

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

KASSYO LOBATO POTENCIANO DA SILVA

Caracterização dos mecanismos de captação de ferro em *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*

GOIÂNIA
FEVEREIRO - 2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

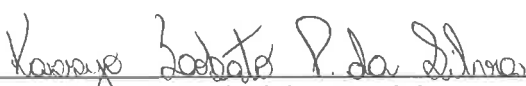
Nome completo do autor: Kassyo Lobato Potenciano da Silva

Título do trabalho: Caracterização dos mecanismos de captação de ferro em *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 01 / 04 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

KASSYO LOBATO POTENCIANO DA SILVA

Caracterização dos mecanismos de captação de ferro em *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

CO-ORIENTADOR: Prof.^a Dra. Mirelle Garcia Silva Bailão

GOIÂNIA

FEVEREIRO - 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lobato Potenciano da Silva, Kassyo

Caracterização dos mecanismos de captação de ferro em *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* [manuscrito] / Kassyo Lobato Potenciano da Silva. - 2017.

XII, 99 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão; co-orientadora Dra. Mirelle Garcia Silva-Bailão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Virulência. 2. sideróforos. 3. metal. 4. via redutiva. 5. reguladores. I. Melo Bailão, Alexandre, orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 041

Aos vinte dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete (20/02/2017), às 09hs30min, no (a) Anfiteatro do ICB II, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão, Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares e Prof. Dr. Augusto Schrank** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**Caracterização dos mecanismos de captação de ferro em *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*.**", em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Kassyo Lobato Potenciano da Silva**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 40 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 55 minutos, encerrou-se a sessão de defesa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

e, para constar, eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em
 Administração do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
 Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos
 membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão
Presidente da Banca
UFG/GO

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares
UFG/GO

Prof. Dr. Augusto Schrank
UFRS/RS

**TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS.**

APOIO FINANCEIRO: CAPES/ CNPq/ FINEP/ FAPEG/UFG.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão – Presidente da banca

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Augusto Schrank

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

SUPLENTE

Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof.^a Dra. Lilian Cristiane Baeza

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIA

Àqueles que durante todo o tempo se fazem presentes na minha vida...

...À Deus, pai, amigo, Senhor em todo o tempo. Obrigado pela força, saúde e por jamais me deixar só. Tu és Fiel em todo o tempo.

...Aos meus pais Adenones e Kelli, porto seguro, refúgio, e sobretudo principais incentivadores desta fome crescente pelo aprendizado e conhecimento. Pelos conselhos, pela educação e pela confiança que vocês sempre depositaram em mim, muito obrigado. Vocês sempre serão a minha maior inspiração na construção de uma vida digna, preservando por uma personalidade íntegra. Eu amo vocês.

...Ao meu irmão Kalley, que sempre torceu pelo meu sucesso e jamais me negou uma ajuda quando precisei. Muito obrigado por tudo irmão. Torço pelo seu sucesso sempre.

...Aos meus sobrinhos, Rebecca e Davi Lucas, por me fazerem babar de amor sempre que podemos estar juntos. Titio ama vocês.

...Aos meus avós, que hoje assistem ao sucesso dos filhos e netos como fruto pela dedicação e garra com as quais batalharam na construção de famílias unidas, fortes e amorosas. Vocês são exemplos de fé e perseverança nos momentos adversos da vida. E mesmo que o avançar da idade lhes roube algumas lembranças e memórias, o carinho dos intermináveis abraços e o afeto dos mais puros beijos sempre nos manterão unidos em um único sentimento, o amor.

...Aos meus príncipes, Christian e Pimpe, por darem aos meus dias mais sentido e preencherem o meu coração de felicidade. Amor, obrigado pela compreensão na dedicação aos estudos quando ela foi necessária, pelo companheirismo e pelos incentivos. Sua presença sempre trará paz e alegria à minha vida. Pimpe, o papai te agradece por você estar comigo todos os dias, noites e madrugadas, deitado bem do meu lado, acompanhando cada suspiro meu. Quero vocês grudados em mim, enquanto a vida nos fizerem um!

AGRADECIMENTOS

Àqueles que durante estes dois anos de trabalho acreditaram na minha capacidade, me ajudaram e tornaram essa caminhada mais leve...

...Aos meus orientadores, Alexandre e Mirelle Bailão, pela confiança depositada no meu trabalho, pelos ensinamentos, pelas cobranças que me fizeram ir adiante, pela paciência com os erros e os reconhecimentos com os acertos. Obrigado pela oportunidade. Vocês são grandes exemplos de entrega e compromisso no que fazem. Desejo que vocês conquistem juntos muito além do que almejam.

...À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular, liderado pela professora Célia, pela cooperação mútua em toda a rotina de trabalho. Agradeço aos professores que sempre auxiliaram quando precisei. Aos colegas de iniciação científica, mestres, doutores e pós-doutores que fazem sua parte na construção de um ambiente de trabalho produtivo.

...Ao meu grupo de trabalho com os fungos negros, Carlos, Davi, Bianca e Euslan. Boa parte dos resultados conquistados aqui se devem ao nosso trabalho em conjunto. Estarei torcendo sempre pelo sucesso de vocês.

...Aos colaboradores Hubertus Haas, Herbert Lindner e Beatrix Elisabeth Lecchner da Universidade Médica de Innsbruck – Áustria, bem como ao Marcus de Melo Teixeira da Universidade de Brasília – Brasil, pelos dados essenciais acrescentados a este trabalho.

...Aos órgãos financiadores de pesquisa, CNPq, FINEP, FAPEG e, em especial à CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

...Aos professores membros da banca, por estarem dispostos a contribuírem para o aperfeiçoamento deste estudo.

...Às amigas que construí neste período, por aliviarem o peso dessa jornada com sorrisos, brincadeiras e muita música. Em especial, agradeço aos amigos do “E aí, publicou?”, que sempre tem a melhor foto no ícone do whatsapp. Karla, você é meu amor à primeira vista do mestrado, minha baixinha predileta, minha melhor companhia. Lana, minha fiel companheira de almoços (embora tenha me trocado algumas vezes), sua chatice persistente me conquistou e hoje um dia de LBM sem você já não tem graça. Miriam e Lilian, depois dessa defesa a gente pode marcar alguma coisa (cerva)? Estarei precisando e de vocês não abro mão. Noja, conterrâneo, quando as condições melhorarem eu te pago umas aulas novas de auto-escola, você precisa. Igor, pare (pelo amor de Deus) de se decepcionar com o verdão, torça para o Vasco. Dani, coloque definitivamente em seus pensamentos que você não é gorda, nós agradeceremos. Por outro lado, Edilânia, que você conquistou os quilos que você luta por eles a tanto tempo, estou com você. Amanda e Manu, vocês continuam guardadas no meu coração. Aparecido, você vai chegar além do que seus olhos possam enxergar, voe. Marielle e Ju, impossível desconectar vocês duas, obrigado pelos bons momentos sempre que estamos juntos. Brincadeiras à parte, essas palavras são para dizerem que levarei vocês no coração de uma forma especial por toda a vida!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Cromoblastomicose	16
1.2. <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e <i>Cladophialophora carrionii</i>	19
1.3. Diferenciação celular	21
1.4. Fatores de virulência.....	22
1.5. Diagnóstico e tratamento	25
1.6. O micronutriente ferro e seu papel na interação patógeno-hospedeiro....	27
1.7. Captação de ferro em fungos patogênicos	28
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo geral	41
3.2. Objetivos específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. Análises <i>in sílico</i>	42
4.2. Cultivo dos fungos	42
4.3. Extração de RNA total e análise por PCR em tempo real	43
4.4. Ensaio Overlaid – Chrome Azurol S (O-CAS).....	44
4.5. Ensaio perclorato férrico.....	45
4.6. Purificação e identificação de sideróforos	45
4.7. Ensaio de captação cruzada de sideróforos	46

4.8. Crescimento em diferentes fontes únicas de ferro	47
4.9. Análise de captação de ferro durante infecção em macrófagos e sobrevivência...	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Identificação e caracterização <i>in silico</i> de genes relacionados à captação e homeostase de ferro em <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i>	48
5.2. Expressão de genes envolvidos nos mecanismos de captação de ferro e sua regulação.....	59
5.3. <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> produzem sideróforo do tipo hidroxamato como estratégia de captação de ferro.....	61
5.4. Produção de ferricrocina como sideróforos intra e extracelulares em <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i>	64
5.5. Sideróforos produzidos por <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> são capazes de restaurar o crescimento da linhagem mutante $\Delta sidA$ de <i>A. nidulans</i>	66
5.6. Crescimento de <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> em diferentes fontes de ferro	67
5.7. Sobrevivência de propágulos de <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrioni</i> em macrófagos expostos a diferentes concentrações de ferro.....	68
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	79
8. PERSPECTIVAS	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da cromoblastomicose de acordo com os casos reportados	17
Figura 2. Variedade das lesões da cromoblastomicose	19
Figura 3. Morfologias de <i>F. pedrosoi</i> observadas por microscopia eletrônica de varredura ..	20
Figura 4. Estruturas de reprodução em <i>C. carrionii</i> e <i>F. pedrosoi</i>	21
Figura 5. Sistemas de alta afinidade de ferro em <i>C. albicans</i>	29
Figura 6. Grupos funcionais de sideróforos.	31
Figura 7. Características estruturais de sideróforos do grupo hidroxamato.	31
Figura 8. Rota de biossíntese de sideróforos no fungo <i>A. fumigatus</i>	34
Figura 9. Domínios e organização modular de peptídeos sintetases não-ribossomais.....	52
Figura 10. Domínios típicos revelados por permeases e oxidases.	53
Figura 11. Ilustração de domínios encontrados em possíveis transportadores de sideróforos	55
Figura 12. Domínios conservados encontrados nos fatores de transcrição HapX e SreA	57
Figura 13. Análise de organização genômica revela clusterização dos genes envolvidos na homeostase do ferro.....	58
Figura 14. Sítios de ligação putativos para fatores de transcrição do tipo GATA e complexos de ligação do fator de transcrição HapX	59
Figura 15. Análise de expressão de genes de <i>F. pedrosoi</i> relacionados com a homeostase de ferro	61
Figura 16. Perfil de expressão de genes envolvidos na homeostase de ferro em <i>C. carrionii</i>	62
Figura 17. Produção de sideróforos sob condições de privação de ferro	64
Figura 18. Sideróforos do tipo hidroxamato secretados durante a deficiência de ferro	65
Figura 19. Análises por RP-HPLC da produção de sideróforos sob condições de privação de ferro em <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i>	66
Figura 20. Análise de ferricrocina por espectrometria de massa (MS)	67
Figura 21. Sideróforos produzidos por <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> recuperam o crescimento da linhagem mutante $\Delta sidA$ de <i>A. nidulans</i>	68

Figura 22. Utilização de diferentes fontes únicas de ferro no crescimento de <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i>	69
Figura 23. Análise da capacidade de utilização de fontes orgânicas e inorgânicas de ferro durante infecção em macrófagos	70
Figura 24. Modelo proposto para a regulação dos sistemas de aquisição de ferro em <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> durante privação do micronutriente	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos senso e antisense utilizados nas reações de RT-PCR para avaliação da expressão gênica	44
Tabela 2. Genes de <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> potencialmente envolvidos na homeostase de ferro	49
Tabela 3. Domínios transmembrânicos identificados em ferroxidases, permeases e transportadores de sideróforos putativos	53
Tabela 4. Prováveis transportadores de sideróforos encontrados em <i>F. pedrosoi</i> e <i>C. carrionii</i> através de busca por homologia.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- BDA - meio batata dextrose ágar;
- BF – meio Butterfield;
- BLAST – *Basic Local Alignment Tool* (ferramenta de alinhamento de sequências);
- BPS – ácido dissulfônico da batofenantrolina;
- °C – graus celsius;
- CBC – *CCAAT-binding complex* (complexo de ligação a CCAAT);
- CBM – Cromoblastomicose;
- Cc* – *Cladophialophora carrionii*;
- cDNA – DNA complementar;
- CFU – *Colony Forming Units* (Unidades Formadoras de Colônia);
- cm – centímetro;
- CO₂ – dióxido de carbono;
- DNA – ácido desoxirribonucléico;
- DNase – desoxirribonuclease;
- FC - ferricrocina
- FO – ferrioxamina;
- FOB – ferrioxamina B;
- Fp* – *Fonseaea pedrosoi*;
- g – grama;
- GPI – glicosilfosfatidilinositol;
- h – hora;
- HE – hematoxilina-eosina;
- IFN- γ – interferon gama
- l – litro;
- mAU – miliabsorção;
- MFS – classe de proteínas transportadoras de membrana;

mg – miligrama;

mili-Q - água reagente tipo 1 livre de Rnase;

min – minuto;

ml – mililitro;

mM – milimolar;

MMcM – meio McVeigh-Morton modificado;

MS – espectrometria de massas;

nm – nanômetro;

NRPS – peptídeo sintetases não ribossômicas;

p – significância estatística;

PBS – tampão fosfato-salino;

PCR – reação em cadeia polimerase;

Pfam – *proteins families* (banco de dados de família de proteínas)

pH – potencial hidrogeniônico;

qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa (q) utilizando a enzima transcriptase reversa (RT);

RNA – ácido ribonucléico;

RP-HPLC – cromatografia líquida de fase reversa;

RPM – rotação por minuto;

SFB - soro fetal bovino;

SIT – transportadores do complexo sideróforo-Fe³⁺;

TAFC – triacetilfusarinina C;

TMS – seguimentos transmembrânicos;

TR – tempo de retenção;

μM – micromolar;

μl – microlitro;

% – percentual.

RESUMO

Os fungos polimórficos *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são os principais agentes etiológicos da Cromoblastomicose (CBM), uma infecção micótica cutânea crônica, que ocorre principalmente em regiões tropicais úmidas. A escassez de protocolos terapêuticos eficazes somada ao polimorfismo clínico da CBM, conduzem a terapias prolongadas e elevada taxa de recidiva. Poucos são os dados a respeito da biologia molecular de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, embora alguns fatores de virulência já tenham sido descritos, salientando a necessidade de se explorar os mecanismos utilizados por estes patógenos durante a infecção. O ferro é um micronutriente vital para todos os organismos, com exceção de algumas bactérias, participando de processos celulares essenciais, tais como: replicação do DNA, combate ao estresse oxidativo, respiração celular, transporte de oxigênio, produção de energia, dentre outros. Durante a infecção o hospedeiro diminui a disponibilidade de ferro para o agente patogênico para conter o avanço da infecção; enquanto o patógeno ativa mecanismos de obtenção e utilização do metal para sobreviver nos tecidos infectados, revelando um cenário de intensa disputa. Com o objetivo de caracterizar a presença destes sistemas em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, análises *in silico* foram realizadas, revelando a presença de ortólogas para proteínas envolvidas na assimilação redutiva de ferro, captação mediada por sideróforos e reguladores das estratégias de captação e utilização do metal, contendo estas sequências domínios conservados consistentes com as funções preditas. O perfil de expressão de transcritos demonstrou a indução de captadores redutivos de ferro, intermediários da biossíntese de sideróforos e do regulador positivo *hapX* durante a privação de ferro, além da repressão do regulador negativo *sreA*. A produção de sideróforos foi observada após abordagens qualitativas, sendo posteriormente identificado o sideróforo ferricrocina intra e extracelularmente em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Estes sideróforos mostraram-se capazes de restaurar o crescimento de uma linhagem mutante de $\Delta sidA$ de *A. nidulans*. Fontes preferenciais de ferro foram observadas após ensaios de crescimento e, além disso, algumas destas fontes foram utilizadas por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* durante infecção em macrófagos, demonstrando que estes patógenos podem possuir estratégias de remodelamento da homeostase de ferro para sobrevivência.

Palavras-chave: virulência, sideróforos, metal, via redutiva, reguladores.

ABSTRACT

The polymorphic fungi *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii* are the main etiological agents of Chromoblastomycosis (CBM), a chronic cutaneous mycotic infection, which occurs mainly in humid tropical regions. The scarcity of effective therapeutic protocols added to the clinical polymorphism of CBM leads to prolonged therapies and a high relapse rate. There are few data on the molecular biology of *F. pedrosoi* and *C. carrionii*, although some virulence factors have already been described, revealing the need to explore the mechanisms used by these pathogens during infection. Iron is a vital micronutrient for all organisms, with the exception of some bacteria, participating in essential cellular processes, such as: DNA replication, oxidative stress, cellular respiration, oxygen transport, energy production, among others. During the infection, the host decreases the availability of iron to the pathogen to contain the advancement of the infection; while the pathogen activates mechanisms for obtain and use the metal to survive in the infected tissues, revealing a scenario of intense dispute. In order to characterize the presence of these systems in *F. pedrosoi* and *C. carrionii*, *in silico* analyzes were performed, revealing the presence of orthologs for proteins involved in reductive iron assimilation, siderophore mediated uptake and regulators of capture and utilization strategies of the metal, these sequences containing conserved domains consistent with the predicted functions. The expression profile of transcripts demonstrated the induction of iron reducing scavengers, siderophore biosynthesis intermediates and the hapX positive regulator during iron deprivation, in addition to repressing the negative regulatory sreA. The production of siderophores was observed after qualitative approaches, and the siderophore ferricrocine was subsequently identified intra- and extracellularly in *F. pedrosoi* and *C. carrionii*. These siderophores were able to restore the growth of a mutant strain of Δ sidA from *A. nidulans*. Preferred iron sources were observed after growth assays and, in addition, some of these sources were used by *F. pedrosoi* and *C. carrionii* during infection in macrophages, demonstrating that these pathogens may have strategies for remodeling iron homeostasis for survival.

Keywords: virulence, siderophores, metal, reductive pathway, regulators.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cromoblastomicose

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica de aspecto polimórfico, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo, causada por uma variedade de fungos pigmentados ou dematiáceos (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; MATTE *et al.*, 1997). A doença foi estudada pela primeira vez em 1911 por Alexandrino Pedroso (São Paulo, Brasil), no entanto, os primeiros casos publicados de CBM são atribuídos ao médico alemão Max Rudolph, que em 1914 descreveu uma doença exótica chamada “figueira” em seis trabalhadores rurais que viviam no interior do Estado de Minas Gerais, Brasil (RUDOLPH, 1914; CASTRO; CASTRO, 1987; QUEIROZ-TELLES, 2015). No ano seguinte, Lane e Medlar descreveram o primeiro caso norte-americano de CBM em um paciente que vivia nos Estados Unidos, caracterizando os primeiros aspectos histopatológicos da doença (MEDLAR, 1915; MCGINNIS, 1983). O termo “cromoblastomicose” foi estabelecido inicialmente por Terra e colaboradores (1922) que definiram a patologia como uma dermatite verrucosa causada por fungos pigmentados (MINOTTO *et al.*, 2001; TERRA *et al.*, 1922).

A CBM apresenta distribuição cosmopolita com incidência maior nas regiões tropicais e subtropicais (**Figura 1**). A maioria dos casos reportados da doença ocorrem na África (Madagascar e África do Sul) (BAYLES, 1986; ESTERRE *et al.*, 1996) e na América Latina (México, América Central, Brasil e Venezuela) (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; MINOTTO *et al.*, 2001; PEREZ-BLANCO *et al.*, 2006; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998). Existem registros da doença também em países da Ásia (Índia, China, Japão e Malásia) e Austrália (ATTAPATTU, 1997; LESLIE; BEARDMORE, 1979; RAJENDRAN *et al.*, 1997). Casos raros de pacientes com CBM são observados no norte da Europa e nos EUA (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). A CBM não é uma doença de relato obrigatório de modo que todos os dados epidemiológicos são derivados de publicações e pesquisas. As taxas de incidência variam de 1:6.800 (14/100.000) em Madagáscar a 1:8.625.000 (0,012/100.000) nos EUA. No Brasil, a taxa de incidência estimada de CBM é de 3 casos por 100.000 habitantes, sendo a região amazônica a principal área endêmica, registrando mais de 500 casos até 2015 (ESTERRE *et al.*, 1996; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998).

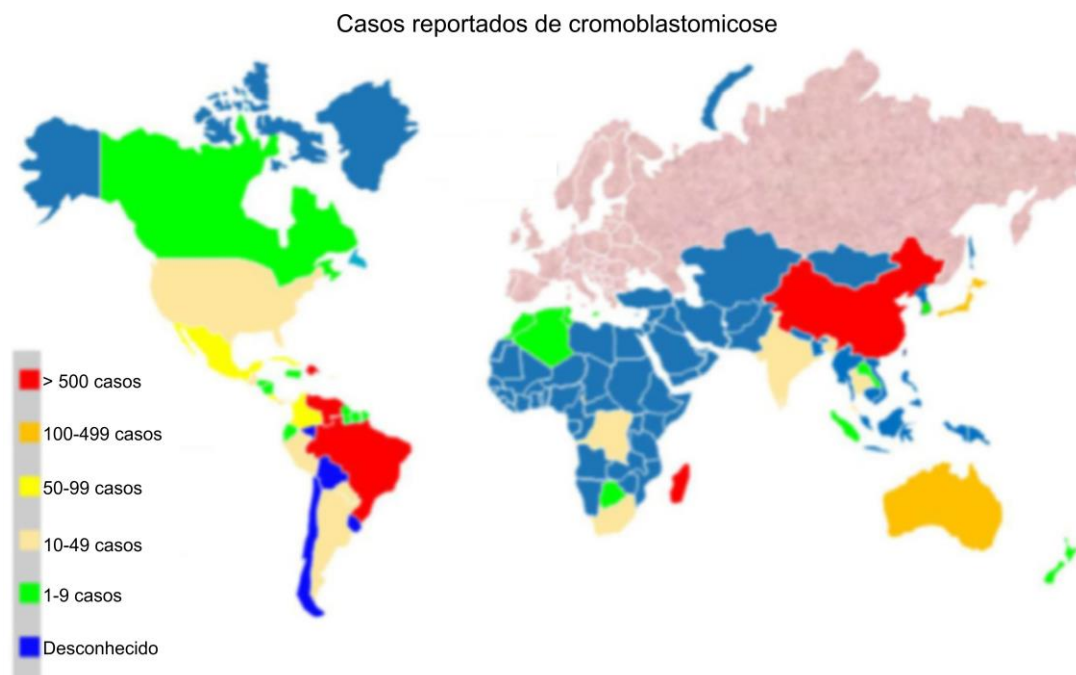


Figura 1. Distribuição geográfica da cromoblastomicose de acordo com os casos reportados. Os países da América do Sul e Ásia são recordistas em casos da doença, seguidos por oceania. Porém, é importante destacar que a falta de diagnóstico e ausência de relato obrigatório da doença demonstra no mapa uma enorme área de dados totalmente desconhecidos. Retirado de (QUEIROZ-TELLES, 2015).

Os fungos causadores da cromoblastomicose são encontrados em todo o mundo no solo e detritos vegetais em decomposição. Devido a CBM ser uma micose de implantação, a ocupação parece desempenhar um papel fundamental. Essa doença raramente ocorre na adolescência, sendo que a maioria dos pacientes estão na faixa etária entre 40 a 50 anos. A CBM ocorre predominantemente em homens; 78 a 82 % dos pacientes são do sexo masculino. A maioria das lesões são observadas nas extremidades dos membros de trabalhadores rurais, sendo considerada uma patologia ocupacional. Os principais fatores de risco associados à infecção por CBM são: não utilização de sapatos, luvas ou vestuários de proteção, má nutrição e hábitos de higiene (MINOTTO *et al.*, 2001; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES, 2015). Uma fonte potencialmente importante de infecção foi relatada em uma área endêmica localizada no Estado do Maranhão, nas margens da floresta amazônica, onde milhares de famílias estão envolvidas na colheita de coco-babaçu (*Orbignya Phalerata Martins*), fruto de uma palmeira selvagem. A população local coleta nozes de babaçu para extrair o óleo de babaçu, um componente importante para fabricantes de produtos de beleza locais e internacionais. Fungos melanizados foram isolados

da casca protetora do babaçu, sendo apontado como fator de risco para as centenas de pessoas que desenvolvem a CBM após o trauma durante a atividade de trabalho (MARQUES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 1992).

Após uma implantação traumática transcutânea, e um período incerto de incubação, a lesão inicial da CBM aparece no local de inoculação. A lesão inicial é geralmente solitária e unilateral, mais tarde evoluindo para uma pápula levantada com uma superfície lisa rosa que aumenta gradualmente ao longo de algumas semanas antes de se tornar escamosa. A lesão cutânea inicial pode progredir e evoluir para diversos tipos clínicos, incluindo nodular, tumoral (semelhante a couve-flor), verrucosa, ou cicatricial, além de lesões em placas (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; CARRIÓN, 1950; MCGINNIS, 1983; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009; QUEIROZ-TELLES; DE C L SANTOS, 2013) (**Figura 2**). É possível observar mais de um tipo de lesão no mesmo paciente, em casos avançados e graves. O polimorfismo clínico das lesões de CBM desencadeia diagnósticos diferenciais múltiplos incluindo possibilidades infecciosas e não infecciosas. Tais fatores podem causar atraso no diagnóstico que implica na falta de resposta terapêutica e perda de mobilidade. No início, as lesões iniciais são assintomáticas, e geralmente não interferem com as atividades do paciente. Ao longo do tempo, o prurido torna-se o sintoma predominante da doença, que nas formas moderada e intensa podem ser acompanhadas por dor local. Como as lesões de CBM são muito pruriginosas, existe a hipótese de que a disseminação da doença para outros locais da pele ocorre geralmente por autoinoculação e/ou disseminação linfática. À medida que a gravidade aumenta, edema e infecções secundárias bacterianas afetam a saúde do paciente como um todo, modificando a aparência da pele e causando cicatrizes. Nos casos mais graves, desenvolvem-se linfedema e anquilose crônicas e podem surgir carcinomas espinocelulares não invasivos. Todas essas complicações podem levar o indivíduo a uma incapacidade definitiva. (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; MCGINNIS, 1983; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009).



Figura 2. Variedade de lesões da cromoblastomicose. A lesão inicial da cromoblastomicose (1A) pode evoluir para cinco tipos clínicos principais: lesões nodulares na perna (1B), lesão verrucosa do pé (1C), lesões cicatriciais no joelho e parte inferior da perna (1D), lesões em placas nas nádegas (1E), lesões tumorais (1F/1G) e lesões mescladas por nodulares e verrucosas envolvendo o membro inferior (1H). Retirado de (QUEIROZ-TELLES, 2015).

Os agentes etiológicos da CBM pertencem principalmente ao gênero *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, embora casos dispersos tenham sido relatados em gêneros *Phialophora*, *Rhinocladiella* e *Exophiala*. Os agentes mais comuns são *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, sendo geralmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais. No entanto, infecções por *F. pedrosoi*, que constituem a maioria dos casos da doença no Brasil e no mundo (70-90%), ocorrem mais frequentemente em regiões de clima úmido. Por outro lado, *C. carrionii* é prevalente em climas semiáridos. Isolados com menor frequência, outros agentes da CBM são: *Phialophora verrucosa*, *Exophiala dermatitidis*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Fonsecaea monophora*, entre outros (ESTERRE *et al.*, 1996; MCGINNIS, 1983; PEREZ-BLANCO *et al.*, 2006; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998).

1.2. *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*

Ambos, *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, são fungos melanizados pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* na ordem *Chaetothyriales* (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR,

2007). *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são organismos polimórficos, que incluem estruturas de reprodução (conídios) e formas fúngicas normalmente encontradas nos estágios saprofíticos (micélios) e parasitários (corpos escleróticos). Qualquer uma destas formas fúngicas pode gerar todas as outras, com exceção da transição de células escleróticas em conídios (**Figura 3**) (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

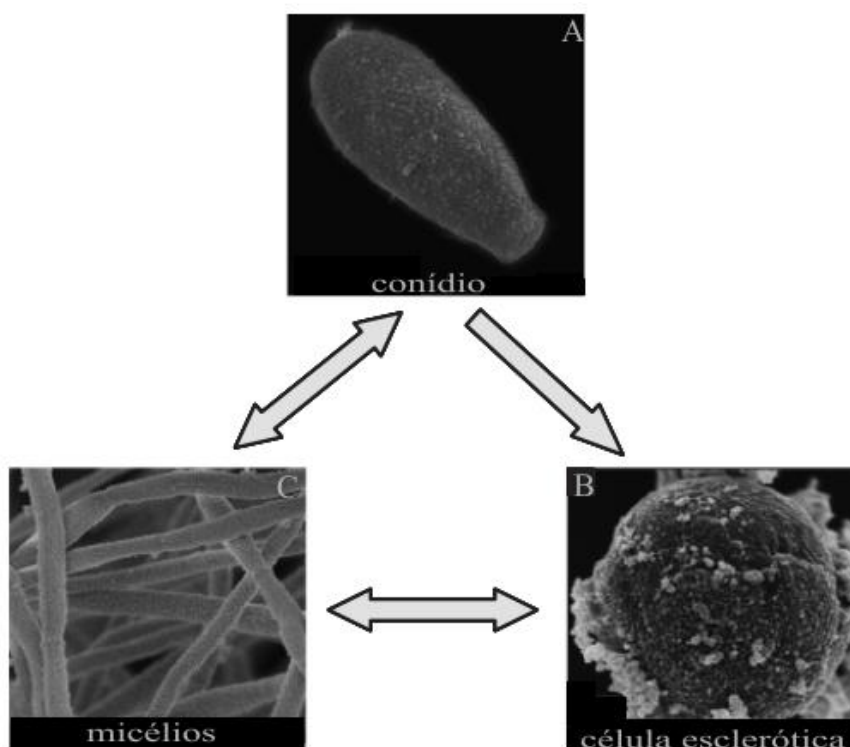


Figura 3. Morfologias de *F. pedrosoi* observadas por microscopia eletrônica de varredura. As imagens de microscopia eletrônica de varredura de cada forma fúngica e as formas potenciais de diferenciação são mostradas pelas setas. Adaptado de (SANTOS *et al.*, 2007).

