

**CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE MELANINA PELO
FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans* E AVALIAÇÃO
DA SUA PARTICIPAÇÃO NA ATIVIDADE PREDATÓRIA**

DEIVID FRANÇA FREITAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Junho/2017

**CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE MELANINA PELO
FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans* E AVALIAÇÃO
DA SUA PARTICIPAÇÃO NA ATIVIDADE PREDATÓRIA**

DEIVID FRANÇA FREITAS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular.

ORIENTADOR: PROF. DR. CLÓVIS DE PAULA SANTOS

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Junho/2017

CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE MELANINA PELO FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans* E AVALIAÇÃO DA SUA PARTICIPAÇÃO NA ATIVIDADE PREDATÓRIA

DEIVID FRANÇA FREITAS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular.

APROVADO EM: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Marcelo Beltrão Molento (Doutor em Parasitologia) – UFPR

Dr. Olney Vieira-da-Motta (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Dra. Valdirene Moreira Gomes (Doutora em Ciências Biológicas) – UENF

Dr. Clóvis de Paula Santos (Doutor em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária- Orientador) – UENF

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o que mais importa é o decidir”

Cora Coralina

Dedico a todos aqueles que contribuíram para a minha formação, em especial ao meu pai Gustavo de Freitas (*In Memoriam*) e a minha mãe Regina Coeli da Silva França, por todo o seu empenho, amor e dedicação e que incansavelmente acreditou em mim, mesmo quando eu mesmo em alguns momentos desacreditei-me.

AGRADECIMENTOS

À FAPERJ e à UENF pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Clóvis de Paula Santos que acreditou em meu potencial desde o princípio do meu doutoramento, pelos seus ensinamentos, conselhos, conversas, pela sua amizade e pela sua orientação. Sendo assim, não dizem por aí que o orientado é o espelho de seu orientador? Pois bem, se existe um professor ao qual tenho me espelhado certamente este tem sido você! Muito obrigado!

Ao professor Dr. Olney-Vieira-da-Motta por tudo que me significou durante o caminhar desta tese, principalmente nos momentos em que eu me senti sem rumo e desmotivado. Pelos seus ensinamentos e pelo seu carinho e pela sua parceria no Laboratório de Doenças Infecciosas do LSA.

Aos meus familiares, em especial Jorge Francisco Chrisóstimo Coelho, primo e irmão, sempre me incentivando nos momentos difíceis.

Ao Daniel da Silva Gomes, por estar ao meu lado durante a minha caminhada acadêmica que por vezes era desanimadora, mas sempre com uma palavra de acalento, incentivo e conforto, pois sem o mesmo este caminho seria mais difícil.

À minha irmã Mayra Freitas por toda ajuda necessária no caminhar desta tese, ao meu irmão Gustavo França Freitas e meu cunhado Tiago Moura.

À Marcele Temporim Novaes que em todas as horas sempre esteve disposta a me ouvir com atenção e carinho.

À aqueles que mesmo tendo participação secundária em minha formação, merecem a minha lembrança.

À Luciana Mathias pelos ensinamentos e pela amizade a mim confiada.

Aos meus amigos mais próximos Valdenísio Egramphonte e Anderson Silveira que sempre me ouviram ou me deram algum conselho quando preciso.

Aos colegas de bancada Letícia Oliveira, Lara Pereira, Josiana Gomes, Jordana Andrioli e tantos outros que merecem a minha consideração e nem por isso menos importantes.

Às técnicas dos laboratórios do CBB/LBCT e do HOVET/LSA pelo apoio técnico durante o desenvolvimento desta tese.

À Sra. Sueli e ao Sr. Ely pela ajuda na esterilização, descontaminação e lavagem de materiais.

À aqueles que não acreditaram no meu potencial ou que sempre me criticaram por alguma razão. A esses eu agradeço de coração, pois sem eles eu não teria combustível para seguir sempre em frente e chegar cada vez mais longe.

Ao Laboratório de Sanidade Animal por me receber de braços abertos e pelo auxílio necessário para a realização deste trabalho.

A todos, meu sincero muito obrigado!

SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Melaninas: Estrutura e Formação	17
2.2. Eumelaninas	19
2.3. Feomelaninas	21
2.4. Alomelaninas	23
2.5. Enzimas Relacionadas à Síntese de Melanina em Microrganismos	24
2.5.1. Tirosinases	24
2.5.2. Laccases	26
2.5.3. Policétideo Sintase (PKS)	28
2.6. Síntese de Melanina	29
2.7. Triciclazol como Inibidor da Síntese de Melanina	32
2.8. Melanina como Fator de Virulência e Patogenicidade em Fungos	33
2.9. Melanina como Fator de Resistência e Proteção	35
2.10. Classificação dos Fungos Nematofagos	37
2.11. Gênero <i>Duddingtonia</i>	38
2.12. Nematóide Avaliado como Modelo Experimental	40
2.12.1. <i>Panagrellus</i> spp.	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivos Específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Cultivo e Avaliação das Concentrações de Glicose e pH	43
4.2. Influência do Inibidor Tricyclazol sobre a Pigmentação	43
4.3. Isolamento e Purificação do Pigmento Melanina	43
4.4. Espectroscopia de Infravermelho (IV)	44
4.5. Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	44
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	45
4.7. Avaliação da Cinética Predatória e Produção da Melanina durante Interação Fungo – Nematóide	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Efeito do Meio de Cultura sobre a Pigmentação	47

5.2. Análise do espectro por infravermelho (IV)	48
5.3. Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	49
5.4. Inibição da Melanização sob a Presença de Tricyclazol (Sigma® Aldrich, USA)	51
5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão MET	51
5.6. Avaliação da Cinética Predatória e Produção da Melanina durante Interação Fungo - Nematóide	54
6. DISCUSSÃO	57
6.1. Caracterização do Pigmento Melanina em Culturas de <i>D. flagrans</i>	57
6.2. Cinética Predatória e Produção da Melanina durante Interação Fungo – Nematóide	63
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Síntese da eumelanina na matriz melassomal em células de organismos melanogênicos	21
Figura 2. Modelo esquemático da síntese de feomelanina após etapa da eumelanogênese via tirosina	22
Figura 3. Síntese de alomelanina- DHN melanina	23
Figura 4. Ciclo catalítico de monofenolase e difenolase para tirosinase fúngica	25
Figura 5. Esquema representivo da melanogênese via DOPA e DOPAquinona via clássica Mason-Raper	28
Figura 6. Caracterização ultraestrutural dos estádios de maturação dos melanossomos em células de mamíferos	31
Figura 7. Pigmentação das colônias de <i>Duddingtonia flagrans</i> em meio SDA com e sem adição de L-DOPA	47
Figura 8. Pigmentação das colônias de <i>Duddingtonia flagrans</i> em meio SDA suplementado com L-DOPA e com adição de glicose	48
Figura 9. Análises obtidas por meio do Infravermelho (IV)	49
Figura 10. Espectros obtidos por meio de RPE	50
Figura 11. Pigmentação das colônias de <i>D. flagrans</i> com adição do inibidor de melanina Tricyclazol	51
Figura 12. Cortes ultrafinos de <i>D. flagrans</i> demonstrando a localização das partículas eletrondensas de melanina	52
Figura 13. Redução de partículas eletrondensas em cortes de <i>D. flagrans</i> tratados com Tricyclazol na concentração de 16 mM	53
Figura 14. Caracterização ultraestrutural do melanossomo em <i>D. flagrans</i>	54
Figura 15. Formação das estruturas de predação durante a interação entre <i>D. flagrans</i> e <i>Panagrellus</i> spp.	56

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Cinética de captura e infecção durante a interação fungo-nematoide para o fungo <i>D. flagrans</i> em três situações	55

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- L-DOPA** - L-3,4-dihidroxifenilalanina
- DHN**- 1,8-di-hidroxinaftaleno
- RPE**- Ressonância Paramagnética Eletrônica
- DHI**- 5,6-dihidroxiindole
- TRP**- Tirosinase
- DHICA**- 5,6- dihidroxiindole-ácido-2-carboxílico
- TRP1**- Tirosinase associada a uma proteína do tipo 1
- TRP2**- Tirosinase associada a uma proteína do tipo 2
- TyrAT**- Tirosina aminotransferase
- Cu**- Cobre
- THN**- 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
- PKS**- Policetídeo sintase
- MITF**- Microftalmia
- THN4**- 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno
- 2-HJ**- 2-hidroxijulgone
- GDHB**- glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno
- PAR-2**- Receptor ativado por protease do tipo 2
- DCT**- DOPAcromo tautomerase
- PMEL**- Proteína pré-melanossomo
- MET**- Microscopia eletrônica de transmissão
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral
- CIM**- Concentração inibitória mínima
- UV**- Radiação ultravioleta
- YPD**- Extrato de levedura
- BDA**- Ágar batata dextrose
- MM**- Meio mínimo
- SDA**- Sabouraud dextrose ágar
- PBS**- Tampão fosfato salino
- HCl**- Ácido clorídrico
- KBr**- Brometo de potássio
- IV**- Infravermelho

RESUMO

Melaninas formam um grupo diverso de pigmentos sintetizados na maioria dos organismos por meio da hidroxilação e polimerização de compostos orgânicos. Nos fungos, a melanina exerce um importante papel na proteção contra as intempéries ambientais, a radiação ultravioleta, extremos de temperaturas, além de aumentar a virulência e a patogenicidade destes organismos. Assim, buscou-se descrever a síntese de melanina em *Duddingtonia flagrans*, fungo nematófago, e a relação da melanização sobre a cinética de predação do nematoide *Panagrellus* spp. Para tal foram testados diferentes meios de cultura na presença e na ausência de precursores L-DOPA, na adição de glicose e do inibidor tricyclazol. As análises foram realizadas por espectroscopia de infravermelho, ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e microscopia eletrônica de transmissão. O melhor crescimento e a melanização do fungo ocorreram em meio Sabouraud dextrose quando comparado aos demais meios utilizados, após 21 dias incubados a 30°C. O acréscimo de glicose nas concentrações de 2% a 10% (v/w) não inibiu o processo de melanização em *D. flagrans*. Entretanto acréscimos de 2% de glicose em pH 5,0 observou-se um aumento na coloração em relação aos demais tratamentos. Nas concentrações de glicose acima de 10% ocorreu a inibição completa do crescimento. Como conclusão pode-se confirmar a presença do pigmento melanina e atribuir os valores obtidos por RPE ($g=2.0051 \pm 0.0001$) a produção de feomelanina pelo fungo. Ainda, pode-se verificar a deposição dos grânulos de melanina sobre a parede celular. A síntese da melanina ocorreu em melanossomos e sua gênese é análoga a de melanossomos de células de mamíferos. Contudo, a presença de melanina não influenciou de forma significativa a cinética de predação entre o fungo e nematoide.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*, melanina, fungo nematófago, L-DOPA, tricyclazol.

ABSTRACT

Melanins form a diverse group of pigments synthesized in most organisms through the hydroxylation and polymerization of organic compounds. In the fungi, melanin has an important role in protecting against environmental inclemencies, ultraviolet radiation, temperature extremes, virulence and pathogenicity of these organisms. Thus, we attempted to describe the melanin synthesis in *Duddingtonia flagrans*, nematophagous fungus, and the relationship between melanization and predation kinetics of *Panagrellus* spp. nematode. For this, different culture media were tested in presence and in absence of L-DOPA precursors, in addition of glucose and tricyclazole inhibitor. The analysis were realized by infrared spectroscopy, electronic paramagnetic resonance (EPR) and transmission electron microscopy. The better growth and melanization of the fungus occurred in Sabouraud dextrose medium when compared to other media used after 21 days incubated at 30°C. The addition of glucose at 2% to 10% (v/w) concentrations did not inhibit the melanization process in *D. flagrans*. However, the addition of glucose at 2% at pH 5.0, it was observed an increase staining in relation to others treatments. In the glucose concentrations above 10% occurred complete inhibition of growth. It was confirmed the presence of melanin pigment and to assign the values obtained by RPE ($g=2.0051 \pm 0.0001$) to production of pheomelanin by the fungus. And it was observed the deposition of the melanin granules on the cell wall. Melanin synthesis has occurred in melanosomes and its genesis is analogous to that of mammalian cell melanosomes. However, the presence of melanin did not significantly influence the kinetics of predation between the fungus and the nematode.

Key words: *Duddingtonia flagrans*, melanin, nematophagous fungus, L-DOPA, tricyclazol.

1. INTRODUÇÃO

Melaninas são substâncias amorfas formadas pela polimerização de compostos fenólicos e indólicos e encontrada em todos os reinos biológicos, o que as colocam em uma posição de destaque na escala evolutiva (Solano, 2014). Dentre as vantagens atribuídas aos portadores de melanina destacam-se a proteção contra a radiação ultravioleta (Allam et al., 2014), a contaminação radioativa em reatores nucleares (Dadachova et al., 2007; Zhdanova et al., 2000), a danos traumáticos (Treseder e Lennon, 2015), ao estresse oxidativo e osmótico (Kejzar et al., 2013), a extremos de temperaturas e pressão (Plonka e Grabacka, 2006). Além de participarem integralmente do aumento do processo de virulência e patogenicidade em muitas espécies de fungos (Tian et al., 2003; Casadevall et al., 2012).

Os pigmentos de melanina são muito comuns no reino Fungi (Solano, 2014), embora a melanogênese esteja restrita a certos estádios do desenvolvimento do micélio, na esporulação ou em reações defensivas contra danos ocasionados no ambiente em que vivem. Sendo assim, esses pigmentos são abundantes e podem ser encontradas associadas a parede celular ou em organelas subcelulares especializadas (Franzen et al., 2008).

Usualmente, os organismos produtores de melanina podem sintetizá-la por duas principais vias: por meio de um substrato de origem endógena, neste caso pela ação de 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN) e de policetídeos ou alternativamente por meio de uma via exógena com a participação de L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) (Almeida-Paes et al., 2009). Em fungos, incluindo as leveduras, estes precursores de melanina, DHN e L-DOPA, são segregados, oxidados e exteriorizados na parede celular do fungo melanizado (Figueiredo-Carvalho et al., 2014).

Apesar da importância e ubiquidade deste pigmento, sua elucidação ainda é inconclusa, uma vez que a melanina é praticamente insolúvel em solventes orgânicos o que dificulta sua investigação por técnicas bioquímicas convencionais, além de serem moléculas estruturalmente complexas, diversas e ainda indefinidas (Eisenman e Casadevall, 2012).

Entre a diversidade de fungos existentes na natureza, os fungos nematófagos que são aqueles com a habilidade de capturar e preda

nematóides, são de interesse dado seu potencial como biocontroladores (Larsen, 2006).

Monacrosporium haptotilum e *Arthrobotrys oligospora*, ambos fungos nematófagos, expressaram tirosinase (Meerupati et al., 2013) uma proteína que regula positivamente a estrutura de captura em comparação com outras proteínas encontradas no micélio em *M. haptotilum* (Andersson et al., 2013).

Em fungos, as tirosinases são enzimas citosólicas, envolvidas na melanogênese, com considerável heterogeneidade em relação a outras enzimas (Bell e Weeler, 1986). Estas possuem uma gama de pesos moleculares e estão geralmente associadas com a formação e estabilidade de esporos, em mecanismos de defesa e aumento da virulência, regeneração de tecidos em casos de danos traumáticos, além do papel fundamental na pigmentação em algumas espécies de fungos, dessa forma, a tirosinase é uma enzima envolvida na síntese e manutenção da melanina (Halaouli et al., 2006).

A presença de melanina na parede celular dos fungos pode aumentar a sobrevivência das espécies em ambientes extremos e severos com alternâncias de temperaturas, que podem incluir as regiões polares ou desertos, no interior de maquinários domésticos, local em que eles aparentemente resistem ao calor e a ação de detergentes (Zalar et al., 2011), e até mesmo a ambientes inóspitos, como em reatores nucleares contaminados pela radiação (Dadachova et al., 2007; Rosa et al., 2010).

Duddingtonia flagrans, outro fungo nematófago, é espécie única deste gênero e um dos principais fungos pesquisados como agente de controle biológico para nematóides gastrintestinais de ruminantes (Larsen, 2006, Silva et al., 2013; Buzatti et al., 2015; Andrade et al., 2016). Este possui a capacidade de produzir conídios e grande número de estruturas reprodutivas conhecidas como clamidósporos, um tipo de esporo de parede mais espessa, coloração marrom claro e de maior resistência (Rubner, 1996). Esta parede celular é tida como responsável pela maior tolerância dos clamidósporos ao trânsito gastrintestinal após sua administração oral fazendo com que *D. Flagrans* suporte melhor o estresse digestivo do que outras espécies de fungos nematófagos e assim, fomentando o interesse no seu estudo. Uma vez estabelecido o fungo nas fezes, a presença de larvas infectantes e de nematóides de vida livre estimulam a produção de hifas adesivas em forma de

armadilhas que aprisionam e matam estes nematoides reduzindo a contaminação das pastagens (Braga e Araújo 2014).

Por se tratar de um polímero com características singulares, as melaninas tem despertado grande interesse, principalmente pelas indústrias em todo mundo (Lopes et al., 2013). O estudo mais aprofundado sobre a sua síntese, estrutura, localização e o seu papel biológico na sobrevivência dos fungos melanizados podem auxiliar na compreensão de como esta macromolécula atua nos processos biológicos e nas interações ecológicas na constante luta pela sobrevivência (Solano, 2014).

Assim, devido à escassez de estudos sobre o processo melanogênico em fungos nematófagos e a importância deste pigmento em fungos, buscou-se investigar a sua presença, localização e sua influência na cinética de predação em *D. flagrans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Melaninas: Estrutura e Formação

As melaninas são pigmentos que em termos evolutivos, talvez tenham surgido nos primórdios da vida na Terra, desde os tempos dos dinossauros e cefalópodes primitivos de 160 milhões de anos (Glass et al., 2012); sendo contemporaneamente encontradas em todos os reinos biológicos (Solano, 2014).

Conferem aos organismos portadores uma variedade de funções dentre as quais destacam-se o aumento da virulência e patogenicidade em microrganismos, aumento da resistência a antibióticos e antifúngicos, proteção contra radiação ultravioleta e nuclear, além responderem de forma positiva contra diferentes poluentes de origem antropogênica (Zhdanova et al., 2000; Tian et al., 2003; Casadevall et al., 2012; Treseder e Lennon, 2015).

O termo melanina provém do grego “melanos” que significa “escuro”, sendo que a terminologia melanina, foi utilizada pela primeira vez em 1840 pelo químico sueco Berzelius. Ele encontrou e batizou um pigmento de cor escura extraído da membrana dos olhos de alguns animais (D’ischia et al., 2013).

O suíço Bruno Bloch, inspirado por estas descobertas, demonstrou que os grânulos de melanina eram depositados no citoplasma de células, geralmente localizados na membrana basal da epiderme, e denominou estas células especializadas de melanoblastos, células precursoras de melanócitos. E ainda evidenciou que o efeito catalisador da oxidação da dihidroxifenilalanina (DOPA-melanina) devido à ação de uma enzima que ele denominou de DOPA-oxidase (Bloch, 1927). No entanto, até aquele momento, DOPA-melanina não havia sido descrita em mamíferos e tão pouco se conhecia ligação da molécula melanina com a tal enzima isolada por Bloch no início do século passado (Simon et al., 2009).

Em geral, as melaninas são compostos fenólicos de alto peso molecular, insolúveis, hidrofóbicas que possuem como base estrutural domínios indólicos representadas covalentemente em estruturas emparelhadas e unidas por interações do tipo Van de Waals (Chatterjee et al., 2012; Figueiredo-Carvalho et al., 2014).

Estruturalmente, as melaninas são um grupo de pigmentos complexos, com uma estrutura diversa e indefinida. Não existindo uma regularidade molecular que possa representá-las de forma concreta ou que as enquadre em qualquer classificação estrutural (Solano, 2014). Além de não existir evidência de cristalinidade que as distinga, pois a maioria das definições propostas apresentam pequenas falhas devido à dificuldade em se definir algo com uma vasta diversidade de composição, cor, tamanho, ocorrência e funções (Treseder e Lennon, 2015).

Alguns modelos estruturais propostos para melaninas comerciais, formados pela oxidação de precursores difenólicos como DOPA-melanina (Ito, 1986) classificam as melaninas como um heteropolímero disposto em uma pilha de oligômeros de quatro a sete monômeros (Duff et al., 1988). No entanto, este modelo descrito por meio de análises por difração de raios-X pode conter algumas falhas quando comparado ao polímero natural, uma vez que seus intrínsecos detalhes estruturais podem variar entre os tipos de melaninas distribuídas e entre os diferentes reinos biológicos (D'ischia et al., 2013).

A base estrutural conhecida por meio da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) ainda é limitada pela exiguidade de informações estruturais

existentes, mas em contrapartida bem definidas, no que diz respeito as suas possíveis ligações covalentes à proteínas, lipídios e carboidratos (Chatterjee et al., 2012).

A característica principal para que as melaninas possam ser representadas provém obviamente e unicamente por uma série de estudos realizados por meio da difração por raios-X, que revelaram uma característica distintiva, um curioso espaçamento entre as moléculas da ordem de 0,34 nm. Fato este, não encontrado em nenhum outro biopolímero, exceto entre a separação das bases nitrogenadas de DNA (Thathachari, 1976; Zajac et al., 1994).

