correspondentes a proteína PksA (AYO21_03016) em bancos de proteínas de *F. monophora* depositadas na plataforma *National Library of Medicine (NCBI)* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Em seguida, por meio da ferramenta de BLAST, buscou-se as sequências de *F. pedrosoi* pela plataforma *Ensembl fungi* (<https://fungi.ensembl.org/index.html>). Como critério de seleção das sequências utilizadas, levou-se em consideração os seguintes parâmetros: menor E-value e maior região de alinhamento. O gene equivalente a *pksA* de *F. pedrosoi* é o Z517_06418 (transcrito KIW79803). As sequências de proteínas PksA de outros organismos foram identificadas via ferramenta Blastp da sequência de *f. monophora* no banco de dados *Ensembl fungi*. Para comparação das sequências a porcentagem de identidade foi calculada pela ferramenta Similarity Matrix IDENTIFY do programa BioEdit (ALZOHAIRY, 2011). As sequências proteicas foram alinhadas pelo programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), usando os parâmetros “default” (MADEIRA et al., 2024). Os domínios conservados de PksA foram identificados segundo o programa CDS (Conserved Database domain) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)(WANG et al., 2022).

A sequência de nucleotídeos foi obtida e utilizada para desenho dos oligonucleotídeos segundo Kim e colaboradores (2009). A lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho está descrita na **Tabela 1**.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR

Nome	Alvo	Uso	Sequência 5' - 3'
Fp 273	1. 5' PKSA_F	DJ-PCR	ATTCAGTAGTCCGGGCAAGCA
Fp 274	2. 5' PKSA_R	DJ-PCR	AGGAGTTGGGAGCTGAGTGAA
Fp 90	3. 5' hphSIL_F	DJ-PCR	CCGCGACGTTAACTGATATT
Fp 15	4. 5' hphSIL_R	DJ-PCR	CGTCTGCTGCTCCATAAAGC
Fp 16	5. 3' hphSIL_F	DJ-PCR	CATATGCGGATTTGCTGATCC
Fp 215	6. 3' hphSIL_R	DJ-PCR	GCGTACTACTAGGGTTGCGAGGT
Fp 275	7. 3' PKSA_F	DJ-PCR	ACCTCGCAACCCTAGTACGCGGAGA GTATTATGACGAAGAC
Fp 276	8. 3' PKSA_R	DJ-PCR	GTGAGTTTCTACCCATGTTAC
Fp 277	9. 5' CONFE PKSA_F	Confirmação Externa	CTCACAGCGGAGGACAGGTT
Fp 278	10. 5' CONFE PKSA_R	Confirmação Externa	GAGCGGGTGGGTATGTTTGT
Fp 279	11. 5' ORF INT PKSA_F	Confirmação Externa	TGATACCTCCCTCTGGCTCGA
Fp 280	12. 3' ORF INT PKSA_R	Confirmação Externa	TGTCAACTTCTCACCCGGCT
Fp 281	13. 5' ORF PKSA_R	Confirmação do Locus Confirmação do Locus	TCTGCCTGTGAGTGAAGGTGG
Fp 282	14. 14. 5' ORF PKSA_F	Confirmação do Locus	TGCATCCTGACCGCAACTACA

4.2.2- Construção do cassete de deleção por DJ-PCR

Para a obtenção dos mutantes nulos para a produção de melanina, foi construído o cassete de deleção pela técnica de DJ-PCR, contendo como marca de seleção o gene que confere resistência a Higromicina B, como descrito por Kim e colegas (2009).

Inicialmente, uma PCR convencional foi usada para amplificar quatro fragmentos: 5' e 3' flanqueando as regiões do gene *pkSA*, usando, respectivamente, Fp 273 + Fp 274 (960 pb), Fp 275 + Fp 276 (955 pb) e DNA genômico (gDNA) da cepa selvagem (WT) (CBS 271.37) como molde, já para os oligonucleotídeos Fp90 + Fp15 foram usados para amplificar o fragmento 5' do marcador de resistência à Higromicina B (HPH/HygR) e a combinação Fp16 + Fp 215 para 3' HygR usando o plasmídeo pSilent-1 (NAKAYASHIKI et al., 2005) como molde para as reações. Os produtos 5' e 3' HygR foram de 1.109 pb e 860 pb, respectivamente.

A segunda etapa consistiu em duas PCRs independentes sobrepostas usando uma combinação de produtos previamente obtidos: a região flanqueadora de 5' *pkSA* foi fusionada

a 5' HygR para produzir o 5'*pksA* + 5' HygR de 2.069 pb. A outra reação gerou um produto de 1.815 pb correspondente a 3' *pksA* + 3' HygR. Para a obtenção dos fragmentos iniciais, utilizou-se a enzima Easy-Taq DNA Polimerase(número de catálogo: AP112-01-Transgen Biotech©), já para a etapa de DJ-PCR foi utilizada a enzima LongAmp Taq DNA Polimerase, seguindo as recomendações do fornecedor.

4.2.3- Transformação Biolística

Partículas de tungstênio M10 (~0,7 µm de diâmetro, BioRad) foram usadas para transportar o DNA utilizado para a transformação dos conídios. Para a precipitação do DNA nas partículas, pipetou-se em um microtubo na seguinte ordem: 50 µL partículas estéreis, 5 µL DNA (contendo 1 µg de DNA para cada placa a ser transformada), 50 µL CaCl₂ (2,5 M) estéril, 20 µL espermidina (0,1 M) estéril. A mistura foi agitada com uso de vortex na velocidade mínima por 10 minutos, foi precipitada por centrifugação por 10 segundos em velocidade máxima. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 150 µL de etanol absoluto para lavagem das partículas. Foram realizadas 3 lavagens e no final da última foram adicionados 4 µL de etanol absoluto para cada placa a ser bombardeada. A amostra rapidamente foi submetida à sonicação e as partículas foram distribuídas nas membranas macrocarreadoras estéreis (número de catálogo: 1652335, BioRad) encaixadas nos discos metálicos. Os discos foram incubados em uma caixa contendo pérolas de sílica fornadas, para secagem por pelo menos 30 minutos antes do bombardeio. O dispositivo utilizado foi o Biolistics PDS-1000/He Particle Delivery System (número de catálogo: 1652257, BioRad).

Para a realização da transformação do cassete de deleção *pksA* a linhagem CBS 271.37 foi cultivada em 250 mL de Caldo de Batata-Dextrose com pH: 5,6 por 7 dias, a 28°C sob agitação a 144-150 rpm. Logo após este período de cultivo os conídios foram purificados mediante filtração no tubo Falcon cortado contendo lã de vidro em seu interior e, então, quantificado. Os conídios foram ressuspensos em Salina (NaCl 0,9%) e quantificados na câmara de Neubauer. A quantidade necessária para realização de cada tiro da biobalística em *F. pedrosoi* foi descrita na literatura como $1,3 \times 10^9$ conídios para 1 µg de DNA do cassete de deleção(Florêncio *et al*, 2018). Após isto, os conídios foram inoculados em 100 mL de Sabouraud (SD) líquido (4% Dextrose e 1% peptona) pH 5,6, para germinação em 24-36h. Para a realização da transformação, os conídios foram previamente observados ao microscópio de luz para a observação dos tubos germinativos nos conídios, que é a condição ótima para o aumento da eficiência da transformação. Os conídios foram então distribuídos sobre uma membrana de celofane posicionada na superfície das placas de

Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA), para posterior exposição aos disparos. No dia seguinte ao bombardeio, os conídios foram raspados da membrana de celofane e espalhados em placas de Petri de vidro de grandes (150 × 15 mm) contendo 60 mL de meio SDA + Higromicina B (50 µg/mL).

4.2.4- Avaliação da estabilidade mitótica e extração do DNA genômico dos transformantes

Para avaliar se os transformantes mantinham a marca de seleção, os mesmos foram repicados em placas de Petri com meio pH 5.6 + Higromicina B (50 µg/mL) e em placas contendo apenas SDA sem antibióticos, como controle, por até 15 dias a 25°C. Após isto, cada colônia crescida em placa de SDA sem antibióticos foi repicada para novas placas de SDA + Higromicina B e SDA sem antibióticos. Este processo foi repetido três vezes com vistas a avaliar a estabilidade mitótica das colônias dos mutantes.

Após isto, os transformantes que mantiveram a marca de resistência a Higromicina B, foram cultivados em 5 mL de Sabouraud líquido em tubos Falcon de 15 mL por 7 dias sob agitação a 144 rpm a 28 °C. Após isto, o micélio foi coletado com espátula estéril e o sobrenadante foi descartado. As células foram misturadas com 0,5 mL de tampão TENTIS (Triton 2%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e SDS 1%), 0,5 mL de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) (Sigma) e esferas de vidro lavadas com ácido (0,6 µm) em quantidade equivalente ao volume de células no tubo de 2 mL. As células foram lisadas três vezes por 1 minuto a 40 Hz usando o sistema de ruptura celular Tissuelyser (QIAGEN) e centrifugadas por 5 min em velocidade máxima. Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo contendo 50 µL de acetato de Sódio (NaOAc) 5 M e a adição de 1 mL de etanol absoluto, o mesmo foi centrifugado por 15 minutos em velocidade máxima (13000 RPM). O pellet foi lavado com 200 µL de etanol 70%. O excesso de álcool foi drenado com a pipeta e os tubos foram secos ao ar em temperatura ambiente por cinco minutos. O DNA foi dissolvido em 50 µL de água MilliQ contendo 100 µg/mL de RNase A e incubado a 37 °C por 2 h.

4.2.5- Triagem molecular dos transformantes de *pksA*

Para a triagem molecular dos transformantes, PCRs convencionais foram realizadas com as enzimas Easy-Taq DNA Polimerase e One-Taq Master Mix. Este procedimento foi realizado apenas para os transformantes de *pksA* cuja aparência era visualmente albina. Para a detecção do gene de *pksA* foram utilizados os oligonucleotídeos de confirmação interna Fp

279 + 280 (5' e 3' ORF PKS_F e R). O DNA genômico de CBS 271.37 (WT) e dos transformantes foram utilizados como moldes. A temperatura de anelamento foi ajustada para 58°C e o tempo de extensão para 35 segundos(**Figura 6a**). O fragmento interno do gene *pksA* tem um tamanho de 578 pb, sendo esperada a amplificação do mesmo apenas no controle contendo o molde do gDNA do tipo selvagem. O ciclo da PCR foi ajustado de acordo com as recomendações do fornecedor da enzima utilizada. Para a confirmação externa do locus do mutante foram usadas as seguintes combinações: Fp 277 + Fp15 e Fp 278 + Fp16 amplificam, respectivamente, a região 5' (2.156 pb para $\Delta pksA$, sem amplificação para WT) e a região 3' (2.081 pb para $\Delta pksA$, sem amplificação para WT) do lócus do gene *pksA* substituída pelo marca de HygR(**Figura 6b**). Para a confirmação externa do locus WT foram usadas as seguintes combinações de primers: Fp 277 + Fp 281 e Fp 278 + Fp 282 que amplificam, respectivamente, a região 5' (1.949 pb para WT, sem amplificação para $\Delta pksA$) e a região 3' (1.898 pb para WT, sem amplificação para $\Delta pksA$) do lócus Wild-Type que não foi substituída pelo marca de HygR. O comprimento total do lócus *pksA* juntamente com as regiões flangeadoras foi acessado pela reação Fp 277 + Fp 278 (3.953 pb para $\Delta pksA$, 9.141 pb para WT). O confirmatório externo da marca de HygR foi realizado com a combinação de primers Fp 90 + Fp 215 (1.969 kb para $\Delta pksA$ e sem amplificação para o WT).

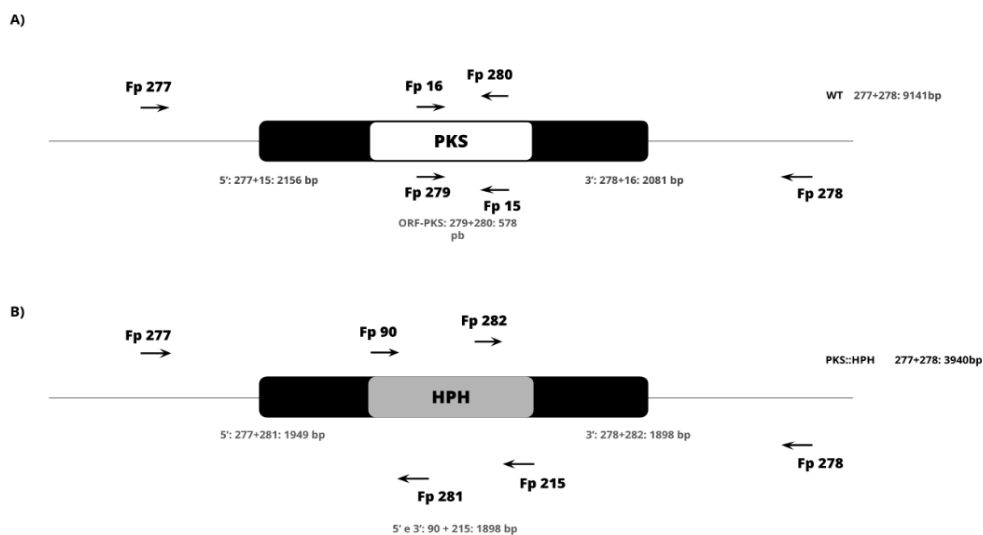


Figura 6: Triagem molecular dos transformantes de *pksA*. As representações esquemáticas acima demonstram os pares de oligonucleotídeos necessários para a amplificação de fragmentos que servem para a triagem e confirmação da deleção do gene *pksA*. A) reações de PCR necessárias para a confirmação do locus do tipo selvagem. B) reações de PCR necessárias para a confirmação do locus do mutante.

4.3- Análise de Crescimento do Diâmetro das Colônias

Para as análises fenotípicas foram escolhidos dois mutantes obtidos a partir de transformações biolísticas independentes 2. $\Delta pksA$ e 25. $\Delta pksA$, uma vez que não foi obtido o mutante reconstituído do gene. Para quantificar o crescimento das colônias os mutantes *pksA* e a linhagem selvagem (WT) foram inoculados pontualmente com 5 μ L de uma suspensão de contendo 1×10^5 conídios/mL em um pequeno orifício feito com uma ponteira P 200 estéril na superfície de placas tripartidas contendo meio SDA. As placas foram incubadas a 25°C e 37°C. Os diâmetros das colônias foram medidos a cada 3 dias durante 3 semanas. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata técnica. Os dados coletados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism versão 8.4.3. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo método estatístico de regressão linear. Os parâmetros de inclinação e intercepção dos eixos da curva foram comparados utilizando-se o método de análise de covariância (ANCOVA) para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e teste.

4.4- Análise do crescimento do micélio a partir da atividade metabólica

Para obtenção de conídios das cepas 2. $\Delta pksA$, 25. $\Delta pksA$ e WT, cultivou-se em CBD2 por 7 a 10 dias a 28 °C sob agitação de 144-150 RPM. O meio foi filtrado em lã de vidro e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, o precipitado foi ressuspensão em 0,09% salina e lavagem repetida por 2 vezes. Os conídios foram contados em câmara de Neubauer e inoculados em RPMI-1640 e a concentração foi ajustada para 1×10^6 conídios/mL. O meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich R6504) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio com adição de 2% glicose, o pH ajustado para 7, esterilizado por filtração em membrana de 0,45 μ m, sendo estocado a 4 °C.

Foram transferidos 100 μ L da suspensão de conídios de cada uma das cepas analisadas para uma placa de 96 poços, em triplicata. Para cada poço, adicionou-se 20 μ L Azul de Alamar 0,2% (Alamar Blue – Sigma Aldrich) e completou-se o volume de todos os poços com 80 μ L de meio RPMI. A atividade metabólica foi mensurada mediante a redução de Azul de Alamar. A placa foi mantida 48 h em 28 °C sob a agitação constante de 144-150 RPM. A leitura de espectrofotometria foi realizada no leitor de microplacas (BioTek - Epoch 2 Microplate Spectrophotometer) nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm nos pontos de 0, 24 e 48 h.

O crescimento percentual nos poços testes foi calculado em relação aos poços de controle de crescimento (contendo apenas o meio e o fungo) com subtração dos valores do

controle negativo (poço contendo RPMI-1640 e Resazurina), conforme a seguinte equação adaptada por Herman e colegas (2024):

$$\text{Crescimento percentual em relação ao controle (\%)} = \frac{(\varepsilon_{OX})\lambda_2 (A\lambda_1 - A'\lambda_1) - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 (A\lambda_2 - A'\lambda_2)}{(\varepsilon_{OX})\lambda_2 A^\circ\lambda_1 - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 A^\circ\lambda_2} \times 100$$

Onde:

ε_{OX} = coeficiente de extinção molar da forma oxidada de resazurina (azul)

λ_1 = 570nm

λ_2 = 600nm

A = absorvância do poço teste

A' = absorvância do poço controle negativo

A° = absorvância do poço de controle de crescimento.

Os resultados de dados percentuais obtidos pela fórmula acima foram modelados numa curva de regressão não-linear com equação de crescimento exponencial. A análise estatística foi conduzida no software GraphPad Prism 8.4.3. Para a análise de variância entre os grupos, o método estatístico ANOVA-*One way* foi utilizado ponto-a-ponto, empregando-se também o teste de hipótese de múltiplas comparações de Dunnett 's para avaliação de possíveis diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

4.4- Avaliação da Taxa de Germinação

Após crescimento em Caldo Batata-2×-Dextrose (CB2D), conídios de *2.ΔpksA*, *25.ΔpksA* e WT foram coletados, contados em câmara de Neubauer e então inoculados em 1 mL de caldo SD na concentração de 1×10^6 conídios/mL em placa de poliestireno de 24 poços (SOUSA et al., 2022). As culturas foram incubadas a 25°C e 37°C por 24 e 48 h (FAVILLA et al., 2023). Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos para promover a adesão celular. As placas foram visualizadas em microscópio de luz invertida ZEISS Primovert. O presente experimento foi realizado de forma cega com auxílio de dois voluntários alheios às condições experimentais e hipóteses do mesmo. A contagem de conídios germinados foi realizada em dois quadrantes completos por duas pessoas diferentes, de maneira independente. Os conídios com tubo germinativo foram considerados germinados e os inchados, não germinados. O experimento foi realizado em triplicata, repetido duas vezes e a análise estatística dos resultados foi realizada no software GraphPad Prism 8.4.3 com método estatístico de Qui-quadrado comparando as variações entre os grupos controle (WT) e mutantes.

4.5- Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para determinar viabilidade dos conídios

Para avaliar a viabilidade dos conídios, *2.ΔpksA*, *25. ΔpksA* e WT foram previamente cultivadas em CB2D, os conídios foram purificados e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, foram inoculados em placas SDA 50 μL de suspensão de conídios em concentração de 1×10^4 conídios/mL, espalhados com pérolas de vidro estéreis, incubadas a 28 e 37°C por 10 dias e então o número de colônias foi contado (UFC). O experimento foi realizado em triplicata, repetido duas vezes e a análise estatística dos resultados foi realizada pelo método estatístico Two-way-ANOVA e o teste de múltiplas comparações de Tukey foi usado para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e mutantes.

4.6- Teste de resistência à agentes estressores

Para o ensaio de susceptibilidade a diferentes agentes estressores, *2.ΔpksA*, *25. ΔpksA* e WT previamente cultivadas em CB2D tiveram seus conídios purificados e contados em câmara de Neubauer. Para cada isolado, 5 μL de suspensão de conídios em Salina (0,9% NaCl) contendo 1×10^5 conídios/mL (500 células) foram inoculados em placas de SDA suplementadas com as seguintes concentrações dos seguintes estressores: estresse osmótico (KCl 0,2, 0,4 e 0,6 M e Sorbitol 0,25, 0,5 e 1 M), estresse oxidativo (Menadiona a 15, 30 μM e 60 μM) e estresse de parede (CalcoFluor-White 0,25, 0,5 e 1 mg/mL), segundo os trabalhos anteriores de Dichtl e colegas (2012). Um total de 1×10^5 conídios/mL (500 conídios) foram plaqueados em SDA e foram submetidos exposição à radiação UV-C no comprimento de onda de 254 nm com pulsos de doses de 50, 100 e 200 J/cm² para avaliar a tolerância à UV no equipamento CL-1000 Ultraviolet Crosslinker. Após incubação de 7-10 em 25° C as UFCs foram contadas. As placas de agentes estressores foram analisadas pelo diâmetro da colônia sendo incubadas por 28 dias e tendo seu diâmetro medido no último dia de experimento (FAVILLA et al., 2023; LI et al., 2022). Os experimentos foram realizados em triplicata, repetido duas vezes e a análise estatística dos resultados foi realizada pelo método estatístico Two-way-ANOVA e o teste de múltiplas comparações de Tukey foi usado para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e teste.

