

11261

9



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología y Parasitología

CARACTERIZACION DE LA VIA DE SINTESIS
DEL PIGMENTO DE *Sporothrix schenckii*

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el grado académico de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P r e s e n t a :

RAFAEL ROMERO MARTINEZ

Directora de Tesis: Dra. HAYDEE TORRES GUERRERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

2000

272989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Haydée Torres Guerrero y con el apoyo de los programas: CONACyT 4330-M y DGAPA-UNAM IN207296.

Dedico este trabajo de tesis a:

Mis hijas:

Angeles Rocío, Tania Azucena y Violeta Amparo.

A mi esposa

Rosaura Mayén Estrada.

A la memoria de mi madre
Aurora Martínez Hernández

A mi padre
Pedro Romero Almaraz

A mis hermanas y hermanos.

Agradecimientos

A la Dra. Haydée Torres Guerrero, Jefa del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., por su dirección académica que permitió llevar a buen término este trabajo de investigación.

De manera especial, al Dr. Michael Wheeler del Southern Crops Research Laboratory, Texas, por haberme apoyado con el análisis, por HPLC y absorción de luz UV, de los compuestos purificados.

Este agradecimiento es también para Marie Therese Nancy de Merchant y para Lilia Robert, del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. por su invaluable apoyo en el trabajo de Microscopía Electrónica.

A las integrantes del laboratorio, Minerva y Gabi, por su compañerismo durante mi estancia en el laboratorio.

1,3,6,8-THN	1,3,6,8-Tetrahidroxinaftaleno.
1,3,8-THN	1,3,8-Trihidroxinaftaleno.
2-HJ	2-Hidroxijuglona.
AT	Acil transferasa.
CoA	Coenzima A.
DBH	γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenceno,
DHI	5,6-dihidroxiindol.
DHN	1,8-Dihidroxinaftaleno.
DOPA	Dihidroxifenilalanina.
GBH	γ -glutaminil-4-dihidroxibenceno.
HPLC	cromatografía líquida de alta presión.
MD	Medio de dopamina.
PAA	Proteína acarreadora de grupos acil.
PDA	Medio papa dextrosa agar.
PDL	Medio papa dextrosa líquido.
SAG	Sintetasa de ácidos grasos.
SAMS	Sintetasa del ácido 6-metilsalicílico.
SPC	Sintetasa de policétidos.
TLC	Cromatografía en capa fina.
UV	Luz ultravioleta.
YEPD	Medio de extracto de levadura, peptona, dextrosa.

Indice

	Página
I. Introducción	1
Metabolismo secundario	1
Derivados del ácido corísmico	3
β -lactámicos	3
Policétidos	4
Pigmentos	5
Melanina	6
Características fisicoquímicas	6
Vías de síntesis	7
Melanina DOPA	8
Fenoloxidasas	8
Melanina DHN	10
Inhibición por triciclazol	13
Sintetasa de policétidos	13
Reductasa de polihidroxinaftalenos	16
Deshidratasa de la scitalona y vermelona	17
Organización genómica	17
Función de la melanina	18
Distribución de la melanina en los hongos	19
<i>Sporothrix schenckii</i>	20
II Objetivo general	22
III Materiales y métodos	23
Conservación de las cepas	25
Inducción de la síntesis de la melanina	25
Inhibición de la síntesis de la melanina	25
Mutagénesis con luz UV	25
Complementación química	26
Extracción de metabolitos	27
Cromatografía en capa fina	28
Microscopía de contraste de fases	29
Microscopía electrónica de transmisión	29
IV. Resultados	31
Inducción de la síntesis de la melanina.	31
Inhibición de la síntesis de la melanina por triciclazol	32
Mutantes no melanizadas.	32
Complementacion química	34
Cultivo entre pares de mutantes	34
Cultivo en medio suplementado con un liofilizado	34

Cultivo en medio suplementado con scitalona	34
Identificación de metabolitos	35
Microscopía de contraste de fases	39
Microscopía electrónica de transmisión.	39
V. Discusión	41
Perspectivas del trabajo	48
VI. Conclusiones	49
VII. Bibliografía	50

RESUMEN

Las melaninas son heteropolímeros de elevado peso molecular de color pardo oscuro o negro. Son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza. A la melanina de los hongos se le ha atribuido diversas funciones de protección en condiciones adversas del medio y durante la invasión de su hospedero. Se han caracterizado dos vías de producción de la melanina en los hongos. La vía de dihidroxifenilalanina (DOPA) que es utilizada por el ascomicete *Neurospora crassa* y por los basidiomicetes *Cryptococcus neoformans* y *Ustilago maydis* y la vía dihidroxinaftaleno (DHN) que es un producto del metabolismo secundario de los polícétidos. El primer compuesto en esta vía es un pentacétido lineal, formado por una sintetasa de polícétidos (SPC). El polícétido es ciclizado para dar origen al 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno. La doble reducción y deshidratación enzimática del tetrahidroxinaftaleno da origen a la scitalona, 1,3,8-trihidroxinaftaleno, vermelona y 1,8-dihidroxinaftaleno. Este último compuesto constituye el monómero que es utilizado para la formación de la melanina de DHN. La acumulación de compuestos poco estables como el tetrahidroxinaftaleno y trihidroxinaftaleno provoca su oxidación espontánea, generando la formación de flaviolina y 2-hidroxijuglona. *Sporothrix schenckii* un hongo dimórfico, patógeno causante de una micosis subcutánea en el humano. Este hongo produce conidios hialinos y pigmentados, éstas son sus estructuras de propagación y de infección. En este trabajo se hizo la caracterización de la vía de síntesis del pigmento de los conidios de *S. schenckii*. La producción de la melanina fue inducida en el medio de papa dextrosa agar (PDA). La pigmentación fue inhibida por triciclazol, el cual es un inhibidor específico de la melanina de DHN. Nueve mutantes no melanizadas fueron obtenidas por irradiación con luz UV, de éstas, cinco mutantes albinas sintetizaron melanina cuando se les sembró en medio de papa dextrosa con scitalona. De la mutante albina Mel¹⁴ crecida en PDA con scitalona se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de transmisión, en ellas se observó la presencia extracelular de gránulos de melanina depositados sobre la pared celular, esta distribución fue semejante a lo observado en la cepa silvestre. De la mutante parda Mel¹⁰ se aislaron scitalona y flaviolina, estos compuestos fueron caracterizados por cromatografía en capa fina, HPLC y absorbancia de luz UV. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el pigmento en *S. schenckii* es sintetizado por la vía de DHN.

I. INTRODUCCION

Metabolismo secundario

Al conjunto de las vías de síntesis de compuestos que no son esenciales para el organismo que las produce se les conoce como metabolismo secundario, por lo tanto, los compuestos producidos por éstas vías son denominados como metabolitos secundarios (Vining, 1992; Griffin, 1994). La biosíntesis de estos compuestos es característica de algunas especies de procariotes y hongos o en algunos casos de plantas e invertebrados (Santana *et al.*, 1994). En la actualidad, aún reconociendo que los metabolitos secundarios no son esenciales para el organismo que las sintetiza, se sabe que la gran mayoría de estos compuestos son biológicamente activos. Estas sustancias son útiles para la especie que las produce como mediadores del crecimiento o como protectores al estrés ambiental. En otros casos al ser liberados en su ecosistema actúan sobre otros organismos de la misma especie, para la reproducción o diferenciación. (Vanek *et al.*, 1981). Los metabolitos secundarios tienen efectos sobre otras especies. En este caso encontramos a muchos antibióticos, micotoxinas, insecticidas herbicidas y otras sustancias de utilidad para la sociedad humana (Vining, 1992).