Devido à sua plasticidade e adaptabilidade a vários ambientes orgânicos e inorgânicos, os fungos melanizados podem apresentar uma grande diversidade na sua morfologia. Macroscopicamente, *F. pedrosoi* apresenta coloração verde escuro, cinza e preto, com crescimento micelial prateado, que pode imitar *C. carrionii*. Sendo assim, a diferenciação morfológica entre *F. pedrosoi* e *C. carrionii* é melhor caracterizada microscopicamente através das estruturas de reprodução assexuadas (**Figura 4**); estas são as fiálides (*Phialophora*), células conidiogênicas com conídios em cadeias longas ou curtas (*Cladosporium*), ou formas denticulares que correspondem a conídios oriundos das células conidiogênicas (*Rhinochadiella*). *F. pedrosoi* é caracterizado pela presença de 3 tipos de

conídios assexuados; isto é, possuem fiálides, *Cladosporium* (curto) e *Rhinocladiella*. Por outro lado, *C. carrionii* apresenta apenas a reprodução do tipo *Cladosporium*, porém as cadeias são longas e ramificadas (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; ROY *et al.*, 2015).

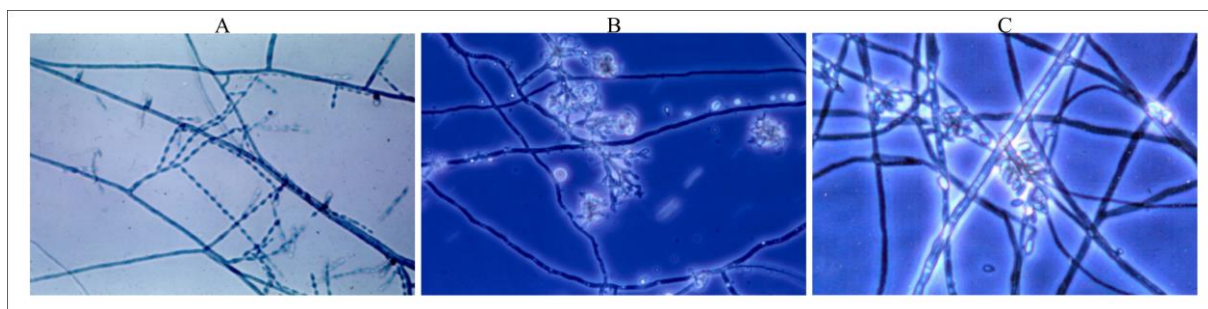


Figura 4. Estruturas de reprodução em *C. carrionii* e *F. pedrosoi*. A. A reprodução do tipo Cladosporium em *C. carrionii* (1000x). B. Reprodução do tipo Cladosporium curta em *F. pedrosoi* (1000x). C. Reprodução tipo *Rhinocladiella* em cultura de *F. pedrosoi* (1000x). Imagens retiradas de (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007).

1.3. Diferenciação celular

Após implantação transcutânea, os propágulos de agentes da CBM apresentam uma plasticidade celular e morfológica única. O papel das formas de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* no estabelecimento da doença ainda é pouco conhecido, especialmente em se tratando de conídios e hifas. Essas duas formas são encontradas no ambiente e, ao adentrar o hospedeiro, passam por um processo de transformação em células muriformes, também denominadas "corpos Medlar" ou, alternativamente, "corpos cromo ou fumagóides" e "células escleróticas ou meristemáticas" (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SALGADO, 2010).

Entre os hospedeiros da CBM, as células muriformes são onipresentes sendo encontradas dentro de células gigantes multinucleadas ou em microabscessos situados na interface do tecido epitelial e derme. As hifas, associadas a um papel de auto-inoculação do fungo no hospedeiro, normalmente são localizadas próximas às camadas mais superficiais da lesão. O termo "célula muriforme" é restrito a células da ordem *Chaetothyriales* com crescimento meristemático que servem como formas invasivas em tecido vivo, humano ou vegetal. As células muriformes podem ser simples ou agrupadas. Elas têm uma forma redonda-poliédrica em uma parede grossa pigmentada com paredes transversais e longitudinais. A célula muriforme é considerada um mecanismo de adaptação evolutiva para

permitir a sobrevivência dentro do microambiente do hospedeiro. Esta habilidade está diretamente associada a uma resposta granulomatosa intensa, bem como à evasão de mecanismos imunológicos sinalizando o início da cronicidade da doença. O tempo de conversão de conídios para células muriformes em estudos *in vitro* foi estimado em 6 dias (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; DA SILVA *et al.*, 2008; DE HOOG, 1993; ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; LEE; HSU; ROSEN, 1998; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SALGADO, 2010; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2014).

A disposição das células muriformes no tecido representa uma relação superfície/volume otimizada, favorecendo a deposição significativa de melanina. *F. pedrosoi* requer uma baixa concentração de Ca^{2+} (0,1 mM, pH 2,5) para diferenciação de micélios em células muriformes, indicando que a concentração iônica pode ser importante no processo de transição durante a CBM (DA SILVA *et al.*, 2007; MENDOZA; KARUPPAYIL; SZANISZLO, 1993; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2014). Células muriformes coletadas de tecidos lesionais podem facilmente se diferenciar em hifas e conídios *in vitro* ou podem ser mantidas como células muriformes sob condições adversas de pH baixo e poucas fontes nutricionais em meio líquido. Tem sido demonstrado que a sobrevivência das formas de resistência e, conseqüentemente, o rápido avanço clínico da doença causada por *F. pedrosoi*, pode estar fortemente associada à presença de células muriformes. Além disso, tais formas permanecem como uma ferramenta diagnóstica diferencial significativa da CBM. Estes tipos celulares são altamente resistentes ao ataque do sistema imunológico e, portanto, um melhor conhecimento desse processo de diferenciação pode permitir a proposta de abordagens terapêuticas diferentes e mais eficientes contra o CBM (DA SILVA *et al.*, 2008; HAMZA *et al.*, 2003; MACHADO; REGIS SILVA; FISCHMAN, 2011; SANTOS *et al.*, 2007; SZANISZLO; COOPER; VOGES, 1972).

1.4. Fatores de virulência

Patógenos fúngicos humanos são a causa de doenças graves geralmente subestimadas associadas com alta morbidade e mortalidade. Tal como outros patógenos, a sua sobrevivência e crescimento no hospedeiro, é mediado por fatores de virulência que os diferenciam de microrganismos inofensivos. Embora muitas destas estratégias necessitem de fatores de virulência específicos do hospedeiro, genericamente qualquer fator que permita o crescimento sob condições semelhantes ao hospedeiro pode ser necessário para a patogênese. Além de um núcleo de atividades comuns relevantes para o crescimento, diferentes grupos de

fungos empregam diferentes estratégias que, apesar da (ou juntamente com) a resposta do hospedeiro, pode levar à doença (BRUNKE *et al.*, 2016).

A termotolerância é um dos importantes fatores de virulência entre os membros da ordem *Chaetothyriales*. As espécies patogênicas de *Fonsecaea* têm uma temperatura ótima de crescimento de 33°C e uma temperatura máxima de crescimento de 37°C (SALGADO, 2010). Estas temperaturas cardinais são ligeiramente mais elevadas do que as de espécies estritamente ambientais. Em comparação, *Cladophialophora bantiana*, que infecta o sistema nervoso central e o sistema respiratório humano, pode crescer a 40°C (MCCARTHY *et al.*, 2014).

A parede celular rígida do fungo contrasta com o fluxo dinâmico de moléculas estruturais necessárias para diferenciação, crescimento e adaptação ao hospedeiro. Diferentes componentes da membrana e da parede celular podem contribuir para a virulência fúngica da CBM, incluindo melanina, quitina sintases, um conjunto de enzimas hidrolíticas (fosfatases, fosfolipases, lipases, esterases, ecto-ATPases, peptidases, DNases, ureases e gelatinases), lipídeos, galactomananos e cerebrosídeos. A diferenciação de hifas e conídios em células muriformes também pode contribuir para a virulência, considerando o aumento da espessura da parede e a formação de células muriformes que resistem às respostas do hospedeiro (KARUPPAYIL *et al.*, 1996; LENARDON *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2004; NIMRICHTER *et al.*, 2004; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SILVA; EKIZLERIAN, 1985; SUZUKI; TAKEDA, 1977).

Lipídeos ou frações da parede celular sem lipídeos extraídas de diferentes agentes da CBM induzem reações granulomatosas significativas em camundongos (SILVA; EKIZLERIAN, 1985; SILVA; FAZIOLI, 1985). De fato, as células muriformes têm uma elevada capacidade para a indução da formação de células gigantes de Langerhans *in vitro* (SALGADO, 2010). Os resíduos de galactofuranosil ácido-lábil são responsáveis pela propriedade imunogênica de galactomananos isolados de três espécies de *Fonsecaea* (SUZUKI *et al.*, 1977). Cerebrosídeos, os principais glicosfingolipídeos neutros de células fúngicas, compostos de um monossacarídeo ligado a um esfingóide N-acil (ceramida), desencadeiam a produção de anticorpos que inibem o crescimento de *F. pedrosoi* e potencializam a função de matar macrófagos em ratos (NIMRICHTER *et al.*, 2004).

A quitina é formada por β -1,3-glucanos e polímeros de N-acetilglucosamina que ocorrem em diferentes conformações, sugerindo um papel na estrutura fúngica e diferenciação (LENARDON *et al.*, 2007). A síntese de quitina depende da atividade enzimática das quitina

sintases I, II e III, que participam na citocinese, síntese do septo e formação da cicatriz dos brotos (LIU *et al.*, 2004), respectivamente, cada uma tendo sua atividade catalítica codificada por diferentes genes, CHS1, CHS2, e CHS3, respectivamente (195), que têm seqüências conservadas em *F. pedrosoi* (BOWEN *et al.*, 1992). A levedura negra *Exophiala dermatitidis*, ocasionalmente envolvida na CBM, possui um gene estrutural para uma classe V CHS, WdCHS5 (LIU *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 1993). O WdCHS5 é essencial para o crescimento fúngico a 37°C e a expansão das células muriformes, indicando uma importância crítica da CHS classe V para a virulência (ABRAMCZYK; PARK; SZANISZLO, 2009). Células muriformes de *F. pedrosoi* demonstraram possuir um componente tipo quitina que medeia o desenvolvimento de Th17 por inibição da dectina-1, prejudicando a resposta imune e contribuindo para a cronicidade da CBM (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

A melanina é uma macromolécula complexa, hidrofóbica, carregada negativamente que inclui polímeros indólicos ou fenólicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; REVANKAR; SUTTON, 2010). Em agentes da CBM, este polímero pode ser derivado de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ou dihidroxinaftaleno (DHN) (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000). A melanina é considerada um composto imunologicamente ativo funcionando como um importante fator de virulência em diferentes fungos patogênicos (LANGFELDER *et al.*, 2003; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). Foram propostos três mecanismos possíveis associados à sua contribuição para a resistência aumentada de fungos contra células hospedeiras imunes: (I) proteção contra enzimas proteolíticas, (II) proteção contra derivados de oxigênio ou nitrogênio e (III) redução da fagocitose. A melanina derivada de DHN é sintetizada pelo precursor de policétido, uma via que começa com acetil coenzima A (acetil-CoA) (FRANZEN *et al.*, 2008). Interessantemente, a inibição desse processo bioquímico específico com triciclazol pode ser utilizada para induzir mudanças morfológicas na parede celular de *F. pedrosoi*, levando a resistência diminuída do fungo à lise mecânica e à morte por macrófagos (CUNHA *et al.*, 2005; FRANZEN *et al.*, 2006). Estudos posteriores demonstraram que *F. pedrosoi* produz não só melanina associada à parede celular, mas também extracelular, piomelanina, que pode acumular, por exemplo, em mutantes da via de degradação da tirosina, como observado para mutantes espontâneos de *F. monophora*. Durante a infecção, a deposição de melanina de *F. pedrosoi* interfere na produção de óxido nítrico (NO) e inibe a fagocitose, que não é revertida com interferon gama (IFN-γ) e lipopolissacarídeo (LPS). Esta

inibição de fagocitose pode também ser observada após incubação *in vitro* com paredes celulares melanizadas (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2013a).

As enzimas proteolíticas, tais como as peptidases, podem ser prejudiciais a vários componentes dos mecanismos de defesa do hospedeiro, levando à fuga imunológica ou à resistência antimicrobiana (PALMEIRA *et al.*, 2006a). Cientistas demonstraram que as células muriformes, em comparação com conídios e micélios, apresentam alta atividade fosfatásica associada à patogenicidade. Os substratos fosforilados foram hidrolisados por ectofosfatases de superfície. A atividade das enzimas e foi bloqueada por compostos específicos tais como fluoreto de sódio e molibdato de sódio (KNEIPP *et al.*, 2003, 2004).

Uma série de enzimas hidrolíticas são produzidas e segregadas por agentes da CBM. As paredes das células muriformes de *F. pedrosoi* apresentam maior atividade de fosfatase do que conídios ou hifas (KNEIPP *et al.*, 2003), e a atividade da fosfatase aumenta a adesão das células hospedeiras em *F. pedrosoi* (KNEIPP *et al.*, 2004) e *Rhinocladiella aquaspersa* (KNEIPP *et al.*, 2012). O efeito citolítico da ATP sugere que as ecto-ATPases encontradas na superfície de *F. pedrosoi* podem favorecer a sobrevivência de fungos em ambientes hostis como o corpo humano (COLLOPY-JUNIOR *et al.*, 2006; FILIPPINI *et al.*, 1990). As peptidases segregadas por *F. pedrosoi* são capazes de clivar proteínas plasmáticas humanas, tais como imunoglobulinas e albumina, e componentes da matriz, como a fibronectina, enquanto os inibidores das metaloproteinases prejudicam o crescimento e a diferenciação conidial (PALMEIRA *et al.*, 2006b). Estes achados foram recentemente confirmados em *P. verrucosa* (GRANATO *et al.*, 2015). Os inibidores de aspartil peptidase do HIV interrompem a atividade aspartil proteolítica, afetam grandemente a ultraestrutura de *F. pedrosoi*, diminuem a adesão às células epiteliais e aumentam a susceptibilidade à morte por macrófagos, indicando possível uso terapêutico em pacientes com CBM (PALMEIRA *et al.*, 2006a).

1.5. Diagnóstico e tratamento

Devido à diversidade dos aspectos clínicos apresentados pela cromoblastomicose, existe a necessidade de um diagnóstico diferencial. O exame microscópico dos raspados da lesão e/ou de uma biópsia de tecido deve ser suficiente para descartar outras patologias, contudo, a identificação da cultura é o único meio confiável de se determinar o diagnóstico definitivo e o agente causal da CBM (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007).

As típicas células muriformes ou fumagóides castanhas podem ser vistas em raspagens de pele, retiradas da superfície da pele, por exame direto usando solução de hidróxido de potássio (KOH) 10 a 40%. Raspagens ou material de biópsia devem ser tomadas das áreas onde uma pequena mancha escura é visível na superfície da pele lesionada, o que otimizará a produção de diagnóstico. As células muriformes ou fumagóides são vistas como estruturas arredondadas, de paredes espessas, de cor castanha, com um septo único ou duplo, com diâmetro entre 10 e 14 μm . Estruturas filamentosas também podem ser observadas em raspagens espessas. As biópsias coradas com hematoxilina-eosina (HE) demonstram um infiltrado inflamatório caracterizado por células multinucleadas, fibrose, acantose, papilomatose, hiperqueratose e hiperplasia pseudo-epiteliomatosa. As células fumagóides típicas também são visualizadas neste método. A cultura de raspagem ou material de biópsia deve ser realizada em Ágar Sabouraud Dextrose. A maioria dos agentes patogênicos crescerão após 10 dias, produzindo colônias aveludadas. Estas são inicialmente de cor verde intenso e depois tornam-se pretas (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009, 2017; ROSEN *et al.*, 2016; URIBE-J *et al.*, 1989).

Pacientes com CBM ainda são um desafio terapêutico para os clínicos, devido à natureza recalcitrante da doença, especialmente nas formas clínicas graves (HAZEN, 1998; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992, 2009; RESTREPO, 1994). Ainda não há tratamento padrão para esta micose, mas sim uma série de opções terapêuticas. O tratamento pode ser dividido em três grupos: tratamento físico, quimioterapia e terapia combinada. Nos estágios iniciais da doença, as lesões respondem à ressecção cirúrgica, mas posteriormente, à medida que a gravidade aumenta, melhores resultados são obtidos com antifúngicos sistêmicos. A determinação de perfis de susceptibilidade *in vitro* pode ser útil para identificar resistência microbiológica intrínseca a fármacos antifúngicos, mas não prediz a resposta clínica (ANDRADE *et al.*, 2004; HAZEN, 1998; MCGINNIS; PASARELL, 1998).

Os métodos físicos disponíveis são usados, na maioria dos casos, como terapia adjuvante em combinação com agentes antifúngicos e incluem cirurgia, terapia com laser, termoterapia e terapia fotodinâmica (PDT) (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Os fármacos mais utilizados são itraconazol e terbinafina em doses diárias de 200-400 mg e 250-500 mg, respectivamente (BONIFAZ *et al.*, 2005; ESTERRE *et al.*, 1998; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992; QUEIROZ-TELLES; DE C L SANTOS, 2013; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012; RESTREPO *et al.*, 1988). Nos casos refratários, a combinação desses dois fármacos pode ser

empregada. Outros tratamentos incluem posaconazol, 800 mg por dia e a combinação de itraconazol com 5-flucitosina. A associação destes com o posaconazol pode desempenhar um papel importante na terapia da CBM. A duração da terapia deve basear-se em critérios clínicos, micológicos e histopatológicos. De acordo com dados publicados, as taxas de cura com terbinafina ou itraconazol variam de 15 a 80%, dependendo da gravidade da doença. Como esperado, em formas graves as taxas de cura são menores e as recidivas são mais comuns (ANTONELLO *et al.*, 2010; GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009; NEGRONI *et al.*, 2005; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012).

1.6. O micronutriente ferro e seu papel na interação patógeno-hospedeiro

O ferro é um componente funcional no transporte de oxigênio em globulinas, citocromos e enzimas que transferem elétrons. O ferro quando sozinho, no grupo heme ou em complexos ferro-enxofre, liga-se a várias proteínas envolvidas em importantes processos celulares que incluem a regulação gênica, a respiração, como também a biossíntese de desoxirribonucleotídeos, lipídeos, aminoácidos e esteróis. Ele é abundante no ambiente, mas insolúvel em soluções aquosas com pH fisiológico. O desafio para a maioria dos organismos é a aquisição de quantidades adequadas de ferro para os processos biológicos críticos, evitando a toxicidade associada ao ferro livre (ANDREWS; SCHMIDT, 2007; CAIRO; BERNUZZI; RECALCATI, 2006). Como metal de transição, as propriedades redox do ferro possibilitam que ele seja encontrado em dois estados de oxidação, ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}), que lhe conferem a capacidade de doar e receber elétrons, respectivamente (JOHNSON, 2008). O ferro é um micronutriente essencial tanto aos mamíferos, quanto aos micro-organismos. Sua utilização como um cofator em vias metabólicas clássicas é fundamental aos micro-organismos patogênicos e seus hospedeiros (HENTZE *et al.*, 2010; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

Nas últimas quatro décadas, milhares de estudos laboratoriais e observações clínicas foram publicados na aquisição microbiana de ferro. Com a exceção de *Lactobacillus* não patogênicos e de *Borrelia burgdorferi* patogênica (que utiliza manganês em lugar de ferro), todos os grupos de protozoários, fungos e bactérias examinados requerem ferro para a sobrevivência e a replicação (WEINBERG, 2009). Além disso, ele também é um elemento essencial da resposta imune inata por meio de seu papel na geração de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio. Durante a evolução, as colônias microbianas invadiram nichos distintos no ecossistema do hospedeiro e desenvolveram diversos mecanismos para explorar

suas fontes nutricionais, como o ferro. Em resposta à infecção, o hospedeiro desenvolveu contramedidas para limitar a disponibilidade de ferro para o agente patogênico, mecanismo conhecido como imunidade nutricional (BAILÃO *et al.*, 2012; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

A imunidade celular dos mamíferos baseia-se fortemente na ação dos macrófagos, que se apresentam como uma fábrica que gerencia a homeostase de ferro (THEURL *et al.*, 2005). Após a infecção, o fluxo de ferro é suprimido pelos macrófagos resultando na redução de 70% do ferro no plasma, restringindo a quantidade disponível do metal para agentes patogênicos extracelulares. Por outro lado, macrófagos infectados limitam a quantidade de ferro para micróbios intracelulares bombeando o ferro para fora da célula através do transportador ferroportina. A lactoferrina é produzida por neutrófilos e células epiteliais para quelar ferro em compartimentos extracelulares, resultando na diminuição da proliferação de fungos invasores. A indução da produção de ferritina, para facilitar a retenção de ferro intracelular, também reduz a quantidade do metal disponível para agentes patogênicos intracelulares (AL-SHEIKH, 2009; BAILÃO *et al.*, 2012; NAIRZ *et al.*, 2010; WEINBERG, 2009).

Dentre os microrganismos que possuem uma notável capacidade de assimilar ferro, quando presente em qualquer uma de suas variáveis formas, estão os fungos. Apropriadamente, esses eucariotos unicelulares expressam uma amplitude de sistemas de captação e utilização de ferro, alguns destes exclusivos para fungos e outros que também estão presentes em plantas e animais (PHILPOTT, 2006). Durante o processo infeccioso, em que o hospedeiro limita a acessibilidade ao metal, o fungo aprimora suas estratégias de obtenção do micronutriente. Sendo assim, as correntes demandas desse nutriente culminam em uma acirrada disputa para aquisição e/ou utilização do metal na interface patógeno-hospedeiro (BAILÃO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011).

1.7. Captação de ferro em fungos e sua regulação

A captação de ferro através da membrana plasmática é considerada o ponto primário de regulação da homeostase de ferro. Estratégias de alta afinidade para a aquisição de ferro evoluíram em fungos patogênicos, uma vez que o mesmo é fundamental para o sucesso da infecção (**Figura 5**). A captação de ferro inclui dois sistemas principais: assimilação redutiva de ferro (oxidação/permeação do ferro) e captação de ferro mediada por sideróforos (ou assimilação não-redutiva de ferro). Um número considerável de fungos abriga ambos os

sistemas de alta afinidade, como por exemplo *Talaromyces marneffei*, *Ustilago maydis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium graminearum* (ASKWITH; KAPLAN, 1997; EICHHORN *et al.*, 2006; GREENSHIELDS *et al.*, 2007; JOHNSON, 2008; MARTY *et al.*, 2015; MEI; BUDDE; LEONG, 1993; PASRICHA *et al.*, 2016; ROMAN *et al.*, 1993; SCHRETTL *et al.*, 2004; SCHWECKE *et al.*, 2006). Além de utilizarem estes dois mecanismos principais, outros fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides* spp. e *Histoplasma capsulatum*, também utilizam heme como fonte nutricional de ferro, que se encontra em sua maioria ligado à hemoglobina, dentro dos eritrócitos (CADIEUX *et al.*, 2013; FOSTER, 2002; MOORS *et al.*, 1992; PHILPOTT, 2006; SILVA *et al.*, 2011).

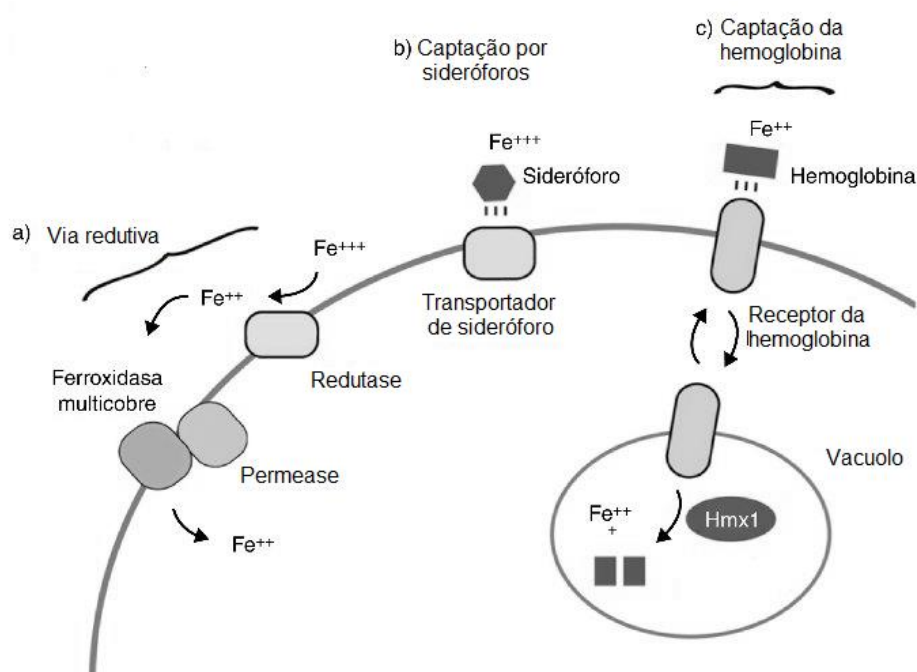


Figura 5. Sistemas de alta afinidade de ferro em *C. albicans* (Adaptado de CHEN *et al.*, 2011). a) Via redutiva pela qual ferro férrico é reduzido a ferro ferroso. b) Produção de sideróforos como moléculas que possuem alta afinidade por ferro. c) Captação do grupo heme ligado a hemoglobina. O gene Hmx1 codifica a heme oxigenase intracelular, que degrada heme.

Transportadores de metais tipicamente reconhecem substratos de uma única valência e não transportam metais de outra valência. Por esta razão, o ferro férrico deve ser reduzido a ferro ferroso antes que ele possa ser captado por um transportador. Assim, o metal é reduzido a partir de Fe^{3+} a Fe^{2+} por ferroredutases ligadas à membrana e, em seguida, é rapidamente internalizado pela ação conjunta de oxidase e permease que formam um complexo proteico na

membrana plasmática (KOSMAN, 2010; PHILPOTT, 2006). O ferro reduzido é retomado através de um complexo de transporte de alta afinidade que consiste em uma ferroxidase multi-cobre (Fet3p) e uma permease (Ftr1p) (ASKWITH *et al.*, 1994; STEARMAN *et al.*, 1996). O ferro ferroso a ser transportado é primeiramente oxidado por Fet3p numa reação que é dependente de cobre e requer oxigênio molecular (DE SILVA *et al.*, 1997; HASSETT; YUAN; KOSMANT, 1998). O íon férrico é então transportado para o citosol através da permease Ftr1p. O passo de oxidação é obrigatório, uma vez que o ferro férrico não é um substrato para o complexo oxidase/permease e formas mutantes de Fet3p sem atividade oxidase não dão suporte ao transporte de ferro (WANG *et al.*, 2003). Há aproximadamente 20 anos, estudos realizados em *S. cerevisiae* levaram à primeira caracterização de Fet3 e Ftr1 (ASKWITH *et al.*, 1994; STEARMAN *et al.*, 1996). Desde então, vários ortólogos foram funcionalmente descritos em outros fungos, incluindo *A. fumigatus* (SCHRETTL *et al.*, 2004) *Schizosaccharomyces pombe* (ASKWITH; KAPLAN, 1997), *Candida albicans* (ECK *et al.*, 1999), *Pichia pastoris* (BONACCORSI DI PATTI *et al.*, 1999), *Arxula adeninivorans* (WARTMANN *et al.*, 2002), *Ustilago maydis* (EICHHORN *et al.*, 2006), *Fusarium graminearum* (PARK *et al.*, 2007), e *Cryptococcus neoformans* (JUNG *et al.*, 2009). Vários organismos como *Schizophyllum commune*, *Coprinopsis cinérea* ou *Coccidioides immitis* parecem não codificar homólogos de Fet3 e Ftr1 em seus genomas (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008; HOEGGER *et al.*, 2006; KUES; RUHL, 2011; SILVA *et al.*, 2011). O genoma de *Paracoccidioides* spp. não apresenta homólogo para Ftr1, porém contém homólogo para Fet3 (BAILÃO *et al.*, 2015).