4.7- Ensaio de Fagocitose com Macrófagos (RAW 267.4)

Para o ensaio de fagocitose com macrófagos, os isolados *2.ΔpksA*, *25. ΔpksA* e WT previamente cultivadas em CB2D tiveram seus conídios purificados e contados em câmara de

Neubauer. As células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram descongeladas na semana anterior e plaqueadas em garrafas de cultura contendo 20 mL de meio Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% Soro fetal Bovino(SFB) e incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Após isto as células que haviam atingido uma boa confluência, foram desaderidas com a TrypLE(Gibco Scientific), ressuspendidas e plaqueadas em 40 mL de meio DMEM com 10% SFB. Uma nova passagem foi realizada, repetindo-se o processo, porém com um volume de DMEM + 10% SFB de 100 mL. Por fim, a suspensão foi transferida para duas garrafas de 50 mL. O MOI (*Multiplicity of Infection*) foi definido em 3:1, sendo a concentração de conídios igual a 3×10^6 conídios/mL. As placas infectadas foram vedadas com Parafilme e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 2h. Os poços foram lavados com 200 µL de PBS estéril para retirada dos conídios não internalizados. Após isto, o conteúdo de cada poço foi diluído em 1:10 e 1:100 e 50 µL foram inoculados e espalhados em cada partição das placas para contagem por UFC. A avaliação da Atividade Fungicida(AF) foi realizada em três condições: RAW 264.7 + Conídios, RAW 264.7 + Conídios + LPS (500 ng/mL) e RAW 264.7 + Conídios + LPS(50 ng/mL) + INF γ (500 ng/mL), as placas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 h. As células RAW 264.7 foram infectadas e estimuladas 24h antes do inóculo em placa, sendo realizadas de forma independente da análise de 2h. Depois do intervalo pós-infecção, os macrófagos foram lavados, lisados e inoculados nas placas para contagem de UFC(LI et al., 2022). A AF foi calculada pela fórmula: $AF(\%) = \frac{\text{Média}\{(\text{UFC } 2\text{h}) - \text{UFC}24\text{h}\}}{\text{UFC}2\text{h}} \times 100$. O experimento foi realizado em triplicata, repetido duas vezes e a análise estatística dos resultados foi realizada pelo método estatístico Two-way-ANOVA e o teste de múltiplas comparações de Tukey.

4.8- Ensaio de sobrevivência de *Galleria mellonella*

Para o ensaio de sobrevivência de *G. mellonella*, os mutantes $2.\Delta pksA$, $25.\Delta pksA$ e WT previamente cultivadas em CB2D tiveram seus conídios purificados e contados em câmara de Neubauer. Foram inoculados na primeira pro-pata esquerda 10 µL de suspensão de conídios na concentração de 5×10^7 conídios/mL. Um total de quatro grupos de 15 larvas foram infectados, a saber: $2.\Delta pksA$, $25.\Delta pksA$ e WT (CBS 271.37) e PBS(controle da infecção). As larvas foram acondicionadas em placas de Petri de vidro durante 20 dias a 37°C. As placas eram limpas diariamente e as larvas que morriam ou entravam em fase de pupa eram retiradas e colocadas em uma nova placa. O experimento foi repetido uma vez. Os dados coletados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism versão 8.0 onde foi feita a análise da curva de sobrevivência e a aplicação do teste Log-rank (Mantel-Cox) e

Gehan-Breslow-Wilcoxon para comparação das curvas entre os grupos controle (PBS), (WT) e testes.

5- Resultados

5.1- Análise *in silico* das sequências de genes que codificam a enzima PKSA

5.1.1- AYO21_03016 de *F. monophora* codifica a proteína hipotética Z517_06418 correspondente em *F. pedrosoi*

As sequências AYO21_03016 e AYO21_10638 são codificadoras de enzimas PksA, contudo, AYO21_03016 é a responsável pela melanização de *F. monophora* (LI et al., 2022). Ao realizar o BlastP com a sequência AYO21_03016 no banco de dados *Emsembl fungi* contra as sequências de *F. pedrosoi* observou-se que a correspondente é Z517_06418 (transcrito KIW79803), que por sua vez foi denominada de PksA de *F. pedrosoi*. A análise de identidade entre as sequências de PksA/Pks1 de vários fungos em comparação à PksA de *F. pedrosoi* variou de 99,63% (para PksA de *F. monophora*) até 30,46% (para PksA de *A. fumigatus*) (Tabela 2)(WANG et al., 2022; LU et al., 2019; MARCHLER-BAUER et al., 2017).

Tabela 2- Análise de similaridade e identidade

Espécie	Número acesso transcrito Ensembl fungi	Número acesso gene Ensembl fungi	% ID com <i>pksA</i> de <i>F. pedrosoi</i>	Tamanho proteína (aa)
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	KIW79803	Z517_06418	-	2177
<i>Fonsecaea monophora</i>	OAG42733	AYO21_03016	99,63	2177
<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY55015	HMPREF1120_03173	89,21	2174
<i>Alternaria alternata</i>	RYN83525	AA0117_g1202	47,04	2161
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF45141	CH063_03518	44,40	2180
<i>Verticillium dahliae</i>	EGY13508	VDAG_00190	43,84	2189
<i>Sporothrix brasiliensis</i> 5110	KIH89511	SPBR_06313	43,50	2215
<i>Beauveria bassiana</i>	BB8028_0005g01000	BB8028_0005g01000.1	36,85	2163
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	AFUA_7G00160	EAL84875	30,46	1794

%ID: calculada pelo programa Bioedit pela ferramenta: Similarity Matrix IDENTIFY

A ferramenta Conserved Domain Search do NCBI identificou os domínios conservados da proteína PksA, sendo eles: SAT (ACP transacilase -posições 5-241; SAT seleciona a unidade inicial hexanoil de um par de subunidades especializadas da sintase de ácidos graxos fúngicos (HexA/HexB) e a transfere para a proteína carreadora de acila da Policetídeo sintase A para iniciar o alongamento da cadeia de policetídeos); PKSD (Domínio de acil transferase em enzimas policetídeo sintase - posições 368-1308, responsável por transferir cadeias carbônicas nucleofílicas α -carboxiladas de Acetil-CoA para a cadeia de fosfopanteteína da ACP-transacilase); PT_fungal_PKS (policetídeo sintase desidratase – posições 1283-1597, que catalisa as reações de desidratação que ocorrem ao longo da biossíntese de PKSA); 2 sítios de ligação a fosfopanteteína (PP-binding, posições: 1672-1729 e 1805-1865, que são grupos prostéticos ligados à SAT que têm como função servir de braço de ligação para ácidos graxos e aminoácidos ativados) e por último EntF2 (Domínio tioesterase da policetídeo sintase tipo I, posições: 1836-2175, que catalisa a última etapa da síntese de policetídeos para ciclização e liberação por meio de uma tríade catalítica canônica que consiste em resíduos Ser-His-Asp) (**Figura suplementar I**)(PUGH; WAKIL, 1965; HANS et al., 2003; KEATINGE-CLAY, 2008; SWARBRICK et al., 2020) (**Figura 7A**). Notavelmente, observou-se que em todas as espécies analisadas *in silico*, o PKSD - Domínio de acil-transferase apresentou maior percentual de alinhamento indicando que este domínio proteico é altamente conservado em diferentes gêneros e espécies de fungos (**Figura 7B**).

A)

Proteína hipotética **Z517_06418**



B)

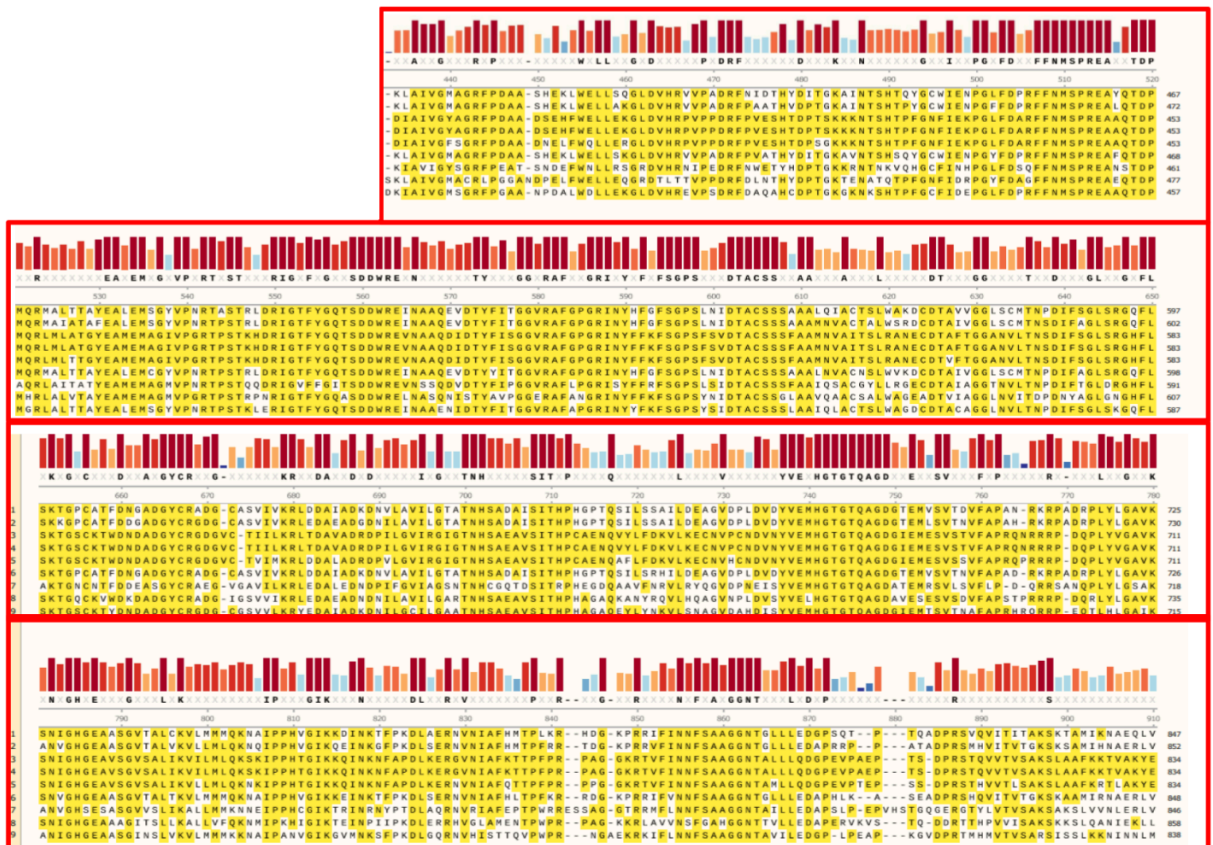


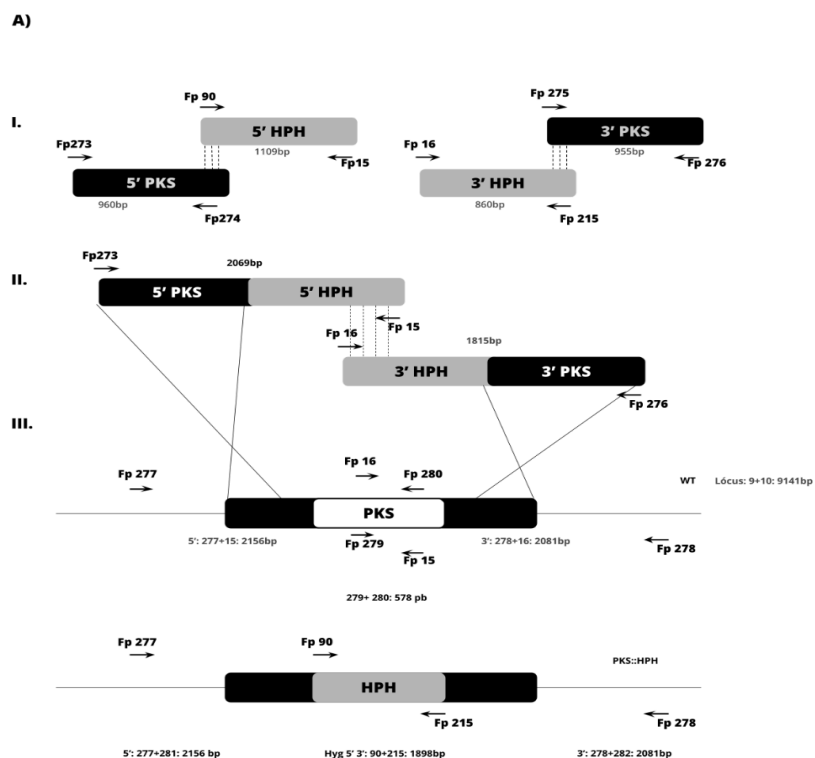
Figura 7: Domínios funcionais da proteína Z517_06418(PksA) de *F. pedrosoi*. A) Estão representados os domínios SAT (ACP transacilase - posições 5-241); PKSD (Domínio de acil transferase em enzimas policetídeo sintase - posições 368-1308); PT_fungal_PKS (policetídeo sintase desidratase – posições 1283-1597); PP, os dois sítios de ligação a fosfopanteteína (PP-binding, posições: 1672-1729 e 1805-1865) e por último EntF2 (Domínio tioesterase da policetídeo sintase tipo I, posições: 1836-2175). B) Domínio PKSD, o domínio com maior alinhamento entre todas as espécies *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *E. dermatitidis*, *A.*

alternata, *C.higginsianum*, *V. dahliae*, *S. brasiliensis*, *B.bassiana* e *A. fumigatus*. As regiões em amarelo representam o grau de conservação de cada resíduo de aminoácidos.

A sequência de nucleotídeos Z517_06418 apresenta 3 exons, gerando um transcrito com uma fase de leitura aberta (ORF) de 6534 pb. A sequência nucleotídica foi utilizada no desenho dos oligonucleotídeos para a obtenção do mutante $\Delta pksA$.

5.1.2- A transformação de conídios com cassete de deleção PKS::HPH

Os fragmentos do cassete de deleção foram construídos a partir da técnica de Double-Joint-PCR(DJ-PCR), realizada segundo o protocolo de Kim e colegas(2009) (**Figura 8A**). Esta metodologia consiste na fusão de sequências de flanqueamento (5' e 3') com um gene que codifica a marca de seleção (HygR) partida ao meio, para que haja uma substituição gênica via recombinação homóloga, tanto no lócus do gene quanto, dentro do próprio cassete de deleção. Inicialmente, quatro fragmentos foram gerados, conforme o primeiro passo da técnica (**Figura 8BI e 8BII**). Logo após esta etapa, esses fragmentos foram fusionados por meio de uma PCR de sobreposição, gerando dois fragmentos, sendo o fragmento 5' do tamanho de 2.156 pb e o 3' de 1815 pb, para transformação genética por biobalística dos conídios do isolado CBS 271.37(**Figura 8BII**).



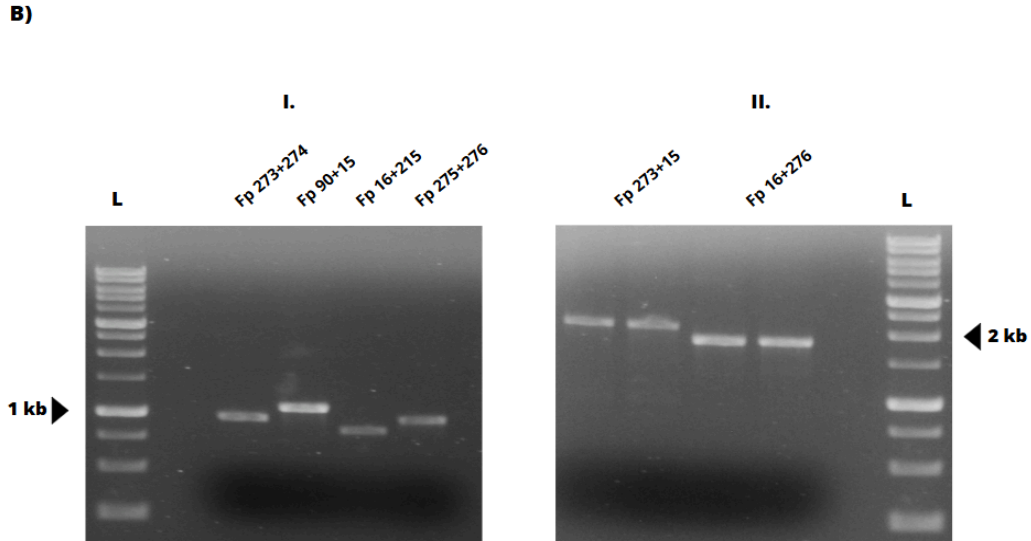
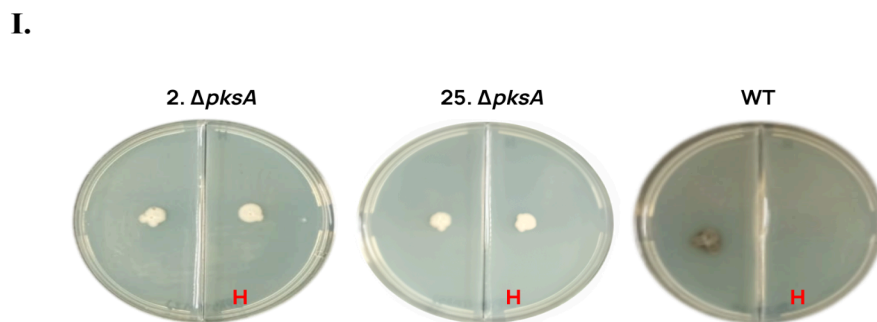


Figura 8. Construção do cassete de deleção *pksA::hph* por DJ-PCR. (A) Esquema da Double-Joint-PCR. (B) Fotos do gel de eletroforese da primeira etapa (esquerda) e da segunda etapa de construção do cassete (direita). Todos os oligonucleotídeos utilizados estão dispostos em mais detalhes na **Tabela 1**. Para a aferição dos tamanhos dos produtos das reações de PCR, foi utilizada a 1Kb DNA Ladder RTU(100pb – 10000 pb) da KASVI.

5.1.3- A substituição do gene *pksA* pelo cassete PKS::HPH gerou um mutante albino de *F. pedrosoi* resistente a Higromicina B

Após a transformação, as colônias brancas que cresceram em meio SDA+ Higromicina B (50 µg/mL)(**Figura 9 I**) foram isoladas e a estabilidade mitótica da marca de seleção foi avaliada através da passagem dos transformantes para placas de SDA e também SDA + Higromicina B (50 µg/mL)(**Figura 9 A e B**). Em seguida, as colônias brancas isoladas foram inoculadas em Caldo Sabouraud-Dextrose por 7 dias para extração do DNA genômico (gDNA)(**Figura 9 C**). A substituição gênica foi confirmada por meio da técnica de PCR visando as regiões interna e externa do gene *pksA* para o locus selvagem (**Figura 10**). Este procedimento foi realizado em ambos os mutantes avaliados(**Figura Suplementar II**).



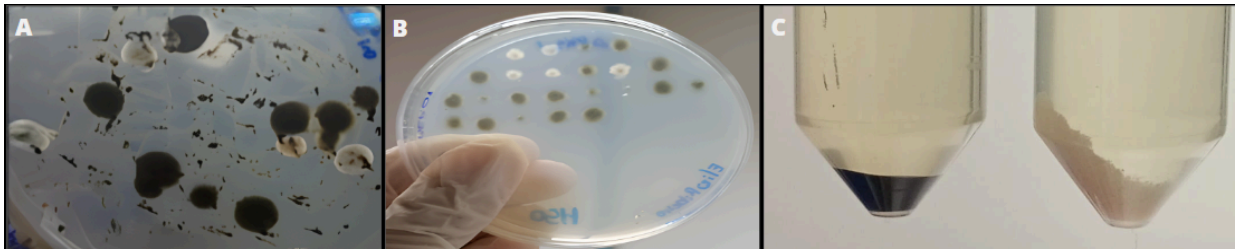


Figura 9. Isolamento, estabilidade mitótica e extração de gDNA. As imagens dispostas acima demonstram o processo desde o isolamento dos transformantes (A e B) até o inóculo em caldo Sabouraud-Dextrose para extração do gDNA(C). Em todas estas etapas os meios utilizados foram suplementados com Higromicina B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