En general, se ha observado que la síntesis de los metabolitos secundarios se inicia cuando el crecimiento del organismo se detiene debido a limitaciones de

nutrimentos (Griffin, 1994). En los microorganismos, las fuentes de carbono ejercen una fuerte regulación sobre ésta vía metabólica. Las fuentes de carbono que son utilizadas eficientemente tienen un efecto negativo sobre la síntesis de estos metabolitos. Un ejemplo de ésta es la D-glucosa. Los polisacáridos y los oligosacáridos resultan ser mejores fuentes de carbono para la producción de los metabolitos secundarios. De las fuentes de nitrógeno, las sales de amonio son las que interfieren con la síntesis de muchos de estos compuestos. Otro elemento que también ejerce su efecto sobre el metabolismo secundario es el fosfato. En algunos sistemas biológicos, la producción de metabolitos secundarios es inversamente proporcional a la concentración de fosfato en el medio de cultivo (Griffin, 1994; Santana, *et al.*, 1994).

El inicio del metabolismo secundario tanto en los microorganismos procariotes como en los eucariotes, es acompañado con frecuencia por la diferenciación celular. Esto sugiere la existencia de una relación estrecha entre los sistemas reguladores de estos dos fenómenos (Chater, 1992; Horinouchi y Beppu 1992; Beppu, 1995; Hicks *et al.*, 1997; Guzmán de Peña y Ruiz Herrera, 1997; Guzmán de Peña *et al.*, 1998).

Se han descrito tres vías de síntesis de los metabolitos secundarios: a) los metabolitos derivados del ácido corísmico, b) los β -lactámicos y c) la vía de síntesis de los policétidos (Vining, 1992).

a) La síntesis de los derivados del ácido corísmico.

Es la principal vía de biosíntesis de los compuestos aromáticos. Uno de estos compuestos es el cloranfenicol, que se sintetiza a partir de la conversión del ácido corísmico en ácido aminocorísmico para luego ser transformado en ácido *p*-aminobenzoico. Este es modificado enzimáticamente en ácido aminoprefenato, el cual se aromatiza para formar el *p*-aminofenilpiruvato. Este producto es transaminado y se forma el *p*-aminofenilalanina. Otras modificaciones posteriores dan origen al cloranfenicol (Vining, 1992).

b) β -lactámicos.

Los metabolitos β -lactámicos más conocidos son las penicilinas y las cefalosporinas. Los sustratos precursores para la producción de los β -lactámicos son los aminoácidos. La síntesis de las penicilinas y las cefalosporinas se inicia a partir de la valina, cisteína y/o del ácido α -aminoadipídico. Los residuos fenilo de algunas penicilinas provienen de algunos compuestos como el fenilacetato y del fenoxiacetato. Las penicilinas producidas en la naturaleza contienen algunas cadenas laterales constituidas por ácidos grasos: el ácido pentenoico en la penicilina F, el ácido pentanoico en la dihidropenicilina y el ácido heptanoico en la penicilina K (Griffin, 1994).

c). Policétidos.

Estos metabolitos secundarios son sintetizados por muy diversos organismos. La estructura y la vía de síntesis de los policétidos tiene profundas similitudes con la de los ácidos grasos. La diferencia básica entre estos compuestos radica en la diversidad de los precursores acilo que se incorporan en su cadena. En los policétidos después de cada paso de extensión, el grupo β -ceto es reducido (Vining, 1992).

Los compuestos derivados de los policétidos son abundantes entre los procariotes y los eucariotes. Los policétidos son metabolitos secundarios debido a que no son sintetizados durante todo el ciclo de vida del organismo que los produce sino que sólo se generan bajo condiciones particulares en el tiempo y espacio. En contraste, la síntesis de los metabolitos primarios, que proporcionan los requerimientos energéticos y estructurales necesarios para todas las células, es continua. En el grupo de los policétidos están incluidos los flavonoides de origen vegetal, las aflatoxinas, la melanina DHN y una gran variedad de compuestos con diferentes estructuras, algunos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorales o antihelmínticas.

Entre los policétidos que son sintetizados por las sintetasas de policétidos (SPC) están las aflatoxinas producidas por las cepas de *Aspergillus flavus* (Norton, 1999), *A. nidulans*, (Wieser *et al.*, 1997) y *A. parasiticus* (Feng y Leonard,

1998); en los procariotes, están los antibióticos del actinomiceto *Streptomyces glaucescens* (Gramajo *et al.*, 1991).

Pigmentos

En los organismos se observa una amplia gama de colores. En la mayoría de los casos, esta coloración se debe a la presencia de sustancias orgánicas a las cuales se les denomina pigmentos o biocromos (Fox, 1983). La presencia de estos compuestos fotosensibles es importante para la adaptación, para la biosíntesis de algunos compuestos orgánicos, para la respiración, visión e incluso para la protección de las condiciones biológicas y fisicoquímicas adversas del medio (Ghidalia, 1985).

Entre los pigmentos más conocidos y de gran importancia para los sistemas biológicos están los principales compuestos fotosintéticos de las plantas como las clorofilas, los carotenos y las ficobilinas. Otras clases de biocromos son las hemoglobinas y las hemocianinas, que tienen funciones respiratorias como acarreadoras de oxígeno. Entre los pigmentos acarreadores de electrones se encuentran las flavoproteínas y los citocromos. Los biocromos con una función visual son las pterinas y las rodopsinas. Los pigmentos con función cromática corporal y de protección son las melaninas (Ghidalia, 1985).

Melanina

En general, melanina es el término que se utiliza para describir los pigmentos de color pardo oscuro o negro. Otros compuestos de color amarillo, rojo, verde, púrpura o azul han sido clasificados como biocromos tipo melanina porque tienen una estructura química similar a la melanina (Wheeler y Bell, 1988). Independientemente de su vía de síntesis, las melaninas son un conjunto de polímeros heterogéneos, de elevado peso molecular, constituidos por diferentes unidades estructurales con grupos funcionales idénticos (Fogarty y Tobin, 1996).

Características fisicoquímicas de las melaninas

La melanina pura es insoluble en agua, ácidos acuosos y solventes orgánicos (acetona, cloroformo, etanol); es poco soluble en soluciones alcalinas. Eventualmente las melaninas pueden formar conjugados con algunos carbohidratos o proteínas, lo cual las vuelve solubles en agua (Wheeler y Bell, 1988).

Las melaninas forman radicales libres debido a su estructura química del tipo de las semiquinonas (Longuet-Higgins, 1960; Mason *et al.*, 1960). La formación de los radicales es favorecida por temperaturas elevadas (Zhdanova *et al.*, 1980, en Fogarty y Tobin, 1996) o por irradiación con luz UV o radiación γ , (Slawinska *et al.*, 1975; Zhdanova *et al.*, 1978, en Fogarty y Tobin, 1996). El espectro de absorción de las melaninas está en el infrarrojo y el patrón de

difracción de rayos X es similar entre ellas (Ellis y Griffiths, 1974). Estos polímeros reaccionan con reductores químicos (Fogarty y Tobin, 1996), funcionando como receptores o donadores de electrones (Lillie, 1969), por lo que se reducen con iones de plata o se oxidan con H_2O_2 (Wheeler y Bell, 1988).

La caracterización química de las melaninas de los hongos permitió establecer que no están constituidas por un único tipo de monómero estructural. El polímero está formado por diferentes tipos de monómeros y éstos a su vez varían según la especie que produce el pigmento. Estas evidencias mostraron que en la síntesis de la melanina se utilizan diversos precursores estructurales y distintas rutas biosintéticas (Bell y Wheeler, 1986; Wheeler y Bell, 1988).