Entretanto, Cadasevall et al. (2012) ao estudarem as características estruturais da melanina por meio da difração por raios-X em cepas de *Cryptococcus neoformans*, observaram que as estruturas planares da melanina encontrada neste fungo produziam picos agudos no espectro de difração em relação a distância umas das outras. Assim notaram uma singela diferença nas distâncias existentes entre a melanina extraída da cepa estudada em relação as estruturas planares das melaninas sintéticas utilizadas como controle. Foi sugerido diferenças entre as estruturas das melaninas sintéticas e as produzidas por *C. neoformans*, o que reforça a ideia de que estes compostos podem assumir uma grande variedade de configurações e formas.

Rodolfo Nicolaus em 1969 classificou as melaninas em três diferentes grupos: as eumelaninas, feomelaninas e alomelaninas. Os dois primeiros grupos compreendem pigmentos de origem animal, presente principalmente na pele. O segundo tipo que engloba uma ampla variedade de pigmentos escuros não-nitrogenados presentes em plantas, algumas espécies de fungos e bactérias. E o último grupo, alomelaninas, presente apenas em fungos e plantas (Nicolaus, 1969). Em uma classificação mais recente, ocorreu a inclusão de outro grupo de melanina, conhecida como neuromelanina. Este grupo estão presentes apenas em células nervosas animais (Magarelli et al., 2010).

2.2. Eumelaninas

As eumelaninas são macromoléculas de cores pretas ou marrons produzidas pela polimerização oxidativa da tirosina pela ação da enzima

tirosinase em dihidroxifenilalanina (DOPA) e DOPA-quinona (Sarna e Plonka, 2005). Essa reação inclui uma série de ciclização, que leva a formação de monômeros indólicos intermediários conhecidos como DOPACHROMO que posteriormente sofrem uma descarboxilação para formação dos compostos 5,6-dihidroxiindole (DHI) ou ainda pode ser catalizada por tirosinase associada a proteínas (TRP2 e TRP1) para produção de 5,6- dihidroxiindole-ácido-2-carboxílico (DHICA) para finalmente serem oxidados para formação de eumelanina (Solano, 2014).

As eumelaninas foram identificadas principalmente em cefalópodes marinhos (Palumbo et al., 1994), em humanos, fato que pode ser notado facilmente pela coloração dos pelos e cabelos de indivíduos juvenis devido a abundância do pigmento (Robbins, 2012), na formação exocuticular de insetos (Nappi e Sugumaran, 1994) e para alguns grupos de bactérias, como *Streptomyces antibioticus*, a produção de eumelanina pode ser utilizada como componente taxonômico (Chen et al., 1992).

Portanto essas macromoléculas heterogêneas podem assumir duas formas distintas ao longo de sua síntese, dependendo das posições e dos acoplamentos envolvidos (Meredith e Sarna, 2006). Sendo que a proporção destes varia de acordo com o tipo de eumelanina produzida, o que irá depender do local onde esta melanina será requerida, conforme demonstrado na figura 1 (Plonka e Grabacka, 2006; Chatterjee et al., 2012).

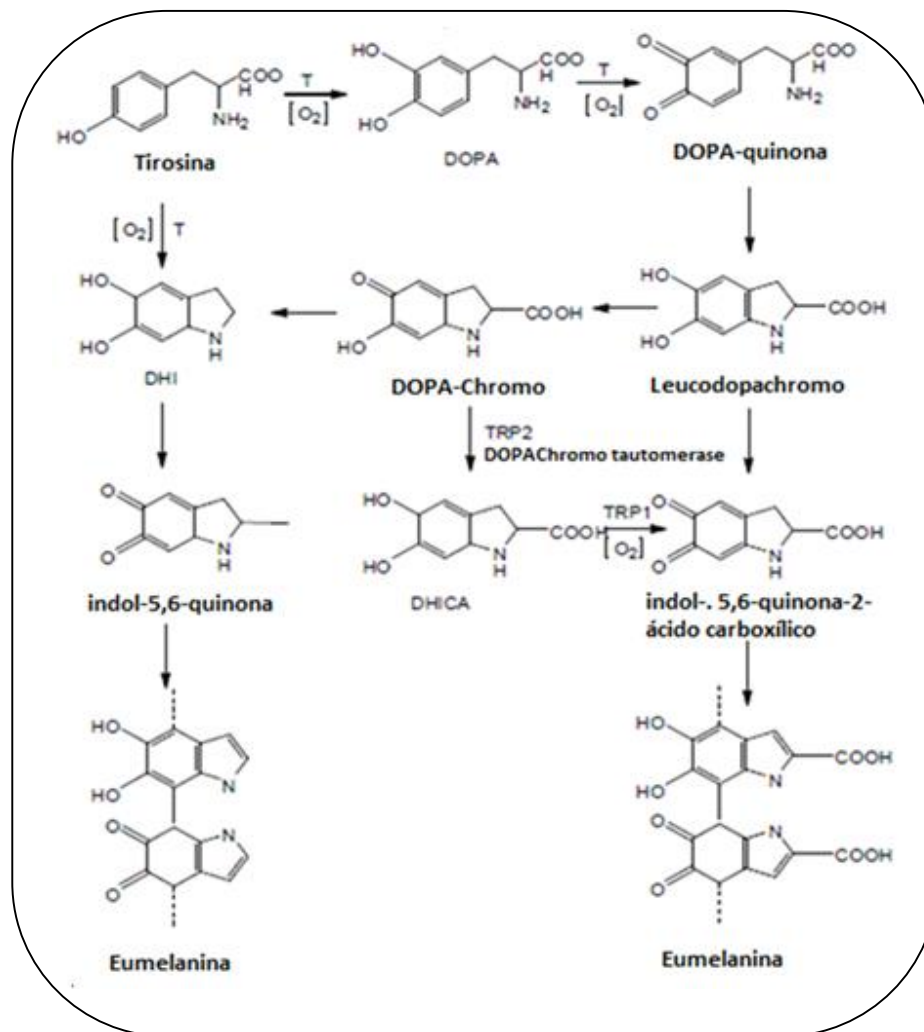


Figura 1. Síntese da eumelanina na matriz melassomal em células de organismos melanogênicos. T- tirosinase; TRP1- tirosinase associada a uma proteína do tipo 1(DHICA oxidase); TRP2- tirosinase associada a uma proteína do tipo 2 (DOPACHromo tautomerase); DOPA-3,4-dihidroxifenilalanina; DHI- 5,6-dihidroxiindole; DHICA- 5,6-dihidroxiindole-ácido-2-carboxílico Fonte: Plonka e Grabacka, 2006.

2.3. Feomelaninas

Biopolímeros de coloração amarelo-avermelhada que são sintetizados *a priori* como eumelaninas, também derivadas do precursor DOPAquinona, porém, na feomelanogênese, a atividade e a expressão da tirosinase é reduzida (Barber et al., 1985). Durante a feomelanogênese, tióis assumem o papel da tirosinase para cisteinização da DOPAquinona por meio da cisteína em cisteinilDOPA ou por intermediação da glutatona em glutatiónilDOPA

(Kobayashi et al., 1995). Subsequentemente após uma série de reações ainda desconhecidas sofre polimerização para produzir alguns derivados de benzotiazina (5-hidroxi-1,4- benzotiazinilalanina) que resultará na formação de macromoléculas de alto peso molecular conhecidas como feomelaninas (Fig. 2) (Chang, 2009).

Muitos organismos foram descritos como feomelanogênicos incluindo répteis, mamíferos e pássaros (Solano, 2014), porém a ocorrência do pigmento em fungos apresentava algumas falhas, uma vez que esta era apenas configurada devido a coloração marron-amarelada observada macroscopicamente em algumas espécies (Ye et al., 2011), e também pela presença de grupos tióis associados aos oligômeros de melanina (Ito e Wakamatsu, 2003).

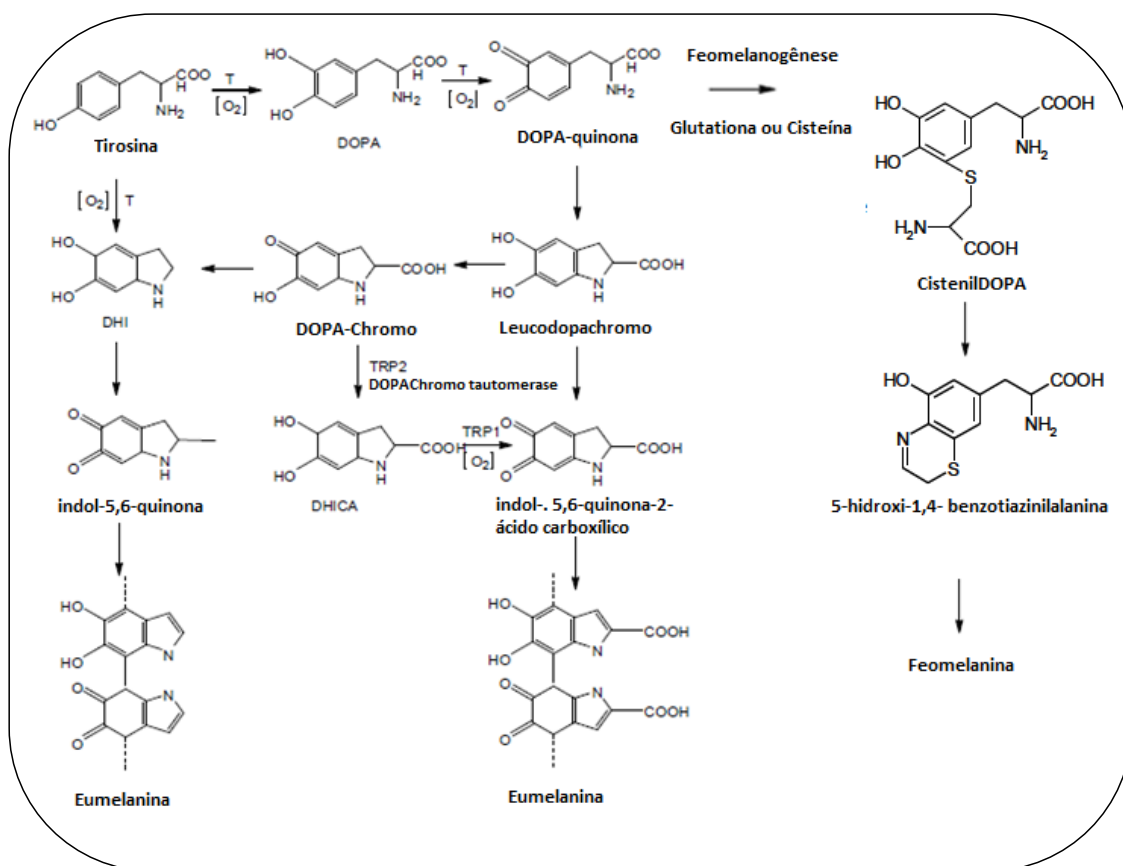


Figura 2. Modelo esquemático da síntese de feomelanina após etapa da eumelanogênese via tirosina. Na feomelanogênese a glutationa ou a cisteína assumem a função da tirosinase e convertem DOPAquinona em CistenilDOPA e derivados de Benzotiazina para a produção de Feomelanina. Fonte: Chang, 2009.

2.4. Alomelaninas

As alomelaninas denotam de um tipo de pigmento não animal resultante da oxidação de fenóis, desprovidos de nitrogênio, pertencentes a um grupo de polímeros heterogêneos que estão presentes em plantas, alguns ascomicetos do gênero *Tuber* (De Angelis et al., 1996), *Aspergillus* (Wheeler, 1983) e deuteromicetos de coloração marrom escuro para preto (Chang, 2009; Solano, 2014).

A síntese inicia-se pela entrada de acetil-CoA ou malonil-CoA (Adachi e Hamer, 1998). Dessa forma, o primeiro passo, é a formação de 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN), que é catalisado por uma PKS em uma série de reações de redução e de desidratação para produção de intermediários, dentre os quais, destaca-se a scitalona, pela ação da enzima catalisadora THN redutase. A desidratação da scitalona produz 1,3,6-trihidroxinaftaleno e vermelona, por meio de outras redutases e finalmente ocorre a polimerização destes compostos o que leva a formação de 1,8-dihidroxinaftaleno, DHN-melanina, como demonstrado na figura 3 (Langfelder et al., 2003; Eisenman e Casadevall, 2012).

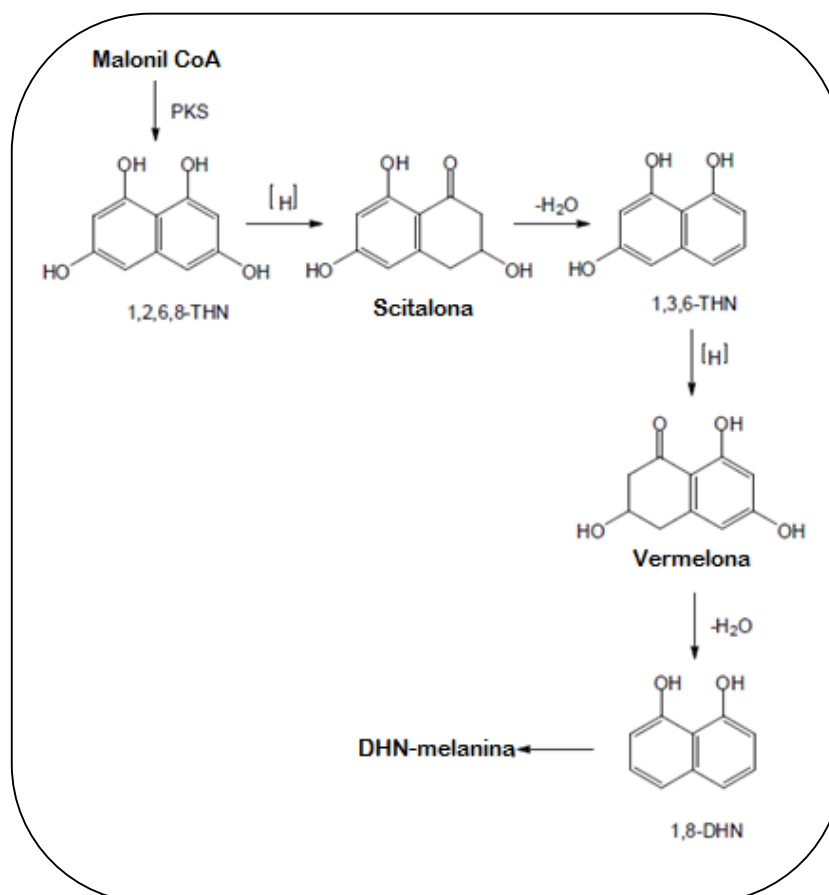


Figura 3. Síntese de alomelanina- DHN melanina. PKS- poliketídeo sintase; 1,3,6,8-THN- 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno; 1,3,6-THN- 1,3,6-trihidroxinaftaleno; 1,8-DHN- 1,8-dihidroxinaftaleno. Fonte: Plonka e Grabacka, 2006.

2.5. Enzimas Relacionadas à Síntese de Melanina em Microrganismos

2.5.1. Tirosinases

As tirosinases (Polifenol-oxidase EC 1.14.18.1) surgiram na Terra em consequência das transformações químicas existentes na atmosfera primitiva, transiente talvez da mudança de um sistema exclusivamente redutor para um oxidante, resultante do surgimento da fotossíntese (Plonka e Grabacka, 2006).

As primeiras referências sobre o possível papel das tirosinases na melanogênese fúngica foram propostas em 1895, quando Bourquelot e Bertrand observaram a presença da enzima no fungo *Russula nigricans*. Desde então, a tirosinases tem sido encontrada amplamente por toda a escala filogenética, distribuída desde as bactérias a mamíferos (Chang, 2009).

As tirosinases pertencem à família das hemocianinas presentes em moluscos e insetos, assim como as catecol-oxidases em plantas (Chang, 2009). As tirosinases envolvidas na formação de melanina podem apresentar-se sob três diferentes formas: as oxi, met, e deoxi-tirosinases (Solano, 2014). Nessas diferentes formas dois átomos de cobre (CuA e CuB) estão interligados a três moléculas de histidina e distribuídos sobre sítios específicos de ligação. Esses sítios catalisam reações de oxidações em monofenóis (ciclo creolase ou monofenolase) e em difenóis (ciclo catecolase ou difenolase). Ambas as reações utilizam oxigênio molecular, participantes nas reações de síntese de melanina para formação de quinonas (Langfelder et al., 2003; Chang, 2012).

No ciclo monofenolase, um monofenol reage com a forma oxi sendo catalisada em um o-difenol, o qual é oxidado em uma o-quinona, que resulta em uma forma deoxi pronta para uma posterior ligação dioxigênio (Chang, 2012). A oxi-tirosinase é, então, regenerada após a ligação do oxigênio molecular à deoxi-tirosinase. Se apenas o- difenol estiver presente, (ciclo difenolase) ambas as formas, oxi e met, poderão reagir com o-difenol, oxidando-o para formar uma o-quinona (Halaouli et al., 2006). Posteriormente,

o-difenol liga-se à forma oxi e é oxidado para *o*-quinona, obtendo-se assim a forma met da enzima. Esta por sua vez, transforma outra molécula de *o*-difenol em *o*-quinona que é finalmente reduzida para a forma deoxi, conforme demonstrado na figura 4 abaixo (Chang, 2009; Chang, 2012).

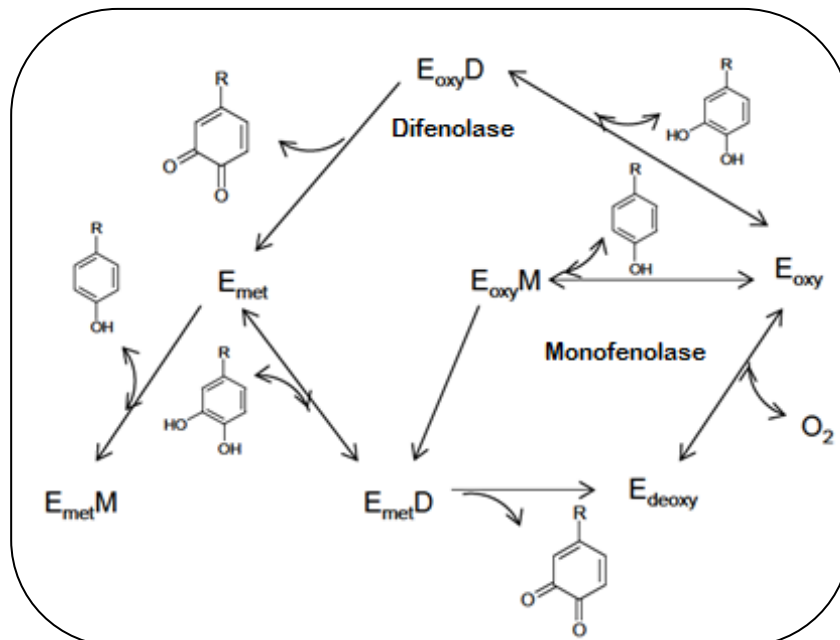


Figura 4. Ciclo catalítico de monofenolase e difenolase para tirosinase fúngica. Eoxy, Emet, E_{oxy}D, E_{oxy}M, EmetM são complexos monofenóis. Fonte: Chang, 2012.

As tirosinases atuam sobre a tirosina formando um complexo enzimático cúprico-proteico, pelo qual, o aminoácido é convertido em L-DOPA (3,4-dihidroxi-fenil-L-alanina) em uma série de reações, das quais L-DOPA é convertida em DOPACHROMO para posterior oxidação em DOPAQUINONA e finalmente polimerizada em DOPA-MELANINA (Kobayashi, 1995; Manivasagan et al., 2013).

Em mamíferos, a melanogênese é regulada pela expressão dos genes codificados pelas enzimas tirosinase, TRP-1 e TRP-2 por três vias principais. Essas vias são reguladas pelo fator de transcrição associado a microftalmia (MITF), que está diretamente relacionada a manutenção dos melanócitos (Vance et al., 2004). Essas vias de regulação são iniciadas por uma série de moléculas como interleucinas, interferon, hormônios de crescimento e prostaglandinas, as quais determinam não apenas a quantidade, mas também a qualidade da melanina produzida (Chang, 2012).

Em fungos, as tirosinases são enzimas citosólicas, envolvidas na melanogênese com considerável heterogeneidade em relação a outras enzimas, que também apresentam átomos de cobre ligados a suas moléculas (Halaouli et al., 2006). Estas possuem uma gama de pesos moleculares e estão geralmente associadas com a formação e estabilidade de esporos, em mecanismos de defesa e aumento da virulência, regeneração de tecidos em casos de danos traumáticos, além do papel fundamental no escurecimento e pigmentação em algumas espécies de fungos (Selinheimo et al., 2007; Van Gelder et al., 1997; Halaouli et al., 2005).

2.5.2. Laccases

As Laccases (benzenediol:oxigênio-oxidoreductase EC 1.10.3.2), juntamente com ascorbato oxidase em plantas, assim como a ceruloplasmina sintetizada no fígado de mamíferos e as ferroxidases, são igualmente metaloproteínas que pertencem a um pequeno grupo conhecido como “proteínas azuis” (Thurston, 1994).

Estas proteínas são caracterizadas por possuírem em sua conformação quatro átomos de cobre ligados à histidina, dos quais, um está ligado a um sítio denominado de CuT1, que atua na redução de substratos e outros dois tri-átomos sob os domínios CuT2/CuT3, que são locais de redução de oxigênio, os responsáveis pela coloração azul-esverdeada (Kunamneni et al., 2007).

A laccase está amplamente distribuída entre plantas e fungos, sendo também encontrada em insetos e bactérias (Nagai et al., 2003). Belouqui et al. (2006) ao mapearem genes de expressão para polifenóis oxidases extraídos de uma comunidade microbiana no rumem de bovinos, encontraram um gene que regula uma enzima com características análogas a laccase, conhecida como RL5. Esta informação pode sugerir que esta enzima pode também estar presente na síntese de melanina destes microrganismos e atuando de alguma forma em mamíferos.