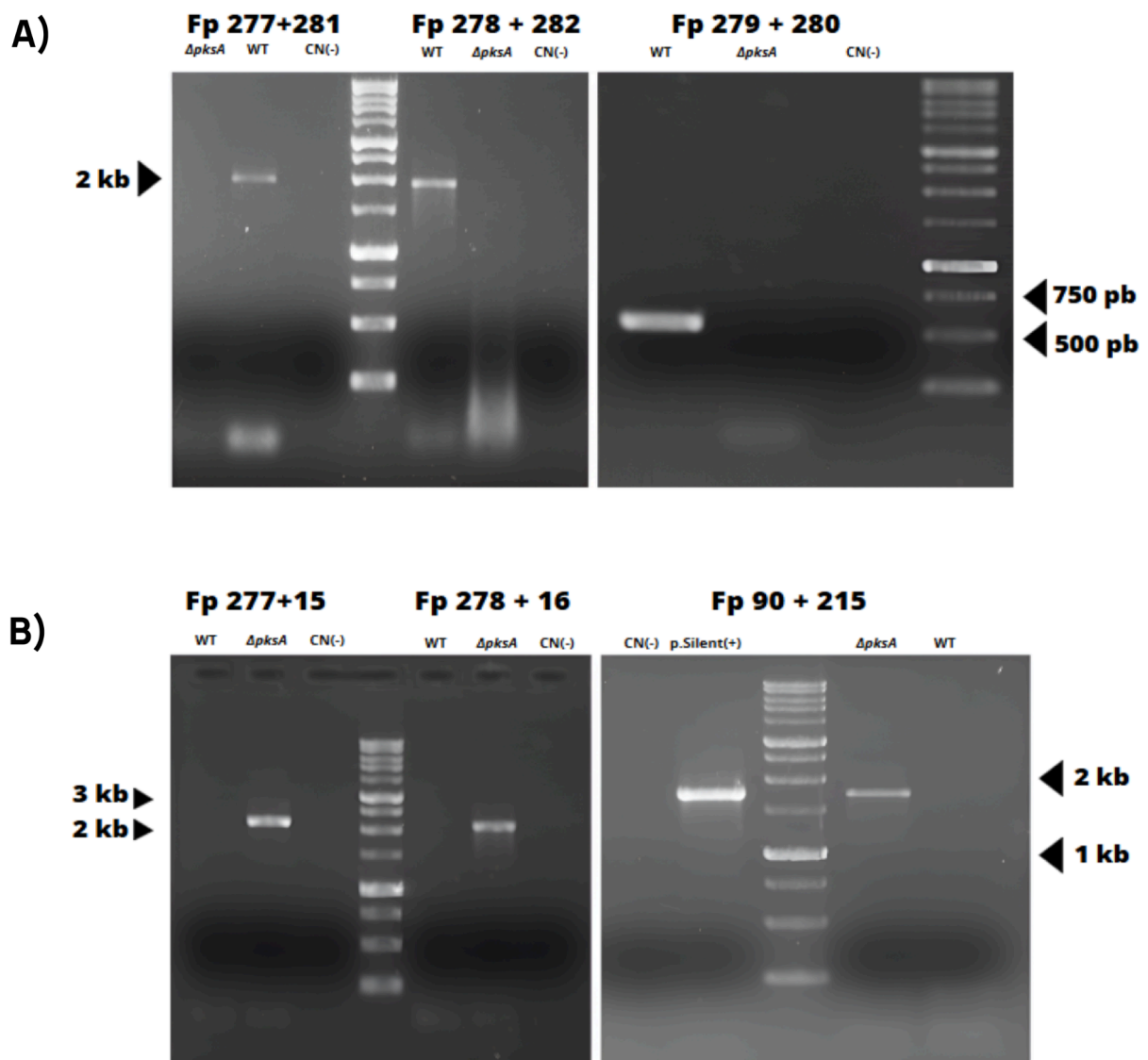


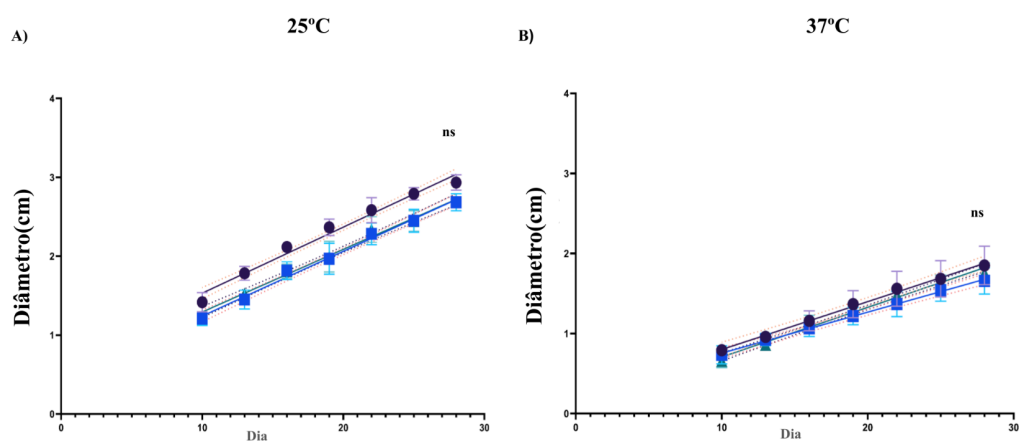
Figura 10. Confirmatório molecular dos mutantes $\Delta pksA$. Fotos dos géis das PCRs confirmatórias dos mutantes 2 e 25 $\Delta pksA$. As fotos foram tiradas após o processo de eletroforese em gel de agarose, indicando o par de oligonucleotídeos utilizados, bem como seus respectivos tamanhos aproximados. A) Confirmatório da deleção no locus PksA. B) Confirmação da substituição gênica a partir da marca de seleção de resistência a

Higromicina B. Para a aferição dos tamanhos dos produtos das reações de PCR, foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder RTU(100pb – 10000p) da KASVI.

5.2- Os mutantes $\Delta pksA$ de *F. pedrosoi* apresentam déficit metabólico, impactando a germinação e a viabilidade celular

5.2.1- A inibição da via da PksA impacta negativamente no crescimento do micélio de *F. pedrosoi*

O impacto da inibição da via biossintética da 1,8-DHN-melanina sob crescimento de colônia de *F. pedrosoi*, foi avaliado pela medida do diâmetro das colônias em SDA durante 28 dias a 25 e 37°C (FAVILLA et al, 2023; LI et al, 2022). Em ambas as temperaturas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre WT e os mutantes $\Delta pksA$, quanto a inclinação da reta (*Slope*) referente ao diâmetro das colônias ao longo de 28 dias de crescimento. Entretanto, por meio da análise de covariância (ANCOVA) observou-se também diferença estatisticamente significativa nos interceptos ($P < 0,0001$) em ambas as temperaturas. Este achado sugere que, embora ambos os grupos apresentem a mesma cinética de crescimento, os grupos $\Delta pksA$ apresentaram colônias menores no primeiro de medição do diâmetro, o que pode ter acontecido devido a um crescimento lentificado nos 9 primeiros dias do ensaio (**Figura 8 A e B**). Esta hipótese pôde ser validada por meio da análise do crescimento do micélio avaliada pela atividade metabólica na qual, observou-se diferença de percentual de crescimento estatisticamente significativa nos pontos de 24 e 48h ($P < 0,05$) (**Figura 8 C**). Este achado demonstra que a ausência da 1,8-DHN-melanina gera um importante prejuízo metabólico para os mutantes $\Delta pksA$ o que impactou negativamente na velocidade do crescimento do micélio, que foi avaliado pela redução de Azul de Alamar. .



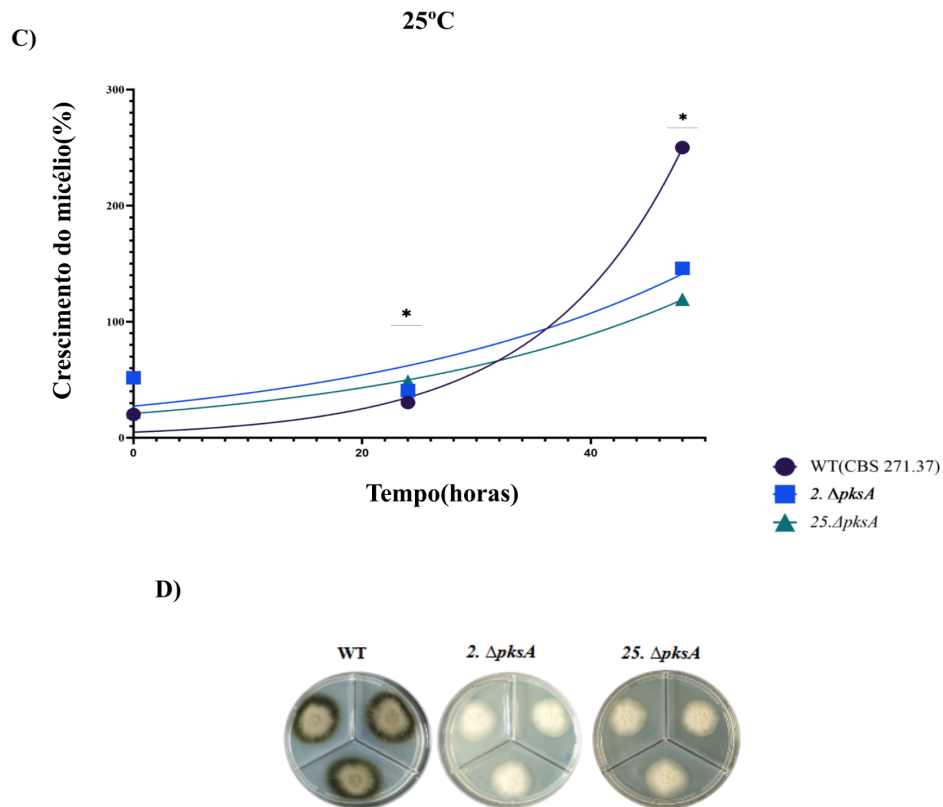


Figura 11. Os mutantes $\Delta pksA$ apresentam uma menor taxa de crescimento do micélio. 5 μL de uma suspensão de conídios 1×10^5 conídios/mL foram inoculados no centro de cada partição de placas tripartidas e o diâmetro das colônias foi medido a cada 3 dias durante 28 dias. (A) Curva de crescimento realizada em 25°C. (B) Curva de crescimento realizada em 37°C. (C) Curva de taxa de crescimento medida pela redução de Azul de Alamar. Os dados percentuais foram modelados em uma curva de regressão não-linear com equação de crescimento exponencial e *One-way* ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnett' s foram usados para comparar as variações entre os grupos teste e o controle (WT). $P < 0,05$ está indicado como *.(D) Foto representativa da diferença de crescimento entre as colônias após 28 dias de crescimento. Ao final dos 28 dias de experimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as inclinações das retas de crescimento radial das colônias.

5.2.2- A deleção do gene *pksA* interferiu negativamente na viabilidade e germinação dos conídios de *F. pedrosoi*

A viabilidade e a taxa de germinação dos conídios foram avaliadas. A viabilidade conidial foi avaliada por meio da diferença de UFCs do WT em comparação com os mutantes $\Delta pksA$, em placas de SDA a 25 e 37°C. Os conídios do mutante apresentaram menor viabilidade em comparação com o WT em ambas as temperaturas ($p < 0,05$)(**Figura suplementar III**). As análises de germinação foram conduzidas em 25 e 37°C em 24 e 48h. Nas temperaturas de 25° observou-se diferença estatisticamente significativa entre WT e os

$\Delta pksA$, tanto em 24h quanto em 48h ($P < 0,0001$), com atraso na germinação dos conídios mutantes (Figura 12 A e C). Já em 37 °C não foi possível observar diferenças importantes entre os grupos avaliados no ponto de 24h, dado que nesta condição observa-se uma lentificação do desenvolvimento de tubos germinativos em todos os grupos (Figura 12 B). Contudo, após 48h foi possível observar diferença estatística significativa entre WT e os mutantes $\Delta pksA$ ($P < 0,0001$).

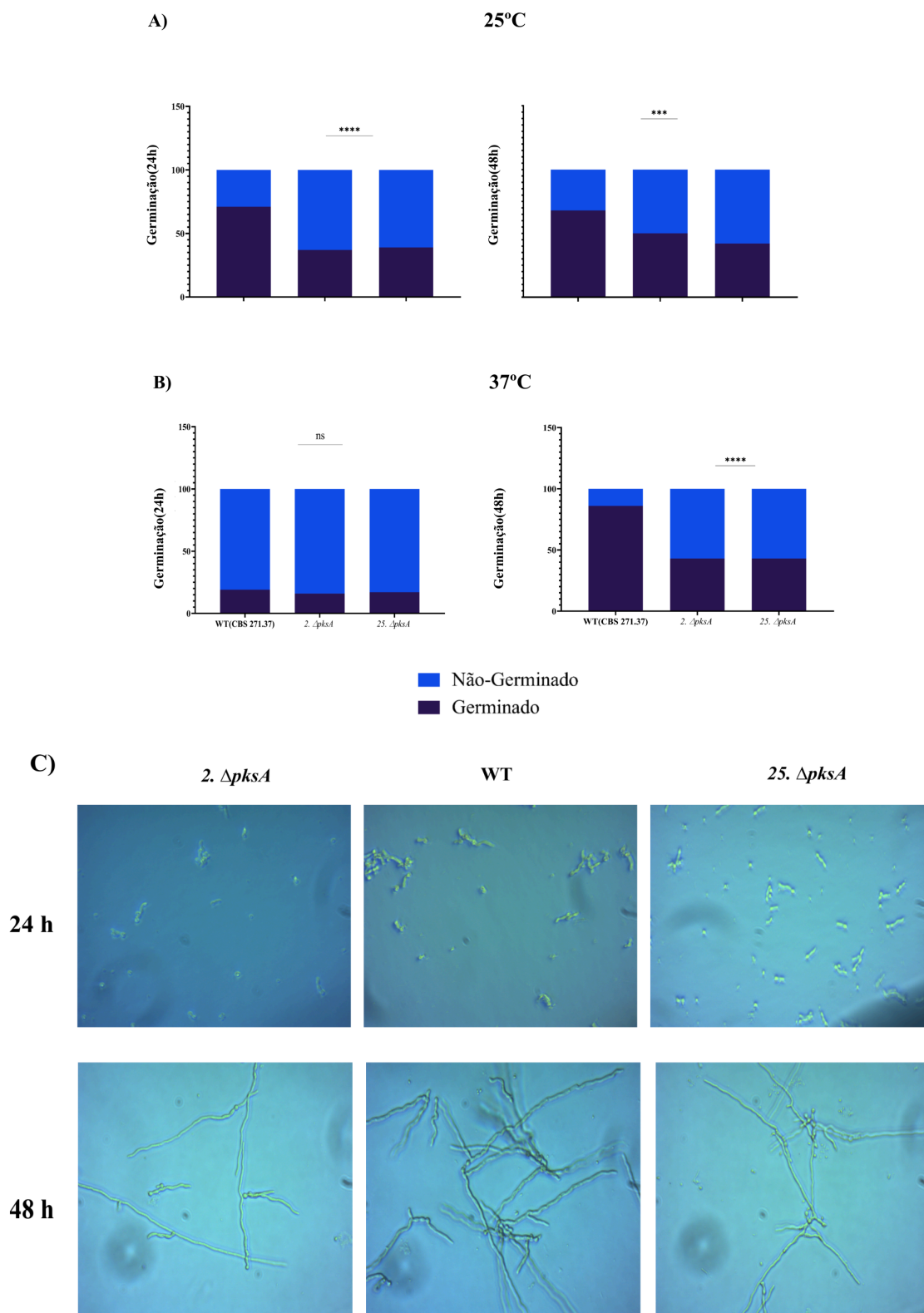


Figura 12: Taxa de germinação. Para o ensaio de germinação, 1×10^6 conídios foram inoculados em 1mL de caldo SAB em placa de 24 poços e incubados à 25 ou 37°C e contados em microscópio invertido. (A) Germinação de conídios a 25°C. (B) Germinação de conídios em 37°C. (C). Fotos em contraste de fase de conídios em germinação em 24 e 48h incubados à 25° C. Os experimentos foram realizados em triplicata, repetido duas vezes. O teste qualitativo Qui-quadrado foi usado para comparar as variações entre os grupos teste e o controle (WT). $P < 0,0001$ está indicado por “****”.

5.3- A 1,8-DHN-melanina é um fator protetivo frente aos estresses osmótico, oxidativo e de parede celular

5.3.1- Estresse osmótico

O estresse osmótico é uma condição adversa que pode acarretar em desidratação osmótica e consecutivamente na morte celular por plasmólise (BREMER; KRÄMER, 2019). Para avaliar a sensibilidade do mutante $\Delta pksA$ nessas condições, 5 μ L de uma suspensão de conídios 1×10^5 conídios/mL foram inoculados em placas de SDA suplementada com diferentes concentrações de dois promotores de estresse osmótico: KCl e Sorbitol. As placas foram incubadas por um total de 28 dias a 25 e 37°C. No último dia de incubação, o diâmetro das colônias foi medido. A análise de estresse osmótico com KCl demonstrou diferenças de crescimento significativas entre os mutantes e a linhagem selvagem em todas as concentrações testadas, tanto em 25 quanto em 37°C. Tais resultados indicam que a DHN-melanina atua como um fator protetivo frente ao estresse osmótico (**Figura 13**).

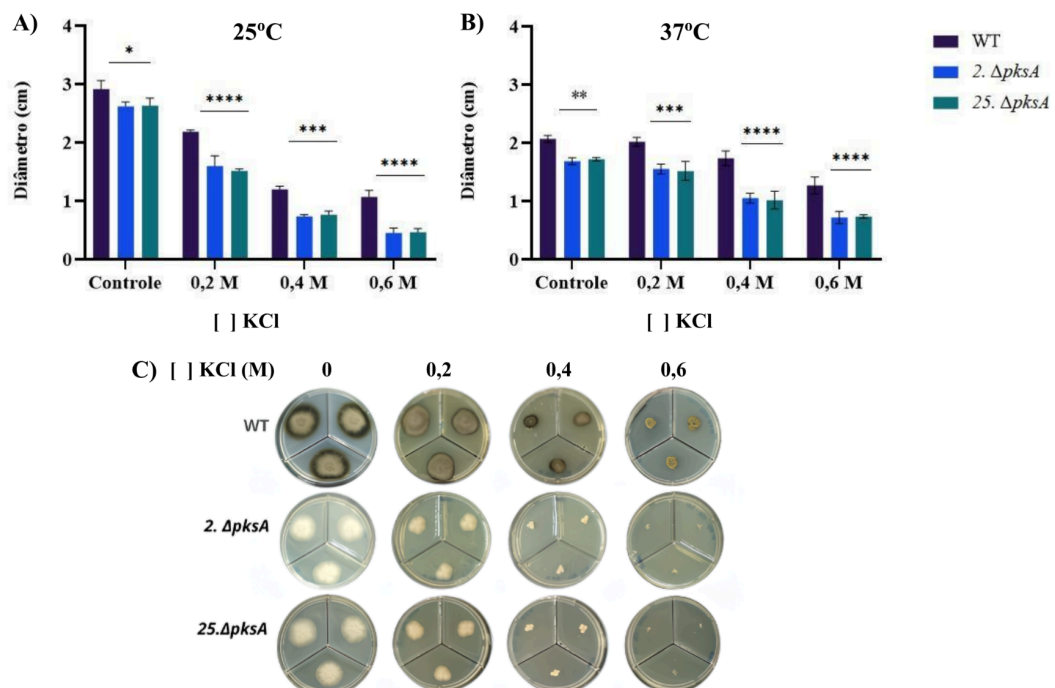


Figura 13: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse osmótico induzido por KCl. Foram inoculados 5 μ L de uma suspensão de conídios 1×10^5 conídios/mL em placas de SDA diferentes concentrações de KCl. O isolado CBS 271.37 foi usado como controle experimental. Gráficos demonstrando a diferença de sensibilidade dos mutantes de *pksA* em relação ao WT, a 25 (A) e 37° C (B). Crescimento em diferentes concentrações de KCl a 25° C (C). $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ estão indicados como *, **, ***, ****, respectivamente.

O estresse osmótico também foi testado por meio do gradiente de concentração de Sorbitol. As placas foram suplementadas com Sorbitol a 0,25, 0,5 e 1 M e incubadas a 25 e 37°C. Por meio da aferição do diâmetro da colônia, observou-se inibição do mutante em todas as concentrações e temperaturas testadas, à exceção da concentração 1M à 37°C. Dentro dessas análises, pode-se observar que as concentrações utilizadas de Sorbitol possuem menor eficiência de inibição do crescimento (Figura 14)

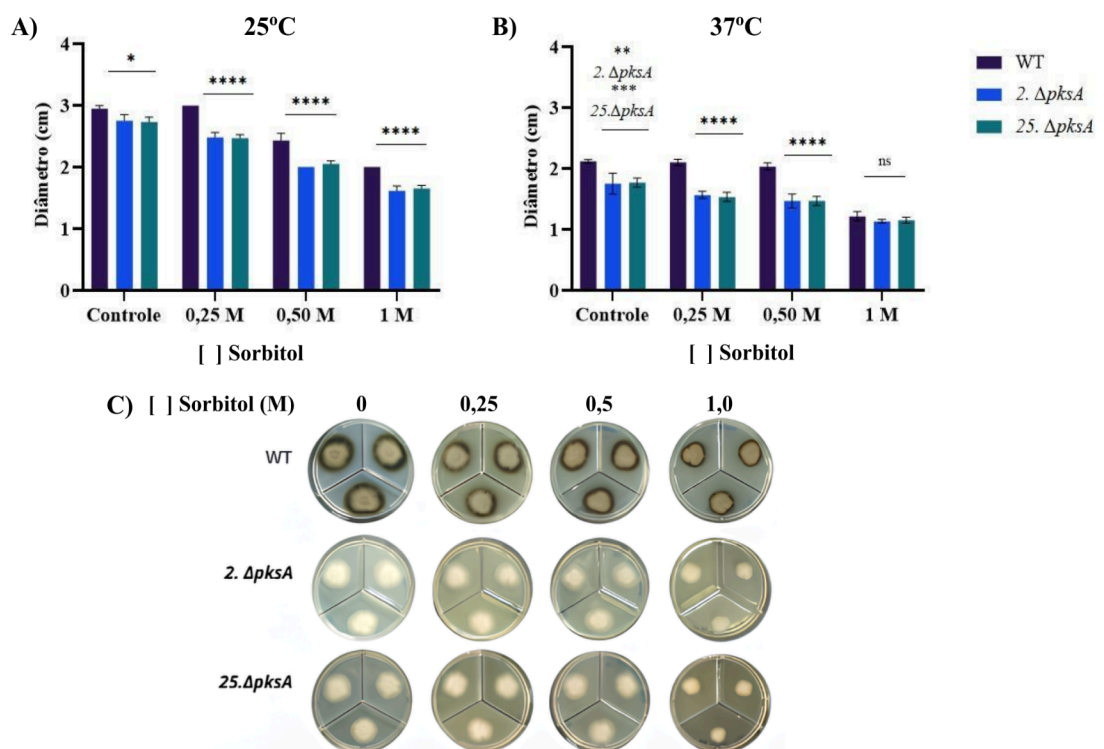


Figura 14: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse osmótico induzido por Sorbitol. Foram inoculados 5 μ L de uma suspensão de conídios 1×10^5 conídios/mL em placas de SDA diferentes concentrações de Sorbitol. O isolado CBS 271.37 foi usado como controle experimental. Gráficos demonstrando a diferença de sensibilidade dos mutantes em relação ao WT, a 25 (A) e 37° C (B). Crescimento em diferentes concentrações de

Sorbitol em 25°C (C). Os valores $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ estão indicados como *, **, ***, ****, respectivamente.