Vías de síntesis de las melaninas

En los hongos, se han identificado dos vías principales de producción del pigmento: a) la vía de DOPA, que es catalizada por fenoloxidasas a partir de precursores como la tirosina (Wheeler y Bell, 1988), la DOPA (Mason, 1948), la γ -glutaminil-4-hidroxibenceno (GHB) (Rast *et al.*, 1981), el catecol (Piattelli *et al.*, 1963) y las catecolaminas como la epinefrina y la norepinefrina (Polacheck *et al.*, 1982) y b) la vía de DHN, catalizada por sintetetasas de policétidos (SPC), reductasas y deshidratasas a partir de precursores como el acetil-CoA y malonil-CoA (Taylor *et al.*, 1987).

A. Melanina-DOPA

La síntesis de la melanina DOPA a partir de la tirosina es la vía que con mayor detalle ha sido descrita. En ella la tirosina es hidroxilada para dar origen a la DOPA (Fig. 1), seguida de su deshidrogenación para formar dopaquinona. Ambas reacciones son catalizadas por la tirosinasa (Mason, 1948; Horowitz y Shen, 1952; Fling *et al.*, 1963). La dopaquinona es una de las primeras unidades utilizadas en la formación del polímero de la melanina. Algunos autores han sugerido que la dopaquinona sufre dos reacciones no enzimáticas: una deshidrogenación y una descarboxilación para dar origen a compuestos como el dopacromo y 5,6-dihidroindol, respectivamente. La deshidrogenación del 5,6-dihidroindol para formar el indol-5,6-quinona es una tercera reacción catalizada por la tirosinasa. Estos compuestos a su vez se polimerizan espontáneamente para dar origen al heteropolímero melanínico denominado como melanina-DOPA (Bell y Wheeler, 1986; Wheeler y Bell, 1988).

Fenoloxidasas

El grupo de enzimas que llevan a cabo la síntesis de la melanina a partir de los precursores fenólicos, son las fenoloxidasas. Estas enzimas catalizan las reacciones de oxidación de los substratos fenólicos para generar las unidades estructurales del polímero de la melanina. A este grupo de enzimas pertenecen las tirosinasas, lacasas y catecolasas. La gran mayoría de fenoloxidasas caracterizadas contienen un ión cobre en estado reducido, cuya función es la de

unirse al grupo fenol del sustrato, por lo que se considera que este ión no es el responsable de la oxidación de los compuestos fenólicos (Bell y Wheeler, 1986).

i. Las tirosinasas fueron aisladas inicialmente de los tejidos animales. Posteriormente se han aislado de una gran diversidad de organismos. Estas enzimas son las únicas fenoloxidasas que pueden utilizar como sustrato la L-tirosina (Mason, 1948), dihidroxifenilalanina (DOPA) y 5,6-dihidroxiindol (DHI). La tirosinasa ha sido purificada de *Neurospora crassa* (Fling *et al.*, 1963, Huber y Lerch, 1987) y esta enzima mostró una gran similitud bioquímica con la tirosinasa obtenida de animales (Korner y Pawelek, 1982).

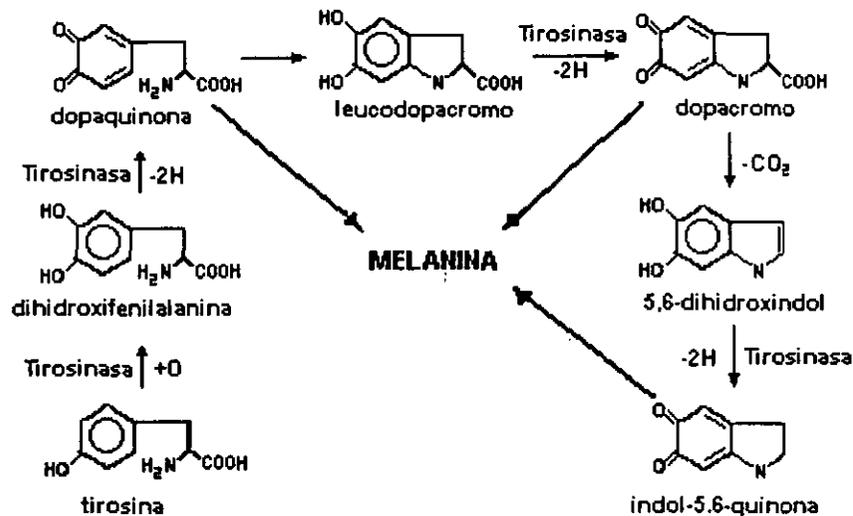


Fig.1. Esquema de la vía de síntesis de melanina-DOPA (Mason, 1948).

ii. Las catecolasas oxidan monofenoles y ortodifenoles exclusivamente. Entre sus sustratos están la γ -glutaminil-4-hidroxibenceno (GHB) y la γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenceno (GDHB) como en *Agaricus bisporus* y el catecol en *Ustilago maydis* (Piattelli *et al.*, 1963).

iii. Las lacasas han mostrado ser las fenoloxidasas más versátiles. Utilizan mono, orto y paradifenoles como sustratos para construir los monómeros que son polimerizados para generar las melaninas (Wheeler y Bell, 1988). Del basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* se aisló la lacasa que utiliza como sustratos los aminofenoles y diaminofenoles (Nurudeen y Ahearn, 1979), catecolaminas como la DOPA, dopamina, epinefrina y norepinefrina (Polacheck *et al.*, 1982; 1990).

B. Melanina-DHN

La melanina DHN es un producto del metabolismo secundario en los hongos. Esta vía fue establecida por primera vez en el hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* (Bell *et al.*, 1976 a y b).

La biosíntesis de la melanina DHN se inicia con la participación de una sintetasa de policétidos (SPC), que cataliza la condensación de un acetil, que es aportado por una acetil-CoA y cuatro acetilos aportados por un número igual de malonil-CoA. El pentacétido lineal formado es ciclizado para dar origen al 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN) (Fig. 2). Por medio de una reductasa, el

1,3,6,8-THN es transformado a scitalona, que a su vez es el sustrato de la deshidratasa de la scitalona para dar origen al 1,3,8-trihidroxinaftaleno (1,3,8-THN). En una segunda reducción enzimática en esta vía de síntesis, el 1,3,8-THN es transformado en vermelona. La deshidratación de la vermelona da origen al monómero 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN), la polimerización espontánea de estos monómeros da origen a la melanina-DHN. En esta vía de síntesis se forman dos compuestos inestables, el 1,3,6,8-THN y el 1,3,8-THN. Si éstos no son reducidos se oxidan espontáneamente para dar origen a dos compuestos derivados de la vía, la flaviolina y la 2-hidroxijuglona (2-HJ) respectivamente (Bell y Wheeler, 1986; Wheeler y Bell, 1988).

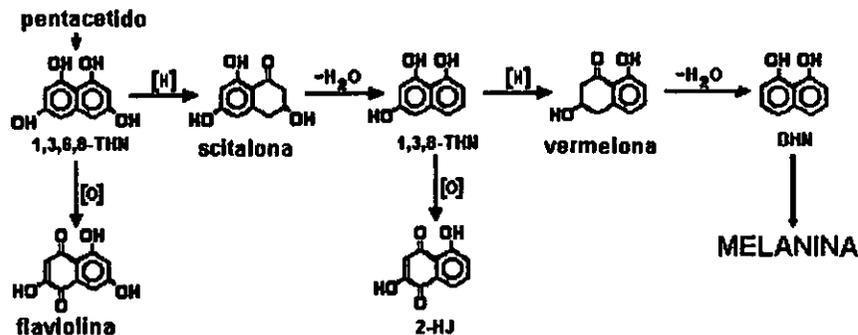


Fig. 2. Esquema de la vía de síntesis de melanina-DHN (Wheeler y Bell, 1988)

Los intermediarios de la vía de síntesis de la melanina-DHN: la scitalona y la vermelona son incoloros en su estado puro. La flaviolina es de color rojo y la 2HJ es amarillo cuando se les disuelve en acetato de etilo. De las mutantes de las que se han aislado estos pigmentos se observan de color pardo rojizo.