As laccases demonstram atividade fenol oxidase, além disso, podem oxidar uma vasta gama de constituintes aromáticos como aminas, N-heterociclos, fenotiazinas, grupos tióis, dentre outros (Levasseur et al., 2010). Em fungos, os principais produtores de laccase são os basidiomicetos, sabidamente conhecidos, por desempenharem importante papel na

degradação de matéria orgânica. Por este motivo, as laccases das espécies de fungos da podridão branca ou da podridão da madeira, têm sido amplamente estudadas e caracterizadas devido a sua fundamental participação na degradação da lignina (Copete et al., 2015).

O papel da laccase na melanogênese está bem descrita em *Cryptococcus neoformans* este fungo, ao contrário de outros, melaniza apenas na presença de substratos exógenos, tais como a L-DOPA. Sua melanização é catalisada pela laccase, que está associada a uma difenoloxidase que catalisa a oxidação de compostos difenólicos para produção de quinonas (Eisenman et al., 2007).

Cryptococcus neoformans presumivelmente melaniza durante o processo de invasão e infecção de mamíferos, provavelmente devido à eliminação de substratos pelos tecidos do hospedeiro (Rosas et al., 2000). *Cryptococcus neoformans* ainda pode melanizar na presença de substratos provenientes de metabólitos bacterianos, além de substratos mono ou polifenólicos (Garcia-Rivera et al., 2005; Frases et al., 2007).

A melanogênese via laccase pode ocorrer por duas formas distintas, dependendo do substrato, tanto pela oxidação de *p*-difenóis, quanto de *o*-difenóis. Assim, a oxidação por *o*-difenóis resulta na deposição de pigmentos insolúveis na parede das células e a oxidação por *p*-difenóis produz pigmentos solúveis que difundem-se entre as células (Williamson, 1998).

Chatterjee et al. (2012) ao utilizarem quatro catecolaminas precursoras de melanina como substratos: L-DOPA, metil-L-DOPA, epinefrina e norepinefrina em cepas de *C. neoformans*. Foi observado a existência de uma semelhança estrutural entre os espectros das melaninas fúngicas obtidos tanto na presença de L-DOPA quanto com metil-L-DOPA. O resultado suporta a ideia da existência de mecanismos comuns na ciclização de seus domínios indóis. Transformações metabólicas análogas seriam então excluídas pela simples presença de noradrenalina e epinefrina, uma vez que estes falham em produzir pigmentos insolúveis com domínios indóis.

A biosíntese de melanina em *C. neoformans* se dá por uma série de reações de oxi-redução onde DOPA e DOPAquinona são catalisadas por uma fenoloxidase. As subsequentes reações melanogênicas ocorrem via clássica Mason-Raper (Mason, 1955) (Fig. 5), pela qual rapidamente formam os

compostos indólicos Dopachromo e 5,6-dihidroxiindole, totalmente dependente da laccase (Polacheck e Kwon-Chung, 1988).

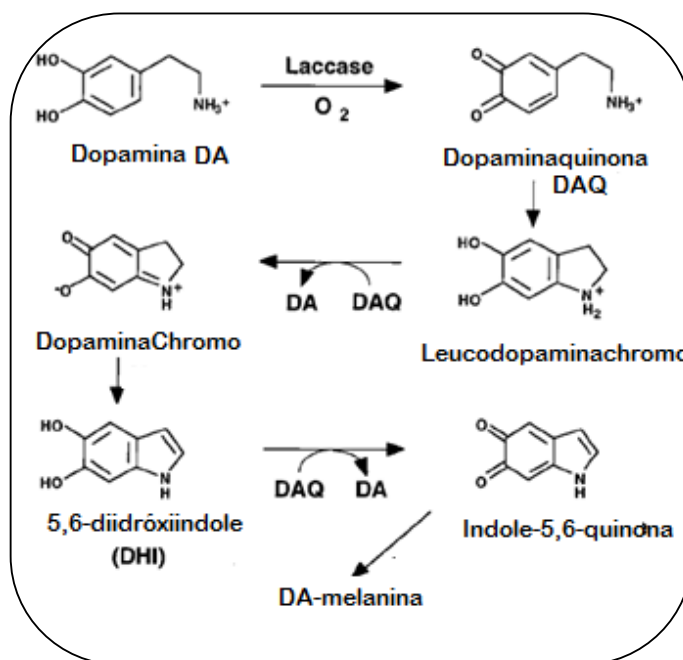


Figura 5. Esquema representivo da melanogênese via DOPA e DOPAquinona via clássica Mason-Raper (Williamson, 1998).

2.5.3. Policétideo Sintase (PKS)

Os policétideos sintases (PKSs) compreendem uma grande classe de metabólitos secundários naturais encontrados em bactérias, plantas e fungos (Pastre et al., 2007). Os PKS são sintetizados por meio de percussores acetil-CoA e são estruturalmente divididos em três classes: do tipo I, que são proteínas modulares; do tipo II que são frequentemente proteínas aromáticas e do tipo III que são pequenas moléculas aromáticas produzidas por diversos tipos de fungos. Estas enzimas são totalmente ativas em diversos sistemas biológicos (Plonka e Glabracka, 2006).

Grande parte do interesse por essas sintases provém da incomparável importância biológica que estas enzimas desempenham nos sistemas naturais, o que faz com que estas sejam potenciais candidatas para descoberta de novas drogas (Shen, 2003). Portanto, estas enzimas fornecem uma gama de oportunidades de estudo devido a sua poderosa atividade catalítica, a sua habilidade em transportar íons entre as membranas biológicas e sua notável

versatilidade na geração de novos compostos por meio da combinação de diferentes mecanismos. Sendo ainda, responsáveis por inúmeros casos de intoxicação alimentar em humanos e também pelo aparecimento do fenômeno de marés vermelhas, causadoras de grande mortalidade em peixes (Hill, 2012).

Em fungos, apenas algumas enzimas PKS estão envolvidas na melanogênese. Em espécies de coloração negra a melanização ocorre por meio de um policético similar a 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN-melanina).e em fungos de coloração marrom escuro a melanina é sintetizada por meio da polimerização de um policético proveniente do precursor 1,3,6,8-tetrahidroxi-naftaleno (THN4) por sucessivas reações de desidratação (Kroken et al., 2003). Portanto, as enzimas que pertencem ao grupo de PKS responsáveis pela síntese melanogênica em fungos são de tipo-I que produzem policetídeos aromáticos não reduzidos (Fujii et al., 2004).

2.6. Síntese de Melanina

Presente em todos os reinos biológicos, as melaninas desempenham um importante papel na proteção e virulência dos organismos que as possuem, o que faz com que seja notavelmente grande o interesse por estudar esse pigmento. Este fato é refletido diretamente nas inúmeras publicações que tratam dos diferentes aspectos relacionados à síntese e função deste polímero em fungos nas últimas décadas (Henson et al., 1999; Plonka e Grabacka, 2006; Eisenman e Cadasevall, 2012; Gessler et al., 2014; Solano, 2014).

A síntese de melanina em microrganismos de vida livre pode estar relacionada a susceptibilidade que o organismo possui por viver em um ambiente hostil sujeito a intempéries ambientais, o que lhes confere uma certa vantagem na sobrevivência em relação aos demais (Steenbergen e Cadasevall, 2003)

O pigmento melanina é muito comum em fungos, embora a melanogênese esteja restrita a certos estádios do desenvolvimento. Portanto, o biopolímero pode ser encontrado no micélio, durante a esporulação, ou devido a reações defensivas a algum dano traumático (Romero-Martinez et al., 2000; Treseder e Lennon 2015). Assim, a melanina é um composto abundante e que pode ser encontrado na parede celular, o que faz com que em fungos a

melanina usualmente seja produzida no interior da célula fúngica e em seguida carregada para fora alojando-se sobre a parede celular (Solano, 2014).

As melaninas fúngicas são carregadas negativamente e formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos tais como a glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB), ou por uma catecolamina, ou pela via 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) ou ainda pela 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) em Basidiomicetos. Contudo, a maioria dos fungos Ascomycota sintetizam melanina do tipo DHN-melanina a partir da via policetídeo sintase (Bell e Wheeler, 1986). Algumas espécies de fungos podem ser capazes de sintetizar o polímero melanina pela via exógena L-DOPA, que se assemelha ao processo de formação em células de mamíferos, embora difira em alguns detalhes (Eisenman e Casadevall, 2012).

Em mamíferos, partículas de melanina são produzidas dentro de organelas ligadas à membrana plasmática das células chamadas de melanossomos, que posteriormente são transportadas ativamente por meio de uma rede de microtúbulos pelos melanócitos aos queratinócitos por mecanismos de transferência celular ainda desconhecidos, de onde serão finalmente transferidos para as células vizinhas, chegando até a parede celular (Hara et al. 2000; Vancoillife et al., 2000; Eisenman, 2012).

A transferência de melanina para os queratinócitos, requer a ativação de um receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) pelo qual as partículas de melanina são carregadas pelas projeções dendríticas dos melanócito. Esta transferência pode ser efetuada por mecanismos distintos dos quais se destacam a citofagocitose (Seiberg, 2001). No processo por citofagocitose as projeções dendríticas dos melanócitos leva a formação de um fagolisossomo, no qual os grânulos de melanina se dispersam pelo citoplasma celular; quando a transferência ocorre por exocitose, a melanina é exteriorizada pela fusão da membrana plasmática do melanossomo com a membrana do queratinócito e em seguida englobada por endocitose ou fagocitose, ou mesmo pela fusão das membranas das organelas envolvidas que podem formar uma rede de canais que permitem a passagem de vesículas de membrana que ao final do processo acoplam-se aos queratinócitos ou podem ser diretamente ingeridos por fagocitose (Van Den Bossche et al., 2006).

Os melanossomos são organelas intracelulares com a função exclusiva de sintetizar e estocar melanina (Eisenman e Casadevall, 2012). Estas estruturas derivam dos endossomos iniciais das membranas endosomais, que são compartimentos formados a partir da endocitose pela fusão de vesículas provenientes do complexo de Golgi (Raposo e Marks, 2007). Em células animais, estas organelas maturam no interior dos melanócitos e passam por quatro estádios morfologicamente distintos conforme descrito para células de humanos e outros mamíferos (Slominski et al., 2004). Dessa forma, o primeiro e o segundo estádio, que são chamados de pré-melanossomos são caracterizados pela completa ausência de melanina e pela formação de fibras intralamelares que começam a se formar no estádio I e irão se completar no final do estádio II. Nesse estádio observa-se grande atividade de Tirosinase provenientes dos ribossomos e enviadas via retículo endoplasmático ao complexo de Golgi e armazenadas nos melanossomos (Raposo e Marks, 2007). Assim que as estriações lamelares são formadas, a síntese de melanina se inicia com a sua deposição ao longo das fibras, o que resulta em seu espaçamento e escurecimento, seguindo a maturação no estádio III e posteriormente, o completo preenchimento de suas paredes proteicas no estádio IV (Fig. 6), local com intensa atividade enzimática onde é notável a presença de Tirosinase, TRP1 e DOPAcromo Tautomerase, também conhecida como DCT ou TRP2 (Miot et al. 2009).

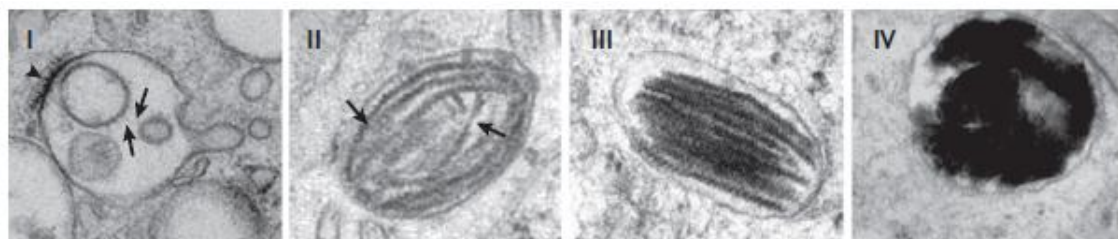


Figura 6. Caracterização ultraestrutural dos estádios de maturação dos melanossomos em células de mamíferos. Etapas que se iniciam no estádio I com a formação das estruturas lamelares até seu completo preenchimento com o pigmento melanina no estádio IV. As setas indicam as vesículas intralumelares no estádio I e as fibras completamente formadas no estádio II. Barra de Escala= 0,5 μ m. Fonte: Raposo e Marks, 2007.

No estágio IV os melanossomos são translocados ao longo de microtúbulos de células actino-dendríticas e são então transferidos os vizinhos queranócitos para posterior deposição sobre a parede celular (Van Den Bossche et al., 2006).

Mutações nos genes que codificam as proteínas do processo de formação das estruturas lamelares nos estádios I e II podem causar albinismo em humanos e atuar na diluição nas cores das pelagens de animais (Bennett e Lamoreux, 2003). O PMEL (Pré-melanossomo Proteína), ou SILV (Silver Locus Protein Homolog) são proteínas codificadas pelo gene PMEL, também conhecido como SILVER, ME20, GP100 ou Pmel17. Este gene é regulado diretamente pela MITF (Microftalmia associada ao fator de transcrição) (Kim et al., 1996).

Em fungos a participação dos melanossomos na síntese da melanina deu-se inicialmente com a descoberta de vesículas de transporte (Rodrigues et al. 2007) no complexo da parede celular algo que serviu de base para demonstrar que a melanização fúngica ocorre também em organelas especializadas análogas aos melanossomos de mamíferos (Frazen et al. 2008, Eisenman et al. 2009, Walker et al., 2010).

2.7. Triciclazol como Inibidor da Síntese de Melanina

O papel das DHN em fungos tem sido extensamente estudado com o uso de inibidores de biossíntese de melanina (BELL et al., 1976; KUBO et al., 1982; Chang, 2006; Romero-Martinez et al., 2000; Almeida-Paes et al., 2009; Figueiredo-Carvalho et al.; 2014). Dentre os quais se distingue o triciclazol (5-metil-1,2,4-triazol-3,4-*b*-benzotiazol) que afeta as células inibindo a atuação da THN redutase (tri-hidróxi-naftaleno-redutase), diminuindo assim a concentração de metabólitos intermediários durante a síntese de melanina (TOKOUSBALIDES e SISLER, 1979). Ao passo dessa transformação podem se auto-oxidarem e acumularem 2-hidroxijulgone (2-HJ) e flaviolina, o que é caracterizado pela aparente coloração castanho avermelhada (Kejzar et al., 2013). Dessa forma, Franzen et al. (2006) ao estudarem culturas de *Fonsecaea pedrosoi* tratadas com triciclazol notaram que os cultivados apresentaram uma coloração avermelhada em relação aos controles (coloração escura com

tonalidades que variaram de verde a preto), o que demonstrou aspectos visíveis sobre a mudança de cor sobre estas culturas.

Brunskole Svegelj et al. (2011) publicaram um estudo utilizando outros tipos de inibidores da síntese de melanina em culturas de *Curvularia lunata* e observaram a atuação dos inibidores benzo-1,3-dioxole e benzo-1,2,5-thiodiazole sobre a enzima THN redutase. A utilização destes inibidores afetou o desenvolvimento da pigmentação negra nas culturas estudadas, o que comprova a eficácia destes inibidores na síntese de melanina.

2.8. Melanina como Fator de Virulência e Patogenicidade em Fungos

Fatores de virulência são atributos que aumentam a capacidade de um patógeno atacar e colonizar com sucesso um determinado hospedeiro (Abad et al., 2010). A flexibilidade genética existente em microrganismos patogênicos, pode resultar em fenótipos alterados e dessa forma permitir a estes organismos uma certa vantagem evolutiva em relação aos demais (Brown et al., 2015).

Devido a sua rápida adaptação a mudanças evolutivas e por conseguinte aumento do seu valor adaptativo, estes organismos tendem a ampliar sua gama de possíveis hospedeiros, explorar novos nichos ecológicos, tolerar com maior facilidade o estresse ambiental e conseqüentemente tornar-se mais virulêntos, neste caso, hipervirulêntos e/ou a sua resistência a agentes antimicrobianos (Andersson et al., 2010). Portanto, um dos mais importantes fatores de virulência e patogenicidade em fungos é a presença de melanina sobre a sua parede celular (Madri et al., 2009).

Nesse contexto, estima-se que exista pouco mais de 100.000 espécies de fungos na natureza (Cadasevall, 2007). No entanto, apenas cerca de 300 espécies têm sido associadas algum tipo de patologia, tanto em humanos quanto em animais. Em geral, o termo virulência e patogenicidade refere-se a capacidade que um organismo possui para causar algum tipo de doença. Esta propriedade é o resultado de uma interação direta entre o patógeno e o seu hospedeiro, portanto, de muitas maneiras, patogenia e virulência são termos amplamente definidos (Al-Fakih, 2014).

A habilidade de produzir melanina como fator de virulência tem sido bem descrita por diversos autores, e desde a descoberta do vírus da AIDS, vários

destes fatores foram identificados e isolados utilizando principalmente como modelo para fungos *C. neoformans* (Eisenman e Cadasevall, 2012).

Dentre os fatores que promovem a virulência, destacam-se a presença de uma parede celular coberta por melanina, uma capsula revestida por polissacarídeos, rápido crescimento a temperaturas superiores a 30°C, ou até mesmo abaixo deste limiar, a ação da enzima urease e a integridade de sua parede celular, dentre tantos outros ainda desconhecidos, que somados, podem auxiliar os fungos na invasão e colonização de um hospedeiro (Cox et al., 2000; Gomes et al., 2010; Ngamskulrungrroj et al., 2011; Feder et al., 2015).

Em *C. neoformans* a melanização da parede celular pode ocorrer tanto *in vitro* quanto *in vivo* pela presença de catecolaminas e compostos índoles ou devido a um processo infeccioso, respectivamente (Chatterjee et al., 2012). Dessa forma, Garcia-Rodas et al. (2015) descreveram o papel que uma proteína expressa na fase G1 do ciclo celular, a G1/S (Cln1), poderia exercer sobre o processo de melanização em *C. neoformans*, uma vez que esta proteína promove a estabilização da parede celular durante o ciclo celular. A relação entre esta ciclina e o processo de melanização foi observada pela utilização de ripamicina, uma substância que provoca paralização de fases específicas do ciclo celular. Os mutantes para Cln1 foram consistentemente mais suscetíveis a danos oxidativos em meios que induziram a melanização na cepa estudada, o que confirmou a importância da participação desta proteína na melanogênese.

Quando uma série de fatores são combinados, observa-se um elevado índice nas taxas de invasão e infecção por inúmeras espécies de fungos patogênicos em humanos e em animais. Raparia et al. (2010) em um estudo com 18 pacientes imunocomprometidos e positivamente infectados por fungos alojados no SNC, observaram que a maioria das infecções fúngicas era devido a presença de espécies de fungos melanizados como *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Cladophialophora bantiana*, *Fonsecaea monophora* e *Scedosporium apiospermum*.

Em muitas espécies de fungos, a parede celular composta por uma estrutura complexa de polissacarídeos também pode estar diretamente associada ao processo de invasão e colonização do tecido do hospedeiro (Latge et al., 1992). Em *A. fumigatus*, a relação existente entre a parede celular

e seu potencial virulento é claro Rementeria et al. (2005) em uma revisão sobre a virulência em *A. fumigatus*, citaram alguns dos genes e proteínas que associados a parede celular poderiam aumentar a patogenicidade e conseqüentemente o poder infeccioso deste fungo. Dentre estes, os autores destacaram a presença de uma estrutura protetora e de sustentação sobre a parede celular composta pelo polissacarídeo β -1,3-glucano, não encontrado em bactérias e que possui diferentes atividades biológicas, das as quais destacam-se a estimulação do sistema complemento e ativação de mediadores nos processos inflamatórios como o TNF- α , fator de necrose tumoral (Yoshioka et al., 1998). Entretanto, os β -glucanos reduzem o metabolismo de gordura corporal e reduzem o risco de hipoglicemia, participam também da síntese de processos alérgicos, estimulam a produção de células do sistema imunitário como macrófagos e células B e T, além de induzirem a expressão de diversas citocinas desencadeando assim, uma resposta específica de defesa contra diferentes patógenos (Malaczewska et al., 2010). O mecanismo de ação parece estar relacionado ao peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização do β -glucano. Algumas espécies de fungos podem mascarar a estrutura de seus β -glucanos ou parte deles, evitando o reconhecimento pelas células de defesa do hospedeiro, minimizando as respostas inflamatórias, o que torna o organismo parasitado muito mais susceptível a doenças (Magnani e Castro-Gómez, 2008).

A produção de enzimas hidrolíticas, tais como proteases, lipases e fosfolipases são em conjunto fatores determinantes no processo de infecção e contribuem dessa forma para o aumento da virulência (Ibrahim et al., 1995). Estas enzimas desempenham um papel fundamental na nutrição, na invasão de tecidos, na aquisição de íons, na proteção contra o estresse oxidativo e também, por promover de certa forma, o escape do fungo as respostas imunológicas do hospedeiro (Aboul-Nasr et al., 2013).

2.9. Melanina como Fator de Resistência e Proteção

A síntese de melanina em microrganismos de vida livre pode oferecer uma miríade de vantagens sobre a sobrevivência e a manutenção destes no ambiente em que vivem (Nosanchuk e Cadasevall, 2006).