5.3.2- Estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio é ocasionada pelo metabolismo do oxigênio atmosférico. Esses agentes oxidantes podem ser bióticos ou sintéticos e são secretados por células do sistema imunitário do hospedeiro causando alterações químicas prejudiciais em proteínas, lipídeos, polissacarídeos, DNA, RNA, impactando até mesmo na produção de metabólitos secundários, gerando reações deletérias acarretando em morte celular (BREITENBACH et al., 2015; HAJAR YAAKOUB et al., 2022). A menadiona (2-methyl-1,4-naphthoquinone) pode ser usada como um gerador de O_2^- mediante a redução de quinona a semiquinona, gerando assim esta espécie reativa de oxigênio (ROS). Nos sistemas biológicos, este processo de redução é viabilizado pela coenzima NAD(P) na presença de enzimas redutases celulares (ZHOU et al., 2021). Sendo assim, para avaliar o envolvimento da DHN-melanina na proteção frente a agentes oxidativos, o crescimento da colônia foi avaliado em placas de SDA após a exposição a diferentes concentrações de Menadiona (Vitamina K) a 25°C. Comparado ao WT, o mutante $\Delta pksA$ apresentou maior suscetibilidade à Menadiona em 15 e 30 μM ($p > 0,0001$) (Figura 15).

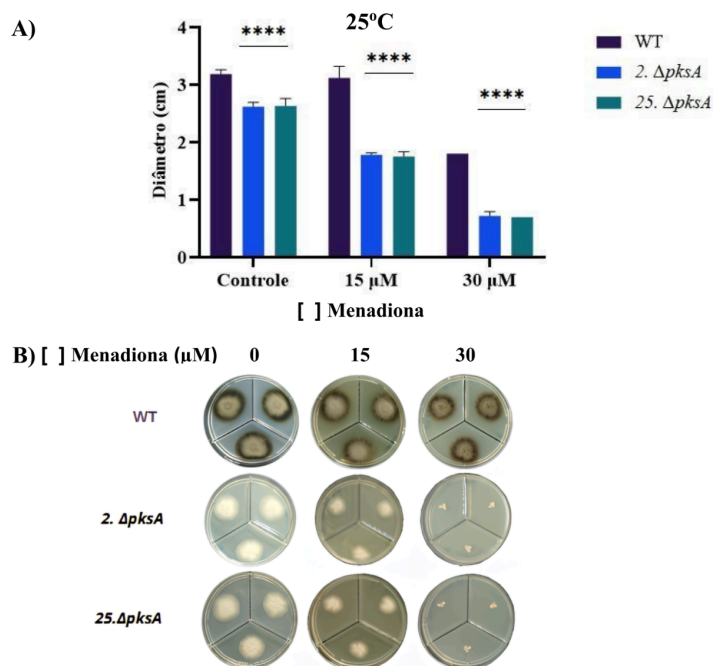


Figura 15: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse oxidativo. Foram inoculados 5 μL de uma suspensão de conídios 1×10^5 conídios/mL em placas de SDA com diferentes concentrações de Menadiona. O isolado CBS 271.37 foi usado como controle experimental. (A) Gráficos demonstrando a diferença de

sensibilidade dos mutantes em relação ao WT, a 25°C. (B) Crescimento em SDA com diferentes concentrações de Menadiona a 25°C. Os valores de $p < 0,0001$ estão indicados como ****.

5.3.3- Estresse de parede celular

O Calcofluor White (CFW) é um composto estressor para a parede celular de fungos, pois o mesmo apresenta uma estrutura química com dois grupos de ácido-sulfônico que ao entrarem em soluções moderadamente ácidas (pH:~5,5) assumem carga negativa, aumentando a afinidade às cadeias nascentes de quitina, inibindo assim as enzimas que fazem a ligação da quitina à α -1,3-Glucana e α -1,6-Glucana, gerando como consequência deste mecanismo uma estrutura de parede celular enfraquecida (RAM; KLIS, 2006). Para avaliar o papel da DHN-melanina na proteção frente ao estresse de parede celular, o crescimento da colônia foi avaliado em placas de SDA após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de CFW a 25 e 37°C. Comparado ao WT, os mutantes $\Delta pksA$ apresentaram uma sensibilidade significativa ($p < 0,0001$) ao estressor em 25°C (Figura 16).

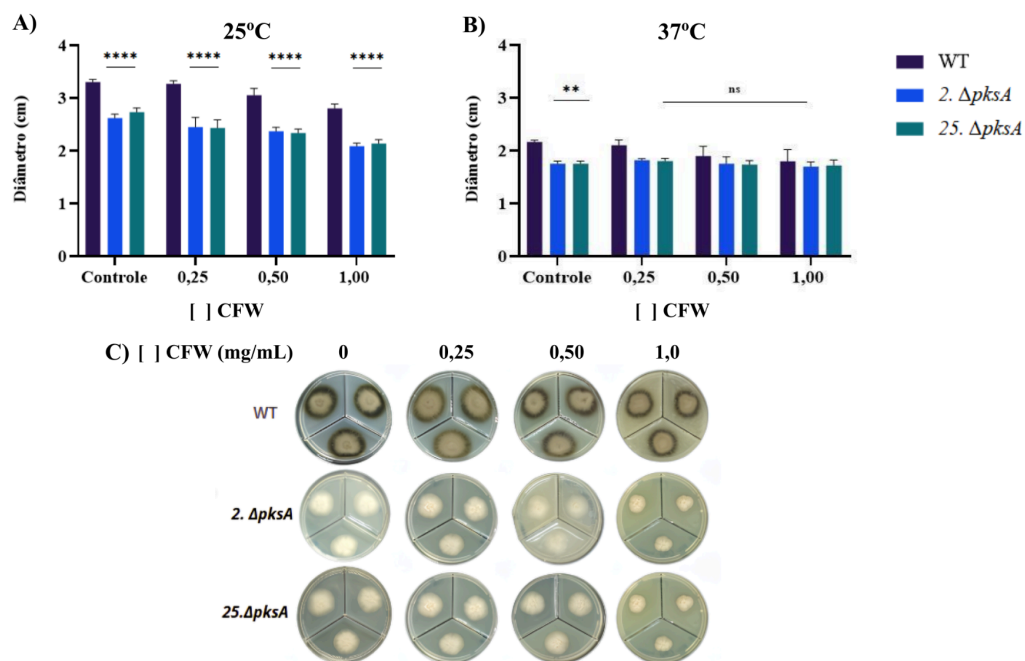


Figura 16: A melanina protege a célula fúngica contra o estresse da parede celular. Foram inoculados 5 μ L de uma suspensão de conídios 1×10^5 conídios/mL em placas de SDA diferentes concentrações de Calcofluor White. O isolado CBS 271.37 foi usado como controle experimental. Gráficos demonstrando a diferença de sensibilidade do mutante em relação ao WT, a 25 (A) e 37 °C (B). (C) Crescimento em diferentes concentrações de CFW em 25°C. não significativa, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$ está indicado como ns, ** e ****.

5.3.4- Tolerância a UV

A radiação Ultravioleta(UV) solar é uma importante fonte de estresse ambiental, pois o mesmo pode alterar parâmetros de crescimento como germinação e, sobretudo, a viabilidade celular(BRAGA et al., 2015;FERNANDES et al., 2015) Além disso, danos no DNA podem ser ocasionados, levando a geração de dímeros de pirimidina, como os dímeros ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos (6-4) pirimidona (6-4PPs), sinalizando também a produção de intermediários oxidativos, como o 8-oxo-7,8-di-hidro2'-desoxiguanosina(8-oxodGuo). Para avaliar se a melanina atua de forma protetiva frente à exposição a diferentes doses de UV-C (254nm) a viabilidade conidial foi avaliada por meio da diferença de UFCs do WT em comparação com os mutantes $\Delta pksA$, em placas de SDA a 25°C. Pulsos de diferentes doses (0, 50, 100 e 200 J/cm²) de UV foram irradiados sobre placas com conídios dos isolados 2. $\Delta pksA$, 25. $\Delta pksA$ e WT. Os conídios do mutante apresentaram menor viabilidade em comparação com o WT, sem exposição a UV. Embora tenha sido observado efeito significativamente dose-dependente ($p < 0,0001$) ou seja, quanto maior a dose, menor a viabilidade, não foram observadas diferenças significativas entre o WT e o $\Delta pksA$ (Figura 17).

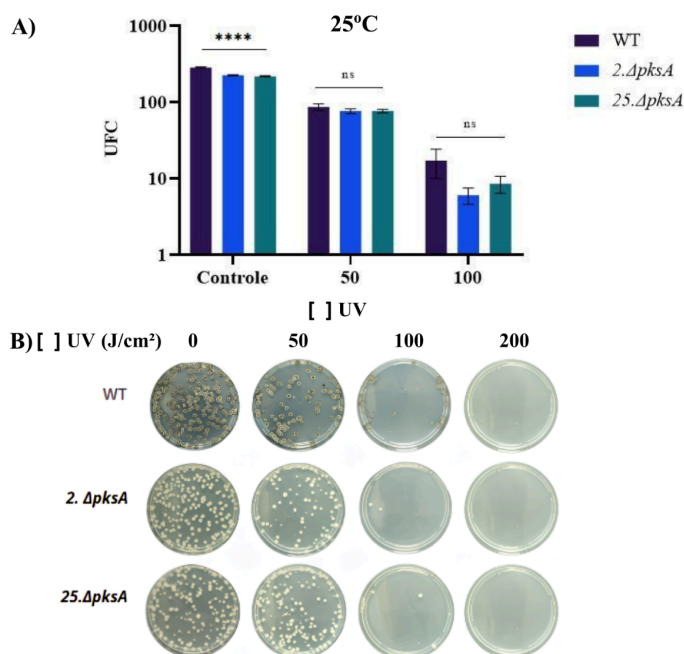


Figura 17: Viabilidade de conídios irradiados com UV. Foram inoculados 50 μ L de uma suspensão de conídios 1×10^4 conídios/mL em placas de SDA e espalhados com pérolas de vidro para contagem de UFC. Um gradiente de pulsos de radiação foi realizado, de 50 até 200 J/cm², para avaliar o impacto da dose sobre a viabilidade dos conídios. O isolado CBS 271.37 foi usado como controle experimental (a) Gráficos

demonstrando a tolerância dos mutantes em relação ao WT, após incubação a 25°C. (C) Crescimento das UFC após exposição a diferentes doses de radiação UV a 25°C. $p < 0,0001$ está indicado como ****.

5.4- Os mutantes $\Delta pksA$ são mais fagocitados e eliminados por células RAW 264.7

Os macrófagos são agentes do sistema imunológico presentes nos granulomas das lesões causadas pela CBM e podem participar, tanto da apresentação de antígenos quanto da resposta imune inata contra *F. pedrosoi* (SOTTO et al., 2003). Durante a fagocitose, os macrófagos ativados liberam ROS e espécies reativas de nitrogênio para conter o crescimento dos patógenos, desempenhando papel fungicida em outros fungos, como *F. monophora* e *Sporothrix schenckii* (ZHONG et al., 2024; FERNANDES et al., 2000).

Para investigar a capacidade dos mutantes $\Delta pksA$ de sobreviverem no interior de células de linhagem RAW 264.7 os mutantes $2.\Delta pksA$, $25.\Delta pksA$ e o WT foram utilizados para avaliar o número de conídios internalizadas e atividade fungicida (AF) dos macrófagos frente a estes isolados. Após a contagem, observou-se que os conídios $\Delta pksA$ geraram um número significativamente menor de colônias em comparação com o WT ($p < 0,001$) ((Figura 18-A,I). Já para avaliar a atividade fungicida (AF), os macrófagos foram estimulados com LPS e/ou INF- γ por 24h. Após a contagem, observou-se significativa diferença na AF entre o WT e o mutante $25.\Delta pksA$ estimulados ou não com LPS ($p > 0,0001$). (Figura 18 A, II e III).

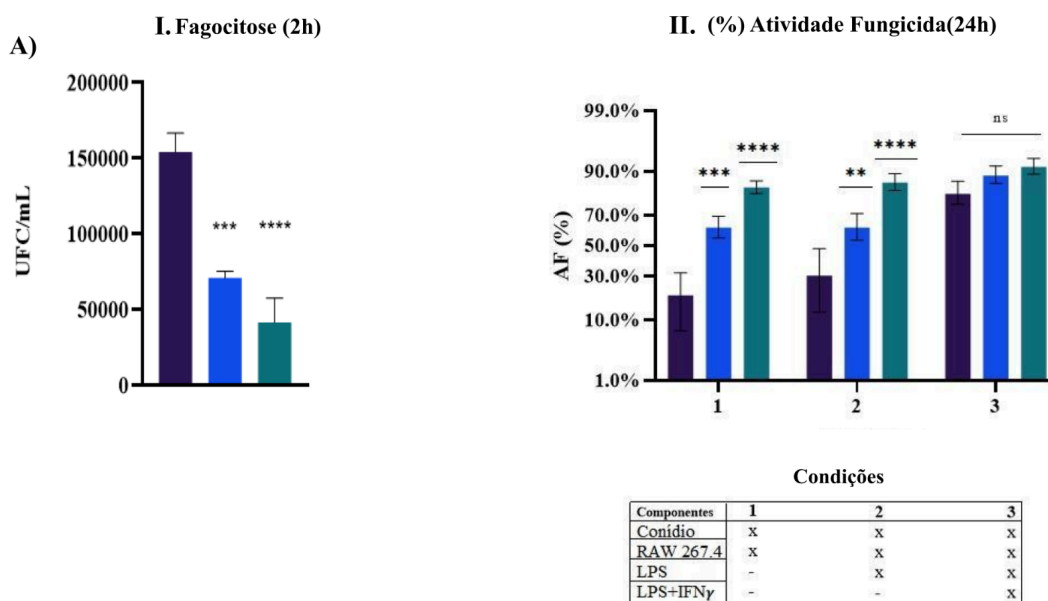


Figura 18: A melanina é um importante fator protetivo frente a atividade microbicida de macrófagos de linhagem RAW 264.7. Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram infectados com conídios dos isolados $2.\Delta pksA$, $25.\Delta pksA$ e o WT com um MOI de 3:1. Para análise do número de conídios internalizados as células não sofreram nenhum estímulo. Já para a aferição da AF elas foram estimuladas classicamente com LPS (500

ng/mL) e IFN- γ (50 ng/mL). Para IF o período de incubação foi de 2h e para AF foram incubadas por 24 horas. Ambas foram incubadas em estufa de 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. (I) UFC das placas de 2h não estimuladas para cálculo do número de conídios viáveis internalizados em UFC/mL. (II) UFC das placas de 24 h para cálculo do AF.(III) Percentual de Atividade Fungicida em três condições experimentais distintas. Foi utilizado o isolado CBS 271.37 como controle positivo e apenas o macrófago no controle negativo. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de ANOVA Two-ways com correção de Tukey para múltiplas comparações. Os valores $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ estão indicados como **, ***, ****, respectivamente.

5.5- Mutantes $\Delta pksA$ são menos virulentos em modelo larval *G. mellonella*

Para investigar a virulência *in vivo* dos mutantes $2.\Delta pksA$, $25.\Delta pksA$, foi efetuado um ensaio de infecção em modelo larval de *G. mellonella*. A curva de sobrevivência teve duração de 20 dias, e as lagartas infectadas foram incubadas a 37°C e observadas diariamente. Ambos os mutantes $2.\Delta pksA$, $25.\Delta pksA$ apresentaram menor capacidade de gerar morte nas larvas *G. mellonella* em comparação com o WT. Enquanto a infecção com a linhagem selvagem gerou a morte de 10 das 15 lagartas ao final do período de 20 dias de experimento, apenas 2 lagartas morreram após infecção com os mutantes $2.\Delta pksA$ e nenhuma morreu após infecção com o mutante $25.\Delta pksA$ e o controle de PBS estéril (**Figura 19, I**). Esses resultados indicam que a melanina é um importante atributo de virulência em *F. pedrosoi* sendo muito importante para a sua patogenicidade e gravidade da infecção. A aparente produção de melanina pelas lagartas também foi observada com nítida diferença entre aquelas infectadas com os mutantes $\Delta pksA$ comparado com o grupo infectado pela linhagem selvagem (**Figura 19, II**). Em situações de infecção, as larvas de *G. mellonella* produzem melanina para gerar a produção de intermediários tóxicos e oxidativos fazendo com que haja diminuição da proliferação microbiana (SMITH et al., 2022).

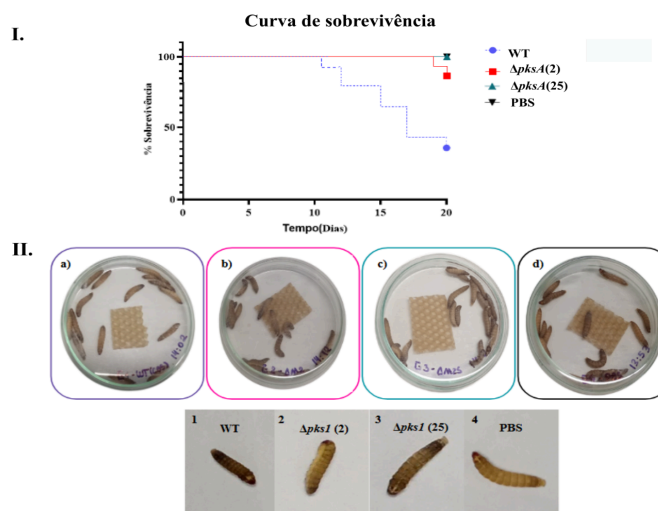


Figura 19: Ensaio de sobrevivência com *Galleria mellonella*. Para a realização do ensaio de sobrevivência, 5×10^5 conídios foram inoculados na última *proleg* esquerda de 15 larvas de cada um dos quatro grupos. (a) grupo infectado com o isolado CBS 271.37 do tipo selvagem, (b) grupo infectado com o isolado $\Delta pksA(2)$, (c) grupo controle da técnica, infectado com um segundo mutante, oriundo de outra transformação, $\Delta pksA(25)$ e (d) grupo controle da infecção, injetados com PBS. As imagens 1, 2, 3 e 4 demonstram o grau de melanização das larvas de cada grupo 20 dias após a infecção, demonstrando que os isolados $\Delta pksA$ possuem menor capacidade de ativação da melanização pois são hipovirulentos.

6. Discussão

Fonsecaea pedrosoi é um fungo filamentoso demácio causador da CBM (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Dentre os diversos estudos que objetivam elucidar seus atributos de virulência, nota-se que a melanina têm sido um importante alvo de análise (ALVIANO, et al., 1991; CUNHA et al., 2010). Sabe-se que a melanina produzida por *F. pedrosoi* é a DHN-melanina, que é o produto final da via biossintética da enzima PksA (CUNHA, et al., 2010; LI et al., 2022; XIAO et al., 2021). A melanina, enquanto atributo de virulência de fungo, desempenha diversas funções, como: redução da taxa de crescimento, esporulação, e aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo, a condições extremas de pH, resistência a antifúngicos, facilita a evasão da resposta imune mediante a proteção contra enzimas hidrolíticas, neutralização de ROS e nitrogênio e inibição da fagocitose (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CUNHA et al., 2005; XIAO et al., 2021)

O gene que codifica a proteína PksA de *F. pedrosoi* foi encontrado a partir de análises *in silico*, codificando a proteína hipotética Z517_06418 com ~99% de identidade (%ID) com PksA (sequência AYO21_03016) de *F. monophora* (LI et al., 2022). Após a confirmação molecular o fenótipo do mutante $\Delta pksA$ de *F. pedrosoi* foi avaliado em diferentes aspectos. Primeiramente, observou-se que todos os parâmetros de crescimento e morfogênese, tais como: velocidade de crescimento, viabilidade e germinação, foram alterados negativamente para o mutante $\Delta pksA$, assim como observado em estudos similares realizados com *F. monophora* (Li et al., 2022; XIAO et al., 2021). Resultados semelhantes, também foram observados em *Aspergillus fumigatus*, em que, tanto a ausência de pigmentação característica da deposição de melanina na superfície dos conídios, quanto alterações morfológicas também foram observadas em mutantes $\Delta alb1$ (TSAI et al., 1998). De igual forma, pesquisadores observaram que a deleção do gene *Cgpk11* que codifica a Chateoglobosina A (ChA), uma proteína PKS-1 sintetizada por *Chaetomium globosum*, também acarretou na lentificação da curva de crescimento, bem como na esporulação (XIANG et al., 2021). Diferentemente, em *Cryomyces antarcticus* e *Colletotrichum higginsianum* a deleção dos genes ortólogos de *pksA*

não resultaram na diminuição do tamanho das colônias, mas gerou uma coloração rosa ocasionada pela produção de carotenoides em *C. antarcticus* (CATANZARO et al., 2024;DUAN et al., 2023).