El descubrimiento de la vía de síntesis de la melanina DHN se llevó a cabo en cepas mutantes albinas y en mutantes de color pardo de *V. dahliae*. De estas mutantes se aislaron compuestos intermediarios de la vía de síntesis, así como los compuestos formados por la oxidación espontánea de los intermediarios inestables. Las mutantes albinas fueron designadas como *alm*. Estas mutantes sintetizaron melanina al adicionarlas con scitalona u otros intermediarios de la vía de síntesis de la melanina DHN. Por esta evidencia se consideró que el albinismo en estas cepas se debía a la incapacidad del hongo para sintetizar el 1,3,6,8-THN, que es el primer precursor directo del pigmento. De las mutantes de color pardo rojizo, designadas *bm1*, se aislaron scitalona y los metabolitos relacionados: flaviolina y *cis*-4-hidroxiscitalona. El análisis químico realizado con derivados de la scitalona mostró que sólo el DHN se oxida en melanina. Otra mutante con colonias de color pardo, diferente a la *bm1*, fue designada como *bm2*. Esta cepa deshidratava la scitalona y acumulaba 2-HJ (Bell *et al.*, 1976 a y b; Taylor *et al.*, 1987; Ichinose *et al.*, 1993).

i. Inhibición por triciclazol

El uso de inhibidores específicos de la síntesis de melanina DHN permitió corroborar una vía distinta a la observada en la producción de melanina-DOPA. Para este fin, se utilizó el triciclazol que inhibió la reducción del 1,3,6,8-THN a scitalona y la reducción de 1,3,8-THN a vermelona y provoca la acumulación de flaviolina y 2-HJ (Viviani *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1987) (Fig. 3).

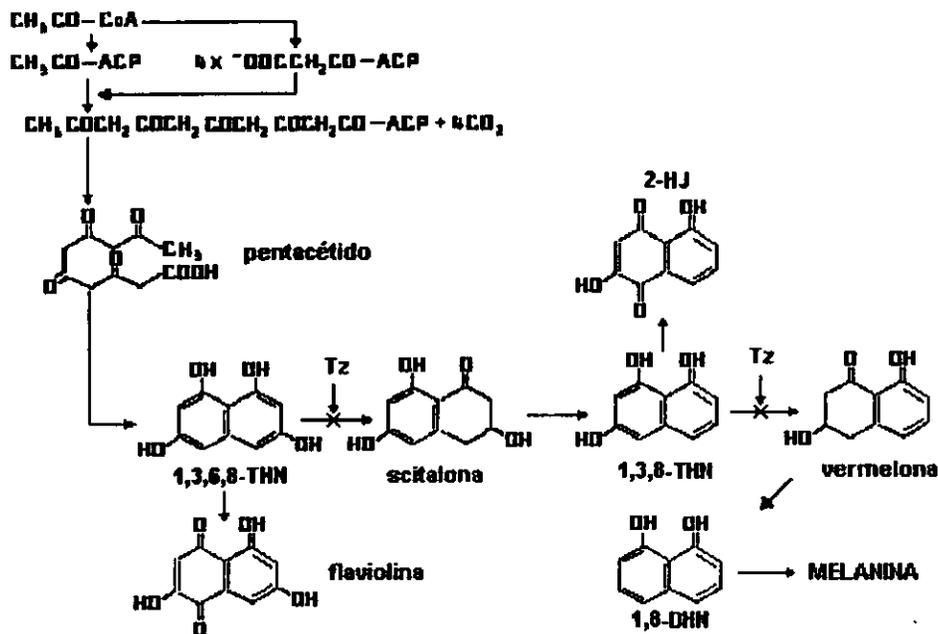


Fig. 3. Inhibición de la vía de síntesis de melanina DHA por triciclazol (Tz) (Viviani *et al.* 1993).

ii. Sintetasa de policétidos (SPC)

El conjunto de SPC conocidas constituye una gran familia de complejos multienzimáticos que contienen diversos sitios catalíticos: i) proteína acarreadora de grupos acil (PAA), ii) sintetasa PAA: β -cetoacil (SP β C) y iii) aciltransferasa PC:acetil-CoA/MalonilCoA (AT). Estos complejos dan origen a una gran diversidad

de compuestos estructuralmente diferentes que comparten patrones comunes de biosíntesis (Hutchinson y Fujii, 1995). Esta biosíntesis se inicia con la adición sucesiva de unidades simples de ácido carboxílico para construir una cadena. Las unidades de construcción pueden ser residuos de acetato, malonato, propionato o butirato, en algunos casos son compuestos más complejos. Todas estas unidades se encuentran ligadas a la coenzima A (CoA). Cada unidad contribuye con dos átomos de carbón al ensamble de la cadena lineal. Estas unidades siempre llevan un grupo ceto en el carbón β . Algunos de estos grupos ceto pueden ser reducidos a hidroxilos o pueden ser removidos después de la adición de una unidad a la cadena. La permanencia del resto de grupos ceto en muchos de los átomos de carbono en la cadena es lo que da origen al término de policétidos a estos compuestos (Hopwood y Sherman, 1990).

Las SPC han sido clasificadas en dos tipos: la de tipo I se encuentra en hongos y animales invertebrados y la de tipo II en bacterias y plantas. La SPC de tipo I es una proteína multifuncional de alto peso molecular. Un ejemplo de ella es la sintetasa del ácido 6-metilsalicílico (SAMS) de *Penicillium patulum*. Este complejo enzimático es una proteína de 750 kDa que contiene las actividades catalíticas necesarias para la síntesis del ácido 6-metilsalicílico a partir de acetil- y malonil-CoA. La secuencia de los genes que codifican para la SAMS indica que esta SPC consiste de cuatro subunidades de 190 kDa. Estas tienen funciones de PAA, SP β C y una AT semejantes a los dominios de la sintetasa de ácidos grasos (SAG) de animales (Dimroth *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 1990). Otros ejemplos de

SPC tipo I de hongos incluye a la SPC de 130 kDa de *P. cyclopium* para la síntesis del ácido orselínico (Jordan y Spencer, 1993). En *A. nidulans*, *A. flavus* y *A. parasiticus* una SPC es la responsable de sintetizar la cadena carbonada que posteriormente es transformada a esterigmatocistina y finalmente a aflatoxina (Chang *et al.*, 1995).

La SPC tipo II es un sistema multienzimático que consiste de proteínas monofuncionales grandes y separadas. Este tipo de complejos se encuentra en las especies de los géneros *Streptomyces* y *Saccharopolyspora*. Con el análisis de la secuencia del ADN que codifica para la SPC de *Streptomyces violaceoruber* (Sherman *et al.*, 1989) se estableció la arquitectura básica de la SPC tipo II, que consiste de PAA, PC y una cetorreductasa (CR) que son semejantes a las enzimas responsables de la biosíntesis de los ácidos grasos en bacterias, más los polipéptidos denominados como ciclasas o aromatasas que catalizan la formación de compuestos que contienen anillos aromáticos.