A presença do polímero e sua possível ligação com a proteção das interperies ambientais se deve ao fato de que os fungos que possuem a capacidade de sintetiza-lo, e que passam parte de sua vida fora do corpo de seus hospedeiros, frequentemente adquirem certo sucesso ao colonizar o ambiente (Eisenman e Casadevall, 2012), conforme demonstrado por Mylonakis et al. (2002), que utilizaram *Caenorhabditis elegans*, nematoide de vida livre, como modelo experimental de infecção para diversas cepas de *C. neoformans* quando estes eram encontrados no solo.

A resistência a agentes microbianos também tem sido atribuída a presença de melanina. Van de Sande et al. (2007) observaram a ocorrência da diminuição da concentração inibitória mínima (CIM) para o fungo *Madura mycetomatis* com a adição de diferentes concentrações de melanina (25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 250 mg/ml, 25 µg/ml, 2,5 µg/ml) ao meio de cultivo contendo itraconazole, ketoconazole, fluconazole e anfotericina B. Similarmente, Van Duin et al. (2002) testaram a eficácia da caspofugina, anfotericina B, itraconazole, fluconazole e flucitosina sobre cepas de *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum* e observaram a redução da atividade antifúngica da anfotericina B e da caspofugina sobre os fungos testados, atribuindo o resultado a presença da melanina no meio. Entretanto, Da Silva et al. (2006), ao estudarem culturas melanizadas e não melanizadas de *Paracoccidioides brasilienses* não encontraram diferenças significativas sobre a CIM do fungo para anfotericina B, fluconazole, itraconazole, sulfametoxazole e ketoconazole e atribuíram a CIM encontrada a limitação de antifúngicos disponíveis para o teste.

Eisenman e Casadevall (2012) chamaram atenção para o número limitado de drogas efetivas no tratamento de infecções fúngicas, e constataram a necessidade inegável da melhoria das terapias antifúngicas, e ainda sugeriram a consideração da melanização em culturas fúngicas quando se cogitar o teste sobre a eficácia de alguma droga *in vitro*.

Este fato se deve às discrepâncias encontradas em alguns estudos e ainda aos resultados duvidosos de outros trabalhos que demonstram um aumento da síntese de melanina quando tratadas com certas drogas, como é o caso do antipsicótico trifluoperazina, em que foi observado uma maior atividade

fungicida contra culturas melanizadas criptocócicas do que contra as não melanizadas (Wang e Casadevall, 1996).

Moretti et al. (2008) atribuíram a resistência encontrada para *Cryptococcus* spp. em diversos estudos sobre resistência a antifúngicos, à casos de falência clínica da terapêutica, uma vez que, conforme mencionando, poucos estudos relacionaram a associação potencial entre o desfecho clínico e a susceptibilidade *in vitro*.

Outros atributos têm sido associados à presença de melanina em fungos. Nestes organismos a melanina pode também fornecer proteção contra radiação ultravioleta (UV) (Singaravelan et al., 2008); contra isótopos radioativos, conforme demonstrado por Zhdanova et al. (2000) que encontrou 37 espécies de fungos pertencentes a 19 gêneros que habitam as instalações de uma usina nuclear abandonada em Chernobyl e também por Dadachova et al. (2007) em *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* encontrados em reatores abandonados na mesma cidade ucraniana.

A melanina é utilizada ainda, na exibição sexual e camuflagem, como a cor do pêlo de animais que é determinado pela presença ou ausência do polímero (Xu e Luo, 2014). Também pode atuar no mecanismo de defesa contra predadores, como a liberação de tinta em suspensão de partículas de melanina produzidas por *Sepia officinalis* em resposta a qualquer situação de perigo (Derby, 2014). A melanina também desempenha um papel importante sobre o sistema imune de insetos, ativando a profenoloxidase, que atuam como mediadores do processo de reconhecimento de patógenos (Nappi e Christensen, 2005).

2.10. Classificação dos Fungos Nematofagos

Fungos nematófagos fazem parte de um diverso grupo de fungos que utilizam estruturas refinadas na captura e obtenção de presas (Herrera-Estrella et al., 2016) dos quais foram descritos mais de 200 espécies (Ahren et al., 2004) e estão classificados de acordo com Drechsler (1937) na divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae (Griffin, 1994). Dessa forma, os organismos nematófagos pertencentes à classe dos Hyphomycetes são em sua maioria organismos

saprófitos e estão relacionados aos seus hábitos de predação de pequenos nematoides (Liu e Zhang, 1994) e ocasionalmente outros animais microscópicos, tais como rotíferos e protozoários (McInnes, 2003). Mais recentemente, a filogenia dos vários tipos de fungos nematófagos os coloca como pertencentes a um grupo monofilético localizado dentro da família *Orbiliiales*, *Ascomycota* (James et al., 2006). Os estudos filogenéticos demonstram que os mecanismos envolvidos na construção das armadilhas estão ligados em pelo menos duas linhagens distintas de fungos, tendo como precursor principal um grupo eficiente na construção de anéis e outro em armadilhas com botões adesivos (Yang et al., 2008).

Não obstante, outra corrente suporta a ideia de que os fungos nematófagos possam ter evoluído de fungos celulolíticos e lignolíticos como uma possível resposta às deficiências de nutrientes em habitats com grandes déficits nutricionais (Barron, 1992). Nestes locais, com uma alta proporção carbono: nitrogênio os nematoides poderiam servir como fonte de nitrogênio durante seu crescimento em substratos contendo grandes quantidades de carboidratos, podendo assim, os fungos nematófagos utilizarem a celulose e outros polissacarídeos como fonte de carbono (Nordbring-Hertz et al., 2006).

Entre os fungos nematófagos mais comumente avaliados nos estudos visando o controle biológico de nematoides gastrintestinais de ruminantes destacam-se os gêneros *Arthrobotrys* (Tunlid e Jansson, 1991; Grønvold et al., 1993; Gomes et al., 2001; Zhang et al., 2013), dos quais *A. oligospora* (Fresen, 1850) e *A. musiformis* (Drechsler, 1937); o gênero *Duddingtonia*, *D. flagrans* (Duddington, 1955) e o gênero *Monacrosporium*, representados principalmente por *M. thaumasium* (Drechsler, 1985), *M. sinense* (Liu e Zhang, 1994) e *M. haptotylum* (Liu e Zhang, 1994) se destacam (Braga et al., 2008).

2.11. Gênero *Duddingtonia*

O gênero *Duddingtonia* é composto por uma única espécie conhecida como *D. flagrans*, e que compreende organismos com capacidade de produzir estruturas reprodutivas resistentes conhecidas como clamidósporos (Larsen et al., 1992). Os clamidósporos podem permanecer viáveis no ambiente mesmo depois de ingeridos e eliminados pelas fezes de ruminantes, colonizando-as

logo após a sua deposição no solo e predando os nematoides por meio de suas redes adesivas (Silva et al., 2013).

Anteriormente descrito como *Tricothecium flagrans* (Duddington, 1950) e posteriormente como *Arthrobotrys flagrans*, em 1950 Duddington observou que formas fúngicas assim como o seu desenvolvimento eram diferentes das presentes em fungos do gênero *Arthrobotrys*. *Tricothecium flagrans* não apresentava aglomerados de conídios formando correntes de anéis, algo comum ao gênero *Arthrobotrys*, portanto, o gênero passou a ser denominado *Duddingtonia*, e a espécie, como *Duddingtonia flagrans* (Cooke, 1969).

Estruturalmente, o micélio de *D. flagrans* é composto por hifas septadas e claras, com pequeno crescimento aéreo. Os conidióforos septados, eretos, retos e alongados com vários crescimentos subapicais e os conídios são produzidos na extremidade dos conidióforos com um septo mediano, possuindo morfologia de 25-50 µm de comprimento por 10-15 µm de largura (Cooke e Godfrey, 1964).

Os estudos promissores utilizando *D. flagrans* como agente biocida de nematoides gastrintestinais de animais datam do início da década de 90. Peloille (1991) demonstrou, dentre outras características, ser o fungo capaz de sobreviver ao trânsito gastrintestinal de ovinos. Em paralelo, um estudo “in vitro”, que simulou o trato digestivo de ovinos (Larsen et al., 1991), permitiu que sete isolados de *D. flagrans*, um de *A. oligospora* e dois de *A. superba* fossem selecionados para estudos complementares “in vivo”. Destes 10 isolados, nove foram re isolados das fezes após a passagem através do trato digestivo de bezerros. A atividade predatória de oito isolados (um *A. superba*, um *A. oligospora* e seis *D. flagrans*) foi entre 61% e 93% nos bioensaios com bolos fecais. Já nas culturas de fezes, sete dos dez isolados (um *A. oligospora* e seis *D. flagrans*) reduziram entre 76% e 99% das larvas (Larsen et al., 1992). Dado a esta capacidade superior de suportar o estresse digestivo, as pesquisas se concentraram com *D. flagrans* primeiramente em bovinos (Grønvold et al., 1993; Wolstrup et al., 1994; Larsen et al., 1995b; Nansen et al., 1995) e posteriormente equinos (Larsen et al., 1995a, Larsen et al., 1996; Fernández et al., 1997, Fernández et al., 1999; Baudena et al., 2000), ovinos (Faedo et al., 1997; Githigia et al., 1997; Faedo et al., 1998; Knox e Faedo, 2001; Peña et al., 2002; Fontenot et al., 2003; Chandrawathani et al., 2002, Chandrawathani

et al., 2003, Chandrawathani et al., 2004; Cordeiro et al., 2004), caprinos (Chandrawathani, et al., 2002, Chandrawathani et al., 2003; Paraud e Chartier, 2003) e suínos (Nansen et al., 1996; Petkevicius et al., 1998) sendo demonstrados em todos um sucesso da espécie em atravessar o trato digestivo e manter alta atividade nematófoga.

Além de resistir à ação do suco gástrico do estômago em ruminantes e outros animais, *D. flagrans* produz grande quantidade de clamidósporos. Assim, diferentes isolados vêm sendo utilizado com sucesso no controle de várias espécies de nematoides, tanto parasitos de animais domésticos e selvagens, quanto em humanos (Tavela et al., 2013; Braga e Araújo, 2014; Andrade et al., 2016; Simin et al., 2016).

Apesar de desempenhar com êxito seu papel como agente biocontrolador, mas, com variações na taxa de predação, um estudo com 22 isolados de *D. flagrans* oriundos da Dinamarca, Reino Unido, França, Alemanha, Estados Unidos, Índia e Malásia curiosamente mostrou haver um baixo nível de variação genética entre estes sugerindo uma divergência recente de um progenitor possivelmente entre 16 a 23 mil anos atrás (Ahren et al., 2004).

A aplicação de fungos nematófagos para o tratamento de parasitos intestinais são promissores, uma vez que estes organismos são potencialmente efetivos no controle, na prevenção e na redução de larvas no ambiente, atuando dessa forma como agente biológico nos estádios de vida livre dos nematoides gastrointestinais, seja em condições experimentais ou naturais (Assis et al., 2013). Porém, a utilização de diferentes partes dos fungos, como conídios, clamidósporos e micélio, em animais domésticos, deve ser ponderada, pois demonstra que diferentes isolados e concentrações, podem gerar resultados divergentes (Braga et al., 2013).

2.12. Nematóide Avaliado como Modelo Experimental

2.12.1. *Panagrellus* spp.

O gênero *Panagrellus* compreende 12 espécies, das quais: *P. pycnus* (Thorne, 1938); *P. ludwigi* (Man, 1910) (Goodey, 1945); *P. nepenthicola* (Menzel, 1922) (Goodey, 1945); *P. silusioides* (Thalolikhin, 1965); *P. redivivus* (Linnaeus, 1767) (Goodey, 1945); *P. redivivoides* (Goodey, 1943) (Goodey,

1945); *P. ventrodentatus* (Weingärtner, 1954) (Goodey, 1963); *P. dorsibidentatus* (Rühm, 1956) (Goodey, 1963); *P. dubius* (Sanwal, 1960); *P. filiformis* (Sukul, 1971) (Andrássy, 1984); *P. ceylonensis* (Hechler, 1971) e *P. leperisini* (Massey, 1974), são os únicos representantes (Andrássy, 1984). Muitos membros da família são saprófitos, e alimentam-se de bactérias e fungos, ocupando uma variedade de nichos, e distribuídos por todo o mundo, exceto nas regiões polares e na Austrália (Hechler, 1971; Ricci et al., 2003).

Panagrellus spp. são organismos vermiformes, não segmentados, de coloração clara, com tamanho médio corporal de 1,5 mm e cerca de 50 µm de diâmetro, cada ponteaguda e com a boca arredondada (Stock e Nadler, 2006). Estes desenvolvem-se rapidamente, atingindo a maturidade em apenas 3 dias de vida. Os machos são menos numerosos que as fêmeas, com tamanho corporal menor e mais afilado em relação ao formato corporal das fêmeas. Reproduzem-se sexuadamente e apresentam altas taxas reprodutivas (Santiago et al., 2003). São vivíparos, e dão a luz de 10 à 40 filhotes em um período de 24 à 36 horas, durante 20 à 25 dias de seu ciclo de vida, pelo qual cada fêmea produz aproximadamente 3000 filhotes durante a sua etapa reprodutiva (Figuerola, 2009).

3. OBJETIVOS

Identificar e caracterizar o pigmento melanina em culturas do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* para comprovar a melanogênese e avaliar relação existente entre o fator de virulência para esta espécie e o grau de infecção nas interações fungo-nematoide.

3.1 Objetivos Específicos

- Buscar a presença de pigmentos que se assemelham a melanina em *D. flagrans*;
- Caracterizar o pigmento melanina sob diferentes condições de cultivo e suplementação por técnicas padronizadas *in vitro*;
- Isolar e purificar o pigmento melanina em colônias de *D. flagrans*;
- Comprovar a melanogênese por meio da Espectroscopia de Infravermelho e por Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica;
- Identificar os locais de deposição do pigmento sobre as hifas fúngicas e clamidósporos por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Avaliar a relação existente entre a produção de melanina pelo fungo e o fator de virulência nas suas relações de predação com a utilização de *Panagrellus* spp. como nematoide modelo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo e Avaliação das Concentrações de Glicose e pH

Para avaliar o meio de cultivo mais indicado para obtenção do material fúngico em *D. flagrans* (CG 721), discos de 10mm de diâmetro das culturas fúngicas foram inoculados nos meios YPD (peptona 2%, extrato de levedura 1% e dextrose 2%); BDA (batata 0.4%, dextrose 2%); MM (meio mínimo composto de glicose 15 mM, MgSO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 29.4 mM, glicina 13 mM e tiamina a 3.0 mM, pH 5.5) e o meio SDA (Sabouraud Dextrose Agar) suplementados com 1 mM de L-DOPA (Sigma® Aldrich, USA) seguidos de incubação por 21 dias em câmara escura a 30°C para evitar a polimerização da L-DOPA. Posteriormente, o meio SDA foi escolhido como padrão para cultivo e suplementado com diferentes concentrações de glicose (2%, 4%, 8%, 10% e 20% w/v) e com valores de pH que variaram entre 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 para todas as formulações, também incubados a 30°C. Seguindo esta modificação, e com o fungo mantido em câmara escura, foi adicionado ao meio 1 mM de L-DOPA, para verificar a intensificação da pigmentação de melanina na cepa estudada. Todos os tratamentos desta etapa experimental foram testados em triplicata.

4.2. Influência do Inibidor Tricyclazol sobre a Pigmentação

Para avaliar o papel das DHN em fungos foram preparadas placas de Petri em meio SDA utilizado o inibidor de biosíntese de melanina tricyclazol (Sigma® Aldrich, USA), (5-metil-1,2,4-triazol-3,4-*b*-benzotiazol). Assim, 10 mg do inibidor foi diluído em 1 mL de etanol e adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 16 e 32 mM. Placas em SDA sem o inibidor foram utilizadas como controle. Os cultivados sobre estas condições foram incubados em câmara escura a 30°C por 21 dias.

4.3. Isolamento e Purificação do Pigmento Melanina

As partículas de melanina foram extraídas de culturas de *D. flagrans* crescidas em SDA na presença de 1 mM de L-DOPA e glicose na concentração de 2% w/v. Em seguida, as partículas de melanina foram isoladas utilizando agentes desnaturantes e ácido quente de acordo com a

metodologia descrita por Rosas et al. (2000) e Alviano et al (2004) conforme segue: (i) centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos das massas fúngicas compostas por colônias de 21 dias desenvolvidas em 5 placas de Petri (10 cm de diâmetro); (ii) lavagem em solução salina PBS (0.1 M, pH 7.5); (iii) ressuspensão em solução de Sorbitol (0.1M) e citrato de sódio (0.1 M, pH 5.5); (iv) centrifugação e adição de enzima de lise de *Trichoderma harzianum* (1mg/mL) incubada *overnight* a 30°C para produção de protoplastos; (v) coleta dos protoplastos por centrifugação e lavagem em PBS; (vi) adição de Tiocianato de guanidina (4.0M) *overnight* a 25°C; (vii) coleta de debris celulares por centrifugação; (viii) lavagem com PBS repetida por 3 vezes; (ix) adição de proteinase k (1mg/mL) e tampão TRIS por 12 horas a 37°C; (x) lavagem com PBS repetida por 3 vezes; (xi) banho-maria do material em HCl 6.0M por 1 h; (xii) centrifugação a 10.000 x g; (xiii) lavagem exaustiva em PBS; (xiv) e diálise com água destilada em temperatura ambiente durante 10 dias para obtenção do polímero de coloração escura.

4.4. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Para análise do pigmento isolado de *D. flagrans* foi confeccionada uma pastilha de Brometo de Potássio (KBr) adicionando-se 1mg do pigmento a 100mg de KBr e submetendo-se em uma pastilhadora com 8 toneladas por cm² de pressão. Como controle positivo utilizou-se 1mg de melanina sintética comercial (Sigma® Aldrich, USA). Os espectros na região do infravermelho foram então obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu FT IR 8300 na região de 4000 a 400 cm⁻¹.

4.5. Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Para as análises em RPE, 10µg do pigmento isolado de *D. flagrans* pelo procedimento anterior previamente descrito foram utilizados. Além desse, outras amostras foram obtidas por meio dos cultivados fúngicos em placas de Petri com meio SDA, suplementados com L-DOPA (1.0 mM) e placas não suplementadas com este precursor, que foram utilizadas como controle. Outras quatro amostras do fungo foram obtidas com a adição de tricyclazol (Sigma® Aldrich, USA) nas concentrações de 2, 6, 8 e 16 mM. As amostras foram então

e trituradas em cadinho de porcelana e em seguida levadas ao espectrômetro.

Os espectros de RPE foram obtidos em temperatura ambiente utilizando um espectrômetro Bruker E500 operando em banda X (9.5 GHz), com potência de micro-ondas de 1 mW, amplitude de modulação de 1 G e frequência de modulação de 100 kHz. Uma amostra de MgO:Cr^{3+} ($g = 1.9797$) foi utilizada como referência para a obtenção do fator g do sinal da amostra estudada.

4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras foram fixadas por 24 horas à temperatura ambiente em glutaraldeído 2,5% grau II diluído em tampão cacodilato 0.1 M pH 7.4. Após a fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes por 5 minutos no mesmo tampão e parte pós-fixadas por 60 minutos em tetróxido de ósmio 1% (OsO_5) adicionado de 0.8% de ferrocianeto de potássio segundo a metodologia proposta por.

Parte das mesmas amostras foram igualmente lavadas após a prévia fixação em glutaraldeído 2,5% grau II diluído em tampão cacodilato 0.1 M pH 7.4 e processadas via técnica utilizada em estudos histoquímicos para coloração conhecida por Fontana-Masson e adaptada para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme descrito por Franzen et al. (2008) e modificada para o presente estudo, pela qual uma solução de nitrato de prata amoniacal a 10% opalescente foi previamente diluída em água destilada e hidróxido de amônio. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes em água destilada e incubadas na solução de nitrato de prata amoniacal e armazenada em câmara escura a 25°C por 40 minutos. A amostra foi então novamente fixada em glutaraldeído diluído em tampão cacodilato 0.1M conforme descrito anteriormente. Após a fixação, as amostras foram novamente lavadas 3 vezes em água destilada e posteriormente desidratadas por 20 minutos em séries crescentes de acetona (Merck® Darmstadt, Germany): 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Para as amostras fixadas em tetróxido de ósmio 1% (OsO_5) e 0.8% de ferrocianeto de potássio seguiu-se o mesmo protocolo de desidratação.

Em seguida, as amostras foram infiltradas lentamente em séries crescentes de acetona e resina Spurr (Sigma® Aldrich, USA) iniciando em concentrações decrescentes de acetona:Spurr 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 respectivamente, até inclusão em resina pura e sendo então, acondicionadas

em estufa a 60°C para polimerização por 48 horas e os blocos obtidos cortados em Ultramicrótomo (Reichert Ultracut, Leica®, Suíça). Os cortes ultrafinos (nm) foram coletados em grades de cobre (300 mesh), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo durante 20 e 5 minutos, respectivamente e depois de secos, observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900 a 80 KV.

4.7. Avaliação da Cinética Predatória e Produção da Melanina durante Interação Fungo – Nematóide

O isolado de *D. flagrans* foi cultivado em triplicata sobre placas de Petri (10 cm de diâmetro) contendo como meio de cultura sob três situações: Agar-milho; Agar-milho com adição de 1 mM de L-DOPA e Agar-milho com adição de 16 mM de tricyclazol (Sigma® Aldrich, USA). As placas foram então mantidas em câmara escura a temperatura de 30° C por 30 dias.