Somado ao fenótipo de crescimento, germinação e esporulação reduzidos, observou-se também que a deleção do gene *pksA* em *F. pedrosoi* gerou uma menor tolerância ao estresse osmótico (KCl e Sorbitol), oxidativo (Menadiona) e de Parede celular (CFW) diferentemente do que foi observado em *Beauveria bassiana*, onde a deleção do gene *BbpksP* não resultou na redução significativa de crescimento na presença dessas fontes de estresse analisados (WANG et al., 2019). Entretanto, em um projeto similar, desenvolvido por Cunha e colegas (2010), os autores analisaram o papel protetivo da melanina frente ao estresse oxidativo em *F. pedrosoi*. Foram utilizados isolados clínicos da linhagem 5VLP identificadas no município de Belo Horizonte/Minas Gerais por Luiz e colaboradores(1973). As culturas do fungo foram tratadas com o triciclazol (TC), que inibe a via biossintética da 1,8-DHN-melanina. Neste estudo observou-se que os conídios de *F. pedrosoi* tratados com TC eram mais sensíveis à exposição aos agentes causadores de estresse oxidativo, como H₂O₂ e SNAP. Em *F. monophora* observou-se que a melanina também exerce papel protetivo contra a ação oxidante do H₂O₂ (XIAO et al., 2021). Similarmente, estudos realizados em *F. monophora* notou-se que os mutantes submetidos ao estresse oxidativo causado pela exposição a menadiona acarretou em diminuição significativa no crescimento em comparação ao WT (SUN et al., 2011). Em mutantes da via de *pksA* de *Sporothrix brasiliensis* foi observada a redução da viabilidade celular frente ao estresse oxidativo, mediante ensaio de bioluminescência (REMI HATINGUAIS et al., 2023). Nos estudos de Cunha e colegas(2010) salientou-se que a melanina atua na proteção contra o estresse oxidativo mediante um fenômeno chamado tamponamento oxidativo, onde a melanina atua diretamente na captura de elétrons desemparelhados dos radicais livres, como o NO[•].

A exposição a UV também é um importante agente estressor, pois o mesmo pode impactar na viabilidade celular mediante danos causados ao DNA. A natureza dos danos ao DNA induzidos pela radiação UV varia conforme o comprimento de onda da radiação incidente. A radiação UV causa danos diretos por absorção de fótons pelo DNA, levando principalmente à formação de dímeros de pirimidina, como os dímeros ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos (6-4) pirimidona (6-4PPs). Embora também induz a ativação de vias de oxidação, como a 8-oxo-7,8-di-hidro2'-desoxiguanosina(8-oxodGuo), sua ocorrência é bem menos frequente(BRAGA et al., 2015). No presente estudo, também foi observado que os mutantes albinos de *F. pedrosoi* não apresentam diferença quanto à tolerância à UV em

relação ao CBS 271.37 do tipo selvagem, diferentemente do que foram observados em estudos realizados com *F. monophora* e *B. bassiana* (LI et al., 2022; WANG et al., 2019). Tal diferença dos resultados pode ser explicada a partir da diferença metodológica utilizada no estudo com *F. pedrosoi*, onde se empregou a contagem de Unidades Formadoras de Colônias(UFC) para a avaliação da viabilidade dos conídios expostos à pulsos de 50, 100 e 200 J/cm² de UV-C(254nm), sem análise do impacto do tempo de exposição ao contrário de como fizeram nos estudos com *B. bassiana* e *F. monophora*. A análise do crescimento radial, metodologia empregada nos estudos de Li(2022) e Wang(2019) não avalia diretamente a viabilidade conidial, mas a velocidade de crescimento dentro de um determinado número de dias e esses resultados não são suficientes para demonstrar o impacto da exposição a UV-C sobre a viabilidade dos conídios, que normalmente é validada por meio de ensaios metabólicos (como XXT e Resazurina), UFC, *live/dead quantitative PCR*, análises de microscopia de fluorescência ou métodos similares que buscam estimar o número aproximado de células viáveis em suspensão(BROWN et al., 2022).

Os macrófagos são células do sistema imunológico presentes nos granulomas das lesões causadas pela CBM e podem participar, tanto da apresentação de antígenos quanto da resposta imune inata contra *F. pedrosoi* (SOTTO et al., 2003). Durante a fagocitose, os macrófagos ativados liberam ROS e NO para conter o crescimento dos patógenos, desempenhando papel fungicida em outros fungos, como *F. monophora* e *Sporothrix schenckii* (ZHONG et al., 2024; FERNANDES et al., 2000). No presente estudo, as análises de fagocitose *in vitro* com macrófagos de linhagem RAW 264.7 revelaram que a melanina foi capaz de diminuir a atividade fungicida, na presença de estímulos com LPS e/ou INF- γ por 24h em *F. pedrosoi* (**Figura 15, A, III**). Esses achados são similares aos observados por Cunha e colaboradores (2010) ao qual concluíram que a DHN-melanina presente na parede celular de *F. pedrosoi* exerce uma ação de tamponação oxidativa por meio da captura do elétron desemparelhado de ROS e NO, protegendo o fungo contra os danos oxidativos.

O ensaio de sobrevivência dos mutantes *pksA* de *F. pedrosoi* em *G.mellonella* demonstrou que a supressão da via biossintética da DHN-melanina acarreta em uma redução significativa da virulência de *F. pedrosoi in vivo*. Achados semelhantes foram observados em *F. monophora* e *B. bassiana*, onde os mutantes sem melanina apresentaram menor patogenicidade nos modelos *in vivo* *G. mellonella* (XIAO et al., 2021; LIU et al., 2019). Em estudos realizados com *C. higginsianum* — um fitopatógeno causador da doença antracnose em cultivares de couve-flor chinesa — a deleção dos gene *ChPks* and *ChThr1*, que codificam duas enzimas relacionadas com a via de biossíntese da DHN-melanina, foi possível observar

uma redução significativa da patogenicidade em ensaio realizado no modelo de planta *in vivo* *Arabidopsis*, sendo os mutantes $\Delta ChPks$ menos virulentos em comparação ao mutante $\Delta ChThr1$ e WT (DUAN et al., 2023).

A melanização das larvas de *G. mellonella* infectadas com os mutantes *pksA* de *F. pedrosoi* e a linhagem selvagem apresentou-se alterada, sendo mais evidente no grupo infectado com a linhagem WT (CBS 271.37). A melanização é uma resposta imunológica crucial em *G. mellonella*, (SMITH et al., 2022). Durante a infecção, os hemócitos de *G. mellonella* — análogos funcionais aos neutrófilos de mamíferos — se agregam em torno dos patógenos, formando nódulos nos quais ocorre intensa melanização. Esta resposta não apenas isola o agente infeccioso, mas também induz sua destruição por meio de barreiras físicas e ação química tóxica (TÜLAY TURGUT GENÇ et al., 2024). Após este processo, conhecido como “nodulação”, ocorre a liberação de enzimas associadas ao sistema imunológico em lepidópteros. Dentre estas enzimas, a prostaglandina exerce a função de lisar os hemócitos da classe dos oenocitóides, que por sua vez, liberam a enzima fenoxidase (FEO). E, por fim, as enzimas FEO catalisam a conversão de catecolaminas de DOPA-melanina na hemolinfa. Durante o processo de melanização ocorre a produção de ROS e intermediários citotóxicos que podem auxiliar a conter ou eliminar a infecção (KIM, et al., 2018).

Por fim, a DHN-melanina desempenha diversas funções em outros fungos filamentosos, podendo estar relacionada ao processo de adesão celular, a conidiogênese e também à resistência a antifúngicos (XIN; WU; ZHANG, 2025; XIAO et al., 2021; Li et al., 2022).

7. Conclusões e Perspectivas

A DHN-melanina é um importante atributo de virulência em *F. pedrosoi*, corroborando tanto na patogenicidade quanto na sobrevivência do mesmo sob estresse ambiental. Os achados deste trabalho sugerem que a DHN-melanina está associada ao crescimento, germinação e viabilidade pois todos esses parâmetros foram alterados negativamente no mutante $\Delta pksA$. Para além disto foi observado que a melanina confere proteção significativa frente ao estresse osmótico induzido por KCl e sorbitol, bem como ao estresse oxidativo causado pela Menadiona. No tocante à fagocitose por macrófagos RAW 264.7, foi observado que os mutantes apresentaram maior percentual de atividade fungicida, demonstrando um possível papel no tamponamento oxidativo da DHN-melanina conforme salientado por Cunha e colegas(2010). Neste sentido, tal achado foi corroborado pela análises *in vivo* no qual se pode notar que as larvas de *G.mellonella* foram incapazes de

sobreviver quando infectadas com *F. pedrosoi* WT mas o mesmo não foi observado entre as larvas infectadas com os mutantes $\Delta pksA$. O aspecto externo da epiderme das larvas também demonstrou que a DHN-melanina do fungo desencadeia um processo de defesa imunológica no qual a *G. mellonella* começa a produzir DOPA-melanina, gerando ROS e outros intermediários citotóxicos e ao mesmo tempo protege o fungo destes radicais.

O estudo em questão ainda não possui testes comparativos com isolados reconstituídos $\Delta pksA+pksA$ para a prova de conceito da técnica de biobalística, fazendo-se necessário esta obtenção, visando o aprimoramento da confiabilidade das diferenças observadas do mutante $\Delta pksA$ em relação ao WT. A taxa de conidiação é uma das principais facetas do crescimento fúngico, sendo um resultado de elevada importância para a elucidação da velocidade reduzida do crescimento dos mutantes $\Delta pksA$. Ademais, outros ensaios associados à morfogênese e crescimento sob estresse UV serão importantes para clarificar aspectos como velocidade de crescimento (diâmetro da colônia), germinação e viabilidade dos conídios no meio ambiente, onde são expostos a UV solar. No tocante aos ensaios de estresse oxidativo, é necessário uma melhor padronização da metodologia utilizada com *F. pedrosoi* tratado com TC por Cunha e Colegas(2010) para avaliar a resistência ao estresse oxidativo ocasionado por H_2O_2 nos mutantes $\Delta pksA$, para se gerar resultados mais redundantes e comprobatórios a respeito da proteção antioxidante da DHN-melanina em *F. pedrosoi*. Além disto, faz-se necessário a padronização de novas metodologias mais acuradas e específicas para a análise da viabilidade conidial, uma vez que o prejuízo metabólico ocasionado pela inibição da via da PksA pode acarretar numa contagem subestimada das colônias em placas de UFCs. Outras metodologias, como ensaio de viabilidade XTT e outras formas de avaliação de células vivas e mortas se fazem necessárias para a validação dos resultados observados na caracterização do fenótipo dos mutantes nos ensaios com agentes estressores, fagocitose e na curva de sobrevivência com *G. mellonella*.

8. Referências Bibliográficas

1. AGARWAL, R. et al. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 cases. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 8, p. e0005534, 3 ago. 2017.
2. ALVIANO, C. S. et al. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. Journal of General Microbiology, v. 137, n. 4, p. 837–844, 1 abr. 1991.
3. ALVIANO, D. S. et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. Infection and Immunity, v. 72, n. 1, p. 229–237, 1 jan. 2004.
4. Alzohairy, Ahmed. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. GEF Bulletin of Biosciences. 2. 60-61.
5. ANDRADE, T. S. et al. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. Diag Microbiol Infect Dis, v. 57, n. 3, p. 267–272, 1 mar. 2007.
6. ANDRADE, T. S. et al. Chromoblastomycosis in the Amazon region, Brazil, caused by *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea nubica*, and *Rhinocladiella similis*: Clinicopathology, susceptibility, and molecular identification. Medical Mycology, 24 abr. 2019.
7. BADALI, H. et al. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and *F. monophora* in Cuba. Mycopathologia, v. 175, n. 5-6, p. 439–444, 1 jun. 2013.
8. BARBOSA, P. et al. Chromoblastomycosis in Brazil: A review of 450 published cases. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 57, 1 jan. 2024.
9. BELDA, W.; CRIADO, P. R.; PASSERO, L. F. D. Successful treatment of chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* using imiquimod. The Journal of Dermatology, v. 47, n. 4, p. 409–412, abr. 2020.
10. BOCCA, A. L. et al. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. Mycopathologia, v. 161, n. 4, p. 195–203, 1 abr. 2006.

11. BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAÚL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*, v. 44, n. 1-2, p. 1–7, 2001.
12. BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 8, n. 8, p. 619–628, 7 jun. 2010.
13. BOULTON, S. J.; JACKSON, S. P. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *The EMBO Journal*, v. 15, n. 18, p. 5093–5103, set. 1996.
14. BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, v. 15 Suppl 2, p. 36–47, 1 nov. 2003.
15. BREITENBACH, M. et al. Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 318–342, 3 abr. 2015.
16. BREMER, E.; KRÄMER, R. Responses of Microorganisms to Osmotic Stress.
17. BRITO, A. C.; BITTENCOURT, M. DE J. S. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 93, n. 4, p. 495–506, 2018.
18. BROWN, J. L. et al. Cell Viability Assays for *Candida auris*. *Methods in Molecular Biology*, p. 129–153, 2022.
19. BRYKSIN, A.; MATSUMURA, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques*, v. 48, n. 6, p. 463–465, jun. 2010.
20. CALIGIORNE, R. B. et al. Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal DNA gene polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mycoses*, v. 42, n. 11-12, p. 609–614, dez. 1999.

21. CATANZARO, I. et al. Deletion of the polyketide synthase-encoding gene *pks1* prevents melanization in the extremophilic fungus *Cryomyces antarcticus*. *IUBMB Life*, v. 76, n. 12, p. 1072–1090, 16 jul. 2024.
22. CHAMILOS, G.; CARVALHO, A. *Aspergillus fumigatus* DHN-Melanin. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 425, p. 17–28, 2020.
23. CARCAMO, P. M.; SCHWALB, A.; SEAS, C. Chromoblastomycosis: A Case of a Verrucous Plaque from the Tropics. *PubMed*, v. 103, n. 2, p. 547–548, 1 ago. 2020.
24. CHEN, Y.-L. et al. Calcineurin Controls Hyphal Growth, Virulence, and Drug Tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryotic Cell*, v. 13, n. 7, p. 844–854, 17 jan. 2014.
25. CHONGKAE, S. et al. Production of melanin pigments in saprophytic fungi in vitro and during infection. *Journal of Basic Microbiology*, v. 59, n. 11, p. 1092–1104, 15 out. 2019.
26. COELHO, R. A. et al. New possibilities for chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis treatment: identification of two compounds from the MMV Pathogen Box® that present synergism with itraconazole. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, p. e220089, 1 jan. 2022.
27. CREAMER, T. P. Calcineurin. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, n. 1, 28 ago. 2020.
28. CUNHA, M. M. et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by triclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microscopy Research and Technique*, v. 68, n. 6, p. 377–384, 1 jan. 2005.
29. CUNHA, M. M. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology*, v. 10, n. 1, 16 mar. 2010.
30. DE HOOG, G. S. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 63, n. 2, p. 105–109, fev. 1993
31. DICHTL, K.; HELMSCHROTT, C.; DIRR, F.; WAGENER, J. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: Identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Molecular Microbiology*, v. 83, n. 3, p. 506–519, 2012.

32. DONG, B. et al. Muriform Cells Can Reproduce by Dividing in an Athymic Murine Model of Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 103, n. 2, p. 704–712, 5 ago. 2020.
33. DUAN, L. et al. Deficiency of ChPks and ChThr1 Inhibited DHN-Melanin Biosynthesis, Disrupted Cell Wall Integrity and Attenuated Pathogenicity in *Colletotrichum higginsianum*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 21, p. 15890, 2 nov. 2023.
34. ELGART, G. W. CHROMOBLASTOMYCOSIS. *Dermatologic Clinics*, v. 14, n. 1, p. 77–83, jan. 1996.
35. ESTERRE et al. Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of chromomycosis. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, v. 422, n. 4, p. 285–291, 1 jul. 1993.
36. FARBIARZ et al. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. v. 30, n. 4, p. 265–273, 1 jul. 1992.
37. FAVILLA, L. D. et al. Expanding the Toolbox for Functional Genomics in *Fonsecaea pedrosoi*: The Use of Split-Marker and Biolistic Transformation for Inactivation of Tryptophan Synthase (*trpB*) Gene. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 2, p. 224, 8 fev. 2023.
38. FERNANDES, K. S. S. et al. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology*, v. 101, n. 4, p. 563–569, dez. 2000.
39. FERNANDES, K. et al. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. v. 61, n. 3, p. 427–440, 19 maio 2015.
40. FLORENCIO, C. S. et al. Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation. *Microbiological Research*, v. 207, p. 269–279, 1 mar. 2018.
41. FRANZEN, A. J. et al. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a specific DHN–melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea*

- pedrosoi conidia and sclerotic cells. *Microscopy Research and Technique*, v. 69, n. 9, p. 729–737, 2006.
42. GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 22, n. 6, p. 559–563, dez. 2009.
43. GOHAIN, D.; TAMULI, R. Calcineurin responsive zinc-finger-1 binds to a unique promoter sequence to upregulate neuronal calcium sensor-1, whose interaction with MID-1 increases tolerance to calcium stress in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, v. 111, n. 6, p. 1510–1528, 1 jun. 2019.
44. GOINS, C. L.; GERIK, K. J.; LODGE, J. K. Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: Absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal Genetics and Biology*, v. 43, n. 8, p. 531–544, ago. 2006.
45. GRILLO, E.; MAVURA, D.; JAÉN-OLASOLO, P. Cromoblastomicosis. *Revista Clínica Española*, v. 214, n. 3, p. e35, abr. 2014.
46. HAJAR YAAKOUB et al. Oxidative stress response pathways in fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 79, n. 6, 1 jun. 2022.
47. HAMZA, S. H. et al. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 30, n. 5, p. 340–343, 1 maio 2003.
48. HANS, M. et al. Mechanistic Analysis of Acyl Transferase Domain Exchange in Polyketide Synthase Modules. v. 125, n. 18, p. 5366–5374, 12 abr. 2003.
49. HERMAN, T. S. et al. Resazurin to determine the minimum inhibitory concentration on antifungal susceptibility assays for *Fonsecaea* sp. using a modified EUCAST protocol. *Brazilian Journal of Microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 4 mar. 2024.

50. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. et al. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa in vitro* and characterization of progesterone receptors. *Medical Mycology*, v. 33, n. 4, p. 235–239, jan. 1995.
51. KEATINGE-CLAY, A. Crystal Structure of the Erythromycin Polyketide Synthase Dehydratase. *Journal of Molecular Biology*, v. 384, n. 4, p. 941–953, 14 out. 2008.
52. KIM, M. S. et al. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 390, n. 3, p. 983–988, dez. 2009.
53. KIM, Y. et al. Eicosanoid-mediated immunity in insects. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 83, p. 130–143, jun. 2018.
54. KRZYŚCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M. Chromoblastomycosis. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, v. 31, n. 5, p. 310–321, 1 out. 2014.
55. KULLAVANIJAYA, P.; ROJANAVANICH, V. Successful treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. *International Journal of Dermatology*, v. 34, n. 11, p. 804–807, 1 nov. 1995.
56. LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal genetics and biology: FG & B*, v. 38, n. 2, p. 143–158, 1 mar. 2003
57. LEE, S. C. et al. Calcineurin Plays Key Roles in the Dimorphic Transition and Virulence of the Human Pathogenic Zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 9, p. e1003625, 5 set. 2013.
58. LI, M. et al. Deletion C-terminal thioesterase abolishes melanin biosynthesis, affects metabolism and reduces the pathogenesis of *Fonsecaea monophora*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 16, n. 6, p. e0010485, 13 jun. 2022.
59. LIMONGI, C. L. et al. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Fonsecaea pedrosoi*. *Medical Mycology*, v. 39, n. 5, p. 429–437, 1 out. 2001.

60. LIU, Y. et al. Increased virulence of albino mutant of *Fonsecaea monophora* in *Galleria mellonella*. *Medical Mycology*, v. 57, n. 8, p. 1018–1023, 13 fev. 2019.
61. LÓPEZ MARTÍNEZ, R.; MÉNDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 2, p. 188–194, mar. 2007.
62. LU, S. et al. Chromoblastomycosis in Mainland China: A Systematic Review on Clinical Characteristics. *Mycopathologia*, v. 175, n. 5-6, p. 489–495, 20 out. 2012.
63. LU, S. et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, 28 nov. 2019.
64. LUIZ. Isolamento e identificação dos agentes da cromomicose em Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 7, n. 1, p. 7–10, 1 fev. 1973.
65. MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic acids research*, v. 52, n. W1, 10 abr. 2024.
66. MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.
67. 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, 1 jan. 1983.
68. MIRANDA, M. F. R.; SILVA, A. J. G. Vinyl adhesive tape also effective for direct microscopy diagnosis of chromomycosis, lobomycosis, and paracoccidioidomycosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 52, n. 1, p. 39–43, 1 maio 2005.
69. MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*, v. 83, n. 1, nov. 2008.
70. NAJAFZADEH, M. J. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Medical mycology*, v. 48, n. 6, p. 800–806, 1 set. 2010.
71. NAKAYASHIKI, H. et al. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, n. 4, p. 275–283, abr. 2005.

72. NAYAK, T. et al. A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, v. 172, n. 3, p. 1557–1566, 30 dez. 2005.
73. NINOMIYA, Y. et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 33, p. 12248–12253, 6 ago. 2004.
74. NÓBREGA, J. P. S. et al. *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis (“chromoblastomycosis”): first human culture-proven case reported in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, p. 217–220, 1 ago. 2003.
75. NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 203–223, abr. 2003.
76. PALMEIRA, V. F. et al. The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key’s host structures. *FEMS immunology and medical microbiology*, v. 46, n. 1, p. 21–29, 1 fev. 2006.
77. PALMEIRA, V. F. et al. Secretory aspartyl peptidase activity from mycelia of the human fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi*: Effect of HIV aspartyl proteolytic inhibitors. v. 157, n. 9, p. 819–826, 1 nov. 2006.
78. PALMEIRA, V. F. et al. Phospholipase and Esterase Production by Clinical Strains of *Fonsecaea pedrosoi* and Their Interactions with Epithelial Cells. *Mycopathologia*, v. 170, n. 1, p. 31–37, 1 mar. 2010.
79. PANIZ-MONDOLFI et al. Extensive chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* successfully treated with a combination of amphotericin B and itraconazole. *Medical mycology*, v. 46, n. 2, p. 179–184, 1 jan. 2008.
80. PÉREZ-BLANCO et al. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Medical Mycology*, v. 44, n. 5, p. 467–471, 1 jan. 2006.