Los genes que codifican para las SPC que participan en la vía de síntesis de la melanina DHN han sido aislados de *Colletotrichum lagenarium* (Takano *et al.*, 1995) y *Alternaria alternata* (Takano *et al.*, 1997). En *A. alternata* (Kimura y Tsuge, 1993) se identificó un transcrito de 7.6 kb del gen *alm* que codifica para una SPC que participa en la biosíntesis del 1,3,6,8-THN. Asimismo, se aisló una proteína similar a las SPC, la PKS1 que participa en la síntesis de este biocromo en *C. lagenarium* (Kubo *et al.*, 1991). Recientemente, Tsai y col., (1998) aislaron una secuencia de 8 kb, que codifica para una SPC de *Aspergillus fumigatus*,

involucrada en la biosíntesis del pigmento verde de los conidios de este hongo. El gene *pks1* de *C. lagenarium* consiste de tres exones separados por dos intrones y codifica un polipéptido de 2187 aminoácidos y que tiene similitud con la SPC codificada por el gene *wA* de *A. nidulans*. El gene *pks1* contiene dominios muy conservados: PAA, SP β C, y una AT.

El gene *alm* codifica para una SPC de *A. alternata*. Con este gene se ha logrado complementar las cepas mutantes albinas de *C. lagenarium* para la síntesis de melanina DHN.

iii. Reductasa de polihidroxi-naftalenos

En la biosíntesis de la melanina DHN, la reductasa de 1,3,6,8-THN, dependiente de NADPH, cataliza la reducción del 1,3,6,8-THN a scitalona y del 1,3,8-THN a vermelona. Esta enzima ha sido purificada de *Magnaporthe grisea*. Es un homotetrámero de cuatro subunidades de 30 kDa. El ADNc obtenido del transcrito del gene de la reductasa contiene un marco de lectura abierta de 846 pb y el péptido que se obtiene es de 282 residuos de aminoácidos. La reductasa tiene las características de las enzimas de la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta. La reductasa comparte 56% de identidad con una probable cetorreductasa, involucrada en la biosíntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Vidal-Cros *et al.*, 1994). El gene *brm2* de *A. alternata* codifica para una reductasa de polihidroxi-naftalenos y complementa las mutantes *buf* de *M.*

grisea (Kawamura *et al.*, 1997). El transcrito de *brn2* es de 0.9 kb (Kimura y Tsuge, 1993).

iv. Deshidratasa de la scitalona y vermelona

La deshidratasa involucrada en la vía de síntesis de la melanina es una enzima que cataliza dos reacciones en esta vía: a) la conversión de la scitalona a 1,3,8-THN y b) la transformación de vermelona a 1,8-DHN. Esta enzima está codificada en *M. grisea* por un segmento de 740 bases que es traducido en un péptido de 172 aminoácidos (Lundqvist *et al.*, 1993). Una enzima con la misma actividad es codificada en un transcrito de 4 kb en *A. alternata* (Kimura y Tsuge, 1993). Estos hallazgos indican la existencia de dos genes que codifican para dos deshidratasas diferentes de la scitalona (Kawamura *et al.*, 1997). La deshidratasa de la scitalona de *M. grisea* es un polipéptido que tiene una identidad del 62 % con la deshidratasa de *C. lagenarium* (Motoyama *et al.*, 1998). En *A. fumigatus* (Tsai *et al.*, 1997) se aisló una secuencia génica que codifica para un homólogo de la deshidratasa de la scitalona.

Organización genómica de los genes involucrados en la síntesis de la melanina

En el genoma, de los hongos que sintetizan melanina-DHN, se han identificado dos tipos de organización de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la producción del pigmento: a) genes dispersos en el genoma, como en *M. grisea*, (Chumley y Valent, 1990) y *C. lagenarium* (Kubo *et al.*, 1991) y b) los genes que están en un segmento de ADN, como en *A. alternata*, en el que

las enzimas están codificadas en un segmento de ADN de 30 kb (Kimura y Tsuge, 1993). En otros hongos de importancia médica, causantes de cromoblastomycosis, feohifomicosis y micetoma (*Wangiella dermatitidis*, *Fonsecae pedrosoi*, *Hendersonula toruloidea*, *Cladosporium carrionii*), no existe informe en el que se indique la organización de los genes que codifican para la biosíntesis de la melanina.

Función de la melanina

En los hongos, las melaninas no son esenciales para su crecimiento y desarrollo (Fogarty y Tobin, 1996). Estos biocromos son importantes para proteger al hongo de las condiciones adversas del ambiente dándole una mayor habilidad competitiva en comparación con las albinas. Los hongos con conidios melanizados son más resistentes a la luz UV, radiación solar, irradiación con rayos γ o X, al calor y al frío (Bell y Wheeler, 1986). Los pigmentos protegen las células del ataque de las enzimas hidrolíticas, como las quitinasas y glucanasas, evitando la lisis en la naturaleza. La hidrólisis de las paredes fúngicas es inhibida en presencia de la melanina (Kuo y Alexander, 1967). También, se ha observado que las estructuras que tienen este pigmento resisten los oxidantes producidos por los neutrófilos del sistema inmune del hombre (Vartivarian, 1992). Se ha sugerido que la melanina puede actuar como un antioxidante al neutralizar las especies de oxígeno reactivas generadas por el sistema oxidativo de la respuesta inmune celular (Jacobson y Tinnell, 1993; Emery *et al*, 1994).

La síntesis de la melanina está asociada a la formación de los apresorios y a la capacidad de penetración, en los tejidos del hospedero, de los hongos fitopatógenos como *V. dahliae* y *M. grisea*. Mutantes albinas de estas mismas especies que han perdido la capacidad de sintetizar melanina, muestran una menor virulencia (Howard y Ferrari, 1989).

La patogenicidad de los hongos de importancia médica que sintetizan melanina como *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Rhodes *et al.*, 1982) y *W. dermatitidis* (Polak, 1989), está asociada a la síntesis de la melanina, que les permite evadir los mecanismos inmunológicos del hospedero.

Distribución de la melanina en los hongos

A diferencia de lo observado en células animales, en los cuales se pueden identificar los melanosomas, los estudios celulares han mostrado que la acumulación de la melanina en los hongos no es citoplásmica. Al microscopio electrónico de transmisión, la melanina se observa como gránulos electrodensos sobre la pared celular de cepas pigmentadas de *Verticillium dahliae*. En mutantes albinas de esta misma especie la superficie granular no está presente (Wheeler *et al.*, 1976).

***Sporothrix schenckii*.**

Sporothrix schenckii es un deuteromiceto con una distribución mundial amplia. Se le encuentra principalmente en las regiones tropicales y templadas que tienen un nivel de precipitación pluvial baja (Kwon-Chung y Bennett, 1992), tales como el Japón, el norte y centro del continente Americano y la zona central (Sierra Norte de Puebla, Guanajuato, Jalisco y la ciudad de México) de la República Mexicana (Lavalle y Mariat, 1983). Es el agente etiológico de la micosis subcutánea denominada como esporotricosis. Esta es una infección crónica, generalmente limitada a tejidos cutáneos y subcutáneos, con una tendencia a diseminarse en los huesos, las articulaciones, los ojos, el sistema nervioso central o en el tracto urogenital (Kwon-Chung y Bennett, 1992; Rippon, 1988).

Las lesiones se inician en el sitio de la introducción del agente etiológico, donde aparece con una úlcera, pápula eritematosa o un nódulo verrucoso, que aumenta de tamaño después de varios días o semanas. Cuando hay ulceración, la secreción de material purulento no provoca dolor en el hospedero. En este caso se le denomina como esporotricosis fija. La dispersión subsecuente del agente etiológico por la vía linfática da origen a nuevas lesiones que siguen los canales linfáticos. Estas lesiones siguen el mismo curso indolente de la lesión inicial. En este caso la infección se describe como lesión linfocutánea. La lesión fija puede persistir por años. Las lesiones crónicas generalmente se localizan en la cara, el cuello, los brazos, o en la mano (Kwon-Chung y Bennett, 1992; Rippon, 1988). La

infección pulmonar resulta de la inhalación de los conidios del hongo (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

S. schenckii es un hongo dimórfico, en el laboratorio crece como micelio a 28°C en un medio de cultivo líquido con un pH de 5 y en forma de levadura en un pH de 7.2. La transición dimórfica también se lleva a cabo a 37°C en un medio de infusión cerebro corazón. En el tejido subcutáneo del hospedero crece en forma de levadura.