Pedaços de 1cm² dos meios de cultura previamente descritos contendo partes do fungo *D. flagrans* foram transferidos individualmente para o centro de placas de Petri contendo Agar-água também em triplicata e sobre três condições: Agar-água, Agar-água com adição de 1mM de L-DOPA e Agar-água com adição de 16 mM de tricyclazol (Sigma® Aldrich, USA) e estocadas em câmara escura por mais 5 dias para o crescimento até o bordo das placas. Posteriormente, duas cavidades (3mm de diâmetro) foram feitas em cada placa em áreas equidistantes e adicionados 200 *Panagrellus* spp. por cavidade e incubadas a temperatura ambiente. A atividade predatória foi então quantificada no microscópio óptico nos tempos de 2h, 4h, 8h, 12h e 24h de interação para verificar o número de nematoides apreendidos nas armadilhas do fungo ao longo da superfície do meio de cultura delimitado pelos quadrantes marcados na parte inferior da placa. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise de variância ANOVA com as médias dos tratamentos em triplicata e o teste de Tukey para comparação entre as médias pelo Programa GENES (CRUZ, 2013) ($p > 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do Meio de Cultura sobre a Pigmentação

A pigmentação das colônias variou em função do meio, do tempo e da suplementação utilizada (Fig. 7 a - d). As colônias cultivadas em SDA apresentaram uma considerável pigmentação somente quando suplementadas com 1mM de L-DOPA (Fig. 7 b , d) em 21 dias de incubação. Aquelas cultivadas sem a presença de L-DOPA não obtiveram uma coloração tão intensa quando comparadas as suplementadas (Fig. 7 a, c). A adição de 2 à 8% w/v de glicose com ajuste de pH a 5,5 foi fundamental para a ocorrência da melanização em *D. flagrans* (Fig. 8). As colônias cultivadas em meio YPD, BDA e MM não desenvolveram bem ao longo dos dias ou não melanizaram nas condições avaliadas.

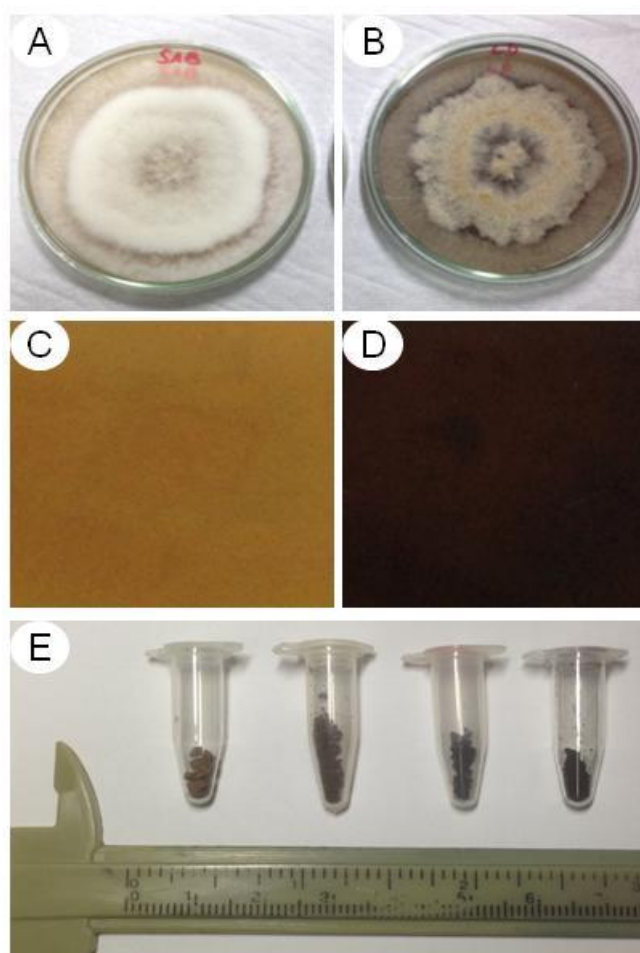


Figura 7. Pigmentação das colônias de *Duddingtonia flagrans* em meio SDA com e sem adição de L-DOPA. Visão da colônia e meio de cultura sem (a) e com adição L-DOPA (b) e vista ventral da placa de Petri com o meio de cultura

sem (c) e com adição de L-DOPA (d) respectivamente. Partículas de melanina extraídas de 5 colônias cultivadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro (e).

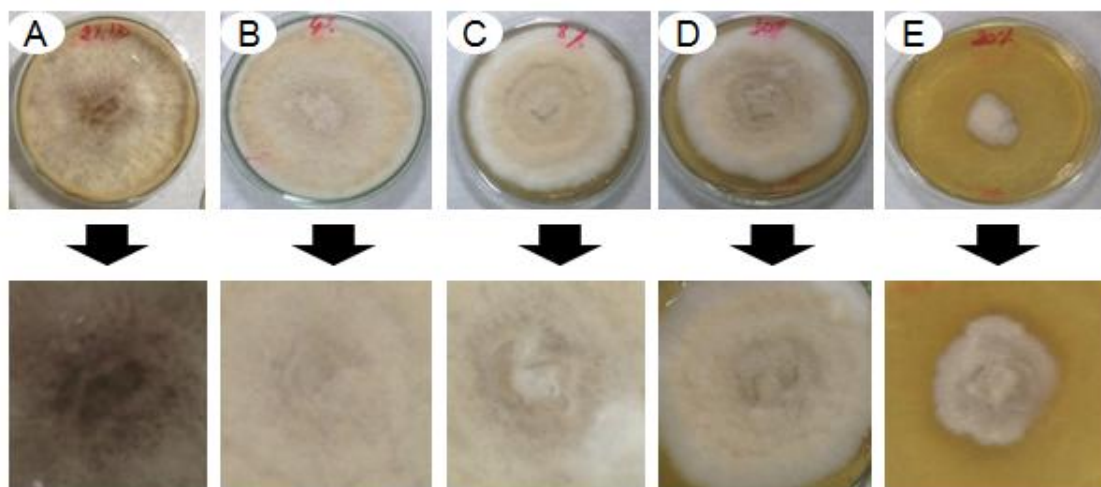


Figura 8. Pigmentação das colônias de *Duddingtonia flagrans* em meio SDA suplementado com L-DOPA e com adição de glicose. (a) concentração de glicose à 2%; (b) à 4%; (c) sob 8%; em (d) à 10%; e (e) à 20%. Foi possível notar que a partir da adição de 8% até atingir a concentração de 20% de glicose, o crescimento da colônia é inibido gradativamente.

5.2. Análise do espectro por infravermelho (IV)

As análises obtidas por infravermelho demonstraram que as bandas de absorção observadas na amostra extraída de *D. flagrans* foram condizentes com a estrutura da melanina sintética (Sigma® Aldrich, USA) que foi utilizada como controle, conforme demonstrado na figura 9 a e 9 b, respectivamente. Com base nos resultados observados nas regiões de estiramento das moléculas do polímero de melanina extraída em *D. flagrans* foi possível identificar os grupos funcionais responsáveis pela absorção do espectro em cm^{-1} (hidroxilas de banda forte associadas e em quilatos centrais (H^+ , $\text{C}=\text{O}$ e NO_2) nas regiões entre 3441 cm^{-1} à 2852 cm^{-1} ; $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ (isotionatos de banda larga e intensa), $\text{C}=\text{O}$ de ésteres, amidas associadas e não substituídas; $\text{C}=\text{C}$ de cadeias aromáticas; NH_2 de banda média forte e CH_2 , CH_3 na região compreendida entre 2087 cm^{-1} à 1377 cm^{-1} ; $\text{C}-\text{F}$ (halogênio), $\text{C}-\text{O}$ de ácidos carboxílicos e de ésteres insaturados e de cadeias aromáticas, além de CO de ésteres aromáticos alifáticos e vinílicos na região entre 1311 cm^{-1} à 1072 cm^{-1} ; $\text{S}=\text{O}$ (sulfóxido), $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}=\text{CH}_2$, $\text{R}_2-\text{C}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$ e anéis aromáticos

diversos na região do espectro de 1028 cm^{-1} à 702 cm^{-1} ; cloroalcanos entre 596 cm^{-1} à 563 cm^{-1} ; além da presença de compostos formados por bromoalcanos e iodoalcanos nas regiões compreendidas entre 532 cm^{-1} à 470 cm^{-1}).

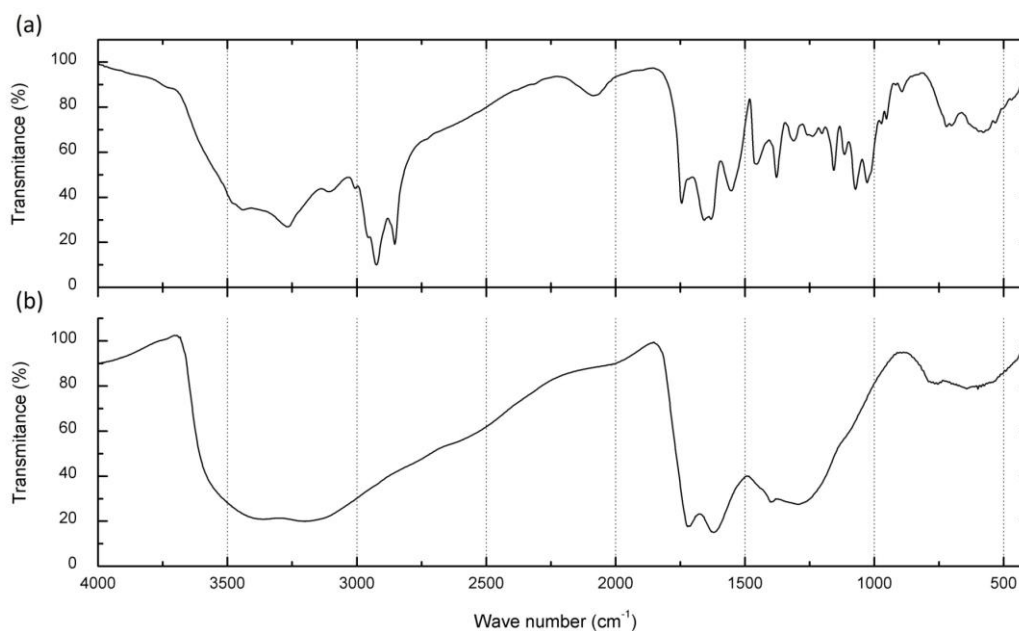


Figura 9. Análises obtidas por meio do Infravermelho (IV). a) 1 mg de partículas de melanina extraída de 5 colônias de *D. flagrans* cultivadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro cada; b) 1mg de partícula de melanina comercial (Sigma® Aldrich, USA). Os demais espectros de onda são derivados da presença de radicais presentes nas partículas de melanina extraída do fungo.

5.3. Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Em todas as amostras analisadas por RPE, ou seja, culturas de *D. flagrans* suplementadas com L-DOPA 1mM, com adição 16 mM de tricyclazol, melanina extraída da cultura fúngica e a melanina comercial, obtiveram espectros que possuem uma linha isotrópica com fator $g = 2.0051 \pm 0.0001$, indicando que em todas as amostras foi detectado um mesmo radical livre. Em relação à cultura fúngica sem este tratamento (Fig. 10 a), o tratamento com tricyclazol a 16 mM (Fig. 10 b) reduz a concentração do radical livre em 84%. A concentração do radical livre na amostra suplementada com L-DOPA foi três vezes maior do que a amostra sem nenhum tratamento (Fig. 10 c). A melanina

extraída de colônias de *D. flagrans* (Fig. 10 d) e a melanina comercial (Fig. 10 e) apresentaram o radical livre em concentração idêntica ao fungo sem nenhum tratamento (Fig. 10 a).

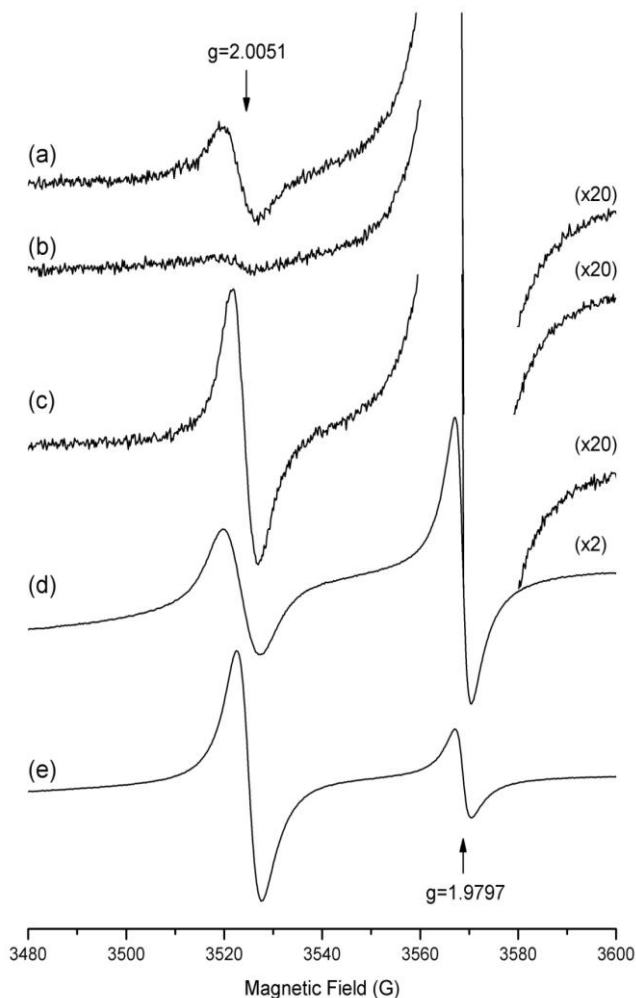


Figura 10. Espectros obtidos por meio de RPE. a) colônia de *D. flagrans* em meio SDA; b) *D. flagrans* tratado com 16 mM de tricyclazol; c) colônia de *D. flagrans* suplementada com L-DOPA a 1 mM; (d) partículas de melanina extraída de *D. flagrans* e (e) melanina comercial (Sigma® Aldrich, USA). É possível observar a redução de 84% do radical livre na amostra tratada com tricyclazol (b) e um aumento de até três vezes mais da colônia suplementada com L-DOPA (c) em relação ao fungo sem nenhum tratamento (a). Uma amostra de $\text{MgO}:\text{Cr}^{3+}$ ($g = 1.9797$) foi utilizada como referência para a obtenção do fator g do sinal da amostra estudada.

5.4. Inibição da Melanização sob a Presença de Tricyclazol (Sigma® Aldrich, USA)

Todas as colônias tratadas com as diferentes concentrações de tricyclazol não desenvolveram pigmentação escura (Fig. 11 a) quando comparadas com as amostras sem tratamento (Fig. 11 b) e com as suplementadas com L-DOPA (Fig. 11 c), porém a análise via Espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) das amostras analisadas tratadas com tricyclazol indicaram a presença do radical livre característico do pigmento melanina (Fig. 10 b). As amostras cultivadas em concentração de 32 mM apresentaram deficiência no seu desenvolvimento (Fig. 11 d).

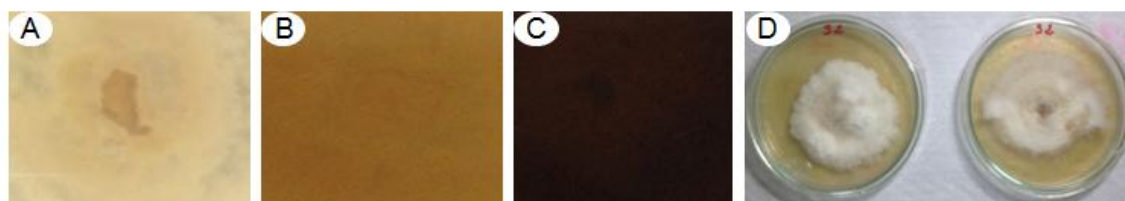


Figura 11. Pigmentação das colônias de *D. flagrans* com adição do inibidor de melanina Tricyclazol. Vista ventral da placa de Petri em meio de cultura SDA com adição de 16 mM de tricyclazol (a); em meio cultivado apenas em SDA (b); em meio SDA com a suplementação de 1 Mm de L-DOPA (c) e placas com amostras tratadas com 32 mM de Tricycalzol (d).

5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão MET

As imagens da ultraestrutura das hifas e clamidósporos corados com marcador específico indicaram a presença de partículas eletrondensas de melanina distribuídas pelo citoplasma e com maior deposição sobre a parede celular (Fig. 12 a, b). O mesmo padrão de pigmentação, porém menos intenso, foi observado para as amostras coradas com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio (Fig. 12 c, d).

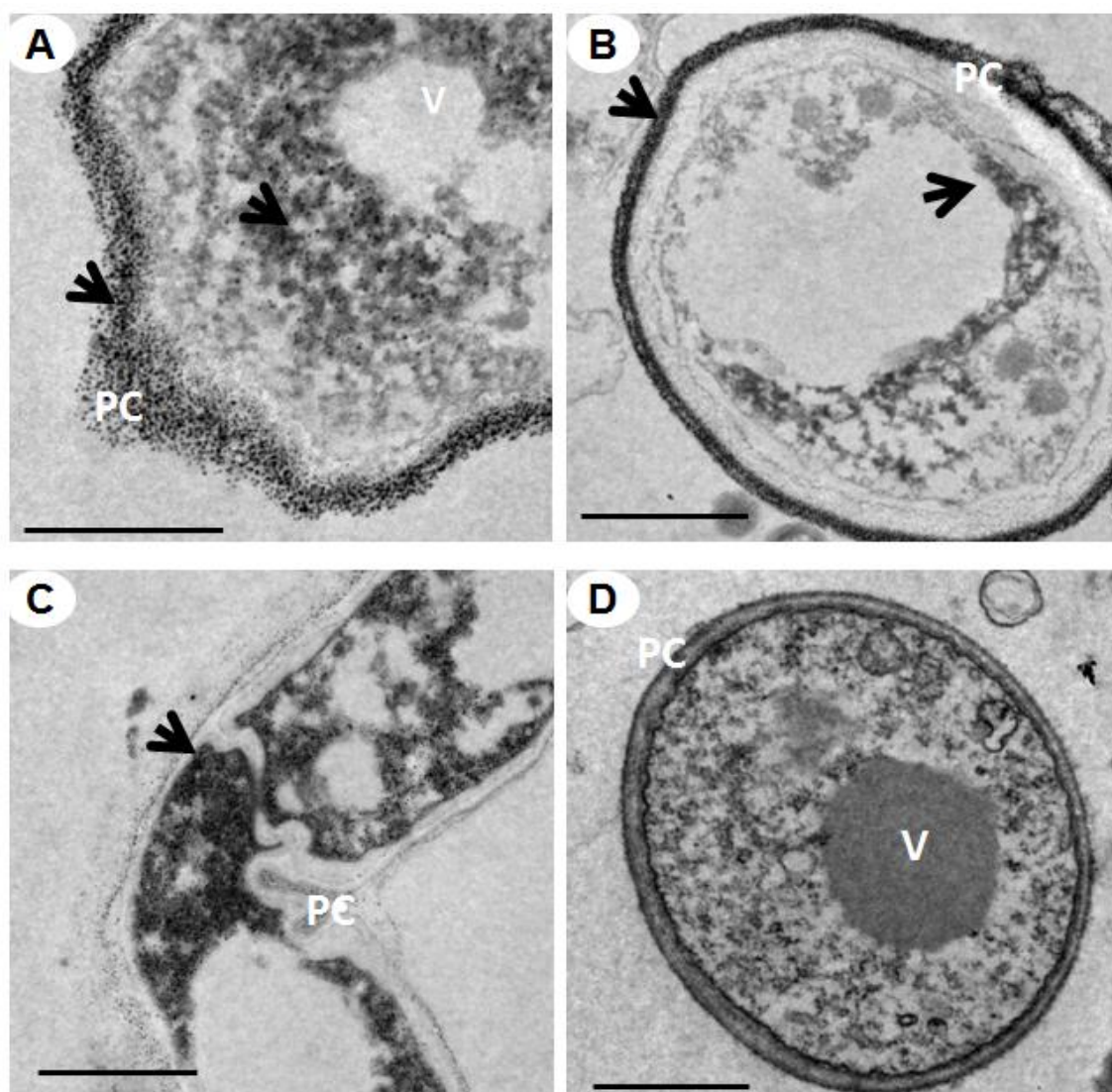


Figura 12. Cortes ultrafinos de *D. flagrans* demonstrando a localização das partículas eletrondensas de melanina. Hifa fúngica (a, c). Clamidósporos (b, d). Amostras contrastadas com solução de nitrato de prata amoniacal a 10% (a, b) e amostras contrastadas com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% (c, d). As setas indicam a presença e localização das partículas de melanina. Foram visualizados a parede celular (PC) e vacúolos (V). Barra de escala: 5 μ m (a - c) e 2 μ m (d).

As amostras tratadas com tricyclazol a 16 mM apresentaram uma redução na quantidade de partículas eletrondensas distribuídas pelo citoplasma e sobre a parede celular, talvez por conta da concentração do inibidor. Este

padrão foi observado mesmo quando as amostras foram submetidas à marcação com a solução de prata amoniacal (Fig. 13 a - d).