Em contraste, o mecanismo não redutivo de captação de ferro utilizado em fungos patogênicos consiste na biossíntese e captação de sideróforos. Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular, quelantes específicos de ferro férrico, que são excretadas durante a deficiência de ferro (NEILANDS, 1993, 1995). Microrganismos produzem sideróforos como agentes de captação, com o objetivo de fornecer ferro para a célula através da solubilização do íon férrico extracelular (MATZANKE *et al.*, 1987). Os sideróforos podem ser classificados em três grupos principais, dependendo da natureza química dos domínios doadores de oxigênio ligantes ao Fe^{3+} : catecóis, carboxilatos e hidroxamatos (**Figura 6**) (MIETHKE; MARAHIEL, 2007). Além disso, várias bactérias produzem sideróforos de tipo misto combinando diferentes ligantes de Fe^{3+} em uma única molécula. Com exceção do rizoferrina carboxilato produzido por zigomicetos, todos os outros sideróforos de fungos identificados até o momento são do tipo hidroxamato. Hidroxamatos são derivados do aminoácido não-

proteínogênico ornitina e de diferentes grupos acil, podendo ser agrupados em quatro famílias estruturais: ácido rodotorúlico, ferricromos, coprógenos e fusarininas (**Figura 7**) (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008).

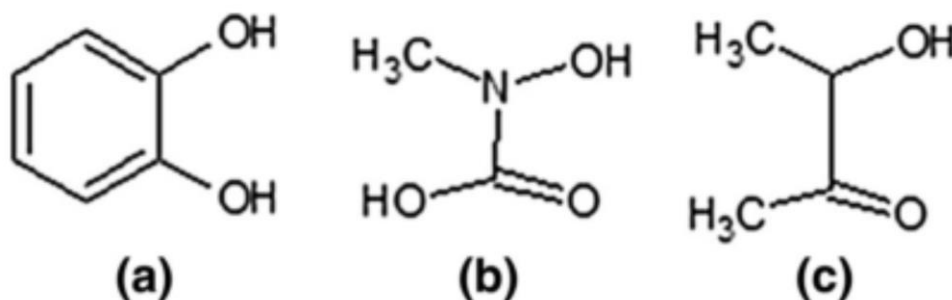


Figura 6. Grupos funcionais de sideróforos. Catecóis (a), hidroxamatos (b) e carboxilatos (c). Retirado de (DE SERRANO; CAMPER; RICHARDS, 2016).

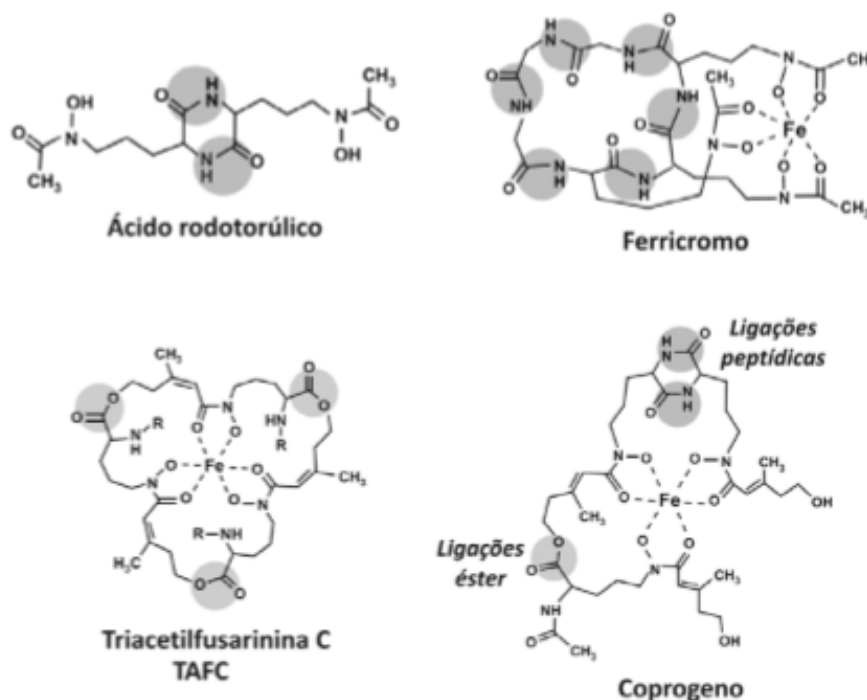


Figura 7. Características estruturais de sideróforos do grupo hidroxamato. Ligações peptídicas entre os grupos hidroximatos são apresentadas no ácido rodotorúlico e ferricromos. TAFC é formada por ligações éster, enquanto coprógenos apresentam ambos os tipos de ligações. Adaptado de (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008)

O hidroxamato mais simples, ácido rodotorúlico, consiste em duas unidades N⁵-acetil-N⁵-hidroxiornitina ligadas cabeça-cabeça para formar um anel de dicetopiperazina

(HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). O ácido rodotorúlico é produzido por diferentes espécies de leveduras basidiomicéticas do gênero *Rhodotorula* (MULLER; BARCLAY; RAYMOND, 1985). O protótipo de fusarininas, fusarinina C, é composta de três resíduos N⁵-*cis*-anidromevalonil-N⁵-hidroxiornitina (denominada *cis* fusarinina), unidas cabeça-cauda por ligação éster. A triacetilfusarinina C (TAFC) é formada por N²-acetilação de fusarinina C, o que aumenta sua estabilidade química e hidrofobicidade. Os coprógenos são hidroxamatos lineares. O coprógeno B contém duas porções *trans*-fusarinina unidas cabeça-cabeça por uma ligação peptídica, formando uma unidade dicetopiperazina (ácido dimerúmico). N²-acetilação e N²-metilação da última porção fusarinina C permitem uma diversidade da família de coprógenos. Além disso, um dos grupos acil da dicetopiperazina pode ser acetil, em vez de anidromevalonil. Os ferricromos como ferricromo A e ferricrocina são hexapeptídeos cíclicos compostos por três cadeias N⁵-acil N⁵-hidroxiornitina e três aminoácidos (glicina, serina ou alanina). Os grupos acil encontrados nesta família são acetil, *cis* e *trans*-anidromevalonil, malonil e *trans*-β-metilglutaconil. Os ferricromos são normalmente utilizados na estocagem intracelular de ferro por espécies do subfilo *Pezizomycota*. Fungos pertencentes ao subfilo *Taphrinomycota* e ao filo *Basidiomycota* podem excretar ferricromos (HAAS, 2014; HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Recentemente, um sideróforo de tipo ferricromo com uma nova estrutura composta por quatro glicinas, uma glutamina e três cadeias N⁵-*trans*-anidromevalonil-N⁵-hidroxi-L-ornitina, produzido pelo endófito *Epichloë festucae*, denominada epichloënin A, foi identificado (KOULMAN *et al.*, 2012). De forma geral, os fungos sintetizam mais de um sideróforo hidroxamato. Por exemplo, *A. nidulans* e *A. fumigatus* excretam principalmente TAFC para aquisição de ferro e contém um ferricromo para metabolismo intracelular de ferro (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Outra análise recente mostrou que representantes do complexo *Paracoccidioides* spp. produzem e secretam coprógeno B. Por outro lado, ferricrocina e ferricromo C foram descritos em *Paracoccidioides* spp. como sideróforos intracelulares (SILVA-BAILÃO *et al.*, 2014a).

Em geral, o primeiro passo comprometido na biossíntese de sideróforos hidroximatos (**Figura 8**) é a N⁵-hidroxilação da ornitina catalisada pela ornitina-N⁵-monoxigenase. O primeiro gene mostrado em fungos para codificar essa atividade enzimática foi *sid1* em *Ustilago maydis* (MEI; BUDDE; LEONG, 1993), seguido pela caracterização de ortólogos em *A. nidulans* (*sidA*), *Aspergillus oryzae* (*dffA*), *A. fumigatus* (*sidA*), *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) (*SID1*), e *Cochiobolus heterostrophus* (*SIDA*) (EISENDLE *et al.*, 2003; GREENSHIELDS *et al.*, 2007; SCHRETTL *et al.*, 2004; TURGEON; OIDE;

BUSHLEY, 2008; YAMADA *et al.*, 2003). Todas estas enzimas requerem oxigênio como substrato, além de NADPH e FAD como cofatores (MEI; BUDDE; LEONG, 1993). A deleção do gene que codifica ornitina-N⁵-monoxigenase bloqueia a síntese de sideróforos em todas as espécies de *Aspergillus*, *Ustilago* e *Fusarium* investigados. Notavelmente, o mutante sidA-deficiente em *A. nidulans* é capaz de crescer apenas quando suplementado com sideróforos ou grandes quantidades de Fe²⁺, devido à ausência de um outro sistema de alta afinidade de aquisição de ferro (EISENDLE *et al.*, 2003).

O segundo passo na biossíntese de sideróforos resulta na composição do grupo hidroxamato, realizada pela N⁵-acilação da N⁵-hidroxiornitina. O grupo hidroxamato é formado pela transferência de um grupo acil, derivado da acil-coenzima A (acil-CoA), para a N⁵-hidroxiornitina. Neste ponto, a via se divide para formação de diferentes sideróforos, devido a escolha do grupo acil, sendo o acetil o mais simples (por exemplo, para a formação de ácidos rodotorúlico, FC e ferricromo) ou mais complexos, tais como anidromevalonil (para a formação de coprógenos e fusarininas, por exemplo) ou metilglutaconil (para a formação do ferricromo A).

No terceiro passo biossintético dos sideróforos, os hidroxamatos são covalentemente ligados por éster (fusarininas, coprogenos) ou ligações peptídicas (ácido rodotorúlico, ferricromos, coprogenos) efetivadas pelos peptídeos sintases não-ribossomais (NRPSs) (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Em *A. fumigatus*, duas transacilases, que acrescentam diferentes grupos acil de hidroxiornitina, foram identificadas até agora: SidF, que adiciona anidromevalonil-CoA, e SidL, que catalisa a adição de acetil-CoA (BLATZER *et al.*, 2011; SCHRETTL *et al.*, 2007). Neste passo, a via de sideróforos se divide em grupos distintos, sendo que a escolha do grupo acil define a natureza das moléculas. Ferricrocina e ferricromo, por exemplo, estão ligados em acetil, enquanto fusarininas e coprógenos possuem anidromevalonil (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Esta última porção é derivada do mevalonato, a partir da via de biossíntese de ergosterol, pela ação subsequente da ligase acil-CoA SidI e da enoil-CoA hidratase SidH (YASMIN *et al.*, 2012). Os NRPSs SidD e SidC estão envolvidos, respectivamente, na síntese de sideróforos extracelulares e intracelulares em *A. fumigatus* (SCHRETTL *et al.*, 2007). A modificação dos produtos por NRPS leva a outras variantes de sideróforos. Como exemplos temos a modificação de coprógenos, a hidroxilação de FC e a N²-acetilação de fusarinina C para a formação de TAFC. Recentemente, a fusarinina C-acetil-CoA-N²-transacetilase (sidG) foi identificada em *A. fumigatus* (SCHRETTL *et al.*, 2007). Cepas sidG-deficientes demonstram ausência de TAFC e produção

do penúltimo precursor fusarinina C como o principal sideróforo. Tais mutantes são fenotipicamente indistinguíveis dos de tipo selvagem, sugerindo que a fusarinina C pode compensar totalmente a perda de TAFC. Os homólogos de *sidG* são encontrados apenas em *Neosartorya fischeri*, *A. nidulans*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus oryzae*, *F. graminearum* e *Nectria hematococca*. Portanto, entre os fungos, a presença de *sidG* parece indicar, potencialmente, a síntese de TAFC (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008).

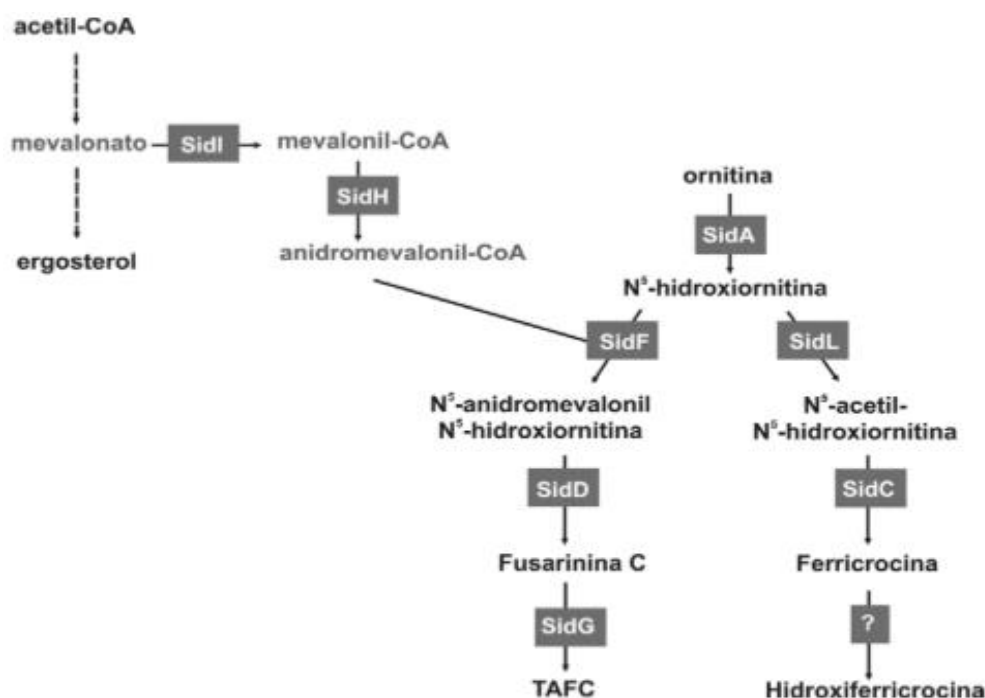


Figura 8. Rota de biossíntese de sideróforos no fungo *A. fumigatus*. O gene *sidA* e o gene *sidI* (por uma via alternativa) encabeçam a cascata biológica da biossíntese de sideróforos. A via se divide para grupamentos distintos por escolha do grupo acil prosseguindo a rota. Retirado de (YASMIN *et al.*, 2012).

O conhecimento em relação a localização subcelular da biossíntese de sideróforos e o mecanismo de excreção dessas moléculas é escasso (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Porém, a localização peroxissomal de enzimas biossintéticas de TAFC para *SidI*, *SidH* e *SidF* foi caracterizada em *A. fumigatus*, assim como a análise de mutantes de *A. nidulans* deficientes na biogênese peroxissomal revelou efeito prejudicial para enzimas envolvidas na produção de TAFC. O estudo concluiu que a biossíntese de sideróforos em ambos os fungos está parcialmente localizada nos peroxissomos (GRÜNDLINGER *et al.*, 2013a).

Em contraste com a maioria dos fungos filamentosos e algumas leveduras, *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. neoformans* não são capazes de sintetizar sideróforos, porém, se

utilizam de sideróforos produzidos por outras espécies microbianas, denominados xenosideróforos (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Curiosamente, mesmo alguns fungos que produzem sideróforos, podem utilizar xenosideróforos como mecanismo de captação de ferro, como sugerido em *H. capsulatum* e *Paracoccidioides* spp. (SILVA-BAILÃO *et al.*, 2014a; TIMMERMAN; WOODS, 2001). Além disso, todos os fungos produtores de sideróforos, estudados até o momento, contêm sideróforos intracelulares como moléculas de armazenamento de ferro. *U. sphaerogena* e *U. maydis* excretam ferricromo e ferricromo A, mas apenas o primeiro serve como composto de armazenamento de ferro, respondendo por 50% do teor celular de ferro (HAAS, 2014; MATZANKE *et al.*, 1987). Os *Pezizomycotas* investigados até agora possuem Fusarina C como sideróforo intracelular em conídios e hifas. No entanto, em *A. fumigatus*, a Fusarinina C deve ser hidroxilada para armazenamento em conídio (SCHRETTL *et al.*, 2007). Fusarinina C, ou seu derivado, constitui 47%-74% do teor de ferro de conídios em *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, e *N. crassa*. Consequentemente, a inativação da biossíntese de Fusarinina C reduz o teor de ferro em conídios, 34% em *A. nidulans* e 76% em *A. fumigatus* (EISENDLE *et al.*, 2006; MATZANKE *et al.*, 1987; SCHRETTL *et al.*, 2007).

Em fungos, os sideróforos quelantes de ferro são normalmente captados através de transportadores SIT (*Siderophore-iron transporter*, subfamília 16), pertencentes à superfamília MFS (*Major facilitator superfamily*), que agem como simportadores energizado por prótons (PAO; PAULSEN; SAIER, 1998; WINKELMANN, 2001). Absorção de ferro mediada por SITs é universalmente conservada no reino dos fungos, mesmo em espécies que não produzem sideróforos (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Esse mecanismo foi estudado com maior riqueza de detalhes em *S. cerevisiae*. Esta levedura expressa quatro diferentes transportadores de sideróforos que diferem na especificidade ao substrato (nomes alternativos dos genes são indicados): Sit1p/Arn3p, Arn1p, Taf1p/Arn2p, Enb1p/Arn4p (HEYMANN; ERNST; WINKELMANN, 1999, 2000a, 2000b; LESUISSE; SIMON-CASTERAS; LABBE, 1998; YUN *et al.*, 2000a, 2000b). Particularmente, algumas variações na especificidade têm sido relatadas entre diferentes cepas de *S. cerevisiae* (LESUISSE *et al.*, 2001). Dois destes transportadores são altamente específicos, Enb1p/Arn4p para o sideróforo enterobactina do tipo catecolato e Taf1/Arn2p para TAFC. Os outros dois transportadores mostram baixa especificidade: Arn1p transporta coprógeno e vários ferricromos; Sit1p/Arn3p reconhece o hidroxamato bacteriano ferrioxamina B, coprógeno, e uma variedade de ferricromos sem ácido anidromevalônico (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008; YUN *et*

al., 2000b). Estudos de expressão heteróloga em *S. cerevisiae* indicaram que os SIT's MirB e MirA de *A. nidulans* transportam TAFC e enterobactina, respectivamente (JUNG; KRONSTAD, 2008; PHILPOTT; PROTCHENKO, 2008). Semelhantemente, um ortólogo de MirB em *A. fumigatus* foi identificado como molécula captadora de TAFC, e FgSit1 em *F. graminearum* foi sugerido como transportador de ferricromo (PARK *et al.*, 2006; RAYMOND-BOUCHARD *et al.*, 2012). Uma análise filogenética de todos os transportadores de sideróforos extraídos das sequências genômicas de seis ascomicetos e dois basidiomicetos, incluindo produtores e não produtores de sideróforos, revelou números diferentes de parálogos: seis em *S. cerevisiae*, um em *C. albicans*, três em *S. pombe*, dez em *A. nidulans*, sete em *A. fumigatus*, dois em *N. crassa*, três em *U. maydis* e seis em *C. neoformans*. Com a exceção de *C. albicans* Sit1p/Arn1p, todos os transportadores de *S. cerevisiae* são mais semelhantes entre si do que comparados à permeases de outras espécies, indicando que estes transportadores surgiram após a separação dessas espécies. A posse de múltiplos transportadores de sideróforos muito provavelmente revela a capacidade de utilizar diferentes tipos, incluindo xenosideróforos (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). Posteriormente à absorção, as ligações éster como as dos complexos ferro-TAFC e ferro-Fusarinina C (FC) são hidrolisadas no citosol. Duas das enzimas envolvidas foram identificadas, as esterases EstB e SidJ, que pertencem a duas famílias distintas de proteínas, superfamília de esterases e família proteica DUF1749 (domínio de função desconhecida), respectivamente. EstB é específica para TAFC e SidJ é específica para FC (GRÜNDLINGER *et al.*, 2013b; KRAGL *et al.*, 2007). Curiosamente, EstB é homóloga a enzimas degradadoras de sideróforos bacterianos tais como Fes em *E. coli*, que está envolvida na liberação de ferro a partir do sideróforo enterobactina do tipo catecolato (BRICKMAN; MCINTOSH, 1992).

A maioria do ferro encontrado em um hospedeiro mamífero é na forma de heme, e a maior parte do heme celular encontra-se ligado à hemoglobina dentro dos eritrócitos. Portanto, não é surpresa que os fungos patogênicos podem usar heme como fonte nutricional de ferro (BAILÃO *et al.*, 2012; PHILPOTT, 2006). O crescimento dos fungos *C. albicans* (SANTOS *et al.*, 2003; WEISSMAN; SHEMER; KORNITZER, 2002) e *H. capsulatum* (FOSTER, 2002) é estimulado pela adição de hemoglobina ou hemina em meio de cultura com ausência de ferro, sendo que *C. albicans* expressa fatores hemolíticos e receptores de superfície para a hemoglobina (MANNS; MOSSER; BUCKLEY, 1994; PENDRAK; KRUTZSCH; ROBERTS, 2000). Em *C. albicans*, a proteína Rbt5 ancorada por GPI (glicosilfosfatidilinositol) é o principal receptor da hemoglobina (WEISSMAN;

KORNITZER, 2004). A aquisição do grupo heme também é uma das fontes preferencias de ferro em *C. neoformans*, com o envolvimento de proteínas auxiliaadoras na assimilação e absorção, como Cig1 e Vps23 (CADIEUX *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2013; JUNG; KRONSTAD, 2008). Os sistemas de transporte para heme ainda não foram identificados em fungos, porém, *C. albicans* transporta heme como uma molécula intacta, que é degradada dentro do vacúolo pela heme oxigenase intracelular, codificada pelo gene *hmx1* (PENDRAK *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2003). Análises *in silico* revelaram que o genoma do *Paracoccidioides* contém ortólogos para os genes *hmx1* e *rbt5*, sugerindo aquisição eficaz de ferro da hemoglobina por este fungo. O ortólogo ao receptor de hemoglobina, Rbt5, foi identificado como uma proteína de superfície ancorada a GPI que reconhece hemina, protoporfirina e hemoglobina (BAILÃO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011).

A adaptação celular à deficiência de ferro requer uma regulação positiva de alta-afinidade de aquisição do metal e regulação negativa de seu armazenamento e consumo, enquanto a suficiência de ferro requer a resposta inversa (HAAS, 2014). Em *A. fumigatus*, variações na disponibilidade de ferro causam uma extensa remodelagem transcricional que afeta aproximadamente 13% dos genes codificadores de proteínas. Os dois reguladores centrais que medeiam esse processo em nível transcricional neste fungo, são os fatores de transcrição SreA e HapX (SCHRETTL *et al.*, 2008, 2010). Durante a suficiência de ferro, o fator GATA SreA, que se liga a sequência consenso ATCWGATAA, reprime a sistema de captura de Fe de alta-afinidade, incluindo o sistema de sideróforos, para evitar toxicidade devido ao acúmulo do metal. Já na deficiência de ferro, o fator transcricional (bZIP) HapX reprime as vias de consumo de ferro, tais como respiração, biossíntese de heme e processos dependentes do complexo ferro-enxofre para poupar o ferro. Além disso, o HapX ativa o sistema de sideróforos (GSALLER *et al.*, 2014; HAAS, 2014). SreA e HapX estão ligados em um laço feedback negativo: SreA reprime a expressão de HapX durante a suficiência de ferro, enquanto HapX reprime a expressão de SreA na deficiência do metal (HAAS *et al.*, 1999; HORTSCHANSKY *et al.*, 2015). Recentemente, HapX teve seu papel descrito na regulação a homeostase de ferro no dermatófito patogênico *Arthroderma benhamiae*, porém mostrou-se dispensável para a virulência (KRÖBER *et al.*, 2016). Em *C. neoformans*, HapX desempenha papéis positivos e negativos na regulação da expressão gênica, como a influência negativa na expressão de genes que codificam funções respiratórias e ciclo de TCA em condições de deficiência de ferro e o papel regulador positivo na expressão de sideróforos transportadores (JUNG *et al.*, 2010). Os ortólogos para HapX e SreA no *H. capsulatum* são denominados

HapX e Sre1 e desempenham função semelhante à desenvolvida em *A. fumigatus*. (HWANG *et al.*, 2012). O fungo *Blastomyces dermatitidis* apresenta um fator transcricional GATA, SREB, que está envolvido na regulação da biossíntese de sideróforos em condições de abundância de ferro, além de participar na morfogênese de patógeno (GAUTHIER *et al.*, 2010). A maioria das espécies de fungos possuem ortólogos para SreA e HapX, sendo confirmado o papel de SreA na regulação de sideróforos em *N. crassa*, *C. heterostrophus*, *S. pombe*, *A. pullulans* e *U. maydis* (CHI *et al.*, 2013; LABBÉ; PELLETIER; MERCIER, 2007; VOISARD *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2013b; ZHOU; HAAS; MARZLUF, 1998).

Por outro lado, *S. cerevisiae* carece de ortólogos para SreA e HapX, utilizando-se de reguladores completamente diferentes, Aft1/2 e Cth1/2, que são conservados apenas em espécies *Saccharomycotina* estreitamente relacionadas (KAPLAN; KAPLAN, 2009). Aft2 ativa a transcrição de genes envolvidos no uso de ferro intracelular na ausência de Aft1. Análises de Northern blot, combinadas com experiências de imunoprecipitação de cromatina em genes selecionados de cada classe, demonstraram que Aft2 ativa diretamente os genes SMF3 e MRS4, envolvidos na homeostase de ferro mitocondrial e vacuolar, enquanto Aft1 não. A ausência de Aft1 ou Aft2 mostrou um aumento dependente de ferro na quantidade do parálogo remanescente (COUREL *et al.*, 2005). Além da estimulação da captação e mobilização de ferro, Aft1 e Aft2 também ativam a expressão de Cth1 e Cth2, proteínas parálogas de ligação a mRNAs que facilitam a decomposição de mRNAs que codificam proteínas que funcionam em vias metabólicas ricas em Fe. As alterações pós-transcricionais relativamente pequenas nos níveis de mRNA mediados por Cth1 e Cth2 em comparação com os efeitos em larga escala do controle transcricional por Aft1/Aft2, sugerem que Cth1 e Cth2 funcionam para ajustar o metabolismo do ferro sob deficiência de ferro (OUTTEN; ALBETEL, 2013).

2. JUSTIFICAVA

A cromoblastomicose é uma doença fúngica crônica humana, lentamente progressiva, que usualmente afeta a pele e/ou tecidos subcutâneos, que tem como principais agentes etiológicos *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Essa doença caracteristicamente ocupacional afeta, em sua maioria, trabalhadores rurais do sexo masculino, acometendo membros inferiores, sendo potencialmente incapacitante. Somado à epidemiologia da doença, a baixa eficiência dos atuais protocolos terapêuticos, o longo período de tratamento e o alto índice de recidiva das lesões, configuram a CBM como um grave problema de saúde pública. Faz-se necessário assim, o estudo sistemático dos agentes causadores dessa patologia, visando entender as relações patógeno-hospedeiro que provocam uma grande variedade de manifestações clínicas e, conseqüentemente, contribuir para a proposição de ferramentas terapêuticas e diagnósticas mais eficazes.

A capacidade de um fungo sobreviver em ambientes adversos é relacionada com sua habilidade em captar nutrientes essenciais. O ferro é um micronutriente fundamental nesse processo, e em geral, por se encontrar em quantidades limitadas e/ou associado à alguma molécula, os microrganismos desenvolveram sistemas altamente específicos para adquiri-lo. Durante o processo infeccioso, o hospedeiro reduz a disponibilidade deste metal como meio de proteção conhecido como imunidade nutricional, levando o patógeno a aprimorar suas estratégias de captação de ferro. Dentre elas, está a produção e absorção de moléculas de alta afinidade pelo metal, chamadas sideróforos, considerada fator de virulência em fungos filamentosos e dimórficos. Os mecanismos envolvidos no processo homeostático do ferro têm sido descritos como potenciais atenuadores da virulência em vários fungos, estabelecendo sua importância na compreensão da infecção. Porém, até o presente, não foram realizados estudos com os agentes etiológicos da CBM sobre os mecanismos de captação deste metal.

Os transportadores de sideróforos podem permitir a entrega de drogas específicas para fungos durante a infecção por uma abordagem “cavalo de Tróia”, em que agentes antimicrobianos conhecidos estão ligados covalentemente a sideróforos. A síntese de conjugados drogas-sideróforos, que são ativas contra bactérias e *C. albicans*, foi descrita. Em bactérias, os benefícios identificados desta estratégia levaram, recentemente, à síntese de uma série de antibióticos à base de sideróforos. Vários estudos demonstram que os conjugados drogas-sideróforos tornam possíveis desenhar antibióticos com transporte celular mais eficiente e reduzir o desenvolvimento de mutantes resistentes. A identificação destes

transportadores em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* possibilita o desenvolvimento de associações a drogas antifúngicas.