Los cultivos de este hongo en medios sólidos producen unas colonias membranosas, con superficie plana o plegada. El color de la colonia inicialmente es blanco o ligeramente amarilla; posteriormente la colonia se torna de un color pardo oscuro o negro, dependiendo del medio de cultivo en el cual se le haya sembrado. Al microscopio óptico, las estructuras que se observan son hifas septadas hialinas de aproximadamente 2-3 μm de diámetro. Los conidios que forman pueden ser hialinos o pigmentados, piriformes o triangulares, pueden formarse en conidióforos de tipo simpodial o formarse lateralmente en las hifas. Los conidios y las hifas son las estructuras infectantes que se introducen al hospedero a través de algún traumatismo.

Se ha documentado la pigmentación en los conidios de *S. schenckii* ha sido documentada en diferentes trabajos. Sin embargo la vía de síntesis del biocromo no ha sido caracterizada hasta la fecha.

II. OBJETIVO GENERAL.

Establecer la vía de síntesis del pigmento de *Sporothrix schenckii*.

III. MATERIALES Y METODOS

Cepas.

El aislamiento clínico de *Sporothrix schenckii* EH-217 fue hecho por el Dr. Jorge Mayorga del Instituto Dermatológico de Jalisco. Se obtuvieron nueve cepas mutantes isogénicas no melanizadas en este trabajo. La cepa *Cryptococcus neoformans* JEC20 Mat a fue proporcionada por el Dr. Jeffrey Edman de la Universidad de California, San Francisco, E.U.A.

Medios de Cultivo

YEPD.

Extracto de levadura (Bioxon)	10 g
Peptona de caseína (Bioxon)	20 g
Dextrosa (J.T. Baker)	20 g
Agar bacteriológico (Bioxon)	20 g
Agua destilada	1000 ml

YEPD-conidios.

Extracto de levadura (Bioxon)	2 g
Peptona de caseína (Bioxon)	3 g
Dextrosa (J.T. Baker)	10 g
Agar bacteriológico (Bioxon)	20 g
Agua destilada	1000 ml

Medio dopamina (MD) (Chaskes y Tyndall, 1978).

KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	1.6 g
MgSO ₄	0.5 g
Dextrosa (Bioxon)	0.5 g
Agar bacteriológico (Bioxon)	20 g
Asparagina	0.1 %
Tiamina	0.2 %
Biotina	0.02 %
Dopamina	0.002 %
Agua destilada	1000 ml

Papa dextrosa agar (PDA) –Bioxon

PDA (polvo)	39 g
Agua destilada	1000 ml

Papa dextrosa líquido (PDL)

Papa	200 g
Dextrosa (Bioxon)	10 g
Agua destilada	1000 ml
	pH 5.5

Conservación de las cepas

Los aislamientos utilizados en el trabajo se sembraron en tubos (16 x 150) de YEPD y se incubaron siete días a 28 °C.

Inducción de la síntesis de la melanina

La inducción de la síntesis de la melanina se llevó a cabo en los medios de cultivo MD y PDA o PDL, en los que se sembraron muestras de las cepas de *S. schenckii* y *C. neoformans*. Los cultivos en medio sólido se incubaron siete días a 28°C y los de medio líquido se incubaron a temperatura ambiente por dos semanas.

Inhibición de la síntesis de la melanina

Se sembraron los conidios de la cepa EH-217 en PDA y PDL adicionados con triciclazol, 16 µg/ml y 8 µg/ml respectivamente. El triciclazol se disolvió en etanol absoluto. La concentración final del etanol en los medios de cultivo fue de 0.1%. Los cultivos en medio sólido se incubaron siete días a 28°C y los de medio líquido se incubaron a temperatura ambiente por dos semanas.

Mutagénesis con luz ultravioleta (UV)

El desconocimiento de la reproducción sexual en *S. schenckii* impide llevar a cabo un estudio de genética clásica en este hongo. La obtención de algunas mutantes alteradas en la pigmentación permitió, a) el aislamiento y la caracterización química de algunos compuestos acumulados y b) el análisis celular de los conidios por microscopía óptica y electrónica de transmisión. A

cuatro cultivos en tubo de la cepa silvestre se agregaron a cada uno 2 ml de agua destilada estéril y se agitaron con el vortex. De los cuatro tubos se recuperaron 6 ml de una suspensión de conidios que se transfirió a tubos de plástico de 15 ml. Se lavaron con 10 ml de agua destilada y se ajustó su densidad a 1×10^6 conidios/ml. Los conidios se expusieron a la luz UV (300 ergs/mm^2) y luego se hicieron diluciones que se sembraron en PDA. Los cultivos se incubaron siete días a 28°C en la oscuridad para evitar una posible fotorreactivación.

Se aislaron las colonias con un fenotipo albino o parcialmente pigmentadas que resultaron estables. Estas cepas se denominaron MeI^- (Tabla 1).

Complementación química

La formación de los grupos de complementación química se realizó: a) en un cultivo de pares de cepas mutantes, b) por el cultivo de las mutantes en un medio adicionado con un liofilizado de las otras mutantes y c) por un cultivo de las mutantes en un medio con scitalona, un intermediario de la vía de síntesis de la melanina.

i. Complementación en un cultivo de pares de cepas mutantes. De la suspensión (1×10^4 conidios/ml) de conidios de dos cepas mutantes diferentes se mezclaron 50 μl de cada una y se sembraron en PDA. Se incubaron a 28°C por siete días.

ii. Complementación de las mutantes con un liofilizado de un cultivo de las otras mutantes. Se sembraron las cepas mutantes en PDA y se incubaron cinco

días a 28°C. A estos cultivos se les agregó 100 µl de una suspensión acuosa de un liofilizado y se incubaron a 28°C por dos días más.

iii. Complementación con scitalona. Las mutantes, sembradas en APD, se incubaron a 28°C por cinco días. A cada uno de los cultivos se les adicionó 100 µl de scitalona 10 mM y se incubaron nuevamente a 28°C por dos días más.

Los cultivos para la complementación química entre pares de mutantes se revisaron a partir del séptimo día de incubación para registrar el tiempo en el cual se observa la síntesis de la melanina. Para determinar la presencia del pigmento, se observaron los cultivos con algún liofilizado o con la scitalona, a las 2, 4, 6 y 24 horas.

Obtención de los liofilizados. Los cultivos de dos semanas de incubación a temperatura ambiente y sin agitación, fueron filtrados en papel Whatman No. 40 y centrifugados a 7000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se liofilizó el sobrenadante y se resuspendió en 3 ml de agua destilada. Para esterilizarlo se le pasó por una membrana Millipore de 0.22 µm.

Extracción de algunos metabolitos

Se sembraron las cepas en 200 ml de PDL, en matraces Erlenmeyer de 1000 ml, y se incubaron por dos semanas a temperatura ambiente, sin agitación. Los cultivos se filtraron a través de papel Whatman No. 40 y se centrifugaron a 7000 rpm por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se ajustaron a pH 5 con ácido fosfórico 1 N y se saturaron con cloruro de sodio. Al sobrenadante (150 ml) se le

hicieron tres extracciones con un volumen igual de acetato de etilo. Para eliminar el agua residual, el acetato de etilo se pasó por sulfato de sodio anhidro. El acetato de etilo se eliminó por calentamiento a 70°C y baja presión. Los metabolitos se resuspendieron en 30 µl de acetato de etilo.