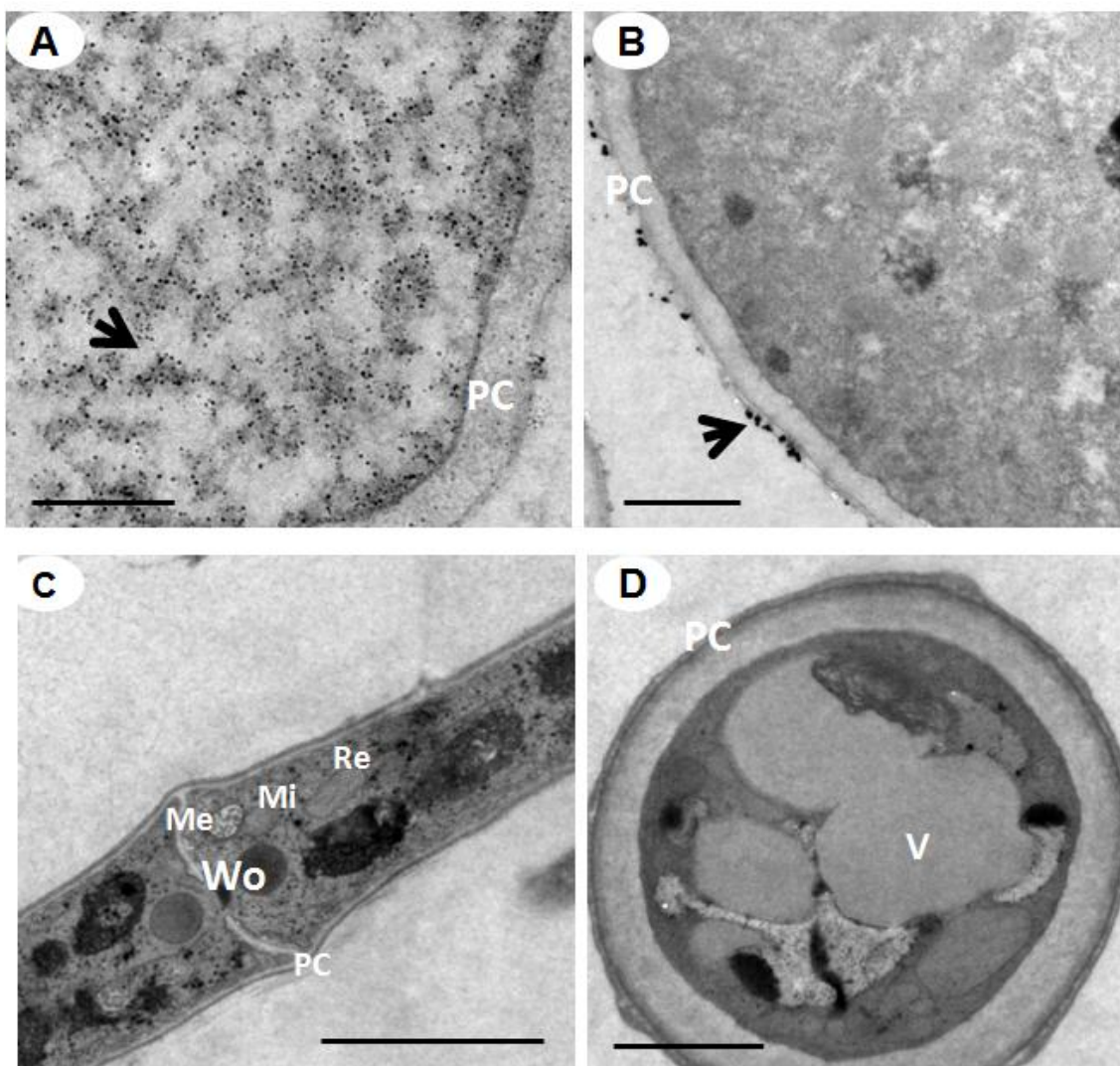


Figura 13. Redução de partículas eletrondensas em cortes de *D. flagrans* tratados com Tricyclazol na concentração de 16 mM. Hifa fúngica (a, c). Clamidósporos (b, d). As setas indicam a presença das partículas eletrondensas. Note que para as amostras coradas com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% os grânulos de melanina pouco ou não apareceram (c, d). As estruturas foram indicadas como: a parede celular (PC), melanosomo (Me), mitocôndria (Mi), vacúolos (V), retículo endoplasmático (Re) e os corpos de Woronin (Wo). Barra de escala: 5 μ m (a) e 2 μ m (b - d).

Os cortes ultrafinos de *D. flagrans* demonstraram a presença de uma estrutura em forma fibrilar com diferentes perfis de deposição de partículas

eletrondensas (Fig. 14 a - f). A possível gênese de formação e maturação desta estrutura foi observada ao acaso pela fusão endosomal da membrana plasmática da célula fúngica (Fig. 14 a), pela qual pode ser observada a formação de vários túbulos no interior da referida organela (setas pretas). Foi possível observar o melanosomo (Fig. 14 b, c), a formação de uma expansão na estrutura do melanosomo (Fig. 14 b), a formação das fibras proteicas no interior da organela (Fig. 14 e, f), o acúmulo de grânulos eletrondensos ao longo das fibras (Fig. 14 e) e ainda uma possível rede de transporte dos grânulos em torno da parede celular de *D. flagrans* (Fig. 14 f).

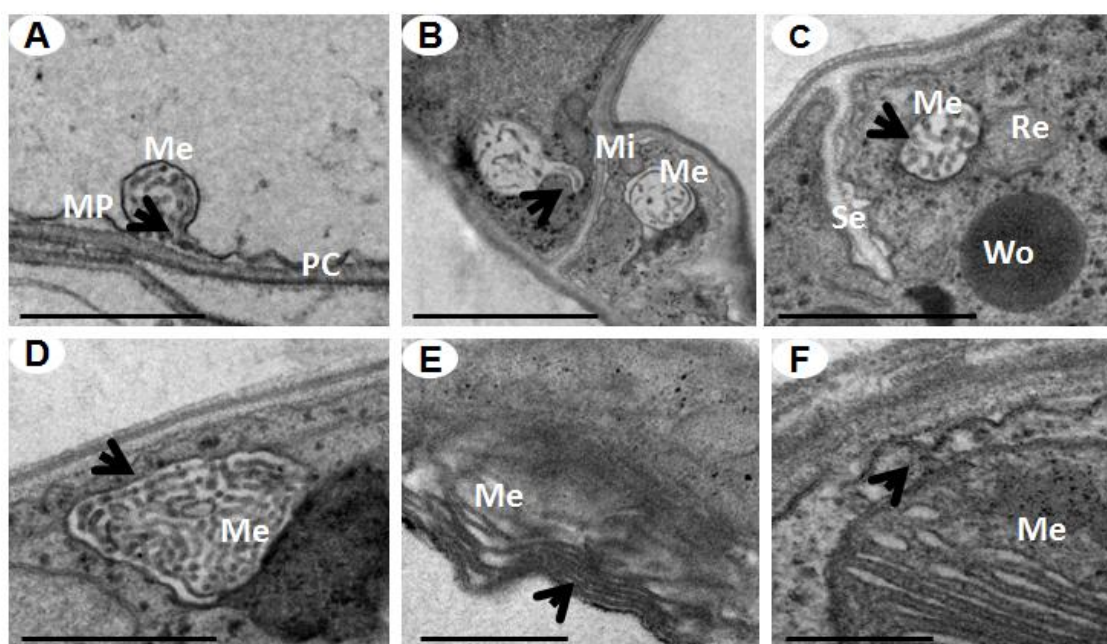


Figura 14. Caracterização ultraestrutural do melanosomo em *D. flagrans*. Cortes ultrafinos demonstrando a possível gênese na formação dos melanosomos em estágio I à III em células tratadas com tricyclazol a 16 mM (a - d) e em estágio III em células tratadas com L-DOPA a 1mM (e, f). Foi possível visualizar o melanosomo (Me), a membrana plasmática (MP), o retículo endoplasmático (Re), mitocôndria (Mi), corpos de Woronin (Wo), septo entre as hifas (Se) e a parede celular (PC). Barra de escala: 5 μ m (a - d) e 2 μ m (e, f).

5.5. Avaliação da Cinética Predatória e Produção da Melanina durante Interação Fungo – Nematóide

Embora a presença do pigmento melanina possa aumentar a virulência e a patogenicidade para muitas espécies de fungos, em *D. flagrans* a produção

de melanina com adição de L-DOPA a 1 mM ou a sua ausência pela adição do inibidor tricyclazol a 16 mM parece não influenciar de forma significativa ($p < 0,05$) a cinética de predação e captura observada no modelo experimental utilizado para este estudo na interação entre *D. flagrans* e *Panagrellus* spp. com médias de captura e apreensão que variaram de 0,25% à 15,75% e 0,25% à 17,00% respectivamente no período compreendido entre 2 à 24 horas de interação. Em relação ao fungo sem tratamento, utilizado aqui como controle, as médias variaram de 0,25% à 13,75%, que também não demonstrou diferença significativa entre os demais tratamentos ($p < 0,05$). As diferenças nas médias de captura e infecção somente foram observadas entre os tempos de interação e não entre os tratamentos conforme demonstrado na Tabela 1 abaixo.

Tempo (horas)	Fungo com adição de L-DOPA 1mM	Fungo com adição de Tricyclazol 16 mM	Fungo sem Tratamento
2	*0,25Ac	0,25Ac	0.25Ab
4	1,50Ac	0,25Ac	2.00Ab
8	2,25Ac	3,25Abc	3.50Ab
12	9,00Ab	6,75Ab	12.00Aa
24	15,75Aa	17,00Aa	13.75Aa

Tabela 1. Cinética de captura e infecção durante a interação fungo-nematoide para o fungo *D. flagrans* em três situações: *in vitro* (fungo cultivado em SDA com adição de L-DOPA a 1 mM, SDA com adição de tricyclazol a 16 mM e cultivado apenas em SDA a 2%) quantificadas e avaliadas nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 horas de interação.

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e na vertical não diferem estatisticamente entre si.

A movimentação de *Panagrellus* spp. sobre a superfície do Agar-água nas placas de Petri e a diferenciação das estruturas de captura e predação em *D. flagrans* foram observadas logo nas primeiras horas de interação. Após 2 horas, uma pequena quantidade de *Panagrellus* spp. foi observada aderida as estruturas de predação (Figura 15 a - c), que aumentou progressivamente a medida que o tempo passava, chegando ao término do experimento a 17,00%

do total de larvas apreendidas, muitas das quais encontravam-se mortas em apenas 24 horas.

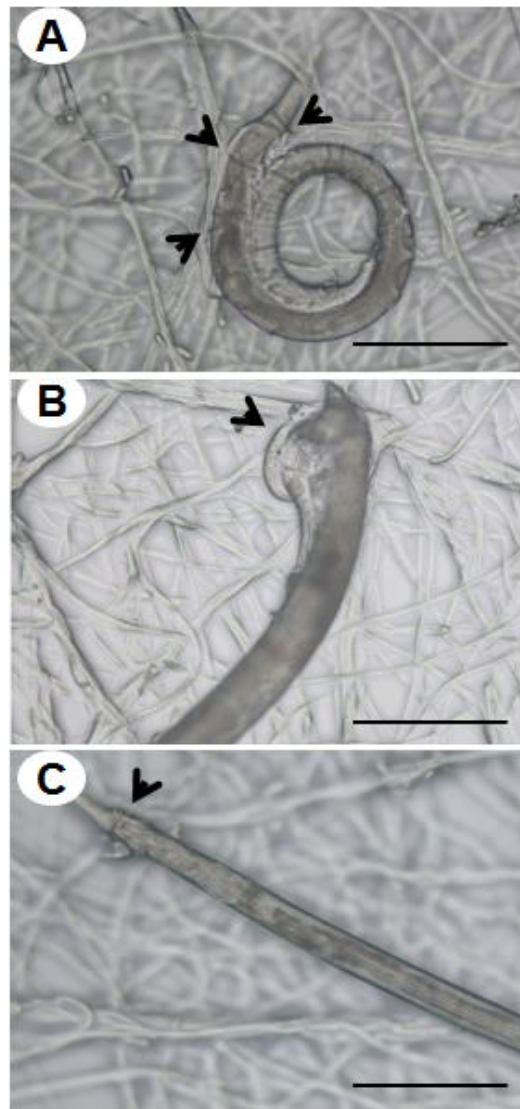


Figura 15. Formação das estruturas de predação durante a interação entre *D. flagrans* e *Panagrellus* spp. em Ágar Água. As setas pretas indicam a formação destas estruturas para culturas melanizadas (a) e não melanizadas (b, c) nos tempos de 2h, 4h, 8h, 12h e 24 horas. Barra de escala: 50 μ m (a, b e c).

6. DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do Pigmento Melanina em Culturas de *D. flagrans*

Melaninas são heteropolímeros insolúveis em água e em solventes orgânicos, sendo substâncias amorfas, com cargas elétricas negativas e de alto peso molecular, formadas pela polimerização de compostos fenólicos e indólicos e distribuídas por todos os reinos biológicos com diversas funções (Eisenman e Casadevall, 2012).

Estruturalmente, as melaninas são um grupo de pigmentos complexos com uma estrutura relativamente diversa, uma vez que ainda não existe nenhuma regularidade molecular que possa representá-las de forma concreta, ou nenhum sentido que as insira em qualquer classificação usual, sendo assim, muitas vezes classificadas provisoriamente com base em sua coloração (Treseder e Lennon, 2015).

Assim, foi analisado a influência que o meio de cultura poderia exercer sobre a pigmentação em *D. flagrans* com a suplementação de L-DOPA e glicose como fonte de carbono em concentrações de 1 mM e de 2 a 20% w/v respectivamente, e observou-se que em *D. flagrans* a pigmentação das hifas e do meio ocorreram apenas sob a presença de L-DOPA, sendo que este é um elemento chave para produção de melanina, conforme demonstraram Figueiredo-Carvalho et al. (2014) para as cepas de *Trichosporon asahii*, *T. asterioides*, *T. inkin*, e *T. mucoides*.

Em *D. flagrans*, a pigmentação foi mais acentuada sob concentrações de glicose consideradas normais aos meios de cultura Sabouroud disponíveis no mercado, uma vez que para este meio, são adicionados em sua formulação a proporção de 2%. Porém, a coloração da colônia intensificou-se com a adição de glicose nas concentrações de 2 a 8%. Resultados similares foram encontrados por Almeida-Paes et al. (2009), em que os autores observaram que a melanização em *Sporotrix schenckii* foi restritiva em meios sem glicose e maior nos meios com a adição de até 10 % do açúcar para algumas cepas, assim como a presença de L-DOPA, que foi fundamental para o processo de melanogênese para fungo analisado. Em meio SDA a pigmentação ocorreu tardiamente em relação aos demais meios e o aumento da concentração de glicose não impediu a pigmentação em *S. schenckii*. Este fato é muito similar ao presente estudo, uma vez que as culturas de *D. flagrans* pigmentaram em um

período superior a 21 dias quando incubadas a 30°C com concentrações de até 8% de glicose.

Da mesma forma, Figueiredo-Carvalho et al. (2014) ao estudarem o efeito que os meios de cultura poderiam exercer sobre a produção de melanina em *Trichosporon* spp., observaram ainda que a melanização ocorreu melhor na presença de concentrações elevadas de glicose e L-DOPA e sugeriram que a melanização pode ser controlada por fatores nutricionais, dado que, a melanização poderia ser reprimida sob altas concentrações de carbono devido a inibição da expressão da enzima laccase (Frasés et al., 2007).

Frasés et al. (2006) também encontraram resultados semelhantes para culturas de *Cryptococcus neoformans*, em que a coloração escura, típica quanto a presença de melanina, foi totalmente dependente do meio utilizado, porém a pigmentação escura não foi observada em meio SDA. No entanto, quando a cepa fúngica foi cultivada na presença de uma cultura bacteriana, altas concentrações de glicose acabaram inibindo a coloração escura no fungo estudado. O mesmo fato foi observado no presente estudo, onde a adição de glicose em concentrações superiores a 10% inibiu o desenvolvimento das colônias de *D. flagrans*.

O papel das DHN em fungos tem sido extensamente estudada com o uso de inibidores de biosíntese de melanina, dentre os quais o tricyclazol é o mais utilizado e que afeta as células inibindo a atuação da THN redutase (tri-hidróxi-naftaleno-redutase) e atua sobre a scytalona, diminuindo assim a concentração de metabólitos intermediários durante a síntese de melanina, que ao passo dessa transformação podem se auto-oxidarem e acumularem 2-hidroxijulgone (2-HJ) e flaviolina, caracterizado por uma fraca coloração castanho avermelhada (Romero-Martinez et al., 2000).

A redução da concentração do radical livre observada na cultura tratada com tricyclazol em 84% pela RPE para a cepa estudada sugere que este radical livre esteja associado com a presença da melanina. Diversos estudos confirmaram que o tricyclazol reduz consideravelmente a coloração do micélio em diferentes culturas de fungos largamente reconhecidos como produtores de melanina (Lazarovits e Stoessl, 1988; Howard e Valent, 1996; Rižner e Wheeler, 2003; Zhang et al., 2006; Kumar et al., 2015), mas não chegam a inibir totalmente a coloração, mesmo em concentrações mais elevadas do

inibidor (Mares et al., 2004). Em *D. flagrans*, um aumento na concentração de tricyclazol levou a uma diminuição considerável no crescimento da cepa, ficando restrita a concentração de 16 mM, além de não inibir completamente a sua produção.

Kejzar et al. (2013) testaram os efeitos que a inibição da síntese de melanina poderia provocar em *Hortaea werneckii* sobre diferentes concentrações hipersalinas e constataram que a ausência de melanina reduz a integridade da parede celular do fungo, afetando a divisão celular e expondo *H. werneckii* aos efeitos nocivos sobre elevadas concentrações de NaCl.

A síntese de melanina envolve reações de redução e/ou oxidação seguida de polimerização de compostos fenólicos e indólicos conduzindo à síntese final de polímeros orgânicos (Slominski et al., 2004). Os radicais livres intermediários formados dentro deste complexo fornecem a melanina propriedades paramagnéticas, o que facilita a análise de espectroscopia por ressonância paramagnética a detectar e investigar com segurança a presença de radicais livres contidos em amostras de melanina (Meredith e Sarna, 2006). Quando buscou-se demonstrar também por meio da RPE sinais de ressonância que confirmassem a presença de melanina nas amostras de *D. flagrans* e para este foi obtido o sinal de ressonância que atesta a presença de um radical livre com fator $g = 2.0051 \pm 0.0001$ para todas as amostras do fungo analisadas (amostra comercial, amostra de partículas de melanina extraídas do fungo cultivado em SDA, amostras do fungo com L-DOPA e amostras tratadas com 16 mM de tricyclazol). Este radical pode estar relacionado com a presença de *o*-semiquinona, um radical livre endógeno, característico da melanina (Meredith e Sarna, 2006).

Sinal idêntico ao encontrado em *D. flagrans* também foi observado por Cesareo et al. (2012) em um estudo sobre o uso da RPE no diagnóstico de células humanas com melanoma e por Otręba et al. (2015) em outro estudo com melanócitos humanos ($g = 2.0021$ para ambos). Zdybel et al. (2015) utilizando como modelos experimentais em RPE de eumelaninas e feomelaninas sintéticas, encontraram valores superiores do fator g para as moléculas de feomelaninas em relação as eumelaninas ($g = 2.0036$ à 2.0053), que são sinais exclusivos quanto a presença do radical livre *o*-semiquinona em feomelaninas.

Chikvaidze et al. (2014) ao desenvolverem um método para determinação das concentrações de feomelaninas e eumelaninas presentes em cabelos humanos, observaram que os sinais de RPE resultariam de uma sobreposição de 2 espectros de microondas, dos quais, um simples espectro era resultante da presença de eumelanina, para cabelos pretos, e um triplo espectro quanto a presença de feomelanina, para cabelos vermelhos. Eles também encontraram valores do fator g parecidos para a presença de eumelanina ($g=2.0035$) e valores superiores ($g=2.0055$) quanto a presença de feomelanina, o que de certa forma, poderia explicar a possível sobreposição de microondas observada.

Estes resultados foram condizentes para *D. flagrans*, uma vez que os valores elevados do fator g dependeram do acoplamento orbital do spin e dos níveis de energia no ambiente molecular durante o desemparelhamento dos elétrons em radicais livres, o que poderia ter elevado os valores do fator g (Wertz, 2012), assim como foi observado por Zdybel et al. (2015) para feomelaninas, sugerindo assim, o fato de que *D. flagrans* possivelmente produza melanina sob a forma de feomelanina. Portanto, o radical livre com fator $g = 2.0051$, detectado nas amostras estudadas corresponde a uma semiquinona e está associada à produção de melanina por *D. Flagrans*. Os valores elevados do fator g podem assim também serem explicados, dado que durante a feomelanogênese, tióis assumem um papel fundamental na posterior cisteinização direta de DOPAquinona em cisteinilDOPA ou na intermediação da glutathione em glutathionilDOPA que subsequentemente após uma série de reações ainda desconhecidas sofre polimerização para produzir alguns derivados de benzotiazina, o que resulta na formação final de macromoléculas de alto peso molecular (Kobayashi et al., 1995; Chang, 2009; Chang, 2012).

O estudo morfológico e ultraestrutural das células de *D. flagrans* permitiu observar os grânulos de melanina presentes em coesão com a parede celular do fungo, seja como um polímero enredado dentro da parede da célula, ou incorporado a sua camada mais externa. Similarmente, Mandal et al. (2007) ao analisarem a ultraestrutura da parede celular de *C. neoformans* demonstraram a presença de melanina sob a forma de anéis concêntricos de diferentes dimensões e que ocupavam aproximadamente 75% da área total da parede celular quando comparadas com cepas albinas utilizadas para o estudo. Zhong

et al. (2008) observaram a existência de ligações covalentes entre polissacarídeos e nanoproteínas presentes em íntima associação com a melanina contida nas paredes celulares de *C. neoformans* e sugeriram que a melanina poderia atuar como um componente da parede celular. Franzen et al. (2006) também verificaram a presença de grânulos de melanina depositados sobre a parede celular do micélio e sobre os conídios de *Fonsecaea pedrosoi*.