Diante de tais informações, uma abordagem sistemática e em larga escala sobre os mecanismos moleculares relacionados a homeostase de ferro em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* mostra-se relevante, atendendo a necessidade de novas abordagens no entendimento da biologia e da patogênese de tais fungos, bem como a incessante busca por métodos terapêuticos que proporcionem uma melhoria da qualidade de vida dos pacientes acometidos pela CBM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar os mecanismos de captação e homeostase de ferro pelas vias redutiva e não-redutiva e sua regulação em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*.

3.2. Objetivos específicos

- Buscar genes ortólogos envolvidos na captação redutiva e não-redutiva de ferro e sua regulação nos genomas de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*;
- Avaliar a expressão dos genes ortólogos encontrados em condições de privação de ferro;
- Caracterizar a produção de sideróforos em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* e, posteriormente, identificá-los;
- Avaliar fontes preferenciais de ferro utilizadas por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* para o crescimento em condições de privação de ferro⁹;
- Avaliar a utilização de possíveis sideróforos, produzidos por *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, como fonte de ferro por linhagem sensível a ausência de sideróforos.
- Analisar a capacidade de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* utilizarem ferro durante a infecção de macrófagos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análises *in silico*

Foram utilizadas sequências de genes relacionados à captação de ferro, incluindo à biossíntese e absorção de sideróforos, e sua regulação na pesquisa de ortólogos dos genomas de *F. pedrosoi*, disponível no banco de dados NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/36244?genome_assembly_id=225492), e *C. carrionii*, disponível na plataforma SABIA (www.sabia.lncc.br). As sequências utilizadas são principalmente de *Aspergillus fumigatus*, mas também incluem genes de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidas a partir dos bancos de dados *Aspergillus Genome Database* e *Saccharomyces Genome Database*, respectivamente. Usando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), a pesquisa por ortólogos foi baseada na similaridade das sequências.

As sequências de aminoácidos referentes aos ortólogos encontrados em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foram submetidas à análises de predições de domínios conservados, peptídeos sinais e seguimentos transmembrânicos utilizando o software SMART (SCHULTZ *et al.*, 1998) e o banco de dados de famílias proteicas Pfam (FINN *et al.*, 2014).

4.2. Cultivo dos fungos

F. pedrosoi (CBS 27.137) e *C. carrionii* (KSF) foram utilizados nesse trabalho. As culturas celulares, de ambos os fungos, foram mantidas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) a 22°C. Para diferenciação celular em conídios, foram utilizados meios distintos para cada um dos fungos. *F. pedrosoi* foi inoculado em meio complexo de Kauffman (PALMEIRA *et al.*, 2006b), contendo: glicose, 5g; extrato de levedura, 2g; NaNO₃, 1g; K₂HPO₄, 1g; MgSO₄ x 7H₂O, 5g; propionato de sódio, 1g; por litro de água destilada. O meio foi ajustado a pH 5.5 com HCl 1 M e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Em contraste, o meio sintético Butterfield (BF) modificado (ALVIANO *et al.*, 2003; BUTTERFIELD; JONG, 1976) foi utilizado para inocular *C. carrionii*, com a seguinte composição: MgSO₄ x 7H₂O, 0,1g; NH₄NO₃, 1,5g; KH₂PO₄, 1,8g; biotina, 5µg; tiamina, 100µg; glicerol, 6,5g; e água destilada para 1 litro. O pH do meio foi ajustado para 6.5 antes de ser autoclavado a 121°C por 15 minutos. Ambas as culturas foram incubadas a 28°C por 10 dias e os conídios, posteriormente, foram isolados por filtração através de gaze.

Para análise de expressão durante privação de ferro, os fungos foram repicados em meio Batata Dextrose líquido, em frascos sob agitação a 28°C por 7 dias. Após quatro lavagens com tampão fosfato-salino (PBS) 1X (1.4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl; pH 7.4), seguidas de centrifugação a 4000 rpm, as células foram transferidas para meio quimicamente definido MMcM (RESTREPO; JIMENEZ; CULTURE, 1980) contendo 100 µM de sulfato ferroso amoniacal ou MMcM com 50 µM de ácido dissulfônico da batofenantrolina (BPS), quelante específico de íon ferroso, a 28°C sob agitação. As culturas foram realizadas em triplicata.

4.3. Extração de RNA total e análise por PCR em tempo real

Micélios foram coletados após 24 horas nas condições de privação e abundância de ferro, maceradas em gral e pistilo até completa pulverização com posterior lise em agitador mecânico (Mini-Beadbeater – Biospec Products Inc.) na presença de TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Em seguida, o RNA total foi extraído e purificado utilizando Kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research). Quantidades iguais de RNA (1 µg) foram tratadas com DNase I (Promega Corporation) e transcritas de forma reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits – Applied Biosystems). Os cDNAs foram então utilizados nos ensaios de PCR em tempo real (qRT-PCR – StepOnePlus™ – Applied Biosystems Inc.). As reações de amplificação foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, em reações de 20 µl contendo 2 µl de cada oligonucleotídeo, 10 µl da mistura completa para PCR contendo SYBR Green e 4 µl da reação de cDNA molde. As sequências de oligonucleotídeos sendo (sentido) e antisenso (antisentido) estão listados na **Tabela 1**. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA.

Os valores de expressão foram normalizados através do método de comparação do ciclo limiar (CT) usando como controles endógenos os transcritos dos genes constitutivos beta tubulina (Z517_05482) para *F. pedrosoi* e actina (CC_02925) para *C. carrionii*. Os resultados também foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou curva de melting, afim de confirmar a especificidade da amplificação. Uma curva padrão relativa foi gerada agrupando uma alíquota de cada amostra de cDNA diluída em série de 1:5 até 1:125. Aplicou-se o método da curva padrão (BOOKOUT *et al.*, 2006) para quantificação relativa para calcular os níveis de expressão relativos dos transcritos de interesse. O teste t de Student foi aplicado nas

análises estatísticas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

Tabela 1. Oligonucleotídeos senso e antisenso utilizados nas reações de RT-PCR para avaliação da expressão gênica.

Gene <i>F. pedrosoi</i>	Oligo senso	Oligo antisenso
<i>hapX</i>	CGAGATCAACGACTTCCGGA	TGGGCGTCGCGGAGATCG
<i>sreA</i>	CTGGGTCAAGTCTGCAGCAA	GGCGAGGACTTTCAGGAGG
<i>frtA1</i>	GAAGTTGCGGAACCAGGTCT	GGCAAGGAGCGCAAAGATAC
<i>frtA2</i>	GCGCATCAACAAGACCAAGG	CACGAAGGGTGGTGATGAAG
<i>sidA</i>	GAGGCCGGCGCTATTTCCA	TCATTGAAGACCTCGGCAGC
<i>sidI</i>	AGTTCACCAGTAGTTACGGCT	CTCACCAACCGGTACGATTC
<i>tubβ</i>	CGACCGAATGATGGCCACTT	CAAATGTCGTAGAGAGCCTCG
Gene <i>C. carrionii</i>		
<i>hapX</i>	TGCACCTTGGAGACCCGCT	ACACTCTCTGGGTTCGAGCT
<i>sreA</i>	ACCTGAGCATACTTCCGGCA	CACTTGCTCCATCTTCGGGT
<i>frtA1</i>	GAAGCTGCGCAACCAGGTCT	GCGACTAGGGCGAACACAC
<i>frtA2</i>	CTCGGTGCTGCTCTCGTTC	GGCCCAGACCGTAGAAGAC
<i>sidA</i>	AGTCGATCCTCCCACACAAG	CGGAGGAGTGCAGGACGC
<i>sidI</i>	GACATCATCATCAGGGGTGG	GCCTCCTCGCTGGTCTGC
<i>act</i>	TGGCAACGAACGATTCCGAG	CATAGTAGTACCACCAGACATG

4.4. Ensaio Overlaid – Chrome Azurol S (O-CAS)

A produção de sideróforos foi detectada qualitativamente através do ensaio colorimétrico de Cromo Azurol S (PÉREZ-MIRANDA *et al.*, 2007). Os fungos foram cultivados a 22°C durante 10 e 15 dias em placas contendo MMcM sólido na presença e ausência de ferro. Como controle, para quantidade suficiente de ferro, foi adicionado sulfato ferroso amoniacal a uma concentração final de 100µM. Completados o tempo de crescimento, o meio CAS foi preparado com modificações mínimas. Assim, para um litro foram utilizados Chrome azurol S (CAS) 60.5 mg; brometo de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA) 72.9 mg;

piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico) (PIPES) 30.24 g; e solução de cloreto férrico 830,2 µl (30 mM FeCl₃ em 10 mM de HCl). Agarose (0.9%, w/v) foi utilizada como agente solidificante. Composto CAS foi diluído em água, sendo posteriormente adicionada a solução de cloreto férrico e HDTMA, também diluído previamente em água. O líquido resultante dessa mistura, de coloração azul escuro, foi autoclavado a 121°C por 15 min. Em outro recipiente, PIPES e agarose formaram uma mistura que, por sua vez, também foi autoclavada. Em seguida, após resfriamento à 50°C as soluções foram misturadas, sendo aplicado 15 ml de O-CAS sobre cada placa contendo a cultura celular com a intenção de evidenciar a presença de sideróforos. Neste ensaio, é observada uma transição de cor de azul para laranja quando o íon férrico fracamente ligado ao CAS é sequestrado por sideróforos que possuem uma maior afinidade por Fe³⁺.

4.5. Ensaio perclorato férrico

Sobrenadantes de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foram submetidos ao ensaio colorimétrico de perclorato férrico afim de caracterizar a presença de sideróforos do tipo hidroxamato (ATKIN; NEILANDS; PHAFF, 1970). Para tal, as células foram cultivadas a 28°C em meio Batata Dextrose líquido por 7 dias e, após sete lavagens com PBS 1X seguidas por centrifugação, transferidas para o meio MMcM líquido na ausência de ferro e MMcM contendo 100 µM de sulfato ferroso amoniacal. Após 30 dias, o sobrenadante coletado foi esterilizado por filtração (poro de 0,22 µm) e liofilizado. As amostras foram então dissolvidas em um décimo do volume original com H₂O (MilliQ-water). Em seguida, foram preparadas alíquotas de 250 µl, além de duas alíquotas de MMcM estéreis com e sem ferro usadas como controle. Foi então adicionado o volume de 1,25 ml de Fe(ClO₄)₃ a 5 mM em cada alíquota, sendo todas posteriormente incubadas a temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. A mudança da coloração, originando uma pigmentação laranja escuro, caracteriza a produção de hidroxamatos.

4.6. Purificação e identificação dos sideróforos

Para isolar e caracterizar os sideróforos intracelulares e extracelulares produzidos por *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, as células foram cultivadas em meio MMcM sem ferro durante 10, 15 e 30 dias. Os sobrenadantes foram coletados e liofilizados após filtração (0,22µm). As amostras foram dissolvidas e concentradas em 10x com H₂O para análise subsequente. Já os extratos celulares foram colhidos por centrifugação e lavados cinco vezes com PBS 1X para

eliminar dos sideróforos secretados. As células foram maceradas com nitrogênio líquido até completa pulverização. O pó foi ressuspense em água (1 ml de água estéril / 4 ml de cultura) e a suspensão foi centrifugada. Os detritos celulares foram descartados, os sobrenadantes foram filtrados (0,22 μ m) e liofilizados. Para submissão à análise, as amostras também foram dissolvidas e concentradas a um décimo do volume original em água MilliQ (SILVA-BAILÃO *et al.*, 2014b).

A fim de converter sideróforos desferri (sideróforos na forma que adquire ferro) em ferri (sideróforos carregados de ferro), adicionou-se às amostras 250 μ l de FeSO_4 a 100 mM. Uma alíquota de 2,5 μ l foi aplicada a uma coluna Amberlite XAD-16 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA). Os complexos ferro-sideróforos foram eluídos com 2 ml de etanol, que por sua vez foi evaporado por centrifugação a vácuo. O sedimento seco foi solubilizado em 100 μ l de água, sendo que 10 μ l foram aplicados a HPLC (KONETSCHNY-RAPP *et al.*, 1988) utilizando uma coluna de fase reversa (Nucleosil C_{18} , 5 mm, 4 x 250 mm, Macherey-Nagel, Duren, Alemanha) para caracterização do tempo de retenção dos sideróforos. A cromatografia foi realizada com um gradiente de acetonitrila em dois passos partindo do solvente A (água) – solvente B (85% acetonitrila) com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) adicionado a ambos os solventes. A concentração de solvente B foi aumentada linearmente de 6% para 15% durante 10 min, de 15% para 60% durante 25 min e mantida a 60% durante 5 min. As frações obtidas deste modo foram recolhidas, liofilizadas e armazenadas a 220°C.

A determinação da massa molecular das amostras obtidas por RP-HPLC foi realizada utilizando um espectrômetro de massas LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific) equipado com uma fonte de eletropulverização (ESI-MS, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) (SILVA-BAILÃO *et al.*, 2014b). As amostras foram dissolvidas em metanol aquoso a 50% contendo ácido fórmico a 0,1%, e infundidas diretamente na fonte de íons utilizando a bomba de seringa. A tensão da eletropulverização foi ajustada para 4,0 kV e o capilar aquecido foi mantido a 270°C.

4.7. Ensaio de captação cruzada de sideróforos

Foi também investigado pelo presente estudo a utilização de sideróforos produzidos pelos fungos negros *F. pedrosoi* e *C. carrionii* a partir de uma linhagem mutante para biossíntese de sideróforos (Δ *sidA*) de *A. nidulans* (EISENDLE *et al.*, 2003), incapaz de crescer em meio deficiente de ferro. A cepa de *A. nidulans* Δ *sidA* foi cultivada para obtenção dos conídios a 37°C em meio mínimo de *Aspergillus* (AMM), conforme descrito

(PONTECORVO *et al.*, 1953), contendo 1% de glicose como fonte de carbono, 20 mM de glutamina como fonte de nitrogênio, 10 mM de FeSO₄, 20 mg l⁻¹ de biotina e 10 µM de triacetilfusarinina C (TAFC). Para realização do ensaio, as células de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foram cultivadas em placas contendo MMcM ágar contendo 50 µM de BPS. Após 15 dias, os esporos de linhagem de *Aspergillus nidulans* mutante *ΔsidA* foram inoculados, dispostos em três pontos distando 2 cm dos limites das colônias de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Esporos de *A. nidulans* *ΔsidA* também foram incubados em placas contendo MMcM ágar com 200 µM de BPS, na ausência de células de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, como controle. Os resultados foram observados após 10 dias.

4.8. Crescimento em diferentes fontes de ferro

Na intenção de investigar o crescimento fúngico em diferentes fontes de ferro, conídios de *F. pedrosoi* em solução 5 x 10⁷ e de *C. carrionii* em solução 5 x 10⁵, foram inoculados em meio MMcM sólido suplementado, com exceção da condição sem ferro (50 µM BPS), com os seguintes nutrientes: 30 µM de ferro orgânico, 30 µM de ferro inorgânico, 30 µM de hemoglobina, 10 µM de halo-transferrina, 10 µg/ml de ferritina e 10 µM de sideróforo ferrioxamina B (FOB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.9. Análise da captação de ferro durante infecção em macrófagos

Foram utilizados neste experimento, macrófagos da linhagem celular J774 A.1 (Banco de células BCRJ, Rio de Janeiro, número de acesso 0121), mantidos em meio RPMI (RPMI 1640, Vitrocell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C com 5% de CO₂. 4 x 10⁶/ml de macrófagos foram semeados em cada poço de placa de cultura de tecido. Para ativação dos macrófagos (YOUSEFF *et al.*, 2012), foi adicionado 10 U/ml de interferão-gama (IFN-γ) murino (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA) por 24h. Para a infecção, uma quantidade de 5:1 conídeo:macrófago, foi adicionada aos poços; sendo co-cultivados por 8 horas a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos infectados foram lavados com PBS 1X e suplementados com novo meio, enriquecido com duas fontes distintas de ferro, uma orgânica (citrato férrico) ou outra inorgânica (sulfato ferroso amoniacal), além de amostras suplementadas com BPS, permanecendo por mais 16 horas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Os macrófagos infectados foram novamente lavados com PBS 1X e, por fim, lisados com água destilada. Diluições dos lisados foram plaquadas em meio batata dextrose ágar. As unidades formadoras de colônia (CFU) foram contadas após 4 dias. As CFUs foram

expressas como o valor médio $\pm$ a partir de duplicatas, e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação e caracterização *in silico* de genes relacionados à captação e homeostase de ferro em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*

Inicialmente, o rastreamento teve como alvo os genes descritos na literatura como envolvidos na manutenção da homeostase de ferro em *A. fumigatus*. Em ambos os microrganismos, *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, foram encontradas sequências preditas como proteínas envolvidas nos mecanismos de captação e homeostase de ferro. Todas as sequências submetidas à análise e as homólogas encontradas em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* estão relacionadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Genes de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* potencialmente envolvidos na homeostase de ferro.

Proteínas <i>A. fumigatus</i>	Função predita	Sequências homólogas <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Identidade	e-value	Sequências homólogas <i>Cladophialophora carrionii</i>	Identidade	e-value
HapX	Fator transcricional	06288	44%	4e-87	01554	43%	e-105
SreA	Fator transcricional	01439	45%	1e-62	05818	41%	5e-75
FtrA	Permease	04451 00276	60% 60%	1e-155 7e-134	07299 03583	65% 60%	e-129 e-114
FetC	Ferroxidase	04450 00275	57% 52%	0.0 0.0	06747 03382	58% 52%	0.0 0.0
SidA	Biossíntese de sideróforos	02623	52%	4e-162	04832	53%	e-137
SidC	Biossíntese de sideróforos	02622	28%	0.0	04490	26%	0.0
SidD	Biossíntese de sideróforos	10058	63%	0.0	02213	63%	0.0
SidF	Biossíntese de sideróforos	10056	62%	0.0	02426	61%	e-170
SidG	Biossíntese de sideróforos	-	-	-	-	-	-
SidH	Biossíntese de sideróforos	10055	57%	2e-109	07463	48%	3e-70
SidI	Biossíntese de sideróforos	10054	59%	0.0	02353	57%	e-174
SidJ	Biossíntese de sideróforos	06207	37%	3e-54	01666	34%	6e-31
SidL	Biossíntese de sideróforos	09087	56%	0.0	04002	57%	e-175
Proteínas <i>S. cerevisiae</i>							
Ftr1	Permease	04451 00276	56% 50%	1e-127 7e-125	07299 03583	53% 51%	e-106 e-105
Fet3	Ferroxidase	04450 00275	49% 48%	0.0 0.0	03382 06747	50% 47%	e-175 e-161

Entre as sequências identificadas, estavam inclusos todos os genes, exceto *sidG*, que codificam proteínas possivelmente envolvidas na biossíntese de sideróforos (*sidA*, *sidC*, *sidD*, *sidF*, *sidH*, *sidI*, *sidJ* e *sidL*) (**Tabela 2**). Domínios conservados semelhantes em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foram preditos para todas as sequências de aminoácidos da biossíntese de sideróforos, porém, os domínios encontrados em SidC revelaram peculiaridade na organização modular (**Figura 9**). As sequências de SidA contém dois domínios preditos de oxidoredutases. O primeiro, K oxigenase, e o segundo domínio, pyr redox. As proteínas putativas sidC possui os seguintes domínios: domínios de ligação a AMP, domínios PKS PP que remetem à fosfopanteteína (ou fosfato de panteteína 4'); domínios de reação de condensação; e domínios AMP-ligante C, que possui um núcleo de folha beta central flanqueado por alfa hélice. SidD putativas compartilham de um domínio de ligação a AMP, seguido de dois grupamentos contendo um domínio ligante a PP, que está relacionado à fosfopanteteína, e um domínio de condensação. Os aminoácidos de SidF apresentam um único domínio AlcB, região conservada de 45 resíduos, assim como as proteínas putativas sidL. Proteínas SidH revelaram duas regiões conservadas de enoil-CoA hidratase (ECH), 1 e 2, respectivamente, da superfamília cronotase. Por fim, as sequências de SidJ demonstraram dois domínios preditos, DUF1749 e abidrolase 6, esta última referente a hidrolase de dobra alfa/beta.

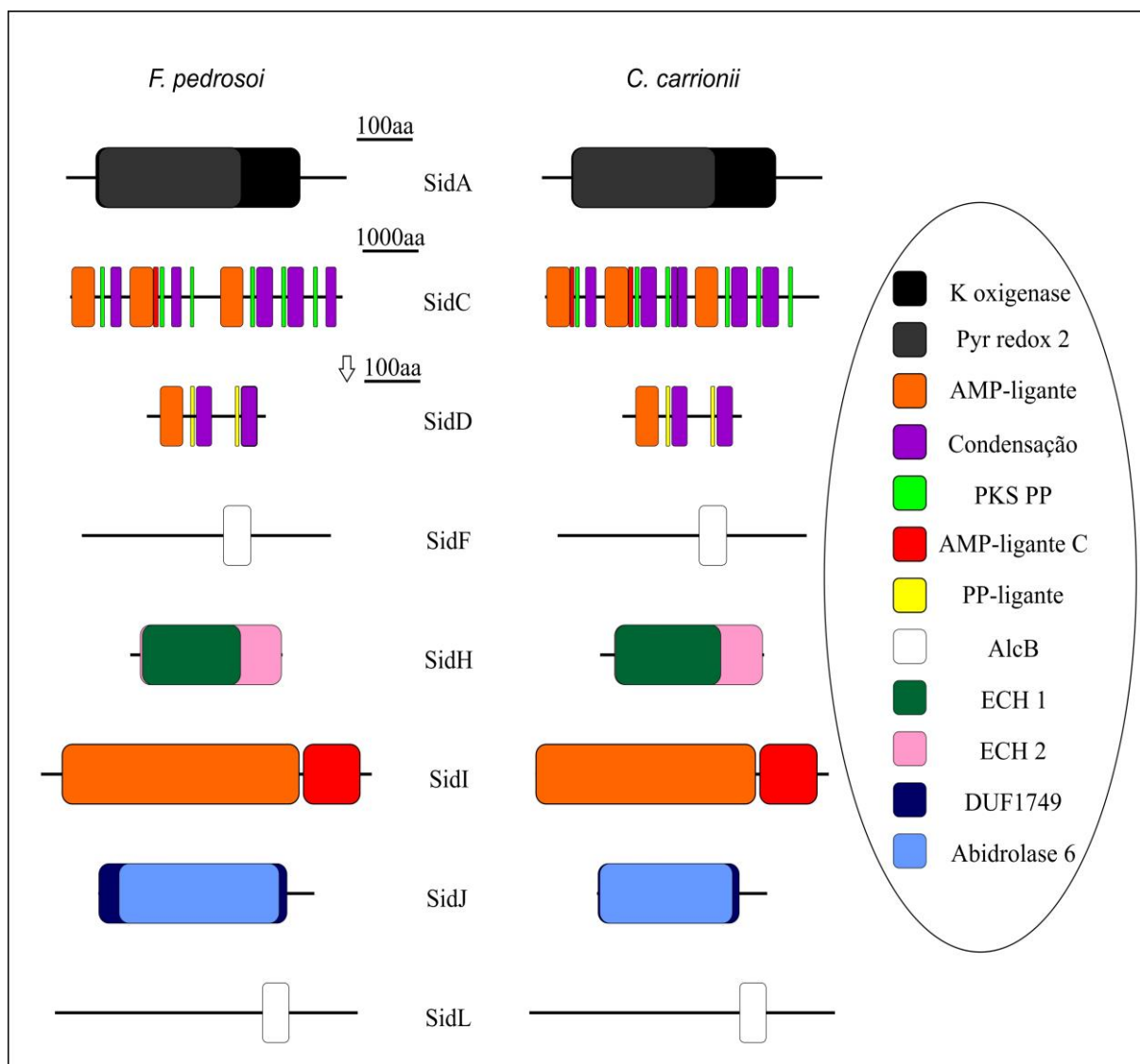


Figura 9. Domínios e organização modular de peptídeos sintetases não-ribossomais. Os domínios estão representados pelas seguintes cores: Preto = K oxigenase, cinza escuro = Pyr redox 2, laranja = AMP-ligante, roxo = condensação; Verde = PKS PP, vermelho = AMP-ligante C, amarelo = PP-ligante, branco = AlcB, verde escuro = ECH 1, rosa = ECH 2, azul escuro = DUF1749, azul claro = Abidrolase 6. O comprimento das proteínas, em aminoácidos, é medido pela escala indicada.

Ambos organismos também apresentaram resultados semelhantes na busca referente as proteínas permease e ferroxidase, sendo encontradas em cada um deles duas permeases (*ftrA1* e *ftrA2*) e duas ferroxidasas (*fetC1* e *fetC2*) (**Tabela 2**). Por este motivo, adicionalmente, proteínas envolvidas na assimilação redutiva de ferro descritas em *S. cerevisiae*, com sequências disponibilizadas no banco de dados *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>), também foram incluídas na busca por

sequências homólogas, sendo confirmado o resultado previamente atribuído à busca derivada de sequências de *A. fumigatus*, sugerindo que ambos os fungos poderiam utilizar dois sistemas de captação redutiva de ferro. As proteínas preditas como pertencentes ao complexo ferroxidase-permease também demonstraram domínios conservados típicos (**Figura 10**). Ambas as permeases (Ftr1 e Ftr2) de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* possuem o domínio Ftr1 segundo banco de famílias proteicas Pfam (FINN *et al.*, 2014), característico da função biológica de transporte transmembrânico de ferro. Além disso, cada permease de alta afinidade por ferro também apresentou sete domínios transmembrânicos (**Tabela 3**). No que diz respeito às ferroxidasas FetC1 e FetC2 preditas em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, foram observados um peptídeo sinal na região N-terminal, além de uma estrutura de três domínios com motivos de oxidase multicobre (tipo 1, tipo 2 e tipo 3, respectivamente) (**Figura 10**). Próximo a região C-terminal, as ferroxidasas também contam com um domínio transmembrânico (**Tabela 3**).

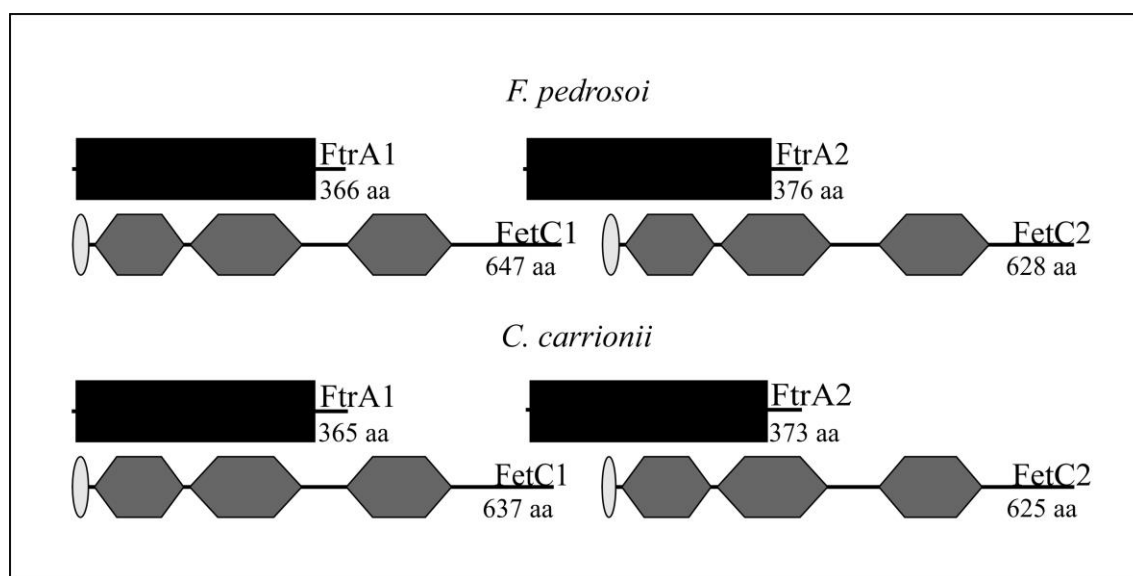


Figura 10. Domínios típicos revelados por permeases e oxidases. As proteínas de ambos os organismos apresentaram domínios semelhantes. As sequências de aminoácidos das permeases (FtrA1 e FtrA2) apresentaram um domínio da família Ftr1 representado por retângulos pretos. As oxidases (FetC1 e FetC2) exibiram um peptídeo de sinal mostrado em elipses cinza-claras e três domínios de oxidase de cobre ilustrados por hexágonos cinza-escuros. As oxidases multicobre incluem ferroxidasas. O tamanho de cada proteína, em aminoácidos, está indicado à direita do desenho.

Tabela 3. Domínios transmembrânicos identificados em ferroxidases, permeases e transportadores de sideróforos putativos.