81. PINTO, L. et al. Activation of the human complement system by pigmented and hypopigmented mycelia of the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycoses*, v. 54, n. 5, p. e474–e480, 9 maio 2011.
82. PINTO, L. et al. Melanin particles isolated from the fungus *Fonsecaea pedrosoi* activates the human complement system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 8, 25 jun. 2018.
83. PUGH, E. L.; WAKIL, S. J. Studies on the Mechanism of Fatty Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 240, n. 12, p. 4727–4733, 1 dez. 1965.
84. QUEIRÓZ, A. J. R.; PEREIRA DOMINGOS, F.; ANTÔNIO, J. R. Chromoblastomycosis: clinical experience and review of literature. *International Journal of Dermatology*, v. 57, n. 11, p. 1351–1355, 16 ago. 2018.
85. QUEIROZ-TELLES, F. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *International Journal of Dermatology*, v. 31, n. 11, p. 805–812, 1 nov. 1992.
86. QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*, v. 47, n. 1, p. 3–15, jan. 2009.
87. QUEIROZ-TELLES, F.; DE C L SANTOS, D. W. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, v. 175, n. 5-6, p. 477–488, 2 maio 2013.
88. QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 1, p. 233–276, 1 jan. 2017.
89. RAM, A. F. J.; KLIS, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2253–2256, 1 dez. 2006.
90. RAPOSO, G.; MARKS, M. S. The Dark Side of Lysosome-Related Organelles: Specialization of the Endocytic Pathway for Melanosome Biogenesis. *Traffic*, v. 3, n. 4, p. 237–248, abr. 2002.

91. RILEY, P. A. Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 29, n. 11, p. 1235–1239, 1 nov. 1997.
92. RENAN MINOTTO et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *v. 44, n. 4, p. 585–592, 1 abr. 2001.*
93. ROSAS, A. L. et al. Synthesis of Polymerized Melanin by *Cryptococcus neoformans* in Infected Rodents. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 5, p. 2845–2853, 1 maio 2000.
94. SALGADO, C. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, n. 1, p. 33–36, fev. 2004.
95. SANTOS, A. L. S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 5, p. 570–591, set. 2007.
96. SANTOS, D. W. C. L. et al. The global burden of chromoblastomycosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 8, p. e0009611, 12 ago. 2021.
97. SANTOS JÚNIOR, C. J. DOS; SOUZA, A. K. P.; ROCHA, T. J. M. Mycosis Fungoides: A Necessary Differential Diagnosis in Infectious Disease and Dermatology Settings. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 57, 2024.
98. SATOW, M. M. et al. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Mycology*, v. 61, p. 157–163, 2008.
99. SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 3, p. 527–542, 1 jul. 2014.
100. SHWAB, E. K. et al. Calcineurin-dependent dephosphorylation of the transcription factor CrzA at specific sites controls conidiation, stress tolerance, and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*, v. 112, n. 1, p. 62–80, 15 abr. 2019.
101. SILVA, C. DE M. P. E et al. Associação de cromoblastomicose e hanseníase: relato de dois casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, n. 4, p. 241–244, dez. 1994.

102. SILVA, J. P. et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 63–69, mar. 2002.
103. SINGH, S. et al. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnology Advances*, v. 53, p. 107773, dez. 2021.
104. SMITH, D. F. Q. et al. *Galleria mellonella* immune melanization is fungicidal during infection. *Communications Biology*, v. 5, n. 1, 12 dez. 2022.
105. SOLANO, F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New Journal of Science*, v. 2014, p. 1–28, 2014.
106. SORIANI, F. M. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Molecular Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 1274–1291, 1 mar. 2008.
107. SOTTO, M. N. et al. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 31, n. 1, p. 14–18, 11 dez. 2003.
108. SOUSA, I. S. et al. Biofilm Formation by Chromoblastomycosis Fungi *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*: Involvement with Antifungal Resistance. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 9, p. 963, 1 set. 2022.
109. SPIELVOGEL, A. et al. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal*, v. 414, n. 3, p. 419–429, 27 ago. 2008.
110. SUN, J. et al. Melanization of a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* Increases Tolerance to Stress Factors While no Effects on Antifungal Susceptibility. *Mycopathologia*, v. 172, n. 5, p. 373–380, 26 jun. 2011.
111. SUN, J. et al. Molecular Characterization of Pathogenic Members of the Genus *Fonsecaea* Using Multilocus Analysis. *PloS one*, v. 7, n. 8, p. e41512–e41512, 2 ago. 2012.

112. SWARBRICK, C. M. D. et al. Structure, function, and regulation of thioesterases. *Progress in Lipid Research*, v. 79, p. 101036, jul. 2020.
113. SZANISZLO, P. J. Molecular genetic studies of the model dematiaceous pathogen *Wangiella dermatitidis*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 292, n. 5-6, p. 381–390, 1 jan. 2002.
114. TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (*Chaetothyriales*, *Ascomycota*). *Studies in Mycology*, v. 86, n. 1, p. 1–28, 1 mar. 2017.
115. TSAI, H.-F. et al. The Developmentally Regulated *alb1* Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 12, p. 3031–3038, 15 jun. 1998.
116. TSUKAMOTO, Y.; KATO, J-I; IKEDA, H. Hdf1, a yeast Ku-protein homologue, is involved in illegitimate recombination, but not in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 11, p. 2067–2072, 1 jun. 1996.
117. TÜLAY TURGUT GENÇ et al. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after mono- and co-injection with *Hypericum perforatum* extract and *Candida albicans*. *APMIS. Acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica.*, 12 fev. 2024.
118. VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 5–15, 21 fev. 2006.
119. VICENTE, V. A. et al. Comparative Genomics of Sibling Species of *Fonsecaea* Associated with Human Chromoblastomycosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 9 out. 2017.
120. VIDAL, M. S. M. et al. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, n. 6, p. 315–318, dez. 2003.
121. VILLENA, C. I. F. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Fonsecaea monophora* and *Fonsecaea erecta* for Host-Environment Interaction Studies. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 4, p. 325–325, 30 nov. 2020.

122. WANG, J. et al. A polyketide synthase, BbpksP, contributes to conidial cell wall structure and UV tolerance in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 169, p. 107280–107280, 18 nov. 2019.
123. WANG, J. et al. The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Res.*, v. 51, n. D1, p. D384–D388, 8 dez. 2022.
124. WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and Their Importance in Pathogenic Fungi. *Current Topics in Medical Mycology*, p. 338–387, 1988.
125. XIANG, B. et al. Deletion of a Rare Fungal PKS CgPKS11 Promotes Chaetoglobosin A Biosynthesis, Yet Defers the Growth and Development of *Chaetomium globosum*. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 9, p. 750–750, 13 set. 2021.
126. XIAO, X. et al. Deletion of pksA attenuates the melanogenesis, growth and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. *Microbiological research*, v. 244, p. 126668, 1 mar. 2021.
127. XU, J. et al. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. *BMC Biotechnology*, v. 15, n. 1, 27 maio 2015.
128. YANG, Y.-P. et al. Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea*: clinicopathology, susceptibility and molecular identification of seven consecutive cases in southern China. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 11, p. 1023–1028, nov. 2013.
129. YANG, Y. et al. The calcineurin-responsive transcription factor CrzA is required for regulation of infection structure differentiation, calcium homeostasis and cell wall integrity in *Alternaria alternata*. *Postharvest biology and technology*, v. 194, p. 112064, 1 dez. 2022.
130. YANG, Y. et al. Updating Insights into the Regulatory Mechanisms of Calcineurin-Activated Transcription Factor Crz1 in Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 10, p. 1082, 14 out. 2022.
131. XIN, T.; WU, Y.; ZHANG, J. The role of melanin in *Fonsecaea monophora* pathogenicity: adhesion, fibroblast interactions, and implications for chromoblastomycosis. *Future Microbiology*, p. 1–8, 20 mar. 2025.

132. ZHONG, J. et al. Role of Dectin-1 in immune response of macrophages induced by *Fonsecaea monophora* wild strain and melanin-deficient mutant strain. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, v. 15, n. 1, p. 45–56, 3 set. 2023.
133. ZHOU, Y. et al. Nitroreductase Increases Menadione-Mediated Oxidative Stress in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, n. 24, 24 nov. 2021.

9. Figura Suplementar I

Fonsecaea_pedrosoi	-----MEEVYVFGDQTA--DCRAFFTKVFSR--KDDV-ILQSFLERAGEAVRVE	44
Beauveria_bassiana	MISTGLHETGKTAELLVFGDLTA--SFEEELRRLHI--RGNE-AINSFFERVAFSLRQE	55
Aspergillus_fumigatus	-----MATPRGQTVWFGNEFPNDLKDLEFRRLHQHSKDRRFRLLSVFLEESTAILKEE	53
Sporothrix_brasiliensis	-----MADRLAFLLFQDQSL--DTYDFLSGFYRE--GHHGILATAFLNQAGEALWRE	48
Fonsecaea_monophora	-----MEEVYVFGDQTA--DCRAFFTKVFSR--KDDV-ILQSFLERAGEAVRVE	44
Alternaria_alternata	-----MNVLIFGDQTA--DQYPLLRKACTW--KNNST-LTTFLDRVSQVVREE	43
Colletotrichum_higginsianum	-----MADMMSYLLFGDQSL--DTHGFLAEFYRS--GNPSTLAKTFLDQAGQALREE	48
Verticillium_dahliae	-----MVGTMSTLLFGDQSL--NTHAFLAEFYRL--GAPSILAKTFLEQAGQALREE	48
Exophiala_dermatitidis	-----MEEVYVFGDQTA--DCRAFFTKVFTS--KDNV-LLQSFLERAGEAVRFE	44
	** : . : * : . : *	
Fonsecaea_pedrosoi	NRARSH-PSKAVPNFSTIQELVDRYRGEAKDAAVESALVCISQFTHFFGAFEERTPSYI	103
Beauveria_bassiana	LGRQPSAIQNMFPRTTLIDMVAGFANKLEGTPVLQFCLMTICQVAKFIHFTTG---KPF	112
Aspergillus_fumigatus	VANLPQQQLQELVPHFDTACTLPEVDFRQGPLGAAMESALLTILELGMLIGHYEAEDIEWD	113
Sporothrix_brasiliensis	IEGLGRLERAKLPLFRTLQQLNERYHAQDLKHPAVDGALLCITQLVHYIDHAEK-HWEDV	107
Fonsecaea_monophora	NRARSH-PSKAVPNFSTIQELVDRYRGEAKDAAVESALVCISQFTHFFGAFEERTPSYI	103
Alternaria_alternata	VQKLPRTQRDQIPNFLTWDLIEAYYAKGLKIPQLESCMVITIAQLAHFIGYYAE-NPSDL	102
Colletotrichum_higginsianum	IDGLGKLERSKLPTFLSLRQLNERYHAQGIKHPGVDSALLCITQLAHYIDRAEK-EPQDA	107
Verticillium_dahliae	IDGLGKLDRAQLPIFRTLQQLNERYHAQSRKHSGVDSALLCVAQLAHYIDRAEK-EPQDV	107
Exophiala_dermatitidis	NQNRSH-PSKAVPNFSTIQELVDRYRGEAKDAAVESALVCISQFCHFIGAFEERRPSYI	103
	.* * : : : : : : : : : .	
Fonsecaea_pedrosoi	PNNVDARLVGLCTGLIAAASVASSDSL TALLPLAVEAVRIA FRAGAHVGRVAEQIDFDS-	162
Beauveria_bassiana	PSPENSÝLLGICTGSFAASAVCVSQSIHEVVVAGVEATIAAFRTALRS--FLQRGLITT-	169
Aspergillus_fumigatus	LDPSRTILAGLSIGILAGAAVALSSSLADVAKVGAESVRVSFRLGVYVADISTKLEAPQS	173
Sporothrix_brasiliensis	TRHEHTÝLVGLCSGLFAAAAIAS T PSLSALVPVAVQAVLMSFRTGLYVATLADRLCPPS-	166
Fonsecaea_monophora	PNNVDARLVGLCTGLIAAASVASSDSL TALLPLAVEAVRIA FRAGAHVGRVAEQIDFDS-	162
Alternaria_alternata	QNPANTRVVLCTGLLAGSVVASARSLSELLPLATEAVRIA FRTGTVVGAAKEAVEQAS-	161

Beauveria_bassiana
 QFFNMSPREANSTDPAQRLAITATYEAMEMAGMVPNRTSTQQDRIGVFFGITSDDWREV 506
 Aspergillus_fumigatus
 GFFNMSPREAEQTDPMHRLALVTAYEAMEMAGMVPGRTPSTRPNRIGTFYGGASDDWREL
 522
 Sporothrix_brasiliensis
 RFFNMSPREALQTDPMQRMAIATAFEALEMSGYVPNRTPSTRLDRIPTFYGGQTSDDWREI 517
 Fonsecaea_monophora
 RFFNMSPREAAQTDPMQRLMLATGYEAMEMAGIVPGRTPSTKHDRIGTFYGGQTSDDWREV
 498
 Alternaria_alternata
 RFFNMSPREAAQTDPMGRLALTTAYEALEMSGYVPNRTPSTKLERIGTFYGGQTSDDWREI 502
 Colletotrichum_higginsianum
 RFFNMSPREAFQTDPMQRMALTTAYEALEMCGYVPNRTPSTRLDRIPTFYGGQTSDDWREI
 513
 Verticillium_dahliae
 RFFNMSPREAYQTDPMQRMALTTAYEALEMSGYVPNRTASTRLDRIGTFYGGQTSDDWREI
 512
 Exophiala_dermatitidis
 RFFNMSPREAAQTDPMQRLMLTTGYEAMEMAGIVPGRTPSTKHDRIGTFYGGQTSDDWREV
 498

***** .*** * : . : .***.* * * * * * . : .***.* * .*****:

Fonsecaea_pedrosoi
NAAQDIDTYFISGGVRAFGPGRINYFFKFSGPSFSVDTACSSSFAAMNVAITSLRANEC 558
 Beauveria_bassiana
 NSSQDVDTYFIPGGVRAFLPGRISYFFRFSGPSLSIDTACSSSFAAIQSACGYLLRGECD 566
 Aspergillus_fumigatus
 NASQNISTYAVPGGERAFANGRINYFFKFSGPSYNIDTACSSGLAAVQAACSALWAGEAD 582
 Sporothrix_brasiliensis
 NAAQEVDTYFITGGVRAFGPGRINYHFGFSGPSLNIDTACSSSAAAMNVACTALWSRDCD 577
 Fonsecaea_monophora
 NAAQDIDTYFISGGVRAFGPGRINYFFKFSGPSFSVDTACSSSFAAMNVAITSLRANEC 558
 Alternaria_alternata
 NAAENIDTYFITGGVRAFAPGRINYFFKFSGPSYSIDTACSSSLAAIQLACTSLWAGDCD 562
 Colletotrichum_higginsianum
 NAAQEVDTYFITGGVRAFGPGRINYHFGFSGPSLNIDTACSSSAAALNVACNSLWVKDCD 573
 Verticillium_dahliae
 NAAQEVDTYFITGGVRAFGPGRINYHFGFSGPSLNIDTACSSSAAALQIACTSLWAKDCD 572
 Exophiala_dermatitidis
 NAAQDIDTYFISGGVRAFGPGRINYFFKFSGPSFSVDTACSSSFAAMNVAITSLRANEC 558

* : . : .***.* * * * * * . : .***.* * .*****:

Fonsecaea_pedrosoi
TAFTGGANVLTNSDIFSGLSRGHFLSKTGSKTWDNDADGYCRGDGVCTIILKRLTDAVA 618
 Beauveria_bassiana
 TAIAGGTNVLTNPDIPTGLDRGHFLAKTGNCNTFDDEASGYCRAEGVGAVILKRLEDALE 626
 Aspergillus_fumigatus
 TVIAGGLNVITDPDNYAGLNGHFLSKTGQCKVWDKDADGYCRADGIGSVVIKRLEDAEA
 642
 Sporothrix_brasiliensis
 TAIVGGLSCMTNSDIFAGLSRGQFLSKKGPCATFDDGADGYCRGDGCASVIVKRLEDAEA 637
 Fonsecaea_monophora
 TAFTGGANVLTNSDIFSGLSRGHFLSKTGSKTWDNDADGYCRGDGVCTIILKRLTDAVA 618
 Alternaria_alternata
 TACAGGLNVLTNPDIPTGLDRGHFLAKTGNCNTFDDEASGYCRAEGVGAVILKRLEDALE
 622

Fonsecaea pedrosoi
PPHTGIKKQINKNFAPDLKERVNIAFKTTPFPRP--AGGKRTVFINNFSAAGGNTALLL 796
 Beauveria bassiana
 PPHCGIKTRINRNYPTDLAQRNVRIAFEPTPWRESSAGGTRRMFLNNFSAAGGNTAILL 805
 Aspergillus fumigatus
 PKHIGIKTEINPIPKDLERRHVGLAMENTPWPRP--AGKKRLAVVNSFGAHGGNTTVLL 820
 Sporothrix brasiliensis
 PPHVGIKQEINKGFPKDLSENVNIAFHMTPFRR--DGKPRRVFINNFSAAGGNTGLLL 815
 Fonsecaea monophora
 PPHTGIKKQINKNFAPDLKERVNIAFKTTPFPRP--AGGKRTVFINNFSAAGGNTALLL 796
 Alternaria alternata
 PANVGIKGVMNKSFPKDLGQRNVHISTTQVPWPRN--GAEKRKIFLNNFSAAGGNTAVIL 800
 Colletotrichum higginsianum
 PPHVGIKKEINKTFPKDLSENVNIAFHLPFKRR--DGKPRRIFVNNFSAAGGNTGLLL 811
 Verticillium dahliae
 PPHVGIKKDINKTFPKDLAERNVNIAFHMTPLKRH--DGKPRRIFINNFSAAGGNTGLLL 810
 Exophiala dermatitidis
 PPHTGIKKQINKNFAPDLKERNVNIAFQTTPFPRP--PGGKRTVFINNFSAAGGNTAMLL 796
 * .*** .* **.** :. * * . * .***** :.*

Fonsecaea pedrosoi
QDGPEVPAEPT---SDPRSTQVVTVSAKSLAAFKKTVAKYEEYLNKNPNVGLADLAYTTT 853
 Beauveria bassiana
 EDAPSLPEPVHSTGQGERGYLVTVSAKSAKSLVNLERLVSFLEENPSCSLPALSYTTT 865
 Aspergillus fumigatus
 EDAPERVKVST---QDDRTTHPVVISAKSKKSLQANIEKLLSWLDQNPANLGDLSYTL 877
 Sporothrix brasiliensis
 EDAPRR-PPAT---ADPRSMHVITVTGKSKSAMIHNAERLVAWIDAHPTPVADVAYTTT 871
 Fonsecaea monophora
 QDGPEVPAEPT---SDPRSTQVVTVSAKSLAAFKKTVAKYEEYLNKNPNVGLADLAYTTT 853
 Alternaria alternata
 EDGPLPEAPKG---VDPRTMHMVTVSARSISLKNINLMQFIDETPGVTLPSLAYTTT 857
 Colletotrichum higginsianum
 EDAPHL-KASE---ADPRSHQVITVTGKSKAAMIRNAERLVGWMEQNPQTPLAHLAYTTT 867
 Verticillium dahliae
 EDGPSQ-TPTQ---ADPRSVQVITITAKSKTAMIKNAEQLVTWMEKNPETPLADVAYTTT 866
 Exophiala dermatitidis
 QDGPEVPTEPS---SDPRSTHVTVLSAKSLAAFKRTLAKYEAYLNAHPNVGLPDLAYTVT 853
 :.* * . * :.:* :. . . :. * : :.*

Fonsecaea pedrosoi
ARRAHYNYRAAFPVQSIAQLQAALKATQDQ---THN----PIPLASPQIAMAFTGQGSQY 906
 Beauveria bassiana
 ARRIHRYRVACSGDSIAAVLEKLSQAQSQSQSHTRTPRLGASKTPKVVFVFTGQGSY 925
 Aspergillus fumigatus
 ARMHHSMRFGAAASGIAALQKTLRSWLDNPKA--SAELRAIPNDTPSVVLTFTGQGAYY 935
 Sporothrix brasiliensis
 ARRIQHYWRMNVTAAADLPEAKQALQARLQG---SFV----PVLPEPPKVAFMFTGQGSY 924
 Fonsecaea monophora
 ARRAHYNYRAAFPVQSIAQLQAALKATQDQ---THN----PIPLASPQIAMAFTGQGSQY 906
 Alternaria alternata
 ARRIQHNYRVAFCVSDINKVKDGLQAQIKD---TYS----PLPMVPAKTAFTFTGQGSY 910
 Colletotrichum higginsianum
 ARRIQHYWRMNVAASDLPEAQRLIKDRLKE---NFT----PISTQQPKVAFMFTGQGSY 920
 Verticillium dahliae
 ARMQHYWRLNVAASSTLSEAMSAIKERLTQ---NFV----PISTEQPKVAFMFTGQGSY 919