Cromatografía en capa fina

De los extractos resuspendidos en acetato de etilo se aplicaron 2 µl en una placa analítica de cromatografía en capa fina (Silica Gel 60F₂₅₄, Sigma). Se corrió con éter etílico-hexano-ácido fórmico (60:40:1), (Wheeler y Stipanovic, 1979). Como estándares se utilizaron scitalona, flaviolina y 2-HJ. Se observaron las placas con luz UV en un transiluminador y posteriormente se revelaron con una solución de cloruro férrico al 1 %. Las imágenes se capturaron utilizando un transiluminador UVP (GDS 7600. Gel Documentation System) y se digitalizaron con el sistema Grab-IT (Annotating Grabber 2.04.6).

Con los metabolitos de las cepas mutantes, en los cuales se observó la presencia de algunos de los compuestos con patrón de corrimiento similar a los estándares, se hizo una cromatografía en placa fina preparativa. Los compuestos se recuperaron de la placa y se extrajeron con éter etílico-acetato de etilo-etanol (12:12:1) (Wheeler y Stipanovic, 1979). Los productos se analizaron e identificaron por absorción de luz UV y por HPLC (la caracterización fue realizada por el Dr. M. Wheeler de la Universidad de Texas).

Microscopía de contraste de fases

Se observaron la cepa *S. schenckii* EH-217 y las mutantes bajo el microscopio de contraste de fases. Para ello se prepararon cajas de Petri con el medio de PDA. Con una navaja estéril se hicieron cortes en el medio solidificado para obtener bloques de agar de 1 cm por cada lado. Todas las placas se inocularon con 200 μ l de una suspensión de conidios. De cada caja de Petri, se sacaron cuatro bloques y se colocaron sobre el resto de la placa. Sobre cada uno de los cuatro bloques se colocó un cubreobjetos limpio estéril. Todos los cultivos se incubaron a 28°C por siete días. Se retiraron los cubreobjetos con los filamentos del hongo adheridos, se fijaron con etanol al 70 % por 15 minutos y cada cubreobjetos se montó y fijó a un portaobjetos. Las observaciones se hicieron con contraste de fases en un microscopio Olympus. De cada mutante se tomaron fotografías con un aumento de 1000 x.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las cepas, silvestre y mutante Mel14, se examinaron por MET. Se sembraron las cepas en PDA y, en el caso de la mutante, también se sembró en PDA con scitalona. Se cortaron bloques de 2-3 mm y se fijaron con una solución de Karnovsky por dos horas, posteriormente se lavaron con una solución amortiguadora fría de cacodilato de sodio 1 M pH 7.3 por 12 horas a 4°C. Las muestras se posfijaron con OsO₄ 1% y ferrocianuro 1.3 % (preparado en el momento de utilizarse) por dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se tiñeron con acetato de uranilo 1 % por dos

horas. Las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol: 50, 60 70 80 y 90 %, 15 minutos en cada uno. Se dejaron dos veces en etanol 100 % por 30 minutos y por dos horas en óxido de propileno. La infiltración con la resina Poly/bed 812 (Polyscience, Inc.) se inició con una mezcla de poly/bed 812-óxido de propileno (1:1) por 24 horas. Se colocaron las muestras en la resina y se polimerizaron a 65°C en ambiente sin humedad. Se hicieron cortes ultrafinos que se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL Mod JEM-1200EX-II).

IV. RESULTADOS

Inducción de la síntesis de la melanina

La primer prueba que se realizó para determinar la vía de síntesis de la melanina en *S. schenckii* consistió en sembrar al hongo en dos medios de inducción del pigmento: a) en MD para la vía de la DOPA (Polachek et al., 1982) y b) en PDA para la vía del DHN. La cepa JC20 Mat a de *C. neoformans* se utilizó como un control positivo para la producción del pigmento por la vía de la DOPA. En MD la cepa EH-217 de *S. schenckii* formó una colonia blanca filamentosa, mientras que la cepa JC20 de *C. neoformans* adquirió un color pardo oscuro. En el medio PDA únicamente las colonias de *S. schenckii* presentaron colonias de color pardo obscuro; *C. neoformans* formó colonias de color amarillento (Fig. 4).

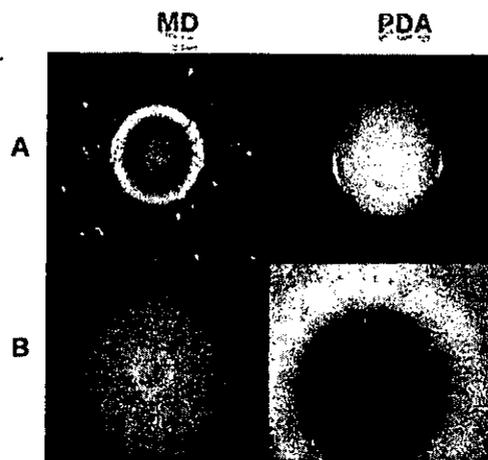


Fig. 4. Síntesis de melanina en los medios MD y PDA. a) *Cryptococcus neoformans* y b) *Sporothrix schenckii*.

Inhibición de la síntesis de la melanina por triciclazol

La cepa silvestre de *S. schenckii* formó colonias de color pardo rojizo y secretó al medio un pigmento rojizo cuando se creció en PDA o PDL adicionados con triciclazol (Fig. 5).

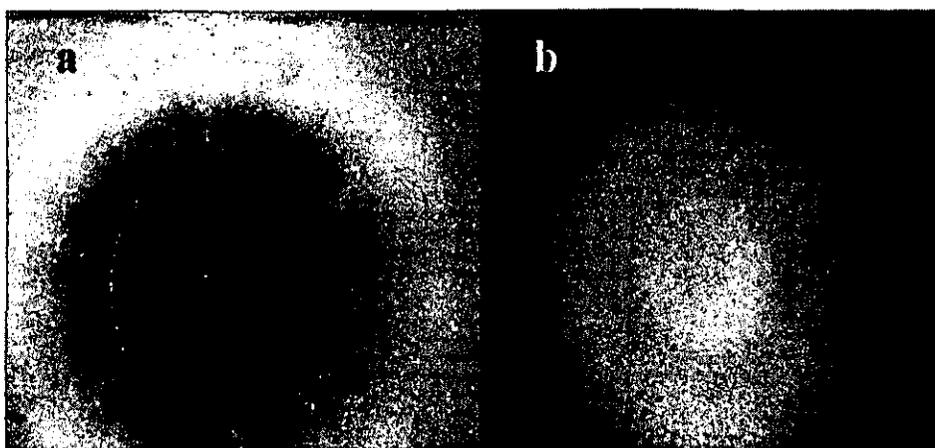


Fig. 5. Inhibición de la síntesis de la melanina DHN de *Sporothrix schenckii* por triciclazol. a) PDA, b) PDA+triciclazol.

Mutantes no melanizadas

La irradiación de la cepa silvestre con luz UV permitió el aislamiento de mutantes alteradas en la síntesis del pigmento. De 12562 sobrevivientes se aislaron nueve mutantes estables lo que representa una frecuencia de mutación de 7.1×10^{-4} . En la caracterización inicial de las mutantes se analizó: a) la producción de conidios b) la viabilidad y c) el color de las colonias (Tabla 1). Se

observaron tres fenotipos de color en las mutantes: seis cepas albinas, dos de color grisáceo y una cepa pardo rojiza.