Proteína <i>F. pedrosoi</i>	Número de acesso	Função predita	Domínios transmembrânicos
FtrA1	XP_013285234	Permease de ferro de alta afinidade	7
FtrA2	XP_013288696	Permease de ferro de alta afinidade	7
FetC1	XP_013285233	Ferro-O ₂ -oxidoreductase	1
FetC2	XP_013288695	Ferro-O ₂ -oxidoreductase	1
10052	XP_013281414	Transportador de sideróforo	14
11666	XP_013278704	Transportador de sideróforo	14
04664	XP_013285446	Transportador de sideróforo	12
02389	XP_013286953	Transportador de sideróforo	14
07865	XP_013281840	Transportador de sideróforo	14
09577	XP_013280939	Transportador de sideróforo	14
06750	XP_013283943	Transportador de sideróforo	14
05760	XP_013286540	Transportador de sideróforo	13
Proteína <i>C. carrionii</i>			
FtrA1	-	Permease de ferro de alta afinidade	7
FtrA2	-	Permease de ferro de alta afinidade	7
FetC1	-	Ferro-O ₂ -oxidoreductase	1
FetC2	-	Ferro-O ₂ -oxidoreductase	1
03365	-	Transportador de sideróforo	14
02321	-	Transportador de sideróforo	14
06890	-	Transportador de sideróforo	12
03414	-	Transportador de sideróforo	12
01135	-	Transportador de sideróforo	14
04614	-	Transportador de sideróforo	11

Foi realizada também uma busca por homólogos de transportadores de sideróforos de *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*. Em *F. pedrosoi* foram apontadas oito sequências de potenciais transportadores, enquanto em *C. carrionii*, seis sequências foram consideradas potenciais codificadoras de transportadores de sideróforos (**Tabela 4**). Apenas a sequência proteica 05760 de *F. pedrosoi* não apresentou domínio MFS (Superfamília dos facilitadores majoritários) (**Figura 11**). Ainda se tratando dos transportadores putativos de *F. pedrosoi*, as sequências 10052, 04664, 02389 e 06750 também apresentaram domínio de efluxo do tricoteceno (TRI12). Em *C. carrionii*, apenas a sequência 03365 não compartilhou da região conservada TRI12. Os transportadores putativos 02389 de *F. pedrosoi* e 06890 de *C. carrionii* ainda apresentaram domínio MFS adicional, somando assim dois domínios semelhantes. Em *F. pedrosoi*, a grande maioria das sequências revelaram 14 domínios transmembrânicos (**Tabela 3**), com exceção das putativas 04664 e 05760, que revelaram 12 e 13 domínios transmembrânicos conservados, respectivamente. Já em *C. carrionii* as proteínas putativas 03365, 02321 e 01135 compartilham 14 regiões transmembrânicas, enquanto 06890 e 03414 possuem 12 semelhantes regiões e 04614 que, por sua vez, apresenta 11 domínios transmembrânicos (**Tabela 3**).

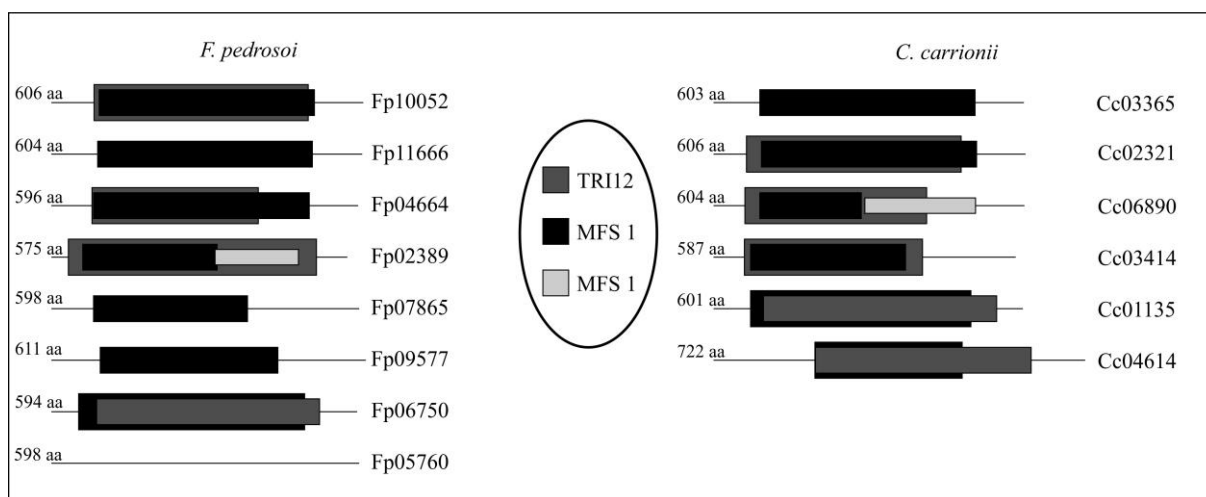


Figura 11. Ilustração de domínios encontrados em possíveis transportadores de sideróforos. Sequências de aminoácidos referentes às proteínas preditas como envolvidas no transporte de sideróforos. As proteínas apresentaram os seguintes domínios: superfamília dos facilitadores majoritários (MFS1), representados por retângulos pretos e cinza claros, e TRI12 (retângulos cinzas escuros). O tamanho das proteínas, em quantidade de aminoácidos, está descrito à esquerda da sequência.

Tabela 4. Prováveis transportadores de sideróforos encontrados em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* através de busca por homologia.

Transportadores de sideróforos em <i>A. fumigatus</i>	Sequências homólogas em <i>F. pedrosoi</i>	Identidade	e-value	Sequências homólogas em <i>C. carrionii</i>	Identidade	e-value
MirB	11666	55%	0.0	03365	52%	e-177
	10052	46%	0.0	02321	47%	e-155
	04664	42%	4e-150	06890	41%	e-128
	02389	38%	1e-122	03414	41%	e-117
	07865	37%	3e-121	01135	30%	4e-67
	09577	34%	2e-110	04614	27%	7e-51
MirC	10052	35%	2e-106	06890	34%	4e-91
	04664	35%	6e-106	02321	35%	5e-91
	06750	35%	2e-104	01135	32%	2e-89
	11666	36%	1e-95	03365	33%	1e-88
	07865	32%	1e-90	03414	33%	2e-76
	09577	31%	3e-88	04614	28%	1e-66
MirD	02389	33%	5e-83			
	10052	62%	0.0	02321	61%	0.0
	11666	55%	0.0	03365	54%	e-177
	04664	43%	5e-164	06890	46%	e-131
	07865	39%	9e-130	03414	41%	e-117
	09577	37%	5e-129	01135	29%	1e-62
Transportadores de sideróforos em <i>S. cerevisiae</i>	02389	38%	3e-125	04614	25%	3e-50
	Arn1					
	06750	41%	1e-152	01135	41%	e-125
	05760	38%	5e-152	03365	26%	3e-51
				06890	25%	6e-50
				02321	25%	2e-48
Taf1				04614	27%	1e-47
				03414	25%	1e-41
	06750	38%	1e-134	01135	40%	e-114
	05760	37%	2e-109	06890	27%	1e-54
				02321	26%	4e-48
				04614	24%	1e-47
Sit1				03365	24%	1e-44
	06750	47%	3e-168	03414	28%	6e-44
	05760	40%	3e-135	01135	48%	e-142
				03414	27%	3e-52
				03365	28%	7e-49
				06890	25%	2e-48
Enb1				02321	24%	3e-48
	06750	34%	8e-102	04614	25%	5e-44
	05760	32%	9e-81	01135	33%	1e-89
				02321	27%	3e-53
				03365	26%	2e-50
				06890	24%	2e-49
				04614	24%	4e-49
				03414	24%	4e-41

Foram também encontradas sequências homólogas correspondentes aos prováveis fatores transcricionais *hapX* e *sreA* (Tabela 2). As sequências proteicas dos fatores de transcrição HapX de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, contendo 509 e 495 resíduos de aminoácidos de comprimento, respectivamente, apresentaram os seguintes domínios (Figura 12): Mínimo

motivo de ligação dos fatores de transcrição da família Hap e um domínio bZIP (região básica zíper leucina). Os fatores transcricionais SreA, por sua vez, revelaram conter dois característicos domínios dedos de zinco tipo-GATA em tandem, separados por 114 e 115 aminoácidos em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, respectivamente. Foi identificado também na região C-terminal dos fatores transcricionais SreA, um domínio predito super-hélice (do inglês, *coiled-coil*).

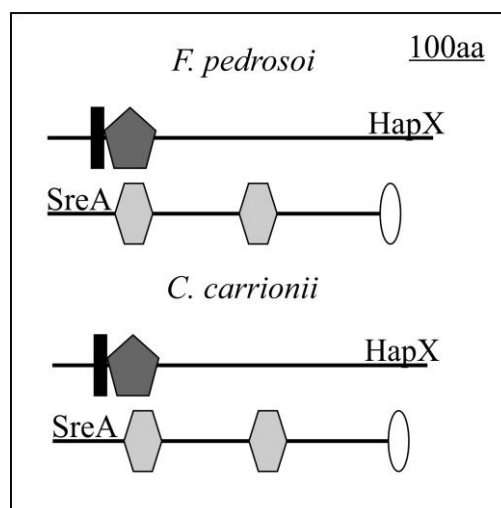


Figura 12. Domínios conservados encontrados nos fatores de transcrição HapX e SreA. Sequências foram submetidas a alinhamentos em análises bioinformáticas para predizer domínios característicos de respectivos ortólogos. Em ambos os microrganismos HapX apresentou dois domínios funcionais, enquanto SreA revelou três domínios conservados. Números de acessos em *F. pedrosoi*: HapX (XP_013283482), SreA (XP_013289853).

Em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, a análise de organização genômica revelou que há formação de clusters abrangendo grande parte dos genes envolvidos na homeostase de ferro (**Figura 13**). Em ambos, dois clusters reúnem os genes envolvidos na assimilação redutiva de ferro, cada cluster contendo uma permease e uma ferroxidase, reforçando a hipótese de que os dois organismos possuem dois sistemas permease-oxidase. Além destes, a maioria dos genes biossintéticos de sideróforos também se apresentam organizados em outros dois clusters acrescidos de um possível transportador de sideróforo. Os genes ortólogos *sidA* e *sidC* constituem um dos clusters em ambos fungos. Já em relação aos genes constituintes do segundo cluster, *F. pedrosoi* apresenta um transcrito a mais que *C. carrionii*. Os genes ortólogos *Fp10052*, provável transportador de sideróforo, *sidI*, *sidH*, *sidF* e *sidD* integra este cluster em *F. pedrosoi*. Entretanto, em *C. carrionii*, este cluster não conta com o gene

ortólogo *sidH*, sendo composto apenas por *sidD*, *sidF*, *sidI* e 02321, sendo o último, um provável codificador de transportador de sideróforo.

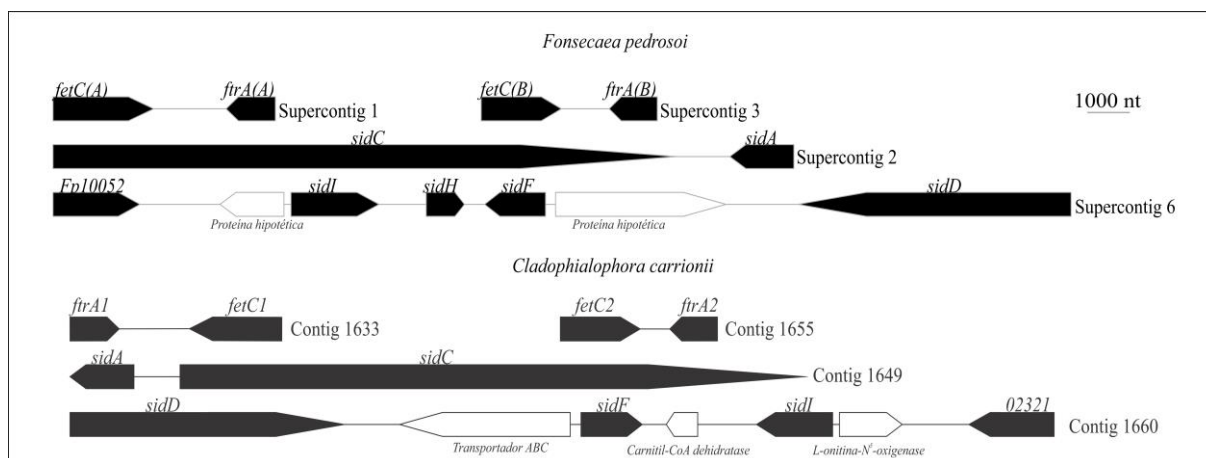


Figura 13. Análise de organização genômica revela clusterização dos genes envolvidos na homeostase do ferro. Ilustração esquemática da localização dos genes envolvidos na biossíntese de sideróforos e captação redutiva de ferro nos genomas de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Os genes são representados na ordem de sua localização cromossômica. A distância entre genes e seu tamanho é medida pela escala indicada. Ambos os genomas apresentam resultados similares. O respectivo supercontig, em *F. pedrosoi*, e contig, em *C. carrionii*, são indicados à direita do cluster gênico.

A região consenso CCAAT (HORTSCHANSKY *et al.*, 2015), consistindo de uma estrutura de núcleo heterotrimérico altamente conservada em eucariotos que constitui um importante regulador transcricional geral, foi identificada por busca homóloga simples na região promotora do gene ortólogo do fator transcricional *hapX* em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Esta busca foi posteriormente estendida à região promotora de todos os genes preditos como envolvidos na homeostase de ferro (**Figura 14**). Análise semelhante foi então realizada para determinar se poderia ser estabelecida uma correlação entre a presença de sítios de ligação ao fator de transcrição SreA. Vários motivos HGATAR (H = A, C ou G; R = A ou G), que representam prováveis locais de ligação para fatores de transcrição do tipo GATA, foram observados em muitas das sequências promotoras analisadas, tais como *sreA* e *hapX* (**Figura 14**).

5.2. Expressão de genes envolvidos nos mecanismos de captação de ferro e sua regulação

O perfil de expressão dos genes *sidA*, *sidI*, *ftrA1*, *ftrA2*, *hapX* e *sreA* de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foi avaliado por análise quantitativa de PCR em tempo real a fim de caracterizar a influência da disponibilidade de ferro sobre o perfil transcricional dos mesmos. O gene *sidA* (L-ornitina-N⁵-monooxigenase) catalisa o primeiro passo comprometido da biossíntese do sideróforo de tipo hidroxamato (SCHRETTL *et al.*, 2004) e o gene *sidI* é necessário para a biossíntese de sideróforo extracelular (YASMIN *et al.*, 2012). Em *F. pedrosoi* (**Figura 15**), a expressão de *sidA* foi aumentada em aproximadamente 2,2 vezes sob condições de deficiência de ferro em relação à expressão em condições de abundância de ferro. A superexpressão de *sidI* também foi evidente quando comparado as duas condições de cultivo, sendo quase 35 vezes mais expresso em condições de privação de ferro. Em *C. carrionii* (**Figura 16**), a expressão de *sidA* foi quase 16 vezes menos expresso sob condições abundantes de ferro em comparação com a expressão *sidA* na ausência de ferro livre. Já *sidI* exibiu uma taxa de expressão de aproximadamente 77 vezes com a baixa disponibilidade do metal.

Células de *F. pedrosoi* cultivadas em meio restrito de ferro demonstraram uma taxa de indução da permease putativa *ftrA1*, com maior identidade na busca prévia por homólogos (60% e 56% de homologia a proteínas de *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, respectivamente), cerca de 17x maior, comparada ao controle. Já a expressão gênica da permease putativa *ftrA2*, que apresentou menor identidade aos homólogos, foi aproximadamente 11x (**Figura 15**). Por outro lado, em *C. carrionii*, a diferença de expressão entre *ftrA1* e *ftrA2* nas condições de deficiência de ferro comparadas às condições de repleção de ferro, foi consideravelmente maior. A expressão do gene putativo *ftrA1* foi aproximadamente 49 vezes maior em condições de carência de ferro, enquanto a expressão de *ftrA2* foi pouco mais que 2 vezes maior na mesma condição, comparadas a expressão em meio repleto de ferro (**Figura 16**). Estes resultados não apenas reforçam a hipótese da existência de dois sistemas independentes de captação redutiva de ferro, em ambos os fungos, como também sugerem que o primeiro sistema redutivo, de maior homologia, possui uma afinidade maior por ferro do que o segundo sistema.

Consistente com os papéis opostos sugeridos para *hapX* e *sreA* como fatores transcricionais regulados de forma recíproca frente a disponibilidade de Fe, a expressão de *hapX* é reduzida sob condições de repleção de ferro. Consequentemente, *hapX* é superexpresso durante as condições de privação de ferro, tanto em *F. pedrosoi* (quase cinco

vezes mais expresso) (**Figura 15**), quanto em *C. carrionii* (aproximadamente quatro vezes mais expresso) (**Figura 16**). Em contrapartida, altos níveis de transcrição de *sreA* foram registrados sob condições suficientes de ferro nos dois microrganismos de estudo. As taxas de expressão foram cinco e cinquenta vezes maiores em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, respectivamente.

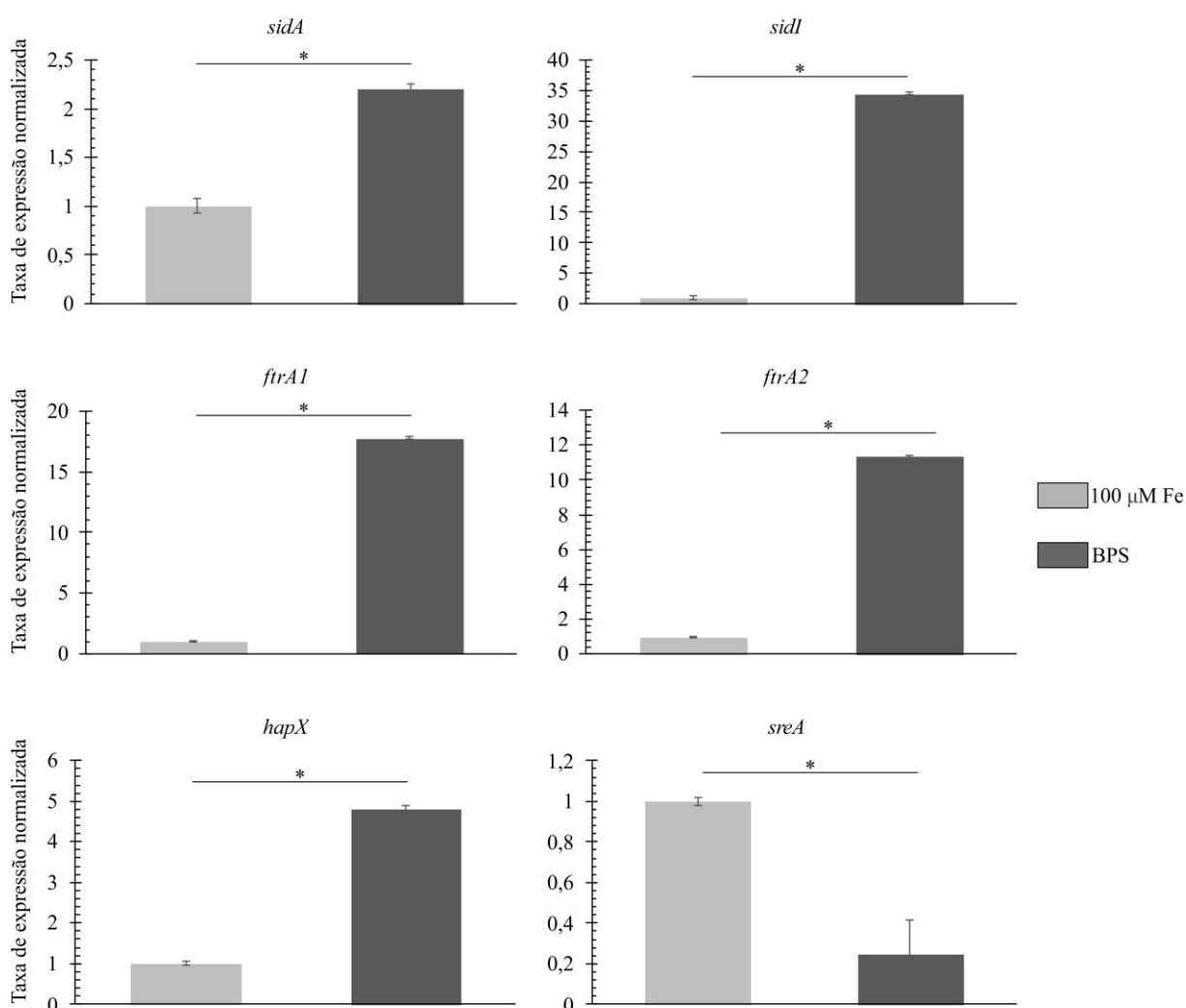


Figura 15. Análise de expressão de genes de *F. pedrosoi* relacionados com a homeostase de ferro. A análise da expressão gênica foi realizada a partir dos transcritos de células de *F. pedrosoi* inoculadas em condições de deficiência de ferro (BPS 50 μM) e suficiência do metal (sulfato ferroso amoniacal 100 μM). As colunas de cor cinza clara indicam a expressão do gene durante a suficiência de ferro, enquanto aquelas de cinza escuro representam a expressão do gene na privação de ferro. Os valores de expressão foram calculados utilizando o gene constitutivamente expresso, β-tubulina, como controle endógeno. $p < 0.05$ (*) foram consideradas diferenças estatisticamente significativas.

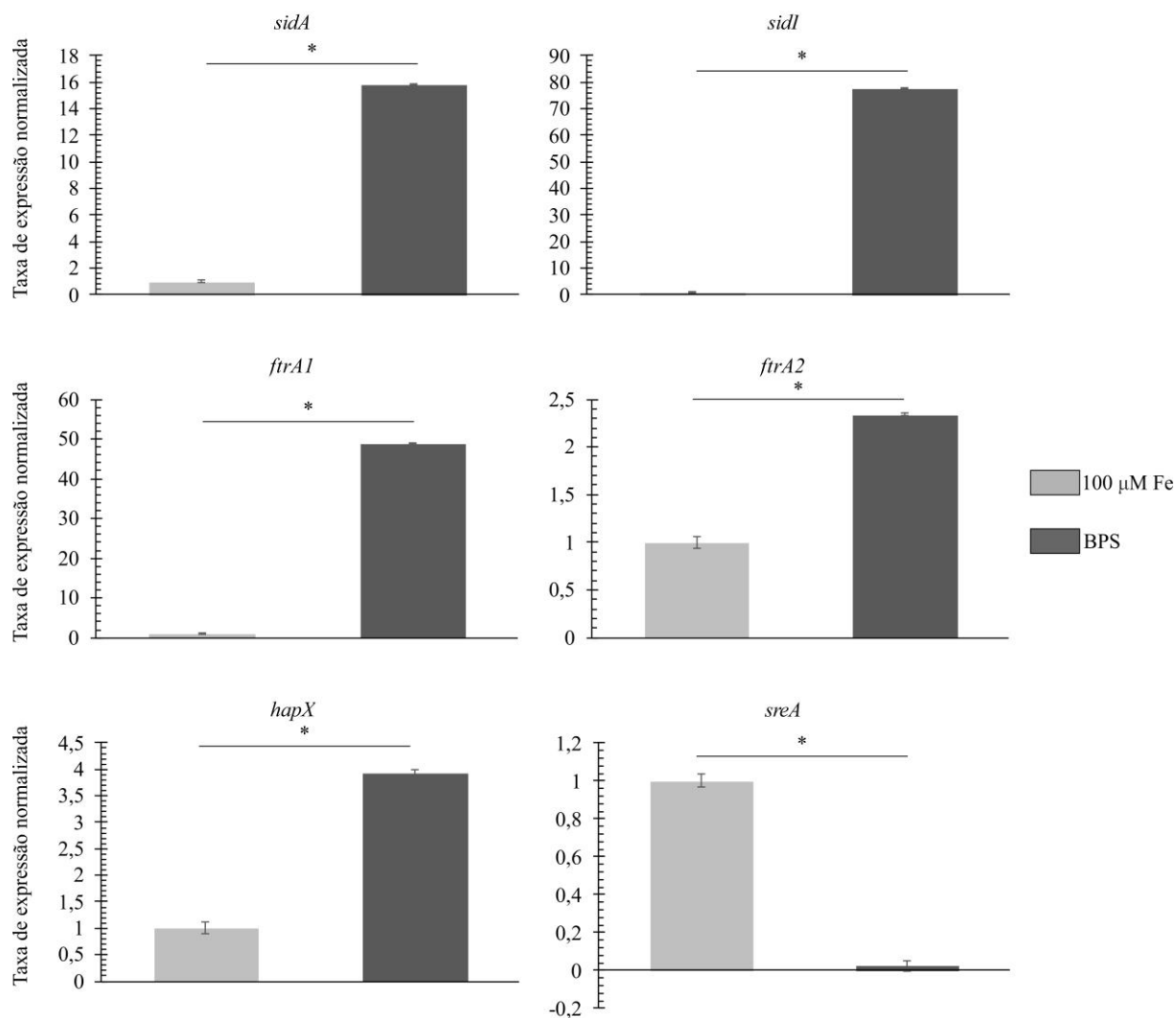


Figura 16. Perfil de expressão de genes envolvidos na homeostase de ferro em *C. carrionii*. As células de *C. carrionii* foram cultivadas sob condições de privação de ferro (BPS 50 μM) e repleção de ferro (sulfato ferroso amoniacal 100 μM) durante 24 horas, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis dos transcritos de interesse foram analisados por qRT-PCR e normalizados usando os transcritos do gene actina, como controle endógeno. Os resultados são apresentados, considerando diferenças estatisticamente significativas quando comparadas por teste t (* $p < 0.05$).

5.3. *F. pedrosoi* e *C. carrionii* produzem sideróforo do tipo hidroxamato como estratégia de captação de ferro

Com o intuito de evidenciar a produção de sideróforos do tipo hidroxamato por parte dos fungos patogênicos negros, *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, ambos foram cultivados em meio de cultura deficiente em ferro durante 10 e 15 dias, e, posteriormente, sobreposto pelo complexo CAS (PÉREZ-MIRANDA *et al.*, 2007). Este ensaio colorimétrico utiliza um

complexo surfactante Fe(III)-cromo azurol S (CAS: um corante orgânico) que muda de cor quando o complexo é lesado por reações de troca com sideróforos. No pH circum-neutral, o complexo Fe(III)-CAS é azul escuro (absorção máxima ~ 635 nm); Após a remoção do ferro, a cor muda para amarelo (absorção máxima ~ 350 nm), podendo, em alguns casos, aproximar-se de um tom alaranjado. Após 10 dias, a produção de sideróforos foi positiva em ambos os microrganismos, com a formação de um halo amarelo após 24 horas de incubação com CAS (**Figura 17**). Este halo formado foi aparentemente pequeno e discreto em *F. pedrosoi*, mas apresentou um diâmetro significativo em *C. carrionii*. A produção de sideróforos foi ainda mais nítida após 15 dias, como esperado, alterando a cor original do meio em toda a circunferência da placa, evidenciando uma alta produção de sideróforos (**Figura 17**). As placas controle em ambos os tempos preservaram a coloração inicial azulada, demonstrando que em quantidades suficientes de ferro, a produção de sideróforos é inibida.

Adicionalmente, foi realizado o ensaio de perclorato férrico para confirmar a produção de sideróforos do tipo hidroxamato pelos patógenos *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Após adição do perclorato férrico nos sobrenadantes de cultura, uma mudança na cor original foi observada (**Figura 18**). Em *F. pedrosoi*, a elevada concentração de melanina conferiu uma tonalidade escura tanto ao sobrenadante contendo ferro, quando ao ausente do metal. No entanto, ainda assim, é possível notar uma diferença clara entre ambas, caracterizada pela cor marro-alaranjada no meio deficiente em ferro constatando a existência de sideróforos do tipo hidroxamato. Por outro lado, em *C. carrionii*, a concentração de melanina foi menor, possibilitando melhor visualização. Sendo assim, após adição do perclorato férrico, o sobrenadante de *C. carrionii* cultivado na presença de ferro não apresentou modificação na pigmentação inicial, já o sobrenadante da cultura inoculada na ausência de ferro revelou uma tonalidade alaranjada, compatível com sideróforo hidroxamato.