Exophiala_dermatitidis
 ARRAHYSYRAAFPVQISQLQASLRAIQDQ---THN---PIPLASPQIAMAFTGQGSQY 906
 *** : : * : : : : : ***** *

Fonsecaea_pedrosoi
TGMGQKLFETSKQFRGDIEEFNEIALRQGLPSIMPLIDGST-EVQHLPPTVVQLGMCCIQ 965
 Beauveria_bassiana
 TSLGRELYETVSSFREDIAQFDNIAQQHGFPPFLSLIDGSVASLEGVDTCTSHLALVCLQ 985
 Aspergillus_fumigatus
 SGMGRELLEAFSYFRTEVFQLDQIAQRLGFPSVVPVIDGSI-DDGPASPVLTLQSVTVLE 994
 Sporothrix_brasiliensis
 AGLGQELYAHAAVFRDSIDEFDQIAKIHFPSFLPLIDGSASDVTTLSPVVVQLGLACFE 984
 Fonsecaea_monophora
 TGMGQKLFETSKQFRGDIEEFNEIALRQGLPSIMPLIDGST-EVQHLPPTVVQLGMCCIQ 965
 Alternaria_alternata
 TGLGQKLYEDLETFRIDIDQLDKLARLHDLPSILPILTGA--DVATLSPVVVQLGMACIQ 968
 Colletotrichum_higginsianum
 AGLGKDLYAHYRVFRDSIDEFNQLAQIHGFPSFLPLIDGSEPDVTKLSPVVVQLGLCCFE 980
 Verticillium_dahliae
 AGLGKDLYAHYSVFRDSINEFNHIAEVHGFPSFVPLIDGSEPDVSKLSPVVVQLGLCCFE 979
 Exophiala_dermatitidis
 TGMGQKLFETSKQFRQDIEEFNEIALRQGLPSIMPLIDGSV-EVQHLPPTVVQLGMCCIQ 965
 :*: * ** : : : * : * : : * : : : * : :

Fonsecaea_pedrosoi
MALTRLWATWGVTPSVVIGHSLGEYAALQAAGVLSVADTIYLVGKRAQLLEQKCTAGTHA
 1025
 Beauveria_bassiana
 MALSRLWNAWNIQPSMIGHSLGEYAALFAAGVLSASDAILLVGTRATLLARHCSPGTHG 1045
 Aspergillus_fumigatus
 IALARFWSHLGIRISAVIGHSLGEYAALFAVAGVISATEALYLVGRRAQLTEERCTQGSHTS 1054
 Sporothrix_brasiliensis
 MALARLWISWGIQPAAVLGHSLGEYAALNVAGVLSASDTIYLVGARARLLVEKCTAGTHT 1044
 Fonsecaea_monophora
 MALTRLWATWGVTPSVVIGHSLGEYAALQAAGVLSVADTIYLVGKRAQLLEQKCTAGTHA
 1025
 Alternaria_alternata
 VALARMWASWGVKPVAVIGHSLGEYAALHVAGVISASDMVLLVGRRAQILEQECTANTHG
 1028
 Colletotrichum_higginsianum
 MALARLWASWGIQPSAVMIGHSLGEYAALNAAGVLSASDTIYLVGARAQLLVQKCTAGTHA
 1040
 Verticillium_dahliae
 MALARLWAAWGIQPAVVLGHSLGEYAALNVAGVLSASDTIYLVGSRAQLLVDRCTAGTHA
 1039
 Exophiala_dermatitidis
 MALTHLWSTWGIQPSVIGHSLGEYAALQAAGVLSIADTIYLVGKRAQLLEQKCTAGTHA
 1025
 :*: * : : * : : : : : * : : : * : : : * : *

Fonsecaea_pedrosoi
MLAVRSPVAGLQDVVANS----QGKIEIACINGVSDTVLSGTMGDIDAVAQKLAD-AGQK 1080
 Beauveria_bassiana
 MMAIKAPVDSILPLLHES-----SCEITCINQPSGVVGGKKNIDELATKVQG-LGYP 1098
 Aspergillus_fumigatus
 MLSVRASEDDIEELIAGSPDTAELAYEVCCRNTQPQDTVIGGTQESIDSIRQALEK-NTIK 1113

Sporothrix_brasiliensis
MLAVQGSLSVTMDALGEAR---AAAVNVACINGPRETVLSGDAAEMAECAQHLGATGGFK
1101

Fonsecaea_monophora
MLAVRSPVAGLQDVVANS----QGKIEIACINGVSDTVLSGTMGDIDAVAQKLAD-AGQK 1080

Alternaria_alternata
MLAVKGSVDAITAALGDK-----MTEIACINGPEETVLCGTVEEVVESTNADLAS-KGFK 1081

Colletotrichum_higginsianum
MLAVTGPVEAIMEXLGAQ---AEAVNVACINGPRETVLSGAAAKISDISSHLGT-AGFK 1095

Verticillium_dahliae
MLAVQGPVGTVNEALGSE---FASVNIACINGPRETVLSGEADHMMKIATQLGA-SGFK 1094

Exophiala_dermatitidis
MLAVRSPVGGGLQDVVANS----HGKIEIACINGVSDTVLSGTMGDIDTVAQKLAD-AGQK 1080
*::: . : : : : ** *:* : : :

Fonsecaea_pedrosoi
CTKLKLPFAFHSSQVDPILADFEKLAASSVKYHAPRVPVISPLLSDIVNVG-----GVFDA 1135

Beauveria_bassiana
TVPLDIPFSFHTSQVDPILADFEKAAQNVHYSTPKIPILSPLLGHVIKDG-----QPFDG 1153

Aspergillus_fumigatus
CTQLDVPFAFHTAQMDPILDSLETLATPITFKAPSIPVLSPLLGSVVFDR-----KSIHA 1168

Sporothrix_brasiliensis
CTQLKVPFAFHSAQVDPILDEFETLARAVAFQRPTVPIVSPLLGRLLIAAGDRDGVAPVDA 1161

Fonsecaea_monophora
CTKLKLPFAFHSSQVDPILADFEKLAASSVKYHAPRVPVISPLLSDIVNVG-----GVFDA 1135

Alternaria_alternata
ATKLNVPFAFHSAQVEPILEKFKAAAASVTFNAPVVPVMSPLTGEIIREA-----GIIGP 1136

Colletotrichum_higginsianum
CTQLKVPFAFHSAQVDPILDDFETLARSVSFERPQVPIISPLLGKMOVET-----EPINA 1149

Verticillium_dahliae
CTELKVPYAFHSAQVEPILDEFEHLARFTRFMPAQVPIISPLLGKLVHEH-----ELIDP 1148

Exophiala_dermatitidis
CTKLKLPFAFHSSQVDPILADFEKLAASSVKYHAPRVPVISPLLSDVVSVG-----GVFDA 1135
. *:*:*:*:*:*:* * : : :*:*:* : :

Fonsecaea_pedrosoi
FYLSRHCRKTVDFVGGLSAGMSTATISDTSWLEVGGHPLCASMISCLSAPT--LPTMR 1193

Beauveria_bassiana
DYLARACRGVVNFQGALEAAKFVSLVDDNTVWLEMGSHPACSGMIKGTLSQSTTLASVR
1213

Aspergillus_fumigatus
QYLRRATRETVDVFAAIEAAQDFGLVDAKTIWIDVGPHPICASLVRGIDSSAS-VISSCR 1227

Sporothrix_brasiliensis
AYLRNHAREAVNFLGGLVSAQQSGAIDEKTVWLEVGHPVCANMVKAAFGATTIAVPTLR
1221

Fonsecaea_monophora
FYLSRHCRKTVDFVGGLSAGMSTATISDTSWLEVGGHPLCASMISCLSAPT--LPTMR 1193

Alternaria_alternata
DYLARHARETVNFCTALTGQDNKLFDAKTAWLEVGHPVCAGMVKSSLGGSPVAAGSLR
1196

Colletotrichum_higginsianum
AYLRNHARDAVNFLGGLVHAQQSGSVDEKTVWLEVGHPVLANFVKSSFGISSVAVPTLR
1209

Verticillium_dahliae
SYLRKHARQPVDLFGGIISAQQSGAINEKTVWLEIGHPVCANMVKAAFGVATIAVPTLR 1208

Exophiala_dermatitidis
FYLSRHCRKTVDFVGGLSAGMSTATISDTSWLEVGGHPLCASMISCLSVPT--LATMR 1193

** . * ** * * : * * * * : *

Fonsecaea pedrosoi
 RDEDPWKIISTSMAGLYTAGKALNWDAFHKENESLRVLNDMPTYGYDEKKNYWLQYTGDWL
 1253

Beauveria bassiana
 NATSPWTTMVSALES MYVKGLEIDWNNFHRSSGESHQVIQLPQYSWDLKKNYWITYKNDWL
 1273

Aspergillus fumigatus
 RNEDNLATMSKSLVTLHLA GLTPCWAEYFRPREQEYSLKLP TYSWNETDYWIPYIGTWT1287

Sporothrix brasiliensis
 RNEATYKTLASLCTLHSAGLNVDWNE MHGDFRASTRLLDLPSYAFDNKNYWLQYEGDWS
 1281

Fonsecaea monophora
 RDEDPWKIISTSMAGLYTAGKALNWDAFHKENESLRVLNDMPTYGYDEKKNYWLQYTGDWL
 1253

Alternaria alternata
 RNEDPWKTLNSITTL YLAGVYDFDFNEYHRVFNDAHEMYTLPTYAFDSK KYWLDYHNNWT
 1256

Colletotrichum higginsianum
 RNESTYKVLŠNTL CALHTAGINLDWDEFHRDFTECTRLLDLPTYSFDEKKNYWLQYTGDC
 1269

Verticillium dahliae
 RNESTYKTLNGLCTLHTAGLNLDWNEYHRDFSESTRLLNLPSYSFDEKKNYWLQYSGDC
 1268

Exophiala dermatitidis
 RDEDPWKIISAS MAGLYTAGKSLNWDAFHKENESLRVLNDLPFYGFDEKKNYWLQYTGDWL
 1253

. : : : * : . : : * * : : * * : * . *

Fonsecaea pedrosoi
 LYKGDYPKSVAPAVAAPVSSGPAKARKYLS TAVQGIVSEEIKGRVATHAESDF AHPKLF 1313

Beauveria bassiana
 LTKGECCSVKP---QASQGTASTNAVRYLSPAVQRVLEESHTAAQS SLLAESDLFDNRLL 1330

Aspergillus fumigatus
 LDKALLKYGEK---KAPLSLSMSRPSALRTSLVHQIT TETVEATTATLHVLSDMQH PDFL 1344

Sporothrix brasiliensis
 LIKNRFATMLP---GASAAVEPPKPTLSTSSVHKV VREEVDGSTVTLETESDMCRADMR 1338

Fonsecaea monophora
 LYKGDYPKSVAPAVAAPVSSGPAKARKYLS TAVQGIVSEEIKGKVATIIAESDF AHPKLF 1313

Alternaria alternata
 LTKGEVLEAPTSVKAIEAAPAVEAASKLSTTSCHKIVREN LQANS GTVVVQSDLSDPK LK 1316

Colletotrichum higginsianum
 LTKNRGPS--A---VKAPLQIEPARPKLSTTSIHAVT NEDVNGDIAI IETETNLSRPDTR 1324

Verticillium dahliae
 LTKNRGSA--P---AKAPALLEAPKPKLSTTSVHAVT KEEINGDIVI IETETNLSREDTR 1323

Exophiala dermatitidis
 LYKGDYPKAIAPAPAAAAAAGPAKARKYLS TSVQGIVSEEVK GKTVTIVAESDF AHPKLF 1313

* * : : : * . . . :

Fonsecaea pedrosoi
 PVVAGHLVNGSGLCPSTLYADMAYTLCNYGVNLIK PGEK----VDINIGTMDNPAP LLLK 1369

Beauveria bassiana
 PVLNGHKVNGAALCPSSLYGDIALTVGRALV----EGSESSHFTGF EVC DVKVDHPLIAL 1386

Aspergillus fumigatus
 EALHGHRMNNCGVATSSIWSDMAFTVGEYLYRRLVPQAK---DVHMNLS DLEVLHAQVAL
 1401

Sporothrix_brasiliensis
 LALEGHLVNNTPLCPSTLYADMAMTIGDYMYRLAKPERDASDRVPTNIADMEVSKTLIFD 1398
 Fonsecaea_monophora
 PVIAGHLVNGSGLCPSTLYADMAYTLCNYGVNLIKPGEK----VDINIGTMDNPAPLLK 1369
 Alternaria_alternata
 ATITGHQVNGTPLTPSSLYADQAMTVADYLYQQLRPGMT---TPGLNVCSMEVTKTLIPQ 1373
 Colletotrichum_higginsianum
 PLVEGHLCNGAPLCPSTLYADMAMTVADYAYKMLRPDAE---PVGLNVANVEVPKTLIFD 1381
 Verticillium_dahliae
 NILEGHLCNGTPLCPSTLYADMAMTICDYAYKLRPEAE---KTGLDVSDVEVPKTLIFD 1380
 Exophiala_dermatitidis
 PVIAGHLVNGSGLCPSTLYADMAYTLVNYGVLLKPGEK----VDINIGTMDNPAPLLK 1369
 : ** * . : * : : * * * : : : :

Fonsecaea_pedrosoi
[NINPESQIVRMTMKIDLDARKADFTVTTN---NGKKD-VVHAKCVL-RFEDAAAWKDEW](#) 1424
 Beauveria_bassiana
 ASDKS--RLFRVSATADWASHLISISIYSV-DDGGNTT-AHHAKANVRLIIDKADWLTEW 1442
 Aspergillus_fumigatus
 EKKGSV-QPLVLKAHLNLSSTSSMLAWFNASAETGECAAESFATCVV-RFEDPAAWTREW 1459
 Sporothrix_brasiliensis
 DSTGS--HILRVSATAHVDQGYATLRFHTG---EGAKT-TEHATCKV-LYGDAQWSNEF 1451
 Fonsecaea_monophora
[NINPESQIVRMTMKIDLDARKADFTVTTN---NGKKD-VVHAKCVL-RFEDAAAWKDEW](#) 1424
 Alternaria_alternata
 YPPPASGQHLQIEGNADLETDEVKITFRTVSADGSNVL-AEHAVGIV-KYEDINAWKEEW 1431
 Colletotrichum_higginsianum
 EK LDA--HVLRTTVTANVALGYADV SFHTG---EGSKK-TEHAHCKV-VYGSTEQWADEF 1434
 Verticillium_dahliae
 DKVES--HMLRCKATANIVLGHADLVFHTG---EGPKR-TEHAKCRV-NFGNTEQWADEF 1433
 Exophiala_dermatitidis
 NINQPESQIVQMTMKIDLDARKADFAVTSN---NGKKD-VTHAKCVI-VFEDA AVWKEQW 1424
 : * : . * :

Fonsecaea_pedrosoi
[NKVSYLVQSRIDMLKHKMENG EADKVSRS MAYKLF GALVDYSDVFQGMQSVIFDGPEFEA](#)
 1484
 Beauveria_bassiana
 KPMAYLIRGRIASLERGVADGNIHKLKRS MVYKLF TSIVDYSSEYQGMQEVILDSDELEA 1502
 Aspergillus_fumigatus
 DRLSHLVLGRIEALQRAVEGKASKLSKPLAYTLFKNVVDYADRYRGMDQVVLYEHEAVA
 1519
 Sporothrix_brasiliensis
 ERVNYLIRGRIDALQRAEEAGTAS KIGRGIAYKLFTALVDYAPRYRGMDEVILDSATCEA 1511
 Fonsecaea_monophora
[NKVSYLVQSRIDMLKHKMENG EADKVSRS MAYKLF GALVDYSDVFQGMQSVIFDGPEFEA](#)
 1484
 Alternaria_alternata
 GRIQYMVQAQINSLEQKLQTGA AHKVL RGMAYKLFKALV TYADNYRGMEEVILDGKETE A
 1491
 Colletotrichum_higginsianum
 ERVSYLIKGRIDALEEAERQ GKASKIGRGLTYKLFTALVDYDTKYQGMEEVILDSKTCEA 1494
 Verticillium_dahliae
 ERVKYLISGRIDALVEAEKV GKASKIGRGLAYKLFTALVDY NPRFQGMEEVILDSRTCEA 1493
 Exophiala_dermatitidis
 SKTSYLIQSRIDMLKHKMENG EADKVS RAMAYKLF GALVDYADIFQGMQSVVFDGPEFEA
 1484

...:* * . * * :...:** :* * :**:*.. *

Fonsecaea_pedrosoi
TSNIKFRAGPNDGDFYFSPYFIDSACHLSGFTVNAT--VNRMEECYISHGWGSLRFLAPL 1542
 Beauveria_bassiana
 TAKVSFRVD--HQGFVMNPRWIDSLGHLAAGFIMNGNEYTQSDKQVFINHGWDRLRFAETL 1560
 Aspergillus_fumigatus
 --EVTL-VAERHGTWHTPPHWIDSVSHLAGLVMNGSNASNTRDYFYVTPGCSSFRLLNPL 1576
 Sporothrix_brasiliensis
 TAAVRFQTSEADGRYFFNPFWIDSMCHISGFIVNATDAVDSREQVYISHGWGSLRFVETP 1571
 Fonsecaea_monophora
 TSNIKFRAGPNDGDFYFSPYFIDSACHLSGFTVNAT--VNRMEECYISHGWGSLRFLAPL 1542
 Alternaria_alternata
 TAQVQFQTTAADGEFLCSPYWIDSLAHLSGFIVNASDHLDSSENSVYISHGWGSIKIAGKL 1551
 Colletotrichum_higginsianum
 TAKISFQTTDKDGSFFFNPYWIDSCCHLSGFVINGTDAIDSREQVFISHGWGSMRFTEKL 1554
 Verticillium_dahliae
 TAKVSFQTSEKDGNGFFSPYWIDSCCHISGFIINGTDAVDSREQIFISHGWGSLKFIEKL 1553
 Exophiala_dermatitidis
 TSNIRFRAGPNDGDFYFSPYFIDSACHLSGFTVNAT--VNPQDECYISHGWSSLRFIEPL 1542
 ... : * :*** * :* :*.. : . : * :...

Fonsecaea_pedrosoi
EQDKQYFAYVKMQPVAG-SKMRAGDVYVFNSNKEVVGVA-----GAV 1583
 Beauveria_bassiana
 SEGKVYTTYTKMQLVE--SKLYIGDTYVLDGE-RIVAKFDKVAVSLPSNPIAEETFPNIS 1617
 Aspergillus_fumigatus
 KAGGKYRSYVRMFPLPEEANMYAGDVYILEGE-QIVGMV-----GHI 1617
 Sporothrix_brasiliensis
 DAAKTYRSYIRMQPVKG-TTMFSGDAYVFDGD-RIIGVC-----GDV 1611
 Fonsecaea_monophora
 EQDKQYFAYVKMQPVAG-SKMRAGDVYVFNSNKEVVGVA-----GAV 1583
 Alternaria_alternata
 SPEKKYRSYVRMQPAPG-N-ISVGDVYIMDGA-EIIGMV-----MGL 1590
 Colletotrichum_higginsianum
 DASKTYRSYVRMQPVKG-TKMMAGDAYVFDGD-RIIGVA-----GDV 1594
 Verticillium_dahliae
 DASKTYRSYIRMQPVKD-TKVMAGDAYVFDGD-RIVGVC-----GDV 1593
 Exophiala_dermatitidis
 QHDKQYYAYVKMQPVAG-SKMRAGDVYVFENADKEVVGVA-----GGV 1583
 . * :* :* : ** :* :... :..