Cepa	Producción de conidios conidios/cm ² (%)*	Viabilidad %	Color de las Colonias
EH-217	8.5 x 10 ⁷ (100)	98	Pardo oscuro
Mel ⁻ 1	3.3 x 10 ⁷ (40)	49	Blanca
Mel ⁻ 2	2.5 x 10 ⁶ (3)	50	Blanca
Mel ⁻ 5	4.6 x 10 ⁷ (54)	46	Grisácea
Mel ⁻ 8	1.7 x 10 ⁶ (2)	14	Blanca
Mel ⁻ 9	1.5 x 10 ⁷ (18)	36	Blanca
Mel ⁻ 10	4.6 x 10 ⁵ (0.54)	28	Parda rojiza
Mel ⁻ 14	7.6 x 10 ⁷ (89)	87	Blanca
Mel ⁻ 15	2.8 x 10 ⁶ (3.3)	40	Grisácea
Mel ⁻ 19	7.9 x 10 ⁶ (9.2)	75	Blanca

Tabla 1. Mutantes no melanizadas obtenidas por irradiación con luz UV. Conidiación, viabilidad y color de las colonias en PDA. * porcentaje de conidiación.

Todas las mutantes presentaron una disminución en la conidiación y la viabilidad de los conidios. La cepa más alterada en éstas características fue la mutante Mel⁻10, su producción de conidios corresponde al 0.54 % de la silvestre y su viabilidad es de sólo 28 %. La viabilidad de las mutantes de color grisáceo Mel⁻5 y Mel⁻15 es de 46 y 40 % respectivamente. La mutante Mel⁻5 tiene una producción de 54 % y la producción de conidios en la cepa Mel⁻15 fue de 3.3 %. Las mutantes albinas presentaron características variadas. La más afectada fue la cepa Mel⁻8 que tuvo una viabilidad del 14 % y una producción de conidios del 2 %. Las mutantes Mel⁻1, Mel⁻2 y Mel⁻9 presentaron una viabilidad del 36 y 50 %

respectivamente. La cepa albina Mel⁻14 mostró menores alteraciones tanto en la producción de conidios como en su viabilidad.

Complementación química

i. Cultivo entre pares de cepas mutantes.

Se sembraron en PDA la mezcla de los conidios de dos mutantes y se analizaron los cambios de coloración en las colonias formadas. Se probaron todas las posibles combinaciones. En este ensayo se encontró que en sólo dos pares se formaron colonias pigmentadas: a) Mel⁻1 con Mel⁻10 y b) Mel⁻9 con Mel⁻14. Las cepas Mel⁻2, Mel⁻5, Mel⁻8, Mel⁻15 y Mel⁻19 no se complementaron químicamente con ninguna otra mutante, las colonias que crecieron fueron albinas.

ii. Cultivo de las mutantes en un medio suplementado con un liofilizado.

La cepa Mel⁻5 sintetizó melanina en presencia de un liofilizado de las mutantes Mel⁻1, Mel⁻2, Mel⁻10, Mel⁻14, Mel⁻15 y Mel⁻19. La cepa Mel⁻10 sintetizó melanina en presencia de metabolitos de la mutante Mel⁻5.

iii. Cultivo en un medio suplementado con scitalona.

Se observó diferente grado de pigmentación en las colonias, dependiendo de la cepa. Las mutantes albinas Mel⁻1, Mel⁻8, Mel⁻9, Mel⁻14 y Mel⁻19 sintetizaron melanina cuando se agregó scitalona al medio. Las cepas Mel⁻1, Mel⁻8, Mel⁻9 y Mel⁻19, aún cuando sintetizaron melanina, sus colonias no mostraron la misma intensidad del color pardo oscuro que se observó en las cepas EH-217 y la mutante Mel⁻14 sembrada el medio con scitalona (Tabla 2).

Cepas Mel ^r	1	2	5	8	9	10	14	15	19
PDA	-	-	<u>±</u>	-	-	=	-	<u>±</u>	-
PDA + scitalona	<u>±</u>	-	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	=	+	<u>±</u>	<u>±</u>

Tabla 2. Pigmentación de las mutantes en un medio con la scitalona. + pardo obscura-negra, = parda rojiza, ± gris, - albina.

Identificación de los metabolitos.

Una evidencia importante en la caracterización de las vías de síntesis de la melanina es la identificación de los metabolitos intermediarios, ya que puede indicar un probable sitio de mutación, que impide la transformación del metabolito acumulado. Para este fin, son de gran utilidad aquellas mutantes que, por el tipo de lesión, acumulan compuestos intermediarios.

La mezcla de productos, acumulados por las mutantes, obtenida por una extracción con solventes orgánicos se analizó en placas de TLC (Fig. 6). Los resultados mostraron que sólo la mutante Mel^r10 acumuló dos compuestos, de dos extracciones, relacionados con la vía de síntesis de la melanina de DHN; la scitalona (Fig. 6) y la flaviolina. La caracterización química por HPLC, mostró que el tiempo de retención fue similar entre los estándares de scitalona y flaviolina utilizados y los compuestos obtenidos de la mutante Mel^r10 (Fig. 7). La caracterización por absorbancia de luz UV corroboró la identidad de los dos compuestos purificados de la mutante parda de *S. schenckii*; el patrón de

absorbancia en el rango de 220 a 400 nm fue similar entre el estandar de scitalona, flaviolina y los dos compuestos purificados (Fig. 8).

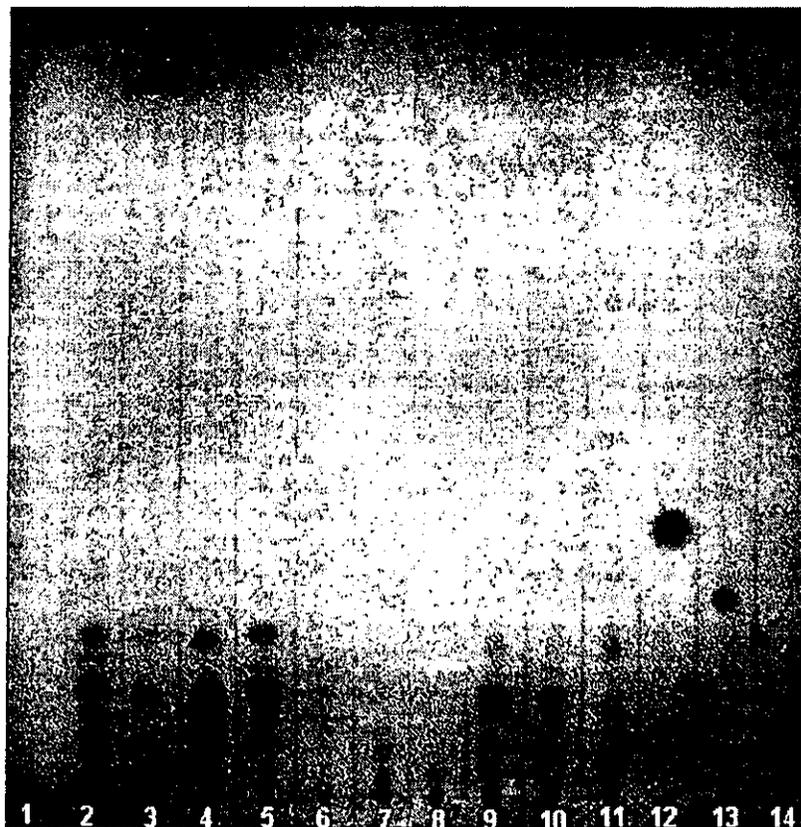


Fig. 6. Cromatografía en capa fina de los metabolitos crudos. 1) Me1'19, 2) Me1'15, 3) Me1'14, 4) Me1'10, 5) Me1'9, 6) Me1'8, 7) Me1'5, 8) Me1'2, 9) Me1'1, 10) EH-217 en triciclazol, 11) EH-217, 12) 2-HJ, 13) flaviolina, 14). Scitalona