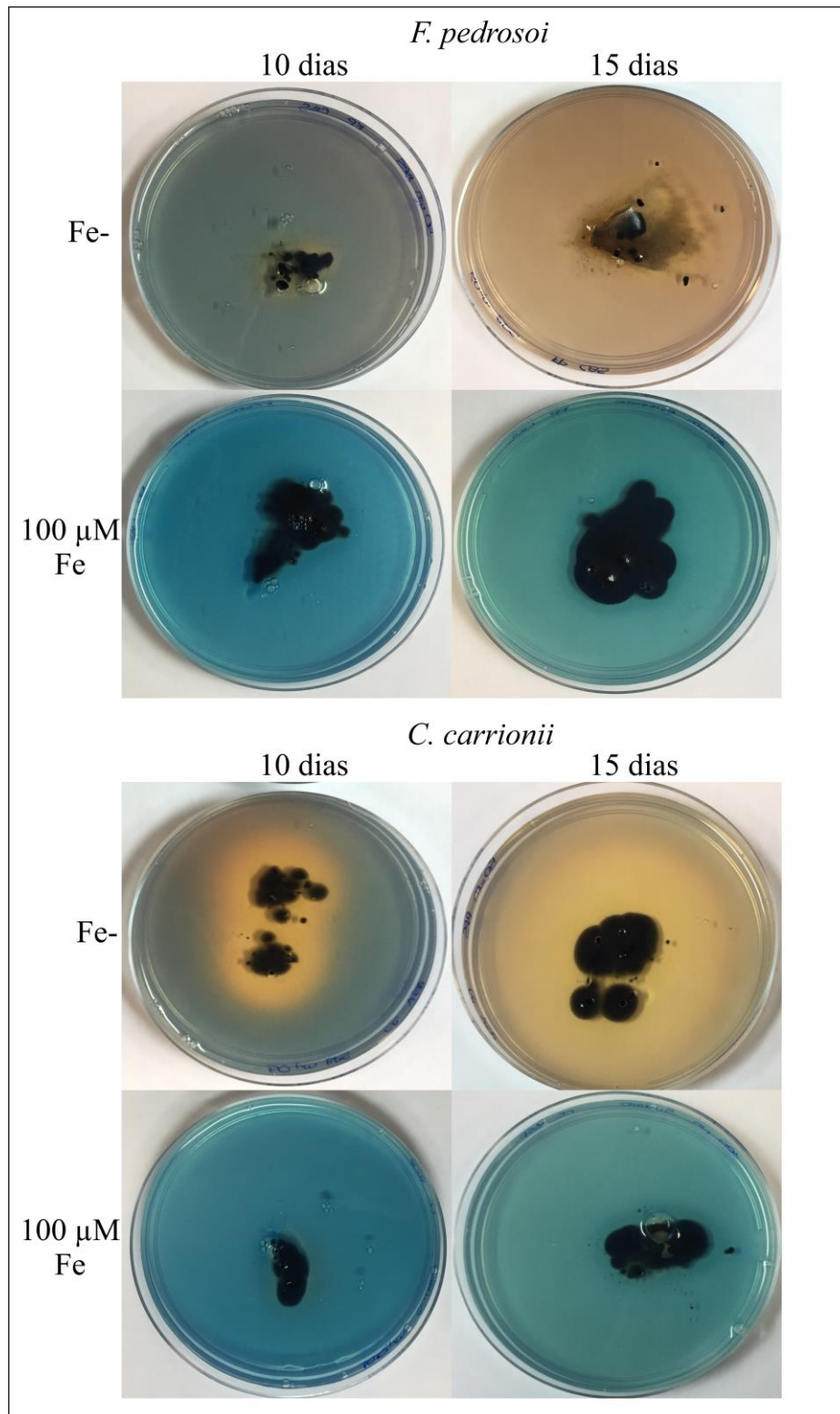


Figura 17. Produção de sideróforos sob condições de privação de ferro. Ensaio de cromo azurol S (O-CAS) demonstra a produção de sideróforos durante a carência de ferro em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, cultivados em placas contendo MMcM agar durante 10 e 15 dias. Sob condições abundantes de ferro (100 μ M de Fe), utilizadas como controle, a produção é reprimida.

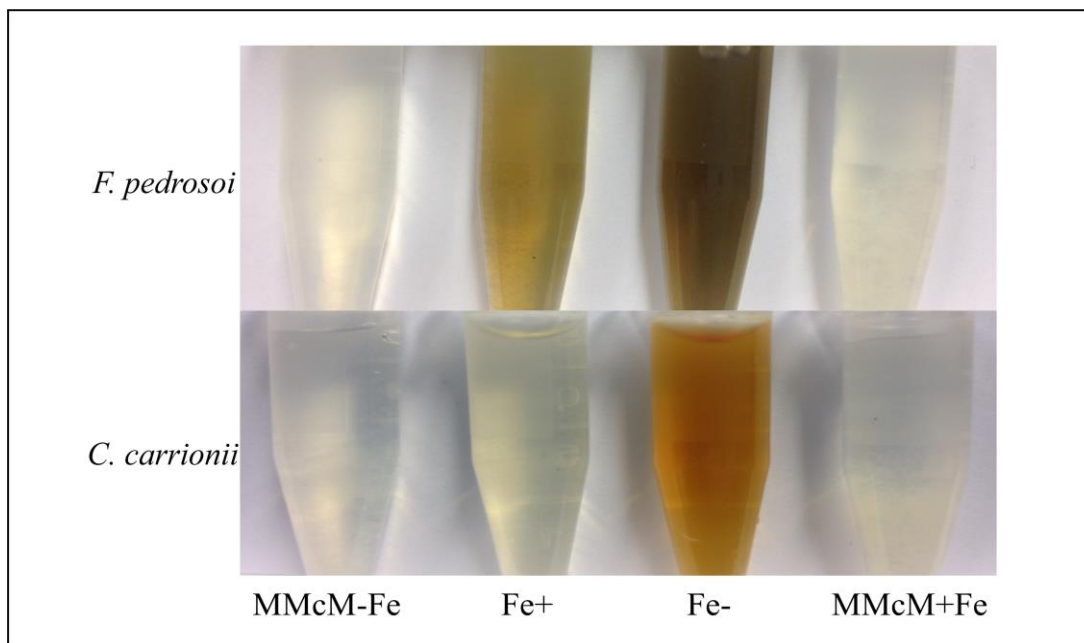


Figura 18. Sideróforos do tipo hidroxamato secretados durante a deficiência de ferro. Na análise de perclorato férrico foram testados os sobrenadantes cultivados na ausência (Fe-) e presença de ferro (Fe+) (100 μ M de sulfato ferroso de amoniacal). Utilizou-se também MMcM (Meio McVeigh/Morton) estéril com e sem ferro como referência positiva (MMcM+Fe) e negativa (MMcM-Fe).

5.4. Produção de ferricrocina como sideróforo extra e intracelular em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*

Com o propósito de identificar os sideróforos previamente caracterizados pelos ensaios de perclorato férrico e O-CAS, células de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foram inoculadas sob condições de privação de ferro durante 30 dias. Extratos extra e intracelulares, estes últimos obtidos após maceração de hifas, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massas (MS). A análise cromatográfica de fase reversa mostrou que, em todas as amostras, os compostos que exibiam absorção a 430 nm apresentaram um pico cromatográfico com tempo de retenção próximos e compatíveis com tempo de retenção do padrão de ferricrocina. Os sobrenadantes extracelulares indicaram altas concentrações do sideróforo identificado, enquanto aqueles extraídos dos extratos celulares apresentaram baixas quantidades (**Figura 19**). A espectrometria de massas de alta resolução dos picos revelados por RP-HPLC confirmou a presença de ferricrocina intra e extracelulares em ambos os dematiáceos (**Figura 20**).

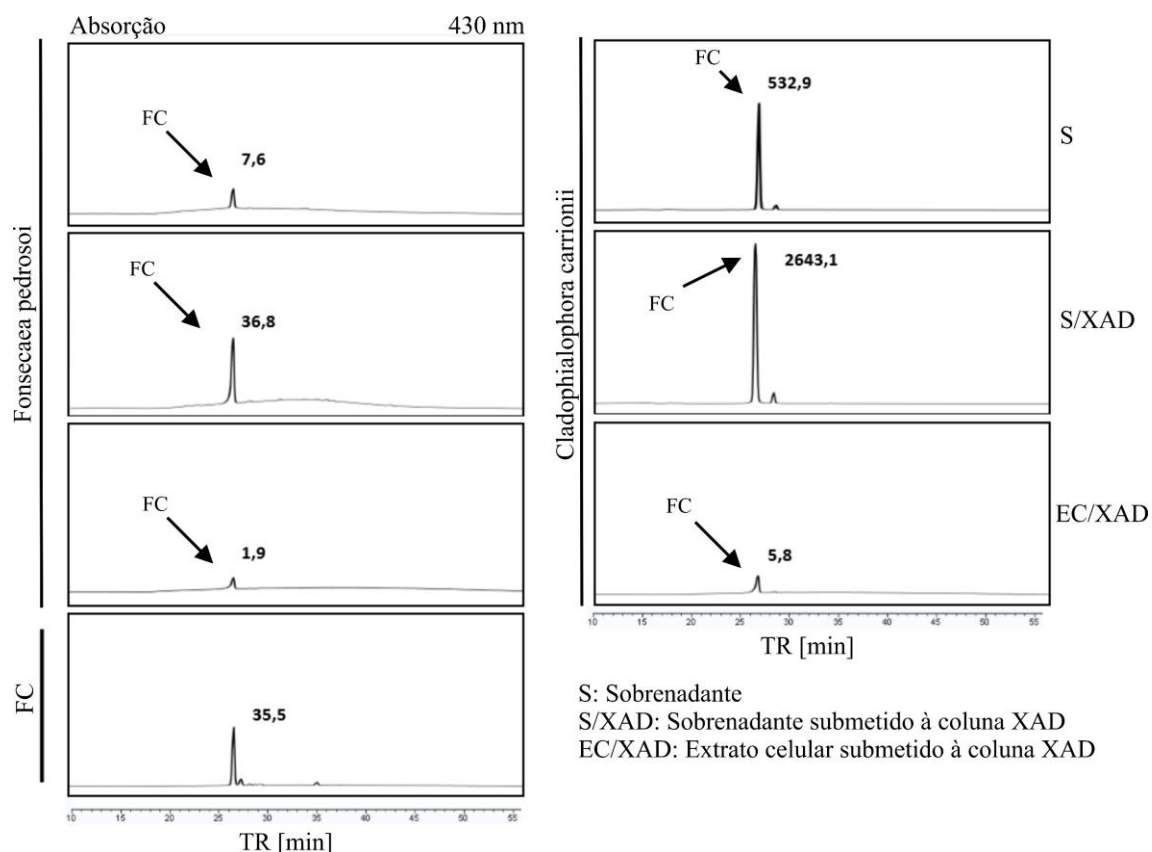


Figura 19: Análises por RP-HPLC da produção de sideróforos sob condições de privação de ferro em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) do acúmulo de sideróforos extra e intracelulares em condições de deficiência de ferro. Células de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foram crescidas por 30 dias em MMcM líquido sem ferro a 28°C. Os resultados se referem aos sobrenadantes brutos, além de sobrenadantes e extrato células submetidos à purificação de sideróforos por meio da coluna XAD. A absorção a 430 nm é medida em unidades de miliabsorção (mAU) e indicada pelos números citados nos gráficos e o tempo de retenção (TR) é dado em minutos.

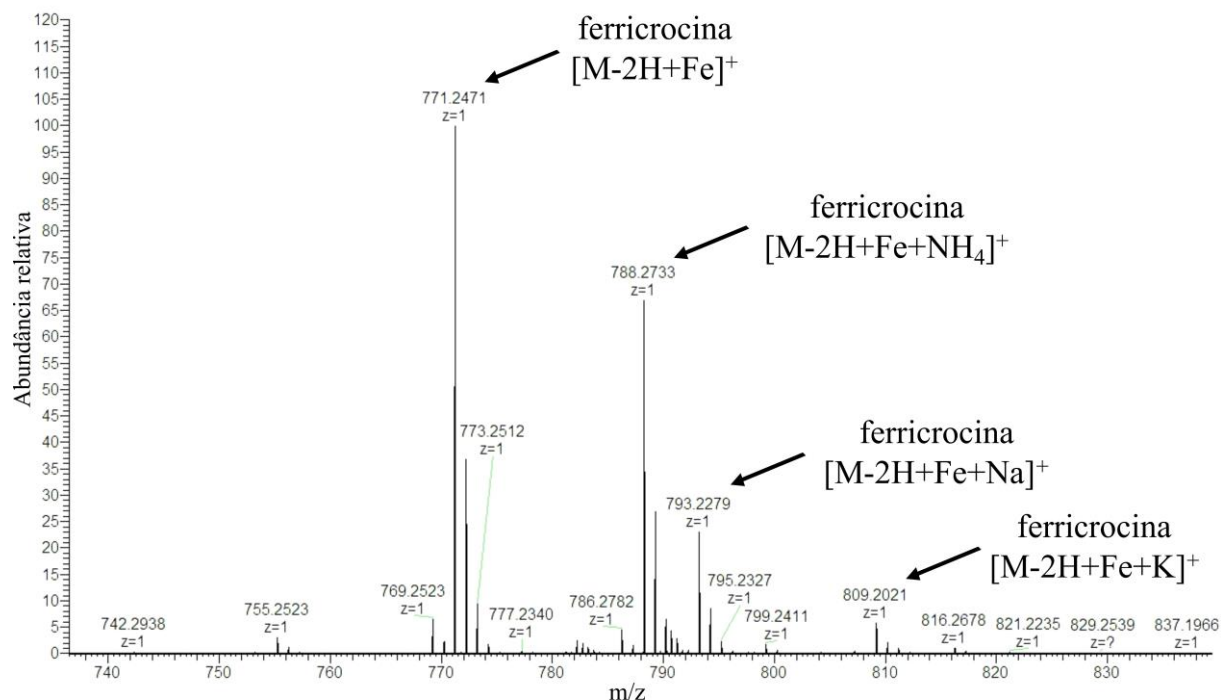


Figure 20. Análise de ferricrocina por espectrometria de massa (MS). Espectro de massa representativo para ferricrocina. O sinal a 771.2 corresponde à massa iônica [M-2H+Fe] de ferricrocina. O sinal m/z = 788.2 foi atribuído a [M-2H+Fe+NH₄]⁺, m/z = 793.2 foi conferido a [M-2H+Fe+Na]⁺ e m/z = 809.2 foi imputado a [M-2H+Fe+K]⁺.

5.5. Sideróforos produzidos por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são capazes de restaurar o crescimento da linhagem Δ *sidA* de *A. nidulans*

Para constatar se sideróforos produzidos *F. pedrosoi* e *C. carrionii* poderiam ser utilizados como fontes de ferro por outras espécies fúngicas, foi testado a habilidade de restauração do crescimento do mutante Δ *sidA* de *A. nidulans* culturas de ambos fungos negros cultivados na ausência do metal. Esta linhagem é incapaz de produzir estas moléculas uma vez que a deleção de *sidA* compromete toda a rota de biossíntese de sideróforos. Desta maneira, tal linhagem é incapaz de crescer na ausência de uma fonte de ferro. Esporos do mutante Δ *sidA* de *A. nidulans* foram inoculados em placas de cultura de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* após 7 dias de crescimento (MMcM + 200 μ M de BPS). Após 10 dias, foi observado o crescimento de hifas de *Aspergillus* em direção a colônia de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* e o crescimento radial foi mantido durante as 24 h seguintes (**Figura 21**). Na ausência de ambos os patógenos, não se observou crescimento da linhagem mutante. Isto sugere que os sideróforos secretados por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* promoveram o crescimento do mutante Δ *sidA*.

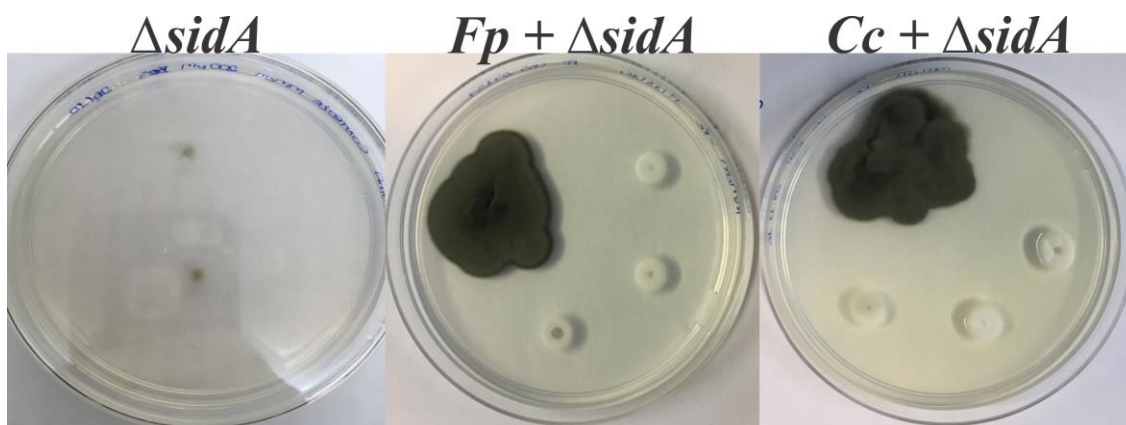


Figura 21. Sideróforos produzidos por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* restauram o crescimento da linhagem $\Delta sidA$ de *A. nidulans*. Hifas de *A. nidulans* foram capazes de crescer na ausência de ferro, porém co-cultivadas na presença dos fungos patogênicos *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Esse crescimento não foi observado na ausência do cultivo anterior destes patógenos.

5.6. Crescimento de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* em diferentes fontes de ferro

Uma grande proporção de ferro circulante em humanos existe como heme em hemoglobina e hemina, enquanto o ferro intracelular está ligado à ferritina (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). Além disso, cerca de 3 mg de ferro (aproximadamente 0,1% do ferro total do corpo) estão ligados à transferrina, sendo esta ser a molécula de transporte de ferro mais importante (EVANS; FRAZER; MARTIN, 1999). Sideróforos também são capazes de capturar ferro a partir das proteínas do hospedeiro (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). Com a finalidade de investigar a capacidade de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* utilizarem estas diferentes fontes de ferro encontradas no hospedeiro, ambos os fungos foram inoculados em meio suplementado com: ferro orgânico, ferro inorgânico, ferrioxamina B (FOB), hemoglobina, ferritina e holo-transferrina, bem como em meio suplementado com BPS. Sutis diferenças foram observadas no perfil de crescimento fúngico, porém ambos, *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, foram capazes de crescer na presença de todas as fontes de ferro oferecidas (**Figura 22**). Em *F. pedrosoi*, observou uma sutil preferência por fontes de ferro inorgânica, orgânica e transferrina e ferritina. Em contrapartida, *C. carrionii* revelou pequenas inversões na ordem de maior crescimento das fontes preferenciais para aquisição de ferro. Ferro orgânico, seguido por ferro inorgânico, ferritina e hemoglobina foram os suplementos de ferro que proporcionaram maior crescimento celular por parte de *C. carrionii*. Os dois microrganismos mostraram crescimento retardado em meio suplementado com quelante de ferro, BPS.

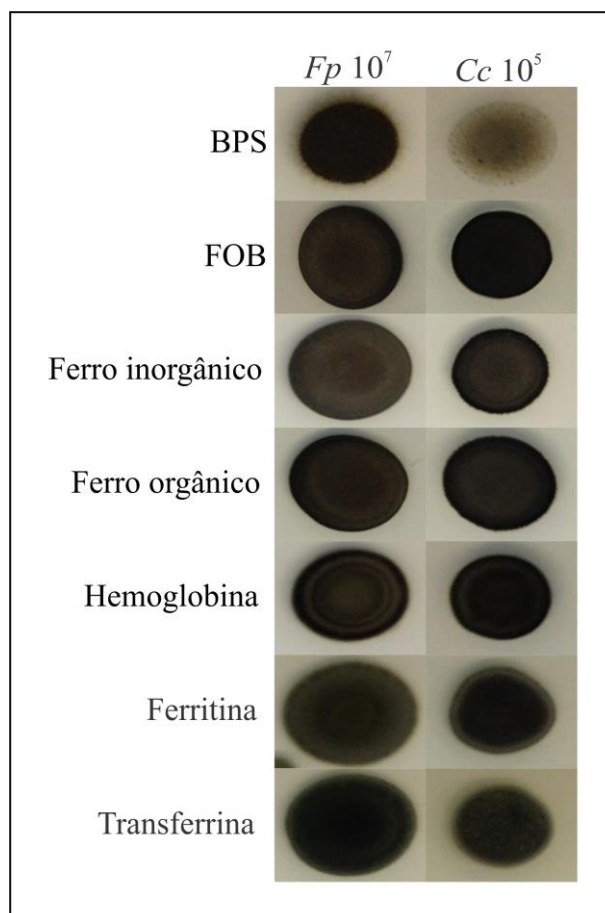


Figura 22. Utilização de diferentes fontes únicas de ferro no crescimento de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. 10⁷ de conídios de *F. pedrosoi* e 10⁵ de conídios de *C. carrionii* inoculados em placas MMcM contendo a fonte de ferro indicada ou não (sem condição de ferro) e incubados por 20 dias a 22°C. Placas de controle sem ferro foram suplementadas com 50 µM de BPS, um quelante de ferro. As diferentes fontes de ferro utilizadas foram: 10 µM de FOB, 30 µM de ferro inorgânico (sulfato ferroso amoniacal), 30 µM de ferro orgânico (citrato férrico), 30 µM de hemoglobina, 10 µg/µl de ferritina e 10 µM de holo-transferrina.

5.7. Sobrevivência de propágulos de *F. pedrosoi* e *C. carrioni* em macrófagos expostos a diferentes concentrações de ferro

F. pedrosoi e *C. carrionii* foram investigados quanto à sobrevivência (CFU), em macrófagos cultivados sob diferentes disponibilidade do metal ferro. De acordo com os resultados obtidos a taxa de sobrevivência de ambos patógenos foi maior em macrófagos expostos a sulfato ferroso amoniacal e citrato férrico do que naqueles que foram tratados com BPS para diminuir a disponibilidade do metal. (**Figura 23**). Estes dados sugerem que, durante a infecção, os fagócitos diminuem a disponibilidade de ferro livre como mecanismo

microbicida contra estes dematiáceos. Em contrapartida os fungos apresentam mecanismos de obtenção do metal sob condições de limitantes.

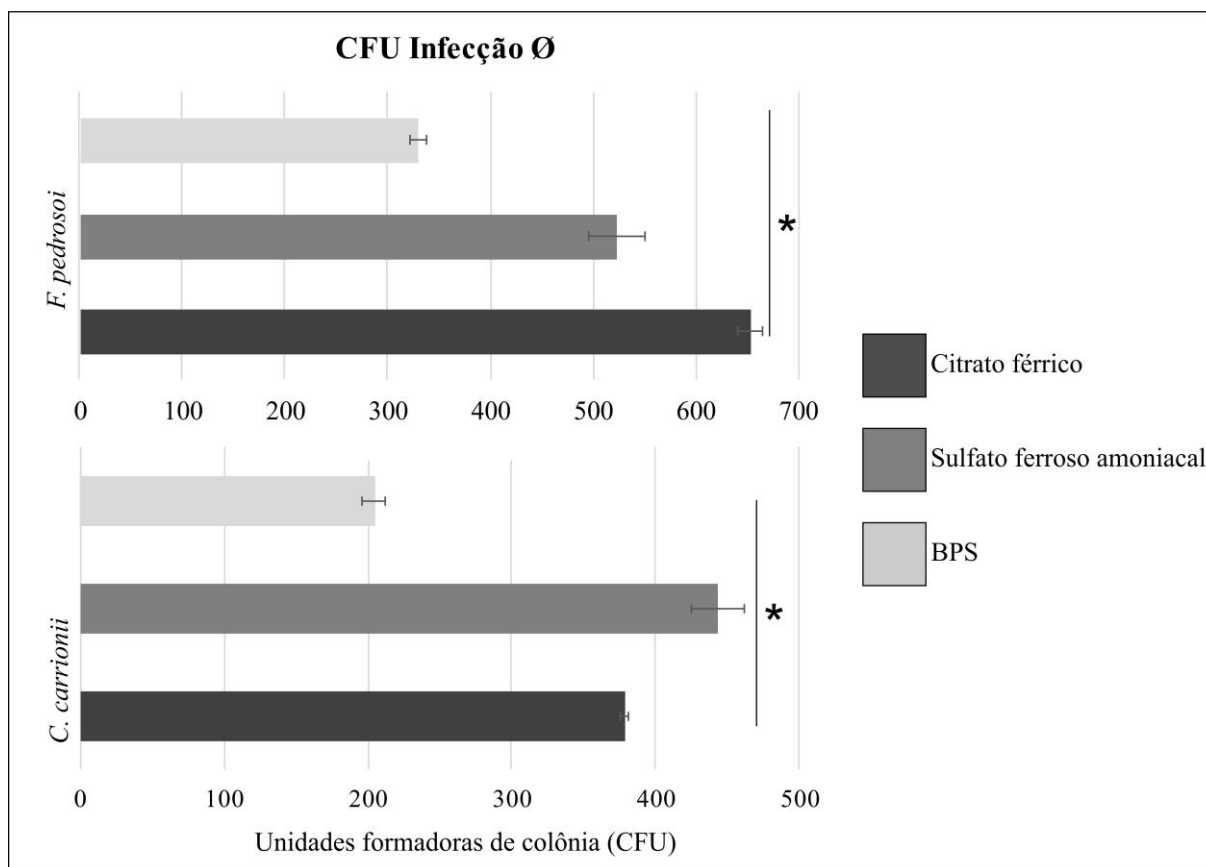


Figura 23. Análise da capacidade de utilização de fontes orgânicas e inorgânicas de ferro durante infecção em macrófagos. Após internalização das células de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* nos macrófagos, o meio foi lavado com PBS 1X e suplementado com diferentes fontes orgânica (citrato férrico 30 μ M) e inorgânica (sulfato ferroso amoniacal 30 μ M) de ferro, além do quelante BPS. Após 14 horas, células resultantes de macrófagos lisados foram plaqueadas em meio ágar batata dextrose e as unidades formadoras de colônia observadas após 4 dias estão expostas no gráfico. O experimento foi realizado em duplicata e a média aplicada, considerando os valores de desvio padrão. *Indica valores estatisticamente significantes com $*p \leq 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Dado que os agentes patogênicos encontram tipicamente um ambiente extremamente limitador de ferro quando se estabelecem em hospedeiros de mamíferos, o papel do ferro nas infecções microbianas tem sido objeto de investigações. Embora exista uma quantidade substancial de ferro presente no hospedeiro, a maior parte está complexada e há pouco ou nenhum ferro livre disponível para o crescimento microbiano. O ferro é predominantemente intracelular, ocorrendo como heme, em proteínas de ferro-enzimas ou ferritina e em quantidades menores em outras proteínas. As quantidades limitadas de ferro extracelular são mantidas por proteínas como a transferrina no soro e a lactoferrina nas superfícies do corpo; Sendo que, em geral, os reservatórios destas proteínas são apenas parcialmente saturados com ferro (HOWARD, 1999; PAYNE, 1993). Com relação aos fungos, até a década passada, pouco se sabia sobre a função do ferro nas interações fungo-hospedeiro e os mecanismos reguladores gerais que governam a homeostase do ferro. No entanto, um micróbio bem-sucedido deve ser aquele que é capaz de adquirir ferro a partir do ambiente de seu hospedeiro limitador de ferro pela expressão de sistemas de captação de ferro de alta afinidade (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; JOHNSON, 2008a; SILVA *et al.*, 2011). Os resultados encontrados neste estudo sugerem que *F. pedrosoi* e *C. carrionii* compartilham de ao menos dois sistemas de captação de ferro de alta afinidade: o sistema redutivo caracterizado por dois complexos permease/oxidase superexpressos em condições de deficiência de ferro, e a captação de ferro mediada por sideróforos do tipo hidroxamato identificados como ferricrocina. Também foram caracterizados alguns fatores transcricionais que regulam a homeostase de ferro, atuando de maneira oposta durante a carência do micronutriente. Os resultados possibilitam a proposição de modelo de mecanismos para captação de ferro durante sua baixa disponibilidade nos fungos *F. pedrosoi* e *C. carrionii* (Figura 23).