Fonsecaea_pedrosoi
RFQCIPRKLMDVMMPKPKAGGGAKAAASAPAKESRAVKTPTPVESVAPAHIEL----- 1636
 Beauveria_bassiana
 QFQGVPRKVLGRLLPSSKEAAPVPSIKRETSNEK-----TWPAATPAPA----- 1661
 Aspergillus_fumigatus
 RFRRVPRLLMDRFFSPAAASHTEKQLQETAP-SATNVKKSTPPPAEAPISVPVAPGNPVA 1676
 Sporothrix_brasiliensis
 RFAAIPRKVLNLVLPFRGVAGAAG-AAAPGA-PARKALAAAPAAAAAA--AAA----- 1660
 Fonsecaea_monophora
 RFQCIPRKLMDVMMPKPKAAGGAKAAAPAPAKESRAVKAPTPVESVAPAHIEL----- 1636
 Alternaria_alternata
 KFQNIPTALNIMMPPSGKAVAAP-VGKAPAKATPKALP-----SAAP--VKT----- 1635
 Colletotrichum_higginsianum
 KFQSIPTKVLNMLVLPFRGRAAGA-VTAS-A-AAPK--AAAPAKA-AP--AKE----- 1639

Verticillium_dahliae
 RFQSI PRKVMNMVLP PRGRAAAGM-ITGA-A-PK-G--VSKPTVV-SP--PKA----- 1637
 Exophiala_dermatitidis
 RFQCIPRKLMDVMMPKPKANAKAASPASATPKAAPT VKA--SSNLAAPASVEL----- 1634
 :* : ** : : :

Fonsecaea_pedrosoi
 PAPKVKAKKPAKTPKVKAP-----APPKSAPSGSLVARAFDIIAKEIDV 1680
 Beauveria_bassiana -----QSDIRRP-----SAAR-SSEDLDFRRVLKIIAEEVGI
 1692
 Aspergillus_fumigatus
 IPLPTASKSQVATPPLTPPSQEDSPGESAVITPATSDRGDSTDAGVVGQCLKVMARETGL 1736
 Sporothrix_brasiliensis
 VPAKAKNTKVVTHANIGK-----VNQKL---TSVVTKVFDILAKEIGV 1700
 Fonsecaea_monophora
 PAPKVKAKKPAKTPKVKAP-----APPKSAPSGSLVARAFDIIAKEIDV 1680
 Alternaria_alternata
 KAAATKAAKPVAKPAKVA-----KPVKAAAPAGVTSKVMKIVAEIDV 1678
 Colletotrichum_higginsianum
 KSGKEKASKQVTAGNLKA-----VNAKLAKR-SVVQDVFDILAKEVGV 1681
 Verticillium_dahliae
 SAPKTKTSKPLTSSNIHT-----VNAKLAKPTSVVAEVM DIIAKEVGV 1680
 Exophiala_dermatitidis
 PTPKVKAKKPVKAQKIKAP-----APPKQASSGSLVVRAFEIIAKEIDV 1678
 : : * : * : :

Fonsecaea_pedrosoi
 DQSELNDDIQWADMGVDSLMSLTISGKFREDLDLEVDNTLFTDHASV G ALRKHLGGMSMP
 1740
 Beauveria_bassiana
 TLSELQPDVQLADLGLDLSLTISSRINDEMGLDLPSTLFVEHPTVKDLQFFFHTEGRS 1752
 Aspergillus_fumigatus
 EVDALTPDASFVQLGIDSLMSLVSEKFR AELGIEIKSSLFLECPTIGEMTAWLEEYC-- 1794
 Sporothrix_brasiliensis
 SHDELVDNVAFGDLGVDSLMSLTVSGRIREELDVDLHSN AFVDYPTIGAFKTYLAQFETA 1760
 Fonsecaea_monophora
 DQSELNDDIQWADMGVDSLMSLTISGKFREDLDLEVDNTLFTDHASV G ALRKHLSGMSLP
 1740
 Alternaria_alternata
 DMSELVDEAAFENLGVDSL SLLSLTISARFREDLDMDIPSTLFTDCTTVGELKKHFSQFDGA 1738
 Colletotrichum_higginsianum
 TQDELADNIAFTDLGCDSL MALT VSGRMREELDIDIDSHAFVEYPTIGAFKAFLAQFETS 1741
 Verticillium_dahliae
 SHDELADNIAFTDLGCDSL MALT VAGRMREELDL DIDSHAFVDHATVGAFKKFLAQLKVP
 1740
 Exophiala_dermatitidis
 DQSELNDDIQWADMGVDSLMSLTISGKFREDLDLEVESTLFTDYASV G ALRKHLSGMSGP
 1738
 . * : : * * * : * : : : : : : * : : : :

Fonsecaea_pedrosoi
 EAANAGDAS-----SVESTDSGSESDDETVESGITTPDTEDFPAKHQDQAKSAA 1789
 Beauveria_bassiana HSDTPR-----L---VDDNSSDSSF-----DHSDV 1774
 Aspergillus_fumigatus ----- 1794
 Sporothrix_brasiliensis
 RTDAAT-----PGASSLEDSGIS-SSDSETDGMKSDSEVTTPMEESESGSVKDAGECAA 1813

Fonsecaea_monophora
EAANAGDAS-----SVESTDSGSESDDETVESGITTPDTEDFPAKHQDQAKSAA 1789
Alternaria_alternata
VVVEDD-----SSESSDDSSPFEEVADENDDTPASS----TGSDDEDEEV 1779
Colletotrichum_higginsianum
DRKDSY-----VQDSGDSSGSVSETPELESDSNVTTTPYEESDRSVKGDGDEE-- 1788
Verticillium_dahliae
DDAGLAQKTHSRSGSYGAQDSGVSCVSDSESDLTSSDSVVTTPPNESDETSKLDG--E-- 1796
Exophiala_dermatitidis
EPIATGDAS-----SVESTDSGSESDDETVESGITTPDTEDFPAKPQEQGKSAA 1787

Fonsecaea_pedrosoi
VEAVAQPPS-SGEDMIETIRQVIAQEMEMDLAEITETDLSNLGMDSLMALTVLGKLRED 1848
Beauveria_bassiana
APNDVPPP-NDTGAVTAMIRQAIADETGIAVEELESTACLADLGVDSLLSLTIADSLTEA 1833
Aspergillus_fumigatus ----- 1794
Sporothrix_brasiliensis
APTTAGTAGGDVAALQKAVRETIAEEMQVDVDEIIAAPDLANLGMDSLMSLQILGTLREK 1873
Fonsecaea_monophora
VEAVAQPPS-SGEDMIETIRQVIAQEMEMDLAEITETDLSNLGMDSLMALTVLGKLRED 1848
Alternaria_alternata
KPSAAPTEGGA----SLARKLVAEEMGVVDVSEITDDLDLTDIGMDSLMSLTILGSMREA 1834
Colletotrichum_higginsianum
-----ASGDLQNILRDTIASSEMGVEVDEIVAAPDLAALGMDSLMSLSILGTLREK 1838
Verticillium_dahliae
-----SHDSLQAIVRSTIAAEMGVDDIDEIIAAPDLAALGMDSLMSLSILGTLREQ 1846
Exophiala_dermatitidis
VEAMAQPPSAEQDMMIETIRVVIAQEMEMDLAEITDATDLSNLGMDSLMALTVLGKLRED
1847

Fonsecaea_pedrosoi
YDIDLPTILADNPSLGHRLKALGLEKQKVAPPT-----AQKHEVRTS 1891
Beauveria_bassiana
LGAEVSSLLLESTTLKDLEGLTKVLGRNVTELNGTSS-LGVLTPE-----TS---- 1881
Aspergillus_fumigatus ----- 1794
Sporothrix_brasiliensis
TGLNIPSDLFVSNPSLKSIIERSLIEAPPRAAKVVAARAPRPVAPAPVPFAAGQEVRL 1933
Fonsecaea_monophora
YDIDLPTILADNPSLGHRLKALGLEKQKVAPPT-----AQKHEVRTS 1891
Alternaria_alternata
TGRDLPADFLTVNVTIKDIETALDMRPKPPQQAKATKPAKVSAQPP--QL---SEVNK- 1888
Colletotrichum_higginsianum
SGMDIPNDLFTVNTNPSLLEVEKALGISTKPKSAPA--APKPSKAPAPRREKVEPTREINTH 1896
Verticillium_dahliae
SGLDIPGDLFVLNPSLSQVEKALGCGPKPKVAPV--APKVPSIARPASPPVAPTRVINTH 1904
Exophiala_dermatitidis
HDIDLPTILADNPTLAHLRKAALGLEKAKPAP-----APKQEVRTN 1888

Fonsecaea_pedrosoi
----VVVAPAAPVE--VVVQMPPATSVLQGNPKTATKNLFLPDGSGSATSYSVSP 1943
Beauveria_bassiana
-----FVSQ--PKVVDQIVSNAPHATSIVLQRAKTPVPSRVMFLLPDGSGSAASYALLA 1933
Aspergillus_fumigatus ----- 1794

Sporothrix_brasiliensis
P---ADPIAKLPRPATIVDHYPHRKATSVLLQG-SHRTATHNMFMIPDGSGSATSYSYTEIS 1989

Fonsecaea_monophora
----VVVAPAAPPVE--VVVQMPPATSVLLQG-NPKTATKNLFLFPDGSGSATSYSVSIP 1943

Alternaria_alternata
-----KLA-----SLPDVSHLPPATSVLLQG-NPKIATKKFFLVPDGSGSATSYSISIP 1935

Colletotrichum_higginsianum
PGNTTASITKPPPPREIIDNYPHRKATSILLQG-STRTATKNLWMVPDGSGCATSYTEIS 1955

Verticillium_dahliae
PGNTTASITKPPPPKEIVDHYPHRKASSTLLQG-STRTATKKLFLIPDGGGCATSYSYTEIS 1963

Exophiala_dermatitidis
----VVVAPAAPPVE--VVVQMPPATSVLLQG-NPKTATKNLFLFPDGSGSATSYSVSIP 1940

Fonsecaea_pedrosoi
AIDSKNLAVYGLNCPFMKDPTSUTC---GIEGVSKLYLEEVMMRRQPMGPYILGGWSAGGV 2000

Beauveria_bassiana
KLE-PSVKVYGLNCPWRATPEDMTRLGVTTAQVVAKFVAEIRRLQPHGPYILGGWSAGGI
1992

Aspergillus_fumigatus ----- 1794

Sporothrix_brasiliensis
DIG-ADWAVWGLFSPFLKTPEEYKC---GVYGVATKFITEMKRRQPVGPYNLAGWSAGGI 2045

Fonsecaea_monophora
AIDSKNLAVYGLNCPFMKDPTSUTC---GIEGVSKLYLEEVMMRRQPMGPYILGGWSAGGV 2000

Alternaria_alternata
NIS-TDMAVYGLNCPFMKCPEKWSC---GVEGVSRLYLSEIKRRQPQGPYLVGGWSAGGV 1991

Colletotrichum_higginsianum
QVS-SQWAVWGLFSPFMKTPEEYKC---GVYGMASKFIEAMKARQPKGPYSLAGWSAGGV
2011

Verticillium_dahliae
QIS-PDWAVWGLFSPFMKTPEEFNC---GVYGMVAVKFIEEMKRRQPQGPYHIGGWSAGGV 2019

Exophiala_dermatitidis
AIDSKNLAVYGLNCPFMKDPTSUTC---GIEGVSKLYLEEVMMRRQPMGPYILGGWSAGGV 1997

Fonsecaea_pedrosoi
VAYEVTRQLSDLQKMHPDRNYTVEKLILIDSPCPIRLEPLPARLHHFFDEIGLLGTGT- 2058

Beauveria_bassiana
FAFEATRALMAA-----GEAVEKLLLIDAPNPIGLENPPSKMFDFFESAGVFGKMT-- 2043

Aspergillus_fumigatus ----- 1794

Sporothrix_brasiliensis
IAFEMVNQLIKA-----GEAVDNLVLIDSPSPDTIEPLPKGLHAWFASIGLLGDGDP- 2097

Fonsecaea_monophora
VAYEVTRQLSDLQKMHPDRNYTVEKLILIDSPCPIRLEPLPARLHHFFDEIGLLGTGT-- 2058

Alternaria_alternata
MAYEVAQQLVNS-----GEKVENLVLIDAPCPVALDPLPARLHIFFDQIGLLGTGKP- 2043

Colletotrichum_higginsianum
IAYEIVNQLTKA-----GESVENLVIDAPCPITIEPLPKSLHAWFASIGLLGEGDD- 2063

Verticillium_dahliae
ICFEIVNQLTKV-----GERVDNLILIDSPCVIIEPLPRSLHAWFASIGLLGDREDA 2072

Exophiala_dermatitidis
VAYEVTRQLSDLQKLHPDKNYTVEKLILIDSPCPIRLEPLPARLHHFFDEIGLLGTGT-- 2055

Fonsecaea_pedrosoi
--GKTPNWLLPHFEYSIKAL TAYRPELKS THDFKAPPTLLIWATDGVC GKP GDPRPPPQA 2116

Beauveria_bassiana
 GSNNVPKWLRRHFDATVTMLDGYAPVPLP----NAPPTVVIYARDGIMKDPSAPQMETAP 2099
 Aspergillus_fumigatus ----- 1794
 Sporothrix_brasiliensis
 --SSVPAWLLPHFAATVTALSNYTAEPLP--AAHCPKVTVIWCEDGVCHLPTDPRPQPYP 2153
 Fonsecaea_monophora
 --GKTPNWLLPHFEYSIKALTAYRPELKSTHDFKAPPTLLIWATDGVCGKPGDPRPPPQA 2116
 Alternaria_alternata
 --GGTPSWLLPHFASAIQNLKDYDPKPM--PKIAPPVLAIWCTDGVCPNPEDPRPPPGE 2099
 Colletotrichum_higginsianum
 DNKKIPSWLLPHFAASVTALSNYTAEPIP--KDKCPNVMAIWCEDGVCHLPSDPRPDYP 2121
 Verticillium_dahliae
 SSKKIPDWLLPHFAASVNALSNYTAEPIP--ADKCPNVMAIWCEDGVCHLPTDPRPDYP 2130
 Exophiala_dermatitidis
 --GKTPNWLLPHFEYSIKALTAYRPELKSTRDFNAPPTLLIWATDGVCGKPGDPRPPPQA 2113

Fonsecaea_pedrosoi
DDPKSMKWLLNRTDFGPNWGDKLLGSDVCKMVTV-VGNHFTMMKPPVA---KGVGQFI
 2171
 Beauveria_bassiana
 -NDPREMLWLLHRTDFSAAGWAALIGRGRMNIHVLNSNVNHFTMMDE--GPHMEQMRGYV
 2156
 Aspergillus_fumigatus ----- 1794
 Sporothrix_brasiliensis
 S---GHALFLLNRTDFGPNLWDAYLDPRKMLIRHM-PGHHFSIIHGDQPPQAKQLGAIM 2209
 Fonsecaea_monophora
 -DDPKSMKWLLNRTDFGPNWGDKLLGVDVCKMVTV-VGNHFTMMKPPVA---KGVGQFI
 2171
 Alternaria_alternata
 GEDPAPMKWLLNRTDFSDNGWAQLLPKENFQYAVM-GGNHFTMMKGEHG---ATLGKLI
 2155
 Colletotrichum_higginsianum
 T---GHALFLLNRTDFGPNRWDEYLDINKFRTRHM-PGNHFSMMHGDYA---KQLGQFI 2174
 Verticillium_dahliae
 T---GHALFLLNRTDFGPNRWDEYLDIAKFRTRSM-PGNHFSMMHGDYA---KMMGTFI 2183
 Exophiala_dermatitidis
 -DDPKSMKWLLNRTDFGPNWGDKLLGAEVCKMVTV-VGNHFTMMKPPVA---KGVGQYI
 2168

Fonsecaea_pedrosoi **REAL**LS- 2177
 Beauveria_bassiana RKEILD 2163
 Aspergillus_fumigatus ----- 1794
 Sporothrix_brasiliensis REGLGV- 2215
 Fonsecaea_monophora REALLS- 2177
 Alternaria_alternata QQGLKL- 2161
 Colletotrichum_higginsianum REAVCE- 2180
 Verticillium_dahliae REALCQ- 2189
 Exophiala_dermatitidis RESLSM- 2174

Figura suplementar I. Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos de PksA/Pks1 de diferentes espécies fúngicas. Os asteriscos (*) indicam os aminoácidos idênticos entre as sequências, (:) os aminoácidos conservados (mesmas propriedades físico químicas e (.) aminoácido semi-conservados. Os números de acesso das sequências estão indicados na Tabela 2. Em amarelo está indicado o domínio SAT (ACP transacilase - posições 5-241); em rosa PKSD (Domínio de acil transferase em enzimas policetídeo sintase - posições

368-1308); em letras azuis o domínio PT_fungal_PKS (policetídeo sintase desidratase – posições 1283-1597); os dois sítios de ligação a fosfopanteteína (PP-binding, posições: 1672-1729 e 1805-1865) estão indicados por letras vermelhas e por último EntF2 em verde (Domínio tioesterase da policetídeo sintase tipo I, posições: 1836-2175).

10. Figura Suplementar II

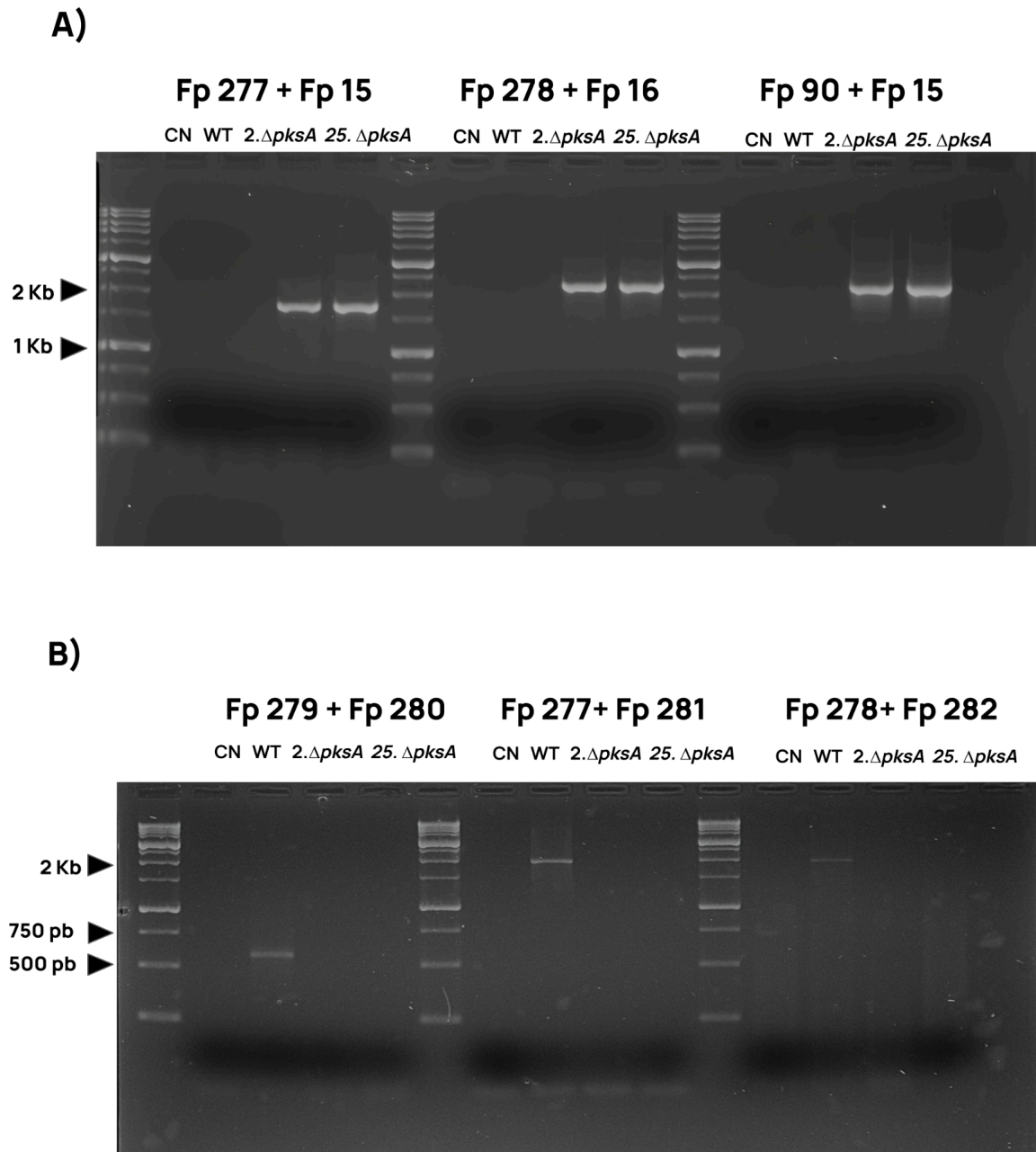


Figura Suplementar III. Confirmatório molecular dos mutantes Δ *pk*sA. Fotos dos géis das PCRs confirmatórias dos mutantes 2 e 25 Δ *pk*sA. As fotos foram tiradas após o processo de eletroforese em gel de agarose, indicando o par de oligonucleotídeos utilizados, bem como seus respectivos tamanhos aproximados. **A)** Confirmatório da deleção no locus *PksA*. **B)** Confirmação da substituição gênica com a marca de seleção de resistência a Higromicina B. Para a aferição dos tamanhos dos produtos das reações de PCR, foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder RTU(100pb – 10000p) da KASVI.

11. Figura Suplementar III

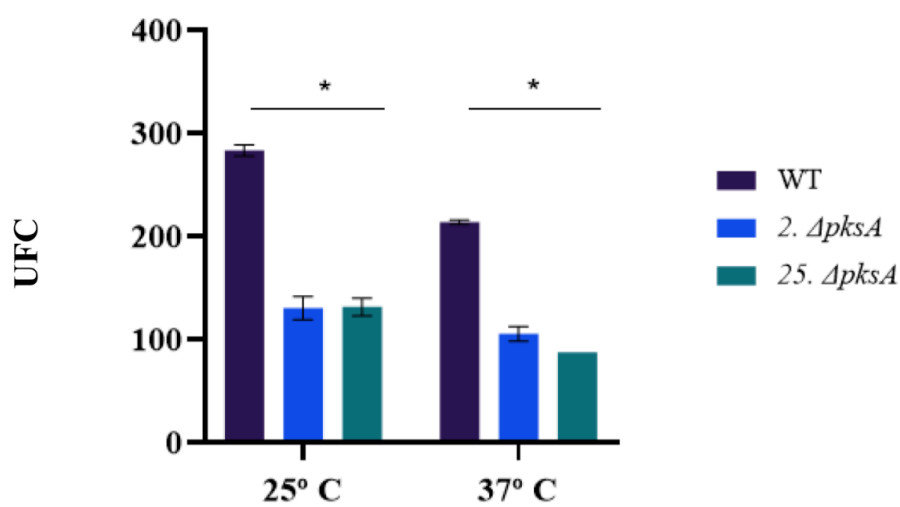


Figura Suplementar II. Viabilidade conidial. A viabilidade conidial foi avaliada por meio do inóculo de 50 μL de uma suspensão de conídios a 1×10^4 conídios/mL e espalhada com auxílio de pérolas de vidro estéreis para contagem das UFCs. O gráfico representa a diferença do número de colônias entre os grupos WT e $\Delta pksA$. $p < 0,05$ está indicado como “*”).