A presença de uma rede densa de múltiplas camadas de melanina sobre a parede celular dos clamidósporos em *D. flagrans* possibilitou entender melhor como uma estrutura de resistência, e que é muito utilizada no controle biológico de nematoides gastrointestinais em ruminantes, poderia resistir tão bem a passagem pelo trato digestivo desses animais antes de sua atuação final na captura e predação de nematoides presentes nas fezes. Eisenman et al. (2005) em seu estudo sobre a ultraestrutura da parede celular em *C. neoformans* observaram que a melanina estava distribuída sobre diversas camadas de grânulos dos quais formavam pequenos poros e canais entre as partículas e ao utilizarem anticorpos específicos anti-melanina notaram que estes poros reduziam em dimensão quando comparados às células controle, e assim, pequenas moléculas poderiam ser impedidas de entrarem na célula através da parede celular. Este fato sugere que durante o trajeto dos clamidósporos de *D. flagrans* pelas vias digestivas dos animais após administração oral, os poros existentes entre os grânulos de melanina poderiam ser comprimidos e diminuir dessa forma o seu diâmetro, o que os tornariam mais resistentes ao ataque dos sucos digestivos ou de outras possíveis moléculas que são lançadas no trato digestivo e que seriam tóxicas ao fungo. Lamy-Freund et al. (1991), evidenciaram o problema da resistência a anti-fúngicos como a Anfotericina B e constataram que o tamanho de suas moléculas favoreciam a formação de pequenos agregados dificultando a penetração e a passagem da droga pela parede celular do fungo analisado.

No presente estudo foi possível demonstrar a presença de estruturas subcelulares, semelhantes aos lisossomos de mamíferos, conhecidas como melanossomos (Seiji et al. 1963) e que a princípio, parecem participar da síntese e deposição de melanina em *D. flagrans*, conforme previamente descrito para *F. pedrosoi* por Franzen et al. (2008) no qual foi proposto que a síntese de melanina para o fungo estudado iniciava-se no interior dos

melanossomos com a formação de uma matriz fibrilar seguida da junção com a membrana fúngica, da qual os grânulos de melanina atingiriam a parede celular ocupando os espaços periplasmáticos entre a membrana e a parede celular do fungo, porém as imagens obtidas no referido trabalho, não deixaram claro a semelhança dos processos descritivos mencionados conforme acontece com os melanossomos de células animais.

Há algum tempo, é sabido que os melanossomos em mamíferos e pelo menos para uma espécie de salamandra, *Proteus anguinus* (Prelovšek e Bulog, 2003), passam por quatro estádios de maturação. Estes podem ser definidos em: estágio I- de pré-melanossomo, com uma matriz filamentosa ainda não bem definida, estágio II- com os filamentos lamelares bem definidos e com grande atuação da enzima tirosinase, passando pelo estágio III, com início da deposição dos grânulos de melanina e alta atividade enzimática ao longo da matriz lamelar e finalmente chegando ao estágio IV, com completa deposição de melanina e aumento da opacidade e escurecimento da organela (Orlow, 1995; Mioti et al., 2009; Nguyen e Wei, 2004; Raposo e Marks, 2007).

Embora tais estádios de maturação dos melanossomos tenham sido propostos para fungos à analogia desta gênese tal como ocorre em células de mamíferos e de uma espécie de salamandra ainda não havia sido bem documentada para fungos com o grau de detalhamento, como feito aqui para *D.flagrans*. Curiosamente observamos no estágio II a organela emitindo um prolongamento em direção ao septo. Embora não tenha atingido total maturação, seria possível a deposição ou transporte de parte do conteúdo por meio deste prolongamento para tal região da hifa?

É importante ressaltar, que o arranjo da melanina sobre a parede celular em fungos tende a ser diferente para cada espécie, contudo, a presença da melanina em fungos está bem descrita para diversas espécies como um importante fator de proteção e de virulência, sendo assim considerada essencial para a sobrevivência principalmente em espécies de vida livre (Eisenman e Casadevall, 2012). Fernandez et al. (2013) ao estudarem o processo de melanização das paredes celulares em hifas de um fungo ectomicorrízico *Cenococcum geophilum* observaram que a produção de melanina funcionava como um regulador importante na tolerância ao estresse osmótico e também sobre a dessecação em ambientes sujeitos ao estresse

hídrico, uma vez que as paredes celulares melanizadas podem ajudar a evitar a saída de solutos da célula, e dessa forma, a melanização poderia reforçar a parede celular, permitindo que a célula suporte a elevada pressão de turgescência resultante da reinundação seguinte ao estresse hídrico. Rosa et al. (2010) ao estudarem fungos extremófilos, observaram que das 26 espécies fungos endófitos analisados sob condições naturais, nas regiões polares, 80,7% daqueles que viviam sobre as folhas da herbácea *Deschampsia antarctica* (Poaceae), comumente encontrada na Antártida, produziam algum tipo de pigmento de melanina. Em *D. Flagrans*, tem-se atribuído o maior exito de sobrevivência ao estresse digestivo aos clamidósporos e em especial a parede celular espessa que estas fases de vida apresentam (Ojeda-Robertos et al., 2009). Porém como demonstrado, existe uma concentração de depósito de melanina numa grossa camada na parede celular, e como se sabe que a melanização interfere na porosidade da parede celular reduzindo o tamanho destes (Jacobson e Ikeda, 2005), é muito provável que a capacidade de resistência do fungo ao transito gastrintestinal dos animais, possivelmente se deva em função da presença da melanina, que age diretamente na parede celular reduzindo a sua porosidade.

Esses achados sustentam a ideia de que esses fungos podem sobreviver bem em locais isolados sob condições extremas de alta insolação, radiação UV, umidade relativa do ar seca e baixas temperaturas e que a melanina pode dessa forma desempenhar um papel chave para o sucesso dos fungos.

6.2. Cinética Predatória e Produção da Melanina durante Interação Fungo – Nematóide

A melanina pode estar presente em fungos, com uma variedade de funções biológicas, dentre as quais destaca-se a proteção contra radiação ultravioleta e seu papel sobre a virulência em algumas espécies (Treseder e Lennon, 2015). Em fungos nematófagos, antagonistas que capturam e infectam nematoides presentes nas fezes de ruminantes por diferentes mecanismos (Assis et al., 2013), a possível presença do polímero melanina só recentemente foi demonstrada por Andersson et al. (2013), com a identificação de genes relacionados a produção de tirosinases em *Monacrosporium haptotylum*

durante o processo de interação fungo-nematoide. Para os ensaios preliminares obtidos no presente modelo de estudo, a presença ou a ausência de melanina durante o processo de interação fungo-nematoide, não influenciou de forma significativa a predação realizada por *D. flagrans*, sugerindo a presença do polímero melanina, porém não a sua participação efetiva nos eventos relacionados à imobilização e morte dos nematoides. Este fato leva a crer que a melanina possivelmente esteja muito mais ligada o estresse do que ao aumento da predação, contrariamente ao que ocorre para muitas espécies de fungos patogênicos que são melanizados, que possuem mecanismos de ação e modos de vida completamente diferentes (Solano, 2014).

A sequência de captura e infecção do nematoide pelo fungo envolve uma série de eventos que inicia-se com o reconhecimento, adesão, infecção e estádios digestivos para posterior absorção de nutrientes (Wang et al., 2015). Alguns estudos tem demonstrado que estes processos são mediados pela participação de polímeros extracelulares que estão presentes nas estruturas de predação formadas ao longo das hifas, como enzimas hidrolíticas (Tunlid et al., 1994; Yang et al., 2008; Cruz et al., 2009), além de nematoxinas que são substâncias com ação nematocida que imobilizam e matam os nematoides tão logo após a penetração da cutícula pelas hifas (Swe et al., 2011). Cruz et al. (2009) demonstraram a importância das fosfatases durante o processo de interação fungo-nematoide entre *D. flagrans* e *Panagrellus* spp. e sugeriu que a fosfatase ácida pode ter um papel fundamental no processo de penetração e digestão extracelular e não somente a influência da presença ou ausência de melanina, como aqui tentou-se demonstrar.

A cinética de captura e infecção por *D. flagrans* foi avaliada logo após a deposição de *Panagrellus* spp. na placa de Petri e em poucos minutos observou-se uma intensa movimentação das larvas do nematoide, seguida de formação de estruturas de predação pelo fungo ao longo das hifas, possivelmente em resposta a motilidade e ao estresse fisiológico ocasionado pelas larvas, conforme evidenciado por Cruz et al. (2011) em que após a adição dos nematoides, as primeiras observações de captura pelo fungo, foram verificadas após 70 minutos de interação, seguida da mortalidade após 9 horas de experimentação.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por meio deste estudo indicaram que *D. flagrans* sintetiza melanina *in vitro* possivelmente sob a forma de feomelanina.

As partículas de melanina parecem estar associadas estruturalmente a parede celular.

Foi demonstrada pela primeira vez para fungos nematófagos a presença de estruturas que possivelmente participem da síntese e deposição de melanina, conhecida como melanossomos, e que sua gênese sugere uma analogia com melanossomos de mamíferos. Porém, seria o melanossomo observado pela microscopia eletrônica de transmissão a fonte da produção de melanina para *Duddingtonia flagrans*?

A síntese de melanina por *D. flagrans* não interfere na predação do fungo sobre *Panagrellus* spp. *in vitro*, mas sim, mais possivelmente, no estresse, do que no aumento da patogenicidade.

O grande desafio seria desvendar a função e a participação da melanina em *D. flagrans* durante o ato de captura e predação no ambiente natural.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J.V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A.; MARGARETO, J.; SENDINO, J.; HERNANDO F.L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 4, p. 155-182, 2010.

ABOUL-NASR, M.B.; ZOHRI, A.N.A.; AMER, E.M. Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. **Springer Plus**, v. 2, n. 1, p. 347, 2013.

ADACHI, K.; HAMER, J.E. Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, v. 10, n. 8, p. 1361-1373, 1998.

AHREN, D.; FAEDO, M.; RAJASHEKAR, B.; TUNLID, A. Low genetic diversity among isolates of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*: evidence for recent worldwide dispersion from a single common ancestor. **Mycological Research**, v. 108, p. 1205-1214, 2004.

AL-FAKIH, A.A. Overview on the fungal metabolites involved in mycopathy. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 2014, 2014.

ALLAM, N.G.; EL-ZAHER, E.H.F. Protective role of *Aspergillus fumigatus* melanin against ultraviolet (UV) irradiation and *Bjerkandera adusta* melanin as a candidate vaccine against systemic candidiasis. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 24, p. 6566-6577, 2014.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 554-562, 2009.

ALVIANO, D.S.; FRANZEN, A.J.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies

and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 2, p. 229-237, 2004.

ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 260-271, 2010.

ANDERSSON, K. M., MEERUPATI, T., LEVANDER, F., FRIMAN, E., AHRÉN, D., TUNLID, A. Characterization of the proteome of the nematode-trapping cells of the fungus *Monacrosporium haptotylum*. **Applied and environmental microbiology**, p. 1-59, 2013.

ANDRÁSSY, I. Klasse Nematoda. Ordnungen Monhysterida, Desmocolocida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida. In: Franz H (ed.). **Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas**. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1984, 508 p.

ASSIS, R.C.L.; LUNS, F.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ASSIS, R.L.; MARCELINO, J.L.; ANDRADE, M.A.S. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 134-140, 2013.

BARBER, J.I.; TOWNSEND, D.; OLDS, D.P.; KING, R.A. Decreased dopachrome oxidoreductase activity in yellow mice. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 1, p. 59-60, 1985.

BARRON, G.L. Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem**, v. 9, p. 311-326, 1992.

BAUDENA, M.A.; CHAPMAN, M.R.; LARSEN, M.; KLEI, T.R. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 219-230, 2000.

BELL, A.A.; STIPANOVIC, R.D.; PUHALLA, J.E. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*: Identification of (+)-scytalone as a natural precursor to melanin. **Tetrahedron**, v. 32, n. 12, p. 1353-1356, 1976.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 411-451, 1986.

BELOQUI, A.; PITA, M.; POLAINA, J.; MARTÍNEZ-ARIAS, A.; GOLYSHINA, O.V.; ZUMÁRRAGA, M.; YAKIMOV, M.M.; GARCÍA-ARELLANO, H.; ALCALDE, M.; FERNÁNDEZ, V.M.; ELBOROUGH, K.; ANDREU, J.M.; BENNETT, D.C.; LAMOREUX, M.L. The color loci of mice- a genetic century. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 333-344, 2003.

BLOCH, B. **Das Pigment**. v. 1, n. 1, p. 343–451, Springer Berlin Heidelberg, 1927.

BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.D.; SOARES, F.E.D.F.; TAVELA, A.D.O.; FRASSY, L.N.; LIMA, W.S.; MOZZER, L.R. In vitro predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 108-110, 2013.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 71-82, 2014.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO, J.M. CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 686-688, 2008.

BROWN, N.A.; URBAN, M.; HAMMOND-KOSACK, K.E. The trans-kingdom identification of negative regulators of pathogen hypervirulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. 1-22, 2015.

BRUNSKOLE SVEGELJ, M.; TURK, S.; BRUS, B.; LANIŠNIK RIŽNER, T.; STOJAN, J.; GOBEC, S. Novel inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase with antifungal activity identified by ligand-based and structure-based virtual

screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 7, p. 1716-1724, 2011.

BUZATTI, A.; DE PAULA SANTOS, C.; FERNANDES, M.A.M.; YOSHITANI, U.Y.; SPRENGER, L.K.; DOS SANTOS, C.D.; MOLENTO, M.B. *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. **Experimental Parasitology**, v. 159, p. 1-4, 2015.

CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 130-132, 2007.

CASADEVALL, A.; NAKOUZI, A.; CRIPPA, P.R.; EISNER, M. Fungal melanins differ in planar stacking distances. **PlosOne**, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2012.

CESAREO, E.; KORKINA, L.; D'ERRICO, G.; VITIELLO, G.; AGUZZI, M.S.; PASSARELLI, F.; PEDERSEN, J.Z.; FACCHIANO, A. An endogenous electron spin resonance (ESR) signal discriminates nevi from melanomas in human specimens: a step forward in its diagnostic application. **PlosOne**, v. 7, p. 1-11, 2012.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; ADNAN, M.; WALLER, P. J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 177-187, 2004.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; HÖGLUND, J.; LARSEN, M.; ZAHARI, W.M. Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 685-696, 2002.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T.; ZAHARI, W.M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 173-183, 2003.

CHANG, T. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 2009.

CHANG, T. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. **Materials**, v. 5, n. 9, p. 1661-1685, 2012.

CHATTERJEE, S.; PRADOS-ROSALES, R.; FRASES, S.; ITIN, B.; CASADEVALL, A.; STARK, R.E. Using solid-state NMR to monitor the molecular consequences of *Cryptococcus neoformans* melanization with different catecholamine precursors. **Biochemistry**, v. 51, n. 31, p. 6080-6088, 2012.

CHEN, L. Y.; LEU, W. M.; WANG, K. T.; LEE, Y. H. Copper transfer and activation of the Streptomyces apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 28, p. 20100-20107, 1992.

CHIKVAIDZE, E.N.; PARTSKHALADZE, T.M; GOGOLADZE, T.V. Electron spin resonance (ESR/EPR) of free radicals observed in human red hair: a new, simple empirical method of determination of pheomelanin/eumelanin ratio in hair. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 7, p. 377-382, 2014.

control. **Bulletin SROP**, v.14, p.13-17, 1991.

COOKE, R.C. Two nematode-trapping hyphomycetes, *Duddingtonia flagrans* gen. et comb.nov. and *Monagrosporium mutabilis* sp.nov. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 53, n. 2, p. 315-319, 1969.

COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key to nematode destroying fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.47, n.1, p. 61, 74, 1964.

COPETE, L.S.; CHANAGÁ, X.; BARRIUSO, J.; LÓPEZ-LUCENDO, M.F.; MARTÍNEZ, M.J.; CAMARERO, S. Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 74, 2015.

CORDEIRO, R.C.; CRUZ, D.G.; LOPES, A.J.O.; ROCHA, L.V.; SANTOS, C.P. Effect of the oral administration of *Duddingtonia flagrans* in a population of gastrointestinal nematodes of ovine in the district of Campos dos Goytacazes-North Fluminense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES,

1., 2004, Ouro Preto. Anais... Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. p. 260.

COX, G.M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G.T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CRUZ, D.G.; ARAÚJO, F.B.; MOLENTO, M.B.; DAMATTA, R.A.; SANTOS, C.P. Kinetics of capture and infection of infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* sp. by *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1085-1091, 2011.

CRUZ, D.G.; SILVA, C.P.; CARNEIRO, C.N.B.; RETAMAL, C.A.; THIÉBAUT, J.T.L.; DAMATTA, R.A.; SANTOS, C.P. Acid phosphatase activity during the interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with the nematode *Panagrellus* sp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, n. 3, p. 238-244, 2009.

DA SILVA, M.B.; MARQUES, A.F.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 1, p. 197-205, 2006.

DADACHOVA, E.; BRYAN, R. A.; HOWELL, R. C.; SCHWEITZER, A.D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 2, p. 192-199, 2008.

DE ANGELIS, F.; ARCADI, A.; MARINELLI, F.; PACI, M.; BOTTI, D.; PACIONI, G.; MIRANDA, M. Partial structures of truffle melanins. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1103-1106, 1996.

DERBY, C.D. Cephalopod ink: Production, chemistry, functions and applications. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2700-2730, 2014.

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; NAPOLITANO, A.; BRIGANTI, S.; GARCIA-BORRON, J.C.; KOVACS, D.; MEREDITH, P.; PEZZELLA, A.; PICARDO, M.; SARNA, T.; SIMON, J.D.; ITO, S. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 5, p. 616-633, 2013.

DUFF, G.A.; ROBERTS, J.E.; FOSTER, N. Analysis of the structure of synthetic and natural melanins by solid-phase NMR. **Biochemistry**, v. 27, n. 18, p. 7112-7116, 1988.

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.

EISENMAN, H.C.; MUES, M.; WEBER, S.E.; FRASES, S.; CHASKES, S.; GERFEN, G.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D-and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3954-3962, 2007.

EISENMAN, H.C.; NOSANCHUK, J.D.; WEBBER, J.B.W.; EMERSON, R.J.; CAMESANO, T.A.; CASADEVALL, A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683-3693, 2005.

FAEDO, M.; BARNES, E.H.; DOBSON, R.J.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 129-135, 1998.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 149-155, 1997.

FEDER, V.; KMETZSCH, L.; STAATS, C.C.; VIDAL-FIGUEIREDO, N.; LIGABUE-BRAUN, R.; CARLINI, C.R.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus gattii*

urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS Journal**, v. 282, n. 8, p. 1406-1418, 2015.

FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 3, p. 257-266, 1997.

FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENNINGSEN, E.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; BJØRN, H. The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the transmission of. **Journal of Helminthology**, v. 73, n. 2, p. 115-122, 1999.

FERNANDEZ, W.C.; KOIDE, R.T. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. **Fungal Ecology**, v. 6, p. 479-486, 2013.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; DOS SANTOS, F.B.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA-PAES, R. I-Dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 988-991, 2014.

FIGUEROA, J. L. Nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. **Investigación y Ciencia**, v. 17, n. 45, 2009.

FONTENOT, M.E.; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3, p. 203-213, 2003.

FRANZEN, A.J.; CUNHA, M.L.; BATISTA, E.J.O.; SEABRA, S.H.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. 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 Technics**. v. 69 n. 9, p. 729-737. 2006.

FRANZEN, A.J.; CUNHA, M.M.L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; SILVA, M.B.; SALGADO, C.G.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v. 162, n. 1, p. 75-84, 2008.

FRASES, S.; CHASKES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 2, p. 1542-1550, 2006.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 615-621, 2007.

FUJII, I.; YASUOKA, Y.; TSAI, H.F.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J.; EBIZUKA, Y. Hydrolytic polyketide shortening by *ayg1p*, a novel enzyme involved in fungal melanin biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44613-44620, 2004.

GARCIA-RIVERA, J.; EISENMAN, H.C.; NOSANCHUK, J.D.; AISEN, P.; ZARAGOZA, O.; MOADEL, T.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 12, p. 989-998, 2005.

GARCÍA-RODAS, R.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; JANBON, G.; MOYRAND, F.; PLA, J.; CADASEVALL, A.; ZARAGOZA, O. Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015.

GESSLER, N.N.; EGOROVA, A.S.; BELOZERSKAYA, T.A. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 105-113, 2014.

GITHIGIA, S.M.; THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M.; KYVSGAARD, N.C.; NANSEN, P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on

trichostrongyle infections of lambs on pasture. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 931-939, 1997.

GLASS, K.; ITO, S.; WILBY, P.R.; SOTA, T.; NAKAMURA, A.; BOWERS, C.R.; VINTHERF, J.; DUTTA, S.; SUMMONS, R.; BRIGGS, D.E.G.; WAKAMATSUB, K.; SIMON, J.D. Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10218-10223, 2012.

GOMES, A.P.S.; VASCONCELLOS, R.S.; RAMOS, M.L.; GUIMARÃES, M.P.; YATSUDA, A.P.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. In vitro interaction of Brazilian strains of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* spp. on *Panagrellus* sp. and *Cooperia punctata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 861-864, 2001.

GOMES, F.S.; SARMENTO, D.N.; SANTO, E.P.T.D.E.; SILVA, S.H.M.D. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 43-49, 2010.