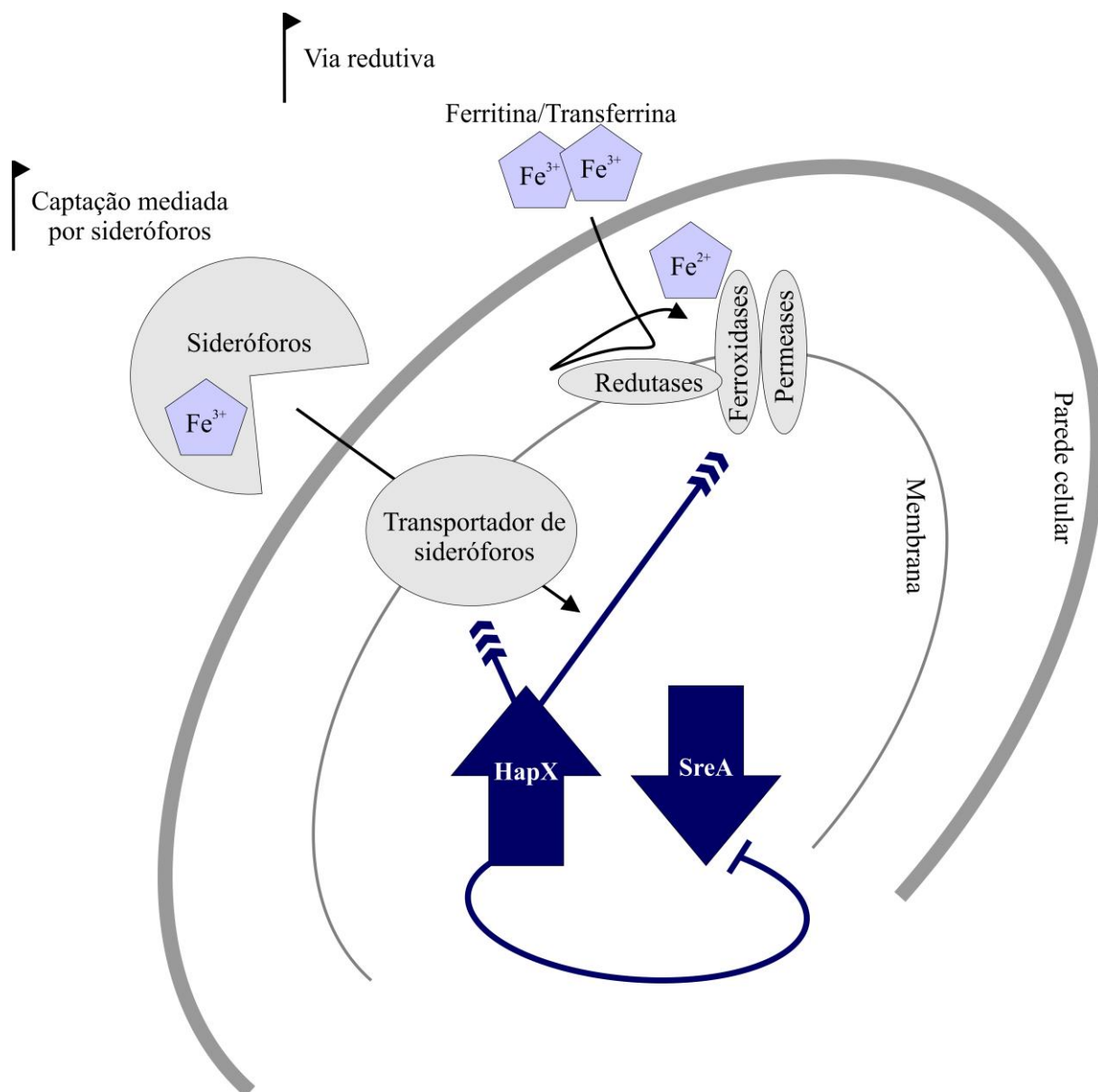


Figura 24. Modelo proposto para a regulação dos sistemas de aquisição de ferro em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* durante privação do micronutriente. Os resultados sugerem que na baixa disponibilidade do metal, sistemas redutivos (complexos ferroxidases/permeases) e não-redutivos (sideróforos) são ativados por ação do fator transcricional HapX. Este, por sua vez, bloqueia o fator transcricional SreA que atua reprimindo as vias de captação de ferro.

Os genes envolvidos em vias comuns tendem a ser genomicamente agrupados em fungos filamentosos. Em *A. fumigatus*, por exemplo, entre os genes afetados pelo produto do gene *hapX*, 41 genes estão organizados em clusters (SCHRETTL *et al.*, 2010). Entre os resultados apresentados neste trabalho, a existência de dois clusters gênicos em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, envolvendo os genes do complexo ferroxidase-permease (*fetC1-ftrA1* e *fetC2-ftrA2*), mostra similaridade com a organização genômica descrita em *A. fumigatus* (*fetC-ftrA*)

(HAAS, 2012), *S. pombe* (*fio1-fiop*) (ASKWITH; KAPLAN, 1997; MOURER *et al.*, 2015) e *U. maydis* (*fer1-fer2*) (EICHHORN *et al.*, 2006), reforçando o desempenho das funções preditas. Dois clusters envolvendo os genes da biossíntese e transporte de sideróforos ocorrem em *F. pedrosoi* (*sidC-sidA* e *10052-sidI-sidH-sidF-sidD*) e *C. carrionii* (*sidA-sidC* e *sidD-sidF-sidI-02321*) e foram descritos em outros fungos. Os genes *sidA* e *sidC*, que codificam a ornitina-N⁵-monooxigenase e a NRPS, constituem um cluster em *U. maydis*, *S. pombe*, *N. crassa*, *Aureobasidium pullulans*, *F. graminearum* e *O. olearius* (HAAS, 2003; SCHRETTL; WINKELMANN; HAAS, 2004; TOBIASEN *et al.*, 2007; WELZEL *et al.*, 2005; YUAN *et al.*, 2001), mas não em *A. nidulans* e *A. fumigatus* (EISENDLE *et al.*, 2003; SCHRETTL *et al.*, 2007). Por outro lado, em *A. fumigatus* e *A. nidulans*, os genes *sidJ*, *sidF*, *sidH* e *sidD* e *mirD*, envolvidos na biossíntese e transporte de sideróforos, formam um cluster (SCHRETTL *et al.*, 2008). Um padrão semelhante de organização foi observado em *Paracoccidioides* Spp. (SILVA-BAILÃO *et al.*, 2014b). Genes de biossíntese e transporte de sideróforos também são observados em cluster em *H. capsulatum* (HWANG *et al.*, 2008) e *Blastomyces dermatitidis* (MARTY *et al.*, 2015). Estes dados indicam que os genes envolvidos na biossíntese de sideróforos podem ter origem num cluster de genes único que foi subsequentemente reorganizado e separado durante a evolução do genoma e a especiação.

O complexo heterotrimérico de ligação a CCAAT (CBC) é conservado evolutivamente em organismos eucarióticos, incluindo fungos, plantas e mamíferos. O fator CBC consiste de três subunidades, que são nomeadas no fungo filamentoso *A. nidulans*, HapB, HapC e HapE. HapX, uma quarta subunidade de CBC, foi identificada exclusivamente em fungos, com exceção de *S. cerevisiae* e as espécies de Saccharomycotina estreitamente relacionadas. O complexo CBC-HapX atua como o regulador mestre da homeostase de ferro (HORTSCHANSKY *et al.*, 2015). Indicando este mesmo papel regulador da homeostase de ferro, a sequência CCAAT apresenta-se também conservada na região promotora dos ortólogos de *hapX* em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* formando o complexo CBC. Além disso, a grande maioria dos genes preditos como envolvidos na captação de ferro apresentam o complexo CCAAT em suas regiões promotoras, sugerindo a ligação com HapX (**Figura 14**). As proteínas ortólogas HapX relevaram um domínio de ligação a Hap e uma região básica zíper leucina (bZIP). O domínio de ligação a Hap é descrito como parte do complexo de ligação dos fatores de transcrição da família Hap (MCNABB; PINTO, 2005). O domínio bZIP é descrito como região de ligação ao DNA e caracteriza a classe de fatores de transcrição à qual os ortólogos de HapX, encontrados em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*,

pertencem. Estudos indicam que HapX, composto apenas pelo domínio de ligação CBC e pela região bZIP, executa funções residuais na ativação da biossíntese de sideróforos e na repressão do consumo de ferro, suprimindo a expressão de *sreA* durante a deficiência de ferro pela interação proteína-proteína com o complexo heterotrimérico de ligação a CCAAT (CBC) e por ligação específica à sequência de DNA (GSALLER *et al.*, 2014; HORTSCHANSKY *et al.*, 2015). A influência dos níveis de ferro sobre a expressão dos ortólogos de *hapX* de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* foi confirmada por análises de quantificação dos transcritos, mostrando-se induzida em condições de deficiência do metal. Os ortólogos *hapX* de *A. fumigatus* (SCHRETTL *et al.*, 2010) e seus ortólogos em *A. nidulans* (HORTSCHANSKY *et al.*, 2007), *F. oxysporum* (LOPEZ-BERGES *et al.*, 2012), *C. albicans* (HSU; YANG; LAN, 2011), *S. pombe* (MERCIER; PELLETIER; LABBÉ, 2006) e *C. neoformans* (JUNG *et al.*, 2010) também são superexpressos transcricionalmente na deficiência de ferro.

As sequências de aminoácidos de SreA foram encontradas com 45% e 41% de identidade com a de *A. fumigatus*, em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, respectivamente. As sequências SreA putativas possuem vários domínios conservados característicos de fatores de transcrição GATA que regulam a assimilação de ferro, incluindo dois motivos de dedo de zinco e um domínio C-terminal super-hélice (coiled-coil). Uma série de fatores de transcrição especificamente se ligam a sequência HGATAR (H = A, C ou G; R = A ou G) (POWER *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 1990) nas regiões regulatórias dos genes. Os genes envolvidos na captação de ferro encontrados em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* apresentaram vários prováveis sítios de ligação HGATAR. Essa sequência consenso serve como local de ligação para fatores GATA *in vivo* tal como no promotor *sid1* de *Ustilago maydis*, o que facilita a ligação do homólogo de SreA, Urbs1 (AN *et al.*, 1997). Análises semelhantes estabeleceram uma correlação entre a expressão de genes envolvidos na captação de ferro e a presença de sítios de ligação ao fator de transcrição SreA (POWER *et al.*, 2006). A integração de dados de microarranjos de expressão gênica com a análise genômica de sítios GATA foi utilizada para identificar supostos sítios de ligação ao fator de transcrição GATA em *B. dermatitidis* (MARTY *et al.*, 2015). Com exceção de Cir1 em *C. neoformans*, todos fatores de transcrição fúngica GATA que regulam a aquisição de ferro contêm dois dedos de zinco (CHI *et al.*, 2013; WON *et al.*, 2006). Este arranjo de dedo de zinco é único, porque a maioria dos fatores de transcrição GATA em fungos contêm apenas um dedo de zinco (HAAS *et al.*, 1999). Os ortólogos SreB de *Blastomyces dermatitidis*, SreA de *A. nidulans*, SreP de *Penicillium chrysogenum* e Sre de *N. crassa*, também possuem o domínio “coiled-coil” na região C-

terminal (GAUTHIER *et al.*, 2010). Similar a *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* (GAUTHIER *et al.*, 2010; HAAS *et al.*, 1999; HWANG *et al.*, 2012; SCHRETTL *et al.*, 2008), a expressão do gene *sreA* de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* é induzida quando o ferro é abundante, e reprimida quando o ferro é limitado. Os resultados propõem a hipótese de que *F. pedrosoi* e *C. carrionii* podem compartilhar do modelo de regulação de homeostase de ferro descrito em *A. fumigatus*, onde *hapX* e *sreA* estão interconectados num circuito de “feed-back” transcricional negativo, ou seja, SreA reprime a expressão de *hapX* durante a abundância de ferro, enquanto HapX reprime *sreA* durante a deficiência do metal (HAAS, 2012).

Adicionalmente, dois sistemas putativos de aquisição redutiva de ferro foram identificados por homologia em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. As ferroxidases preditas (FetC1 e FetC2) de ambos os microrganismos apresentaram na busca por regiões conservadas um peptídeo sinal, um domínio transmembrânico e um complexo multicobre, composto por três sítios de oxidase de cobre (tipos 3, 1 e 2, respectivamente). Multicobre oxidases são enzimas que oxidam seu substrato aceitando elétrons em um centro catalítico que contém cobre mononuclear e transferindo-os para um centro de cobre trinuclear. O dioxigênio se liga ao centro trinuclear e, após a transferência de quatro elétrons, é reduzido a duas moléculas de água (BENTO *et al.*, 2005). Existem três centros de cobre espectroscopicamente diferentes encontrados em multicobre oxidases: tipo 1 (ou azul), tipo 2 (ou normal) e tipo 3 (ou acoplado binuclear) (MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990; OUZOUNIS; SANDER, 1991). As multicobre oxidases incluem as ferroxidases (OSAKI, 1966). Ortólogos de ferroxidases da via redutiva em *C. albicans* Fet3 e Fet33, *S. cerevisiae* Fet3, *C. neoformans* Fet3, *S. pombe* Fio1, *A. fumigatus* FetC (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; ASKWITH *et al.*, 1994; ASKWITH; KAPLAN, 1997; SCHRETTL *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011) apresentam regiões conservadas estritamente idênticas. As permeases putativas FtrA1 e FtrA2 revelaram um domínio característico de permease, Ftr1, descrito pela primeira vez na proteína Ftr1 de *S. cerevisiae*, além de sete domínios transmembrânicos preditos. Os elementos conservados encontrados em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são condizentes com os encontrados em *A. fumigatus* FtrA, *C. neoformans* Ftr1 (SILVA *et al.*, 2011), *S. pombe* Fip1 (LABBÉ; PELLETIER; MERCIER, 2007), *S. cerevisiae* Ftr1 (SEVERANCE; CHAKRABORTY; KOSMAN, 2004), *C. albicans* CaFtr1 e CaFtr2 (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; RAMANAN; WANG, 2000) e *Nomuraea rileyi* NrFtrA (LI *et al.*, 2016). Os resultados sugerem que os complexos redutivos ferroxidase-permease, por meio das análises de

expressão dos genes *ftrA1* e *ftrA2*, são regulados por níveis de ferro. Porém, a superexpressão de *ftrA1* sob condições de deficiência de ferro é mais significativa que a de *ftrA2* comparada às condições repletas do metal, principalmente em *C. carrionii*. A levedura *C. albicans* também possui dois genes homólogos para a aquisição redutiva de ferro (ferroxidase-permease), porém a expressão da permease *Caft1* foi induzida sob condições limitadas de ferro e reprimida quando o fornecimento de ferro era suficiente, enquanto que a expressão de *Caft2* foi regulada de forma inversa (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). Em leveduras, a expressão dos genes *ftr1* (permease de ferro) e *fet3* (multicobre oxidase) é altamente induzida pela deficiência de ferro (ASKWITH *et al.*, 1994). Por fim, o gene *ftrA* em *A. fumigatus* mostrou-se superexpresso na deficiência de ferro, porém reprimido na abundância do metal (POWER *et al.*, 2006). Assim, nossos resultados sugerem que *F. pedrosoi* e *C. carrionii* possuem duas vias que agem de forma similar, reduzindo íons férricos, durante a deficiência de ferro.

Em se tratando dos sideróforos putativos, domínios característicos foram encontrados em todas as sequências de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* analisadas. Dois domínios foram preditos na proteína putativa SidA: o primeiro seletivo a uma família de oxidoredutases envolvidas na biossíntese de sideróforos, incluindo a L-ornitina 5-monooxigenase (VISCA; CIERVO; ORSI, 1994), e o segundo é um pequeno domínio de ligação a NADH dentro de um domínio de ligação a FAD maior (EGGINK *et al.*, 1990; KURIYAN *et al.*, 1991; ROSS; CLAIBORNE, 1992). As proteínas ortólogas em *A. fumigatus* SidA, *S. pombe* Sib2, *H. capsulatum* Sid1 e *A. nidulans* SidA, compartilham de domínios equivalentes (EISENDLE *et al.*, 2003; HWANG *et al.*, 2008; LABBÉ; PELLETIER; MERCIER, 2007; MARTÍN DEL CAMPO *et al.*, 2016). SidC, de *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, apresentam domínios conservados idênticos, porém, organizados modularmente de formas distintas: o domínio de ligação a AMP está relacionado a ácidos graxos de cadeia longa ligase-CoA, acetil-CoA sintase e várias outras sintetases estritamente relacionadas (SCHRÖDER, 1989); a região de ligação a PP (PKS PP) refere-se ao local de ligação da fosfopanteteína (TOOMEY; WAKIL, 1968); o domínio de condensação, que catalisa uma reação de condensação para formar ligações peptídicas na biossíntese de peptídeos não ribossomais (STACHELHAUS *et al.*, 1998); por fim, um pequeno domínio que é encontrado na região C-terminal denominado de ligação a AMP-C (FINKING; MARAHIEL, 2004; WILKINSON; MICKLEFIELD, 2009). Proteínas SidC de *A. nidulans* (EISENDLE *et al.*, 2003), *A. fumigatus* (REIBER *et al.*, 2005), *P. brasiliensis* (SILVA *et al.*, 2011) e *S. pombe* (SCHRETTL; WINKELMANN; HAAS, 2004)

revelam os mesmos domínios que também se organizam em módulos divergentes. Domínios encontrados em SidD de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são semelhantes aos preditos em ortólogos de *A. fumigatus* e *P. brasiliensis* (REIBER *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011). Em *A. fumigatus*, SidF e SidL parecem ser os únicos dois portadores do domínio AlcB (HAAS, 2014) preditos também em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Os ortólogos de SidF em *H. capsulatum* Sid3, *P. brasiliensis* SidF e *A. nidulans* SidF, igualmente possuem o domínio AlcB (GRÜNDLINGER *et al.*, 2013a; HWANG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011). Em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, a proteína putativa SidH apresentam duas regiões conservadas preditas como ECH1 e ECH2 relacionadas à atividades de desalogenase, hidratase e isomerase (HOLDEN *et al.*, 2001). As proteínas SidI putativas apresentaram domínios de ligação a AMP e ligação a AMP-C, também encontrados em ortólogos de *A. fumigatus* e *A. nidulans* (GRÜNDLINGER *et al.*, 2013a; YASMIN *et al.*, 2012). Finalmente, a sequência SidJ putativa revelou dois domínios, sendo o primeiro, DUF1749 (OLLIS *et al.*, 1992), também encontrado na proteína ortóloga SidJ de *A. fumigatus* (GRÜNDLINGER *et al.*, 2013b). Todas as sequências preditas como envolvidas na biossíntese de sideróforos em *F. pedrosoi* e *C. carrionii* apresentaram regiões conservadas equivalentes, reforçando possível função semelhante aos descritos em seus ortólogos.

Genes putativos *sidA* e *sidI*, envolvidos na rota de biossíntese de sideróforos, foram superexpressos em condições de deficiência de ferro. Estes resultados corroboram com o perfil de expressão dos ortólogos destes genes em *A. fumigatus* e *A. nidulans* (GRÜNDLINGER *et al.*, 2013a; OBEREGGER *et al.*, 2001; SCHRETTTL *et al.*, 2004; YASMIN *et al.*, 2012). Ortólogos de SidA também induzidos em condições de deficiência de ferro foram descritos em *H. capsulatum* (*sid1*), *S. pombe* (*sib2*) e *P. brasiliensis* (*sidA*) (HWANG *et al.*, 2008; MERCIER; LABBÉ, 2010; PARENTE *et al.*, 2011). As análises indicam que *F. pedrosoi* e *C. carrionii* podem produzir sideróforos para superar a deficiência de ferro.

Conjuntamente, a mineração de dados do genoma, a presença dos elementos reguladores putativos dos genes da biossíntese e transporte de sideróforos, somados às análises de expressão gênica, sugeriram fortemente que *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são produtores de sideróforos hidroxamatos. A presença dessas moléculas foi primeiramente detectada em placas de ágar dos dois microrganismos privados de ferro com uma sobreposição de solução CAS, e posteriormente constatada por análise de perclorato férrico em sobrenadantes de culturas celulares, sideróforos tipicamente produzidos por fungos

(HOLZBERG; ARTIS, 1983). A produção em ambos os ensaios foi reprimida sob condições abundantes de ferro. Ensaios semelhantes também ratificaram a produção de sideróforos do tipo hidroxamato em outros patógenos, a exemplo de *A. fumigatus* (REIBER *et al.*, 2005), *A. nidulans* (EISENDLE *et al.*, 2003), *P. brasiliensis* (PARENTE *et al.*, 2011), *H. capsulatum* (HWANG *et al.*, 2008), *C. albicans* (SWEET; DOUGLAS, 1991) e *C. neoformans* (JACOBSON; PETRO, 1987). A análise por HPLC em fase reversa acoplada à espectrometria de massas permitiram a confirmação da produção de hidroxamato por *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Ferricrocina foi identificada como sideróforo intra e extracelular em ambos os patógenos. Ferricrocina é um hexapeptídeo cíclico com a estrutura Gli-Ser-Gli-(N⁵-acetyl-N⁵-hydroxyornithine)₃, o que significa que o grupo acil ligado à hidroxiornitina é um acetil (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008; RENSHAW *et al.*, 2002). Ferricrocina é produzido intracelularmente por *A. fumigatus* e *A. nidulans* para armazenamento e distribuição de ferro em hifas (EISENDLE *et al.*, 2006; SCHRETTL *et al.*, 2007; WALLNER *et al.*, 2009). Os patógenos de plantas *Magnaporthe grisea* e *Fusarium graminearum*, o organismo modelo não-patogênico *Neurospora crassa* utilizam ferricrocina para armazenamento de ferro intracelular, também o dermatófito *Trichophyton rubrum* sintetiza ferricrocina intracelularmente (ANTELO *et al.*, 2006; MATZANKE *et al.*, 1987; MOR *et al.*, 1992; OIDE *et al.*, 2015). Ferricrocina ainda não foi descrito como sideróforo sintetizado extracelularmente em nenhum fungo, sendo um achado exclusivo para *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, até o presente.

Os experimentos de captação cruzada (*cross-feeding*) demonstraram que os sideróforos secretados por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* restauram o crescimento do mutante Δ *sidA* de *A. nidulans* não produtor de sideróforo. Esta cepa mostrou-se incapaz de crescer em meio de crescimento padrão, a menos que os sideróforos fossem fornecidos (EISENDLE *et al.*, 2003). Este fato, associado à falta de um sistema de assimilação de ferro redutor, está de acordo com a capacidade deste fungo para utilizar xenosideróforos. Além dos sideróforos nativos ferricrocina e TAFC, *A. nidulans* também é capaz de utilizar ferro da enterobactina, um sideróforo bacteriano do tipo catecolato, e da ferrioxamina B, uma fonte de ferro menos eficaz (OBEREGGER *et al.*, 2001).

O crescimento de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* evidenciou a flexibilidade de utilização de fontes de ferro distintas durante o processo infeccioso em ambos os fungos. Para utilizar o ferro a partir da transferrina e da ferritina, *C. albicans*, *H. capsulatum*, e *P. brasiliensis* utilizam a via redutora (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; BAILÃO *et al.*, 2015;

TIMMERMAN; WOODS, 1999). Em *A. fumigatus*, os sideróforos TAFC, ferricromo e ferricrocina removem ferro da holo-transferrina com uma afinidade elevada e similar (HISSEN *et al.*, 2004). A presença de duas vias redutivas de alta afinidade por ferro e a produção de ferricrocina como sideróforo intra e extracelular, sugerem uma estreita relação com o crescimento significativo nas fontes transferrina e ferritina apresentados neste estudo. No sangue humano, 66% do ferro circulante total do corpo está ligado à hemoglobina, sendo que cada molécula de hemoglobina possui quatro grupos heme, e cada grupo heme contém um íon ferroso (Fe^{2+}) (RAMAKRISHNA; ROOKE; COOPER, 2003). Os resultados destacam o uso de hemoglobina como fonte de crescimento significativo, indicando ser um suplemento importante para *F. pedrosoi* e *C. carrionii*. Uma elevada capacidade de utilizar ferrioxamina B como fonte de crescimento foi observada em ambos patógenos. Em fungos, a absorção do complexo sideróforo-ferro é geralmente mediada por transportadores pertencentes à superfamília facilitadora principal (MFS)(SILVA-BAILÃO *et al.*, 2014b). Os genes que codificam os ortólogos de transportadores de sideróforos putativos encontrados no genoma de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* apresentam um domínio MFS1. A presença de mais de um transportador de sideróforo putativo pode refletir a capacidade de utilizar uma variedade de sideróforos como fontes de ferro, incluindo a xenosideróforos ou ferrioxamina B.

Os mecanismos moleculares que governam a sobrevivência de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* nas células hospedeiras permanecem amplamente indefinidos (DE HOOG *et al.*, 2007; ROZENTAL; ALVIANO; DE SOUZA, 1994). Os resultados de sobrevivência demonstraram que a disponibilidade de ferro durante a infecção de fagócitos influencia na sobrevivência do fungo nestas condições. Adicionalmente, pode-se sugerir que neste nicho do hospedeiro a capacidade de obter ferro é importante para o sucesso destes patógenos e que provavelmente macrófagos utilizam como estratégia fungicida a diminuição da disponibilidade de Fe livre. Um estudo indica que *A. fumigatus* afeta a regulação da homeostase de ferro de macrófagos e vias efetoras imune inatas por um do sistema de sideróforo durante a infecção e que as alterações na resposta imune podem ser uma consequência da restrição de ferro por parte dos macrófagos (SEIFERT *et al.*, 2008). Desta maneira, os mecanismos moleculares de captação de Fe de alta afinidade podem ser cruciais para sobrevivência dos fungos negros durante o processo infeccioso.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e discutidos podemos concluir que:

- A regulação oposta dos genes putativos *hapX* e *sreA* em resposta à indisponibilidade de ferro, bem como os domínios proteicos funcionais encontrados, os colocam como prováveis fatores transcricionais responsáveis pela indução e repressão, respectivamente, dos mecanismos de alta afinidade de aquisição deste micronutriente.
- Dois sistemas de assimilação redutiva de ferro, constituídos pelo complexo ferroxidase-permease, possivelmente compõem as estratégias de absorção de ferro em *F. pedrosoi* e *C. carrionii*.
- Ambos os patógenos, *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, são capazes de secretar sideróforos do tipo hidroxamato como ferramenta para a mobilização específica de ferro em presença de íons metálicos. Os genes *sidA* e *sidI* certamente estão envolvidos na rota de biossíntese de sideróforos.
- Os fungos patogênicos *F. pedrosoi* e *C. carrionii* produzem sideróforos ferricrocina (FC) intra e extracelularmente após 30 dias sob condições de deficiência de ferro.
- Sideróforos produzidos por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* podem ser usados como fonte para o crescimento de cepas mutantes para biossíntese de sideróforos (*A. fumigatus* Δ *sidA*).
- *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são capazes de crescer em diferentes fontes únicas de ferro. Além das fontes primordiais de ferro orgânica e inorgânica, também ambos demonstram preferência por transferrina e ferritina, comparadas à hemoglobina e ferrioxiamina B (FOB), revelando vantagem em poder utilizar ferro de substâncias abundantes no hospedeiro.
- Os patógenos *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são capazes de captar ferro de fontes orgânica e inorgânica durante infecção em macrófagos.

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas do presente estudo são:

- Análise proteômica por espectrometria de massas de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* sob condições de privação e abundância de ferro, visando caracterizar moléculas influenciadas pelos níveis de ferro;
- Caracterização, através de ensaios de expressão heteróloga, dos complexos proteicos reguladores da homeostase de ferro como HapX e SreA;
- Construção dos mutantes dos principais genes induzidos na privação de ferro (*hapX*, *sreA*, *sidA* e *ftrA1*) buscando descrever suas funções;
- Análise fenotípica e de virulência das linhagens mutantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMCZYK, D.; PARK, C.; SZANISZLO, P. J. Cyto-localization of the class V chitin synthase in the yeast, hyphal and sclerotic morphotypes of *Wangiella* (Exophiala) dermatitidis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 28–41, 2009.
- AL-SHEIKH, H. Effect of lactoferrin and iron on the growth of human pathogenic *Candida* species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 2009.
- ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1000–1012, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.
- ALVIANO, D. S. *et al.* Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 689–695, 2003.
- AN, Z. *et al.* The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. **The EMBO journal**, v. 16, n. 7, p. 1742–50, 1 abr. 1997.
- ANDRADE, T. S. *et al.* Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. **Mycoses**, v. 47, n. 5–6, p. 216–221, 2004.
- ANDREWS, N. C.; SCHMIDT, P. J. Iron homeostasis. **Annu. Rev. Physiol**, v. 69, n. 11, p. 69–85, 2007.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUÍÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, 2003.
- ANTELO, L. *et al.* Siderophores produced by *Magnaporthe grisea* in the presence and absence of iron. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 61, n. 5–6, p. 461–4, 2006.
- ANTONELLO, V. S. *et al.* Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-flucytosine association. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 6, p. 329–331, 2010.
- ASKWITH, C. *et al.* The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 403–410, jan. 1994.
- ASKWITH, C.; KAPLAN, J. An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 1, p. 401–5, 3 jan. 1997.
- ATKIN, C. L.; NEILANDS, J. B.; PHAFF, H. J. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. **Journal of bacteriology**, v. 103, n. 3, p. 722–33, set. 1970.

ATTAPATTU, M. C. Chromoblastomycosis - A clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 145–151, 1997.

BAILÃO, E. F. L. C. *et al.* Metal acquisition and homeostasis in fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 257–266, 2012.

BAILÃO, E. F. L. C. *et al.* Paracoccidioides spp. ferrous and ferric iron assimilation pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. August, p. 1–12, 12 ago. 2015.

BAYLES, M. A. Chromomycosis. In Hay RJ (ed.), **Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. Tropical Fungal Infections**. London: WB Saunders, p. 45–70, 1986.

BENTO, I. *et al.* Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 3, n. 21, p. 3507–13, 7 nov. 2005.

BLATZER, M. *et al.* SidL, an *Aspergillus fumigatus* Transacetylase Involved in Biosynthesis of the Siderophores Ferricrocin and Hydroxyferricrocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4959–4966, 15 jul. 2011.

BONACCORSI DI PATTI, M. C. *et al.* Release of highly active Fet3 from membranes of the yeast *Pichia pastoris* by limited proteolysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 372, n. 2, p. 295–9, 1999.

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.

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.

BONIFAZ, A. *et al.* Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. **The Journal of dermatological treatment**, v. 16, n. 1, p. 47–51, 2005.

BOOKOUT, A. L. *et al.* High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]**, v. Chapter 15, p. Unit 15.8, 2006.

BOWEN, A R. *et al.* Classification of fungal chitin synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 2, p. 519–523, 15 jan. 1992.

BRICKMAN, T. J.; MCINTOSH, M. A. Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*: Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 17, p. 12350–12355, 1992.

BRUNKE, S. *et al.* **Virulence factors in fungal pathogens of man** **Current Opinion in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>>

BUTTERFIELD, W.; JONG, S. C. Effect of carbon source on conidiogenesis in *Fonsecaea dermatitidis*, agent of chromomycosis. **Mycopathologia**, v. 58, n. 1, p. 59–62, 4 jun. 1976.

CADIEUX, B. *et al.* The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1339–1347, 15 abr. 2013.

CAIRO, G.; BERNUZZI, F.; RECALCATI, S. A precious metal: Iron, an essential nutrient for all cells. **Genes & Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 25–39, 2006.

CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1255–82, set. 1950.

CASTRO, R. M.; CASTRO, L. G. M. On the priority of description chromomycosis. **Mykosen**, v. 30, n. 9, p. 1987, 1987.

CHEN, C. *et al.* An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 2, p. 118–135, 2011.

CHI, Z. *et al.* Role of a GATA-type transcriptional repressor Sre1 in regulation of siderophore biosynthesis in the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2. **BioMetals**, v. 26, n. 5, p. 955–967, 2013.

COLLOPY-JUNIOR, I. *et al.* Characterization of an ecto-ATPase activity in *Fonsecaea pedrosoi*. **Archives of microbiology**, v. 185, n. 5, p. 355–62, jun. 2006.

COUREL, M. *et al.* Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 15, p. 6760–6771, 2005.

CUNHA, M. M. L. *et al.* Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microscopy Research and Technique**, v. 68, p. 377–384, 2005.

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

DA SILVA, M. B. *et al.* Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3839–3841, 2008.

DE HOOG, G. S. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105–9, 1993.

DE HOOG, G. S. *et al.* Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 219–234, 2007.

DE SERRANO, L. O.; CAMPER, A. K.; RICHARDS, A. M. An overview of siderophores for iron acquisition in microorganisms living in the extreme. **BioMetals**, v. 29, n. 4, p. 551–571, 2016.

DE SILVA, D. *et al.* Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of

ceruloplasmin. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14208–13, 30 maio 1997.

ECK, R. *et al.* A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: Cloning, characterization and disruption. **Microbiology**, v. 145, n. 9, p. 2415–2422, 1999.

EGGINK, G. *et al.* Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, n. 1, p. 135–142, 1990.

EICHHORN, H. *et al.* A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. **Plant Cell**, v. 18, n. 11, p. 3332–3345, 2006.

EISENDLE, M. *et al.* The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: Functional analysis of two genes encoding L-ornithine N5-monooxygenase (sidA) and a non-ribosomal peptide synthetase (sidC). **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 359–375, 2003.

EISENDLE, M. *et al.* The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1596–1603, 2006.

ESTERRE, P. *et al.* Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 1, p. 45–47, 1996.

ESTERRE, P. *et al.* A multicentre trial of terbinafine in patients with chromoblastomycosis: Effect on clinical and biological criteria. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 9, n. s1, p. S29–S34, 1998.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 2, p. 148–152, abr. 2006.

EVANS, D. M.; FRAZER, I. H.; MARTIN, N. G. Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells. **Twin research: The official journal of the International Society for Twin Studies**, v. 2, n. 4, p. 250–7, 1 dez. 1999.

FILIPPINI, A. *et al.* Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 1, p. 334–40, 5 jan. 1990.

FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 453–488, 2004.

FINN, R. D. *et al.* Pfam: the protein families database. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D222–30, jan. 2014.

FOSTER, L.-A. A. Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. **Canadian journal of microbiology**, v. 48, n. 5, p. 437–442, 2002.

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. 729–37, set. 2006.

FRANZEN, A. J. *et al.* Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v. 162, n. 1, p. 75–84, abr. 2008.

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

GAUTHIER, G. M. *et al.* SREB, a GATA transcription factor that directs disparate fates in *Blastomyces dermatitidis* including morphogenesis and siderophore biosynthesis. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000846, 2010.

GRANATO, M. Q. *et al.* 1,10-Phenanthroline Inhibits the Metallopeptidase Secreted by *Phialophora verrucosa* and Modulates its Growth, Morphology and Differentiation. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3–4, p. 231–242, 2015.

GREENSHIELDS, D. L. *et al.* The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 4, p. 411–421, 2007.

GRÜNDLINGER, M. *et al.* Fungal siderophore biosynthesis is partially localized in peroxisomes. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 5, p. 862–875, 2013a.

GRÜNDLINGER, M. *et al.* *Aspergillus fumigatus* SidJ mediates intracellular siderophore hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7534–7536, 2013b.

GSALLER, F. *et al.* The Janus transcription factor HapX controls fungal adaptation to both iron starvation and iron excess. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 19, p. 2261–2276, 1 out. 2014.

HAAS, H. *et al.* The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4613–9, 19 fev. 1999.

HAAS, H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: The role of siderophores in iron uptake and storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003.

HAAS, H. Iron - a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. February, p. 1–10, 2012.

HAAS, H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. **Natural product reports**, v. 31, n. 10, p. 1266–1276, 2014.

HAAS, H.; EISENDLE, M.; TURGEON, B. G. Siderophores in fungal physiology and virulence. **Annual review of phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 149–187, 2008.

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, 2003.

HASSETT, R. F.; YUAN, D. S.; KOSMANT, D. J. Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 36, p. 23274–23282, 1998.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: an in vitro comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. S37–S41, 1998.

HENTZE, M. W. *et al.* **Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism** *Cell*, 2010.

HEYMANN, P.; ERNST, J. F.; WINKELMANN, G. Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (TAF1) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. **BioMetals**, v. 12, n. 4, p. 301–306, 1999.

HEYMANN, P.; ERNST, J. F.; WINKELMANN, G. A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. **BioMetals**, v. 13, n. 1, p. 65–72, 2000a.

HEYMANN, P.; ERNST, J. F.; WINKELMANN, G. Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, n. 2, p. 221–227, 15 maio 2000b.

HISSEN, A. H. T. *et al.* Survival of *Aspergillus fumigatus* in Serum Involves Removal of Iron from Transferrin: The Role of Siderophores. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1402–1408, 2004.

HOEGGER, P. J. *et al.* Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **FEBS Journal**, v. 273, n. 10, p. 2308–2326, maio 2006.

HOLDEN, H. M. *et al.* The crotonase superfamily: divergently related enzymes that catalyze different reactions involving acyl coenzyme A thioesters. **Accounts of chemical research**, v. 34, n. 2, p. 145–57, fev. 2001.

HOLZBERG, M.; ARTIS, W. M. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. **Infection and immunity**, v. 40, n. 3, p. 1134–9, jun. 1983.

HORTSCHANSKY, P. *et al.* Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. **The EMBO journal**, v. 26, n. 13, p. 3157–68, 2007.

HORTSCHANSKY, P. *et al.* Deciphering the combinatorial DNA-binding code of the CCAAT-binding complex and the iron-regulatory basic region leucine zipper (bZIP) transcription factor HapX. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 10, p. 6058–6070, 2015.

HOWARD, D. H. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 394–404, jul. 1999.

HSU, P. C.; YANG, C. Y.; LAN, C. Y. *Candida albicans* Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 207–225, 2011.

HU, G. *et al.* *Cryptococcus neoformans* requires the ESCRT protein Vps23 for iron acquisition from heme, for capsule formation, and for virulence. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 292–302, 2013.

HWANG, L. H. *et al.* Histoplasma requires SID1, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, 2008.

HWANG, L. H. *et al.* SRE1 Regulates Iron-Dependent and -Independent Pathways in the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 1, p. 16–25, 1 jan. 2012.

JACOBSON, E. S.; PETRO, M. J. Extracellular iron chelation in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 25, n. 6, p. 415–8, dez. 1987.

JOHNSON, L. Iron and siderophores in fungal-host interactions. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 170–183, 2008a.

JOHNSON, L. Iron and siderophores in fungal–host interactions. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 170–183, fev. 2008b.

JUNG, W. H. *et al.* Role of Ferroxidases in Iron Uptake and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 10, p. 1511–1520, 1 out. 2009.

JUNG, W. H. *et al.* HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 11, 2010.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: A case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 277–284, 2008.

KAPLAN, C. D.; KAPLAN, J. **Iron Acquisition and Transcriptional Regulation** **Chemical Reviews**, 2009.

KARUPPAYIL, S. M. *et al.* Identification of the conserved coding sequences of three chitin synthase genes in *Fonsecaea pedrosoi*. **Medical Mycology**, v. 34, n. 2, p. 117–125, jan. 1996.

KNEIPP, L. F. *et al.* Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. **Medical mycology**, v. 41, n. 6, p. 469–77, dez. 2003.

KNEIPP, L. F. *et al.* Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3355–3362, 2004.

KNEIPP, L. F. *et al.* Surface phosphatase in *Rhinocladiella aquaspersa*: biochemical properties and its involvement with adhesion. **Medical mycology**, v. 50, n. 6, p. 570–8, ago. 2012.

KONETSCHNY-RAPP, S. *et al.* High-performance liquid chromatography of siderophores from fungi. **Biology of Metals**, v. 1, p. 9–17, 1988.

KOSMAN, D. J. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 35, p. 26729–26735, 2010.

KOULMAN, A. *et al.* Identification of extracellular siderophores and a related peptide from the endophytic fungus *Epichloë festucae* in culture and endophyte-infected *Lolium perenne*. **Phytochemistry**, v. 75, p. 128–39, mar. 2012.

KRAGL, C. *et al.* EstB-mediated hydrolysis of the siderophore triacetylfusarinine C optimizes iron uptake of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1278–1285, 2007.

KRÖBER, A. *et al.* HapX Mediates Iron Homeostasis in the Pathogenic Dermatophyte *Arthroderma benhamiae* but Is Dispensable for Virulence. **Plos One**, v. 11, p. e0150701, 2016.

KRZYŚCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M. Chromoblastomycosis. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 5, p. 310–321, 2014.

KUES, U.; RUHL, M. Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes - What for? **Current Genomics**, v. 12, n. July 2016, p. 72–94, 2011.

KURIYAN, J. *et al.* Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. **Nature**, v. 352, n. 6331, p. 172–174, 11 jul. 1991.

LABBÉ, S.; PELLETIER, B.; MERCIER, A. Iron homeostasis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 20, n. 3–4, p. 523–37, jun. 2007b.

LANGFELDER, K. *et al.* Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143–158, 2003.

LEE, M. W.; HSU, S.; ROSEN, T. Spores and mycelia in cutaneous chromomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 5 Pt 2, p. 850–2, nov. 1998.

LENARDON, M. D. *et al.* Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1164–1173, 2007.

LESLIE, D. F.; BEARDMORE, G. L. Chromoblastomycosis in Queensland: a retrospective study of 13 cases at the Royal Brisbane Hospital. **The Australasian Journal of Dermatology**, v. 20, p. 23–30, 1979.

LESUISSE, E. *et al.* Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 289–298, 2001.

LESUISSE, E.; SIMON-CASTERAS, M.; LABBE, P. Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. **Microbiology**, v. 144, n. 12, p. 3455–3462, 1 dez. 1998.

LI, Y. *et al.* Siderophore Biosynthesis but Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for the Dimorphic Fungus *Nomuraea rileyi* Conidiation, Dimorphism Transition, Resistance to Oxidative Stress, Pigmented Microsclerotium Formation, and Virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–19, 2016.

LIU, H. *et al.* Wangiella (Exophiala) dermatitidis WdChs5p, a Class V Chitin Synthase, Is Essential for Sustained Cell Growth at Temperature of Infection. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 1, p. 40–51, 2004.

LOPEZ-BERGES, M. S. *et al.* HapX-Mediated Iron Homeostasis Is Essential for Rhizosphere

Competence and Virulence of the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum*. **The Plant Cell**, v. 24, n. 9, p. 3805–3822, 2012.

LÓPEZ MARTÍNEZ, R.; MÉNDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 188–194, 2007.

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

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, 1994.

MARQUES, S. G. *et al.* Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–11, 2006.

MARTÍN DEL CAMPO, J. S. *et al.* Inhibition of the Flavin-Dependent Monooxygenase Siderophore A (SidA) Blocks Siderophore Biosynthesis and *Aspergillus fumigatus* Growth. **ACS chemical biology**, v. 11, n. 11, p. 3035–3042, 18 nov. 2016.

MARTY, A. J. *et al.* Fungal Morphology, Iron Homeostasis, and Lipid Metabolism Regulated by a GATA Transcription Factor in *Blastomyces dermatitidis*. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 1–40, 2015.

M RUDOLPH. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). **Archiv Schiffs und Tropen-Hyg**, v. 18, p. 498–499, 1914.

MATSUMOTO, T. *et al.* Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. **Mycoses**, v. 36, n. 5–6, p. 145–55, 1993.

MATTE, S. M. *et al.* Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 309–311, 1997.

MATZANKE, B. F. *et al.* Role of siderophores in iron storage in spores of *Neurospora crassa* and *Aspergillus ochraceus*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5873–5876, 1987.

MCCARTHY, M. *et al.* Mold infections of the central nervous system. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 2, p. 150–60, 10 jul. 2014.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 1983.

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

MCNABB, D. S.; PINTO, I. Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 11, p. 1829–39, nov. 2005.

MEDLAR, E. M. A cutaneous Infection caused by a new Fungus, *Phialophora Verrucosa*,

with a Study of the Fungus. **The Journal of medical research**, v. 32, n. 3, p. 507–522.9, jul. 1915.

MEI, B.; BUDDE, A. D.; LEONG, S. A. sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 3, p. 903–7, 1 fev. 1993.

MENDOZA, L.; KARUPPAYIL, S. M.; SZANISZLO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. **Mycoses**, v. 36, n. 5–6, p. 157–164, 1993.

MERCIER, A.; LABBÉ, S. Iron-Dependent remodeling of fungal metabolic pathways associated with ferrichrome biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3806–3817, 2010.

MERCIER, A.; PELLETIER, B.; LABBÉ, S. A transcription factor cascade involving Fep1 and the CCAAT-binding factor Php4 regulates gene expression in response to iron deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 11, p. 1866–81, nov. 2006.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. **European journal of biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 341–52, 26 jan. 1990.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413–451, 1 set. 2007.

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

MOORS, M. A. *et al.* A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, n. 6, p. 1643–51, 1 jun. 1992.

MOR, H. *et al.* Characterization of siderophores produced by different species of the dermatophytic fungi *Microsporum* and *Trichophyton*. **BioMetals**, v. 5, n. 4, p. 213–216, 1992.

MOURER, T. *et al.* Shu1 Is a Cell-surface Protein Involved in Iron Acquisition from Heme in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 16, p. 10176–10190, 17 abr. 2015.

MULLER, G.; BARCLAY, S. J.; RAYMOND, K. N. The mechanism and specificity of iron transport in *Rhodotorula pilimanae* probed by synthetic analogs of Rhodotorulic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 26, p. 13916–13920, 1985.

NAIRZ, M. *et al.* **The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface** *Cellular Microbiology*, 2010.

NEGRONI, R. *et al.* Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 6,

p. 339–346, 2005.

NEILANDS, J. B. **Siderophores. Archives of biochemistry and biophysics**, 1993.

NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26723–6, 10 nov. 1995.

NIMRICHTER, L. *et al.* A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 7, p. 657–665, 2004.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–23, abr. 2003.

OBEREGER, H. *et al.* SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1077–1089, 2001.

OIDE, S. *et al.* Individual and combined roles of malonichrome, ferricrocin, and TAFC siderophores in *Fusarium graminearum* pathogenic and sexual development. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–15, 2015.

OLLIS, D. L. *et al.* The alpha/beta hydrolase fold. **Protein engineering**, v. 5, n. 3, p. 197–211, abr. 1992.

OSAKI, S. Kinetic studies of ferrous ion oxidation with crystalline human ferroxidase (ceruloplasmin). **The Journal of biological chemistry**, v. 241, n. 21, p. 5053–9, 10 nov. 1966.

OUTTEN, C. E.; ALBETEL, A. N. Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 662–668, 2013.

OUZOUNIS, C.; SANDER, C. A structure-derived sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. **FEBS letters**, v. 279, n. 1, p. 73–8, 11 fev. 1991.

PALMEIRA, V. F. *et al.* Secretory aspartyl peptidase activity from mycelia of the human fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi*: Effect of HIV aspartyl proteolytic inhibitors. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 819–826, 2006a.

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. 21–9, fev. 2006b.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. Major facilitator superfamily. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 1, p. 1–34, mar. 1998.

PARENTE, A. F. A. *et al.* Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n.

7, 2011.

PARK, Y.-S. *et al.* Physical and functional interaction of FgFtr1-FgFet1 and FgFtr2-FgFet2 is required for iron uptake in *Fusarium graminearum*. **The Biochemical journal**, v. 408, n. 1, p. 97–104, 15 nov. 2007.

PARK, Y. S. *et al.* Cellular iron utilization is regulated by putative siderophore transporter FgSit1 not by free iron transporter in *Fusarium graminearum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 4, p. 1634–1642, 2006.

PASRICHA, S. *et al.* Differentially regulated high-affinity iron assimilation systems support growth of the various cell types in the dimorphic pathogen *Talaromyces marneffe*. **Molecular Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 715–737, nov. 2016.

PAYNE, S. M. Iron acquisition in microbial pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 66–69, 1993.

PENDRAK, M. L. *et al.* Heme Oxygenase in *Candida albicans* Is Regulated by Hemoglobin and Is Necessary for Metabolism of Exogenous Heme and Hemoglobin to α -Biliverdin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3426–3433, 2004.

PENDRAK, M. L.; KRUTZSCH, H. C.; ROBERTS, D. D. Structural requirements for hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*. **Biochemistry**, v. 39, n. 51, p. 16110–16118, 2000.

PEREZ-BLANCO, M. *et al.* Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. **Med Mycol**, v. 44, n. 5, p. 467–471, 2006.

PÉREZ-MIRANDA, S. *et al.* O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 1, p. 127–131, 2007.

PHILPOTT, C. C. Iron uptake in fungi: A system for every source. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 636–645, jul. 2006.

PHILPOTT, C. C.; PROTCHENKO, O. **Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*** *Eukaryotic Cell*, 2008.

PONTECORVO, G. *et al.* The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, n. C, p. 141–238, 1953.

POWER, T. *et al.* Differential expression of genes involved in iron metabolism in *Aspergillus fumigatus*. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 281–287, 2006.

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, 1992.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Subcutaneous mycoses. **Infectious disease clinics of North America**, v. 17, n. 1, p. 59–85, viii, mar. 2003.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology**, v. 47, n. 1, p. 3–15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, 2011.

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

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 16 jan. 2017.

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

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. C. L. Chromoblastomycosis in the clinical practice. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 312–319, 2012.

RAJENDRAN, C. *et al.* Chromoblastomycosis in India. **International journal of dermatology**, v. 36, n. 1, p. 29–33, jan. 1997.

RAMAKRISHNA, G.; ROOKE, T. W.; COOPER, L. T. Iron and peripheral arterial disease: revisiting the iron hypothesis in a different light. **Vascular medicine (London, England)**, v. 8, n. 3, p. 203–10, 2003.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5468, p. 1062–4, 2000.

RAYMOND-BOUCHARD, I. *et al.* Structural requirements for the activity of the MirB ferrisiderophore transporter of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 11, p. 1333–1344, 2012.

REIBER, K. *et al.* The expression of selected non-ribosomal peptide synthetases in *Aspergillus fumigatus* is controlled by the availability of free iron. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 83–91, 2005.

RENSHAW, J. C. *et al.* Fungal siderophores: structures, functions and applications. **Mycological Research**, v. 106, n. 10, p. 1123–1142, 2002.

RESTREPO, A. *et al.* Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 544, p. 504–16, 1988.

RESTREPO, A. Treatment of tropical mycoses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3 Pt 2, p. S91-102, 1994.

RESTREPO, A.; JIMENEZ, B. E.; CULTURE, C. D. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 279–281, 1980.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized Fungi in Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 884–928, 1 out. 2010.

ROMAN, D. G. *et al.* The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron

uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 7, p. 4342–50, 1993.

ROMERO-MARTINEZ, R. *et al.* Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696–703, jun. 2000.

ROSEN, T. *et al.* Chromoblastomycosis. In: **Dermatological Cryosurgery and Cryotherapy**. London: Springer London, 2016. p. 349–355.

ROSS, R. P.; CLAIBORNE, A. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the NADH oxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1. Comparison with NADH peroxidase and the flavoprotein disulfide reductases. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, n. 3, p. 658–671, 1992.

ROY, P. *et al.* Chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii* in a skin graft recipient. **Medical Journal Armed Forces India**, p. 8–11, 2015.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia**, v. 126, n. 2, p. 85–91, 1994.

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

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. 570–91, set. 2007.

SANTOS, R. *et al.* Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: Role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. **Microbiology**, 2003.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 946–953, dez. 2004.

SCHRETTL, M. *et al.* Siderophore Biosynthesis But Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 9, p. 1213–1219, 2004.

SCHRETTL, M. *et al.* Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 9, p. e128, 2007.

SCHRETTL, M. *et al.* SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. August, p. 27–43, 2008.

SCHRETTL, M. *et al.* HapX-Mediated Adaption to Iron Starvation Is Crucial for Virulence of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001124, 30 set. 2010.

SCHRETTL, M.; WINKELMANN, G.; HAAS, H. Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe* - an iron transport and iron storage compound. **BioMetals**, v. 17, n. 6, p. 647–54, dez. 2004.

SCHRÖDER, J. Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and

firefly luciferase. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 1, p. 460, 11 jan. 1989.

SCHULTZ, J. *et al.* SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5857–64, 1998.

SCHWECKE, T. *et al.* Nonribosomal Peptide Synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the Architectures of Ferrichrome-Type Siderophore Synthetases in Fungi. **ChemBioChem**, v. 7, n. 4, p. 612–622, 3 abr. 2006.

SEIFERT, M. *et al.* Effects of the *Aspergillus fumigatus* siderophore systems on the regulation of macrophage immune effector pathways and iron homeostasis. **Immunobiology**, v. 213, n. 9–10, p. 767–778, 2008.

SEVERANCE, S.; CHAKRABORTY, S.; KOSMAN, D. J. The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. **The Biochemical journal**, v. 380, p. 487–496, 2004.

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

SILVA-BAILÃO, M. G. *et al.* Hydroxamate production as a high affinity iron acquisition mechanism in *Paracoccidioides* Spp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014a.

SILVA-BAILÃO, M. G. *et al.* Hydroxamate production as a high affinity iron acquisition mechanism in *Paracoccidioides* spp. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105805, 2014b.

SILVA, A. C. C. M. E *et al.* Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I - aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 1, p. 37–44, mar. 1992.

SILVA, C. L.; EKIZLERIAN, S. M. Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Cladosporium carrionii* and *Phialophora verrucosum*. **Journal of general microbiology**, v. 131, n. 1, p. 187–94, 1 jan. 1985.

SILVA, C. L.; FAZIOLI, R. A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. **Journal of medical microbiology**, v. 20, n. 3, p. 299–305, dez. 1985.

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

SILVA, M. G. *et al.* The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. Grubii, and *Cryptococcus gattii*: A comparative analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAR, p. 1–19, 2011.

STACHELHAUS, T. *et al.* Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22773–81, 28 ago. 1998.

STEARMAN, R. *et al.* A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in

yeast. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5255, p. 1552–1557, 15 mar. 1996.

SUZUKI, S. *et al.* Immunochemical studies on the galactomannans isolated from mycelia and culture broths of three *Hormodendrum* strains. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 3, p. 483–490, 1977.

SUZUKI, S.; TAKEDA, N. Immunochemical studies on the galactomannans isolated from mycelia and culture broths of three *Hormodendrum* strains. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 3, p. 483–490, 1977.

SWEET, S. P.; DOUGLAS, L. J. Effect of iron concentration on siderophore synthesis and pigment production by *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 64, n. 1, p. 87–91, 1991.

SZANISZLO, P. J.; COOPER, B. H.; VOGES, H. S. Chemical compositions of the hyphal walls of three chromomycosis agents. **Sabouraudia**, v. 10, n. 1, p. 94–102, mar. 1972.

TERRA, F. *et al.* Novo tipo de dermatite verrucosa: micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. **Brasil Medico**, v. 36, p. 363–8, 1922.

THEURL, I. *et al.* The macrophage: A cellular factory at the interphase between iron and immunity for the control of infections. **BioMetals**, v. 18, n. 4, p. 359–367, ago. 2005.

TIMMERMAN, M. M.; WOODS, J. P. Ferric reduction is a potential iron acquisition mechanism for *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6403–6408, 1999.

TIMMERMAN, M. M.; WOODS, J. P. Potential role for extracellular glutathione-dependent ferric reductase in utilization of environmental and host ferric compounds by *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7671–7678, 2001.

TOBIASEN, C. *et al.* Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. **Current Genetics**, v. 51, n. 1, p. 43–58, 2007.

TOOMEY, R. E.; WAKIL, S. J. Studies on the Mechanism of Fatty Acid Synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 12, p. 1159–1165, 1968.

TURGEON, B. G.; OIDE, S.; BUSHLEY, K. Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants. **Mycological research**, v. 112, n. Pt 2, p. 200–6, fev. 2008.

URIBE-J, F. *et al.* Histopathology of chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 105, n. 1, p. 1–6, jan. 1989.

VISCA, P.; CIERVO, A.; ORSI, N. Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N⁵-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 4, p. 1128–40, fev. 1994.

VOISARD, C. *et al.* *urbs1*, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 11, p. 7091–100, nov. 1993.

WALLNER, A. *et al.* Ferricrocin, a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4194–4196, 2009.

WANG, T. P. *et al.* Targeted suppression of the ferroxidase and iron trafficking activities of the multicopper oxidase Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 611–620, 2003.

WARTMANN, T. *et al.* Post-translational modifications of the AFET3 gene product - A component of the iron transport system in budding cells and mycelia of the yeast *Arxula adenivorans*. **Yeast**, v. 19, n. 10, p. 849–862, 2002.

WEINBERG, E. D. **Iron availability and infection** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* Elsevier B.V., 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.002>>

WEISSMAN, Z.; KORNITZER, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1209–1220, 2004.

WEISSMAN, Z.; SHEMER, R.; KORNITZER, D. Deletion of the copper transporter CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1551–1560, 2002.

WELZEL, K. *et al.* Characterization of the ferrichrome A biosynthetic gene cluster in the homobasidiomycete *Omphalotus olearius*. **FEMS microbiology letters**, v. 249, n. 1, p. 157–63, 1 ago. 2005.

WILKINSON, B.; MICKLEFIELD, J. Chapter 14. Biosynthesis of nonribosomal peptide precursors. **Methods in enzymology**, v. 458, n. A, p. 353–78, 2009.

WINKELMANN, G. Siderophore Transport in Fungi. In: **Microbial Transport Systems**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2001. v. 9p. 463–480.

WON, H. J. *et al.* Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Biology**, v. 4, n. 12, p. 2282–2295, 2006.

YAMADA, O. *et al.* dffA gene from *Aspergillus oryzae* encodes L-ornithine N5-oxygenase and is indispensable for deferri-ferrichrysin biosynthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 1, p. 82–88, 2003.

YAMAMOTO, M. *et al.* Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. **Genes & development**, v. 4, n. 10, p. 1650–62, out. 1990.

YASMIN, S. *et al.* Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. E497-504, 21 fev. 2012.

YOUSEFF, B. H. *et al.* Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.

YUAN, W. M. *et al.* Characterization of the *Ustilago maydis* sid2 gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 13, p. 4040–4051, 2001.

YUN, C. *et al.* Desferrioxamine-mediated Iron Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10709–10715, 2000a.

YUN, C. W. *et al.* Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16354–16359, 2000b.

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

ZHANG, N. *et al.* Iron, oxidative stress, and virulence: roles of iron-sensitive transcription factor Sre1 and the redox sensor ChA1 in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI**, v. 26, n. 12, p. 1473–85, 2013b.

ZHOU, L. W.; HAAS, H.; MARZLUF, G. A. Isolation and characterization of a new gene, sre, which encodes a GATA-type regulatory protein that controls iron transport in *Neurospora crassa*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 259, n. 5, p. 532–40, 29 set. 1998.