GOODEY, T. A note on the subfamily Turbatricinae and the genus *Turbator* Goodey, 1943. **Journal of Helminthology**, v. 21, n. 2-3, p. 69-70, 1945.

GOODEY, T. On the systematic relationships of the vinegar eelworm, *Turbatrix aceti*, and its congeners, with a description of a new species. **Journal of Helminthology**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 1943.

GOODEY, T. Soil and freshwater nematodes. **Soil and freshwater nematodes**, 2^a Ed. Londres, UK, 1963. 544 p.

GRIFIN, D.H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss. 1994. 458 p.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A. Nematode-trapping fungi against parasitic cattle nematodes. **Parasitology Today**, v. 9, n. 4, p. 137-140, 1993.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J.C.; HAMDI, M.; LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics,

bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 219-232, 2006.

HARA, M.; YAAR, M.; BYERS, H.R.; GOUKASSIAN, D.; GONSALVES, J.; GILCHREST, B.A.; FINE, R.E. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 438-443, 2000.

HECHLER, H. C. Taxonomic notes on four species of *Panagrellus Thorne* (Nematoda: Cephalobidae). **Journal of Nematology**, v. 3, n. 3, p. 227-237, 1971.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 447-471, 1999.

HERRERA-ESTRELLA, A.; CASAS-FLORES, S.; KUBICEK, P.C. **Nematophagous Fungi**. In: DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. (Eds.) *Environmental and Microbial Relationships*, 3^aEd, The Mycota IV. Springer International Publishing, Switzerland, 2016. p. 247-247

HILL, A.M. **Polyketide Polyethers**. In.: *Natural Products in Chemical Biology*, CIVJAN, N., Ed. Wiley: New York, 2012. p.189-206

HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 491-512, 1996.

HUTCHINSON, C.R. Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: falling together by coming apart. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 6, p. 3010-3012, 2003.

IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S.G.; BANNO, Y.; COLE, G.T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS, J.E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M.A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1993-1998, 1995.

IKEDA, H.; SHIN-YA, K.; OMURA, S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 233-250, 2014.

ITO, S. Reexamination of the structure of eumelanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 883, n. 1, p. 155-161, 1986.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 5, p. 523-531, 2003.

JACOBSON, E.S.; IKEDA, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p. 327-333, 2005.

JAMES, T.Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C.L.; MATHENY, P.B.; HOFSTETTER, V.; COX, C.J.; LUMBSCH, H.T. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.

KEJZAR, A.; GOBEC, S.; PLEMENITAS, A.; LENASSI, M. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. **Fungal Biology**, v. 117, n. 5, p. 368-379, 2013.

KIM, K.; YOUN, B.S.; HENG, H.H.Q.; SHI, X.M.; TSUI, L.C.; LEE, Z.H.; KWON, B.S. Genomic organization and FISH mapping of human Pmel 17, the putative silver locus. **Pigment Cell Research**, v. 9, n. 1, p. 42-48, 1996.

KNOX, M.R.; FAEDO, M. Biological control of field infections of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans* and effects of spore intake on efficacy. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 2, p. 155-160, 2001.

KOBAYASHI, T.; VIEIRA, W.D.; POTTERF, B.; SAKAI, C.; IMOKAWA, G.; HEARING, V.J. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 6, p. 2301-2309, 1995.

KROKEN, S.; GLASS, N.L.; TAYLOR, J.W.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic

and saprobic ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15670-15675, 2003.

KUBO, Y.; SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; YAMAMOTO, M. Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1198-1200, 1982.

KUMAR, M.; CHAND, R.; DUBEY, R.S.; SHAH, K. Effect of Tricyclazole on morphology, virulence and enzymatic alterations in pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* for management of spot blotch disease in barley. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 23-35, 2015.

KUNAMNENI, A.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J.; ALCALDE, M. Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. 1, p. 233-245, 2007.

LAMY-FREUND, M.T.; SCHREIER, S.; PEITZSCH, R.M.; REED, W.F. Characterization and time dependence of amphotericin B: deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 3, p. 262-266, 1991.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.

LARSEN, M. Biological control of nematode parasites in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 13, p. 133-139, 2006.

LARSEN, M., WOLSTRUP, J., HENRIKSEN, S.A., DACKMAN, C., GRØNVOLD, J., NANSEN, P. *In vitro* stress selection of nematophagous fungi biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v. 65, p. 193- 200, 1991.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNDHAL, C.; THAMSBORG, S.M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; MONRAD, J. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 1-6, 1996.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; ZORN, A.; WEDØ, E. Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 3-4, p. 315-320, 1995.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 3-4, p. 321-330, 1995.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**. v. 66, n. 2, p.137-141, 1992.

LATGE, J.P.; DEBEAUPUIS, J.P.; SARFATI, J.; DIAQUIN, M.; PARIS, S. Cell wall antigens in *Aspergillus fumigatus*. **Archives of Medical Research**, v. 24, n. 3, p. 269-274, 1992.

LAZAROVITS, G.; STOESSL, A. Tricyclazole induces melanin shunt products and inhibits altersolanol A accumulation by *Alternaria solani*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 31, n. 1, p. 36-45, 1988.

LEVASSEUR, A.; SALOHEIMO, M.; NAVARRO, D.; ANDBERG, M.; PONTAROTTI, P.; KRUIUS, K.; RECORD, E. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. **BMC Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 32, 2010.

LIU, X.; ZHANG, K.Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. **Mycological Research**, v. 98, n. 8, p. 862-868, 1994.

LOPES, F. C.; TICHOTA, D. M.; PEREIRA, J. Q.; SEGALIN, J.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; BRANDELLI, A. Pigment production by filamentous fungi on agro-

industrial byproducts: an eco-friendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 3, p. 616, 2013.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; GUIM, T.N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M. C. A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 2, p. 162-165, 2010.

MAGARELLI, M.; PASSAMONTI, P.; RENIERI, C. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*). **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 5, n. 2, p. 18-29, 2010.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MALACZEWSKA, J.O.A.N.N.A.; WOJCIK, R.; JUNG, L.E.S.Z.E.K.; SIWICKI, A.K. Effect of Biolex β -HP on selected parameters of specific and non-specific humoral and cellular immunity in rats. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, p. 75-80, 2010.

MANDAL, P.; ROY, T.S.; DAS, T.K.; BANERJEE, U.; XESS, I.; NOSANCHUK, J.D. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 662-666, 2007.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SENTHILKUMAR, K.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S.K. Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 263-274, 2013.

MARES; D., ROMAGNOLI, C.; ANDREOTTI, E.; MANFRINI, M.; VICENTINI, C.B. Synthesis and antifungal action of new tricyclazole analogues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, p. 2003-2009, 2004.

MASON, H.S. Comparative biochemistry of the phenolase complex. **Advances in Enzymology**, v. 16, p. 105-184, 1955.

MCINNES, S. J. A predatory fungus (Hyphomycetes: Lecophagus) attacking Rotifera and Tardigrada in maritime Antarctic lakes. **Polar Biology**, v. 26, n. 2, p. 79-82, 2003.

MEERUPATI, T.; ANDERSSON, K. M.; FRIMAN, E.; KUMAR, D.; TUNLID, A.; AHRÉN, D. Genomic mechanisms accounting for the adaptation to parasitism in nematode-trapping fungi. **PLoS Genet**, v. 9, n. 11, p. 1-20, 2013.

MEREDITH, P.; SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v. 19, n. 6, p. 572-594, 2006.

MIOT, B.; MIOT, H.A.; GUIMARAES DA SILVA, M.; ALENCAR MARQUES, M.E. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623-635, 2009.

MORETTI, M.L.; RESENDE, M.R.; LAZÉRA, M.S.; COLOMBO, A.L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-44, 2008.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F.M.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S.B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

NAGAI, M.; KAWATA, M.; WATANABE, H.; OGAWA, M.; SAITO, K.; TAKESAWA, T.; KATSUHIRO, K.; SATO, T. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2455-2462, 2003.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; ZORN, A.; HENRIKSEN, S.A. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v. 81, n. 5, p. 371-374, 1995.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v. 82, n. 7, p. 580-584, 1996.

NAPPI A.J.; SUGUMARAN M. Some Biochemical Aspects of Eumelanin Formation in Insect Immunity. In: PATHAK J.P.N. (Eds) **Insect Immunity**. Series Entomologica, v. 48, Kluwer Academic, Boston, MA, 1993. p. 131-148

NAPPI, A.J.; CHRISTENSEN, B.M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 443-459, 2005.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; PRICE, J.; SORRELL, T.; PERFECT, J.R.; MEYER, W. *Cryptococcus gattii* virulence composite: candidate genes revealed by microarray analysis of high and less virulent Vancouver island outbreak strains. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p.1-12, 2011.

NGUYEN, T.; WEI, M.L. Characterization of melanosomes in murine Hermansky–Pudlak syndrome: mechanisms of hypopigmentation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 452-460, 2004.

NICOLAUS, R.A. **Melanins**. (Paris: Hermann), v. 69, 1969. p. 130-133.

NORDBRING-HERTZ, B., JANSSON, H., TUNLID, A. **Nematophagous Fungi**. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2006.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519-3528, 2006.

OJEDA-ROBERTOS, N.F.; TORRES-ACOSTA, J.F.; AYALA-BURGOS, A.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; VALERO-COSS, R.O.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 1, p. 46, 2009.

ORLOW, S.J. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, n. 1, p. 3-7, 1995.

OTRĘBA, M.; ZDYBEL, M.; PILAWA, B.; BEBEROK, A.; WRZEŚNIOK, D.; ROK, J.; BUSZMAN, E. EPR spectroscopy of chlorpromazine-induced free radical formation in normal human melanocytes. **European Biophysics Journal**, v. 44, n. 5, p. 359-365, 2015.

OTRĘBA, M.; ZDYBEL, M.; PILAWA, B.; BEBEROK, A.; WRZEŚNIOK, D.; ROK, J.; BUSZMAN, E. EPR spectroscopy of chlorpromazine-induced free radical formation in normal human melanocytes. **European Biophysics Journal**, v. 5, p. 359-365, 2015.

PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M.; MISURACA, G.; DE MARTINO, L.; PROTA, G. A new dopachrome-rearranging enzyme from the ejected ink of the cuttlefish *Sepia officinalis*. **Biochemical Journal**, v. 299, n. 3, p. 839–844, 1994.

PARAUD, C.; CHARTIER, C. Biological control of infective larvae of a gastrointestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. **Parasitology Research**, v. 89, n. 2, p. 102-106, 2003.

PASTRE, R.; MARINHO, A.M.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A.Q.; PEREIRA, J.O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867, 2007.

PELOILLE, M. Selection of nematode-trapping fungi for use in biological

PEÑA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 259-265, 2002.

PETKEVICIUS, S.; LARSEN, M.; KNUDSEN, K.E.B.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. The effect of the nematode-destroying fungus *Duddingtonia flagrans* against *Oesophagostomum*

dentatum larvae in faeces from pigs fed different diets. **Helminthologia**, v. 35, p. 111-116, 1998.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 429-443, 2006.

POLACHEK, I.; KWON-CHUNG, K.J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 134, n. 4, p. 1037-1041, 1988.

PRELOVŠEK, P.M.; BULOG, B. Biogenesis of melanosomes in Kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 345-350, 2003.

RAPARIA, K.; POWELL, S.Z.; CERNOCH, P.; TAKEI, H. Cerebral mycosis: 7-year retrospective series in a tertiary center. **Neuropathology**, v. 30, n. 3, p. 218-223, 2010.

RAPOSO, G.; MARKS, M.S. Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 786-797, 2007.

REMENTERIA, A.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LUDWIG, A.; VIVANCO, A.B.; BIKANDI, J.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 1, p. 1-23, 2005.

RICCI, M.; FIFI, A.; RAGNI, A.; SCHLECHTRIEM, C.; FOCKEN, U. Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 556-559, 2003.

RIŽNER, T.L.; WHEELER, M.H. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 110-119, 2003.

ROBBINS, R. C. Chemical and physical behavior of human hair. In: **Genetic Control/Involvement in Hair Fiber Traits**, 5^a Ed. Springer, Berlin, Alemanha, 2012. p. 177–203

RODRIGUES, M.L.; NAKAYASU, E.S.; OLIVEIRA, D.L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J.D.; ALMEIDA, I.C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696-3703, 2000.

ROSA, L.H.; VIEIRA, M.D.L.A.; SANTIAGO, I.F.; ROSA, C.A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.(Caryophyllaceae) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 1, p. 178-189, 2010.

ROSAS, A.L.; NOSANCHUK, J.D.; FELDMESSER, M.; COX, G.M.; MCDADE, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2845-2853, 2000.

RUBNER, A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. **Studies in Mycology**, v. 39, p. 1-134, 1996.

RUTHERFORD, J.C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

SANTIAGO, C. B.; GONZAL, A. C.; RICCI, M.; HARPAZ, S. Response of bighead carp *Aristichthys nobilis* and Asian catfish *Clarias macrocephalus* larvae to free-living nematode *Panagrellus redivivus* as alternative feed. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. 239-243, 2003.

SARNA, T.; PLONKA, P.M. Biophysical studies of melanin. In: **Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology**. Springer US, 2005. p. 125-146.

SEIBERG, M. Keratinocyte–melanocyte interactions during melanosome transfer. **Pigment Cell Research**, v. 14, n. 4, p. 236-242, 2001.

SEIJI, M.; SHIMAO, K.; FITZPATRICK, T.B.; SIMPSON, R.T.; BIRBECK, M.S.C.; Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. **Nature**, v. 197, p. 1082-1084, 1963.

SELINHEIMO, E., NIEIDHIN, D., STEFFENSEN, C., NIELSEN, J., LOMASCOLO, A., HALAOULI, S.; RECORD, E.; O'BEIRNE, D.; BUCHERT, J.; KRUUS, K. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 471-480, 2007.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 285-295, 2003.

SILVA, M.E.; ARAÚJO, J.V.D.; BRAGA, F.R.; FREITAS, F.E.D.S.; RODRIGUES, D.S. Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 78-83, 2013.

SIMIN, S.; ĐURIĆ, S.; KURUCA, L.; HAJNAL-JAFARI, T.; STAMENOV, D.; LALOŠEVIĆ, V. Nematophagous Activity of *Duddingtonia Flagrans* MUCL 9827 Against Sheep Gastrointestinal Nematodes. **Contemporary Agriculture**, v. 65, n. 3-4, p. 13-20, 2016.

SIMON, J.D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 5, p. 563-579, 2009.

SINGARAVELAN, N.; GRISHKAN, I.; BEHARAV, A.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; NEVO, E. Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at "Evolution Canyon", Mount Carmel, Israel. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. 1-5, 2008.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155-1228, 2004.

SOLANO, F. Melanins: skin pigments and much more types, structural models, biological functions, and formation routes. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1-28, 2014.

STEENBERGEN, J.N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.

STOCK, S. P.; NADLER, S. A. Morphological and molecular characterisation of *Panagrellus* spp. (Cephalobina: Panagrolaimidae): taxonomic status and phylogenetic relationships. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 921-938, 2006.

SWE, A.; LI, J.; ZHANG, K.Q.; POINTING, S.B.; JEEWON, R.; HYDE, K.D. Nematode-trapping fungi. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 1, n. 1, p. 1-26, 2011.

TAVELA A.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; SILVEIRA, W.F.; DORNELAS, V.H.; CARRETTA JÚNIOR, M.; BORGES, L.A.; ARAUJO, J.M.; BENJAMIN, L.A.; CARVALHO, G.R.; PAULA, A.T. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 568-572, 2013.

THATHACHARI, Y.T. Spatial structure of melanin. **Pigment Cell**. v. 3, p. 64-68, 1976.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TIAN, S.; GARCIA-RIVERA, J.; YAN, B.; CASADEVALL, A.; STARK, R.E. Unlocking the molecular structure of fungal melanin using ¹³C biosynthetic labeling and solid-state NMR. **Biochemistry**, v. 42, n. 27, p. 8105-8109, 2003.

TOKOUSBALIDES, M.C.; SISLER, H.D. Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 11, n. 1-3, p. 64-73, 1979.

TRESEDER, K.K.; LENNON, J.T. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 2, p. 243-262, 2015.

TUNLID, A.; JANSSON, S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2868-2872, 1991.

TUNLID, AL.; ROSÉN, S.; EK, B.O.; RASK, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology**, v. 140, n. 7, p. 1687-1695, 1994.

TYVOLD, S.S.; SOLLIGÅRD, E.; LYNG, O.; STEINSHAMN, S.L.; GUNNES, S.; AADAHL, P. Continuous monitoring of the bronchial epithelial lining fluid by microdialysis. **Respiratory Research**, v. 8, n. 1, p. 78, 2007.

VAN DE SANDE, W.W.; DE KAT, J.; COPPENS, J.; AHMED, A.O.; FAHAL, A.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUM, A. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1114-1123, 2007.

VAN DEN BOSSCHE, K.; NAEYAERT, J.M.; LAMBERT, J. The quest for the mechanism of melanin transfer. **Traffic**, v. 7, n. 7, p. 769-778, 2006.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

VAN GELDER, C.W.; FLURKEY, W.H.; WICHERS, H.J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1309-1323, 1997.

VANCE, K.W.; GODING, C.R. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 17, n. 4, p. 318-325, 2004.

VANCOILLIE, G.; LAMBERT, J.; NAEYAERT, J.M.; MULDER, A.; KOERTEN, H.K.; MOMMAAS, A.M.; VAN OOSTVELDT, P. Kinesin and kinectin can associate with the melanosomal surface and form a link with microtubules in normal human melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 421-429, 2000.

WALKER, C.A.; GÓMEZ, B.L.; MORA-MONTES, H.M.; MACKENZIE, K.S.; MUNRO, C.A.; BROWN, A.J.; GOW, N.A.R.; CHRISTOPHER C. KIBBLER, C.C.; ODDS, F.C. Melanin externalization in *Candida albicans* depends on cell wall chitin structures. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 9, p. 1329-1342, 2010.

WANG, B.; LIU, W.; CHEN, M.Y.; LI, X.; HAN, Y.; XU, Q.; SUN, L.; XIE, D.Q.; CAI, K.; LIU, Y.; LIU, J.; YI, L.; WANG, H.; ZHAO, M.; LI, X.; WU, J.; YANG, J.; WANG, Y. Isolation and characterization of China isolates of *Duddingtonia flagrans*, a candidate of the nematophagous fungi for biocontrol of animal parasitic nematodes. **The Journal of Parasitology**, v. 101, n. 4, p. 476-484, 2015.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 541-545, 1996.

WERTZ, J. Electron spin resonance: Elementary theory and practical applications. Springer Science and Business Media, Berlin, 2012. 498 p.

WHEELER, M. H. Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 81, n. 1, p. 29-36, 1983.

WILLIAMSON, P.R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1570-1572, 1998.

WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BØGH, H.O.; ILSØE, B. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. **Journal of Helminthology**, v. 68, n. 2, p. 175-180, 1994.

XU, X.; LUO, S. How the white tiger lost its color, but kept its stripes. **Science China. Life Sciences**, v. 57, n. 10, p. 1041, 2014.

YANG, J.K.; YE, F.P.; MI, Q.L.; TANG, S.Q.; LI, J.; ZHANG, K.Q. Purification and cloning of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Monacrosporium cystosporium*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 852-858, 2008.

YANG, Y.; YANG, E.; AN, Z.; XINGZHONG, L. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from r-RNA-encoding DNA and multiprotein sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8379-8384, 2007.

YE, M.; CHEN, X.; LI, G. W.; GUO, G. Y.; YANG, L. **Structural characteristics of pheomelanin-like pigment from *Lachnum singerianum***. In: Advanced Materials Research. Trans Tech Publications, 2011. p. 1742-1745.

YOSHIOKA, S.; Ohno, N.; Miura, T.; Adachi, Y.; Yadomae, T. Immunotoxicity of soluble β -glucans induced by indomethacin treatment. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 171-179, 1998.

ZAJAC, G.W.; GALLAS, J.M.; CHENG, J.; EISNER, M.; MOSS, S.C.; ALVARADO-SWAISGOOD, A.E. The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1199, n. 3, p. 271-278, 1994.

ZALAR, P.; NOVAK, M.; DE HOOG, G.S.; GUNDE-CIMERMAN, N. Dishwashers-a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. **Fungal Biology**, v. 115, n. 10, p. 997-1007, 2011.

ZDYBEL, M.; CHODUREK, E.; PILAWA, B. Free radicals in ultraviolet irradiated melanins and melanin complexes with Cd (II) and Cu (II)–EPR examination. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 2, p. 131-141, 2015.

ZHANG, C.Q.; ZHU, G.N.; MA, Z.H.; ZHOU, M.G. Isolation, Characterization and Preliminary Genetic Analysis of Laboratory Tricyclazole-resistant Mutants of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 7-8, p. 392-397, 2006.

ZHANG, Y.; QIAO, M.; XU, J.; CAO, Y.; ZHANG, K.Q.; YU, Z.F. Genetic diversity and recombination in natural populations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 312-325, 2013.

ZHDANOVA, N.N.; ZAKHARCHENKO, V.A.; VEMBER, V.V.; NAKONECHNAYA, L.T. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. **Mycological Research**, v. 104, n. 12, p. 1421-1426, 2000.

ZHONG, J.; FRASES, S.; WANG, H.; CASADEVALL, A.; STARK, R.E. Following Fungal Melanin Biosynthesis with Solid-State NMR: Biopolymer Molecular Structures and Possible Connections to Cell-Wall Polysaccharides. **Biochemistry**, v. 16, p. 4701-4710, 2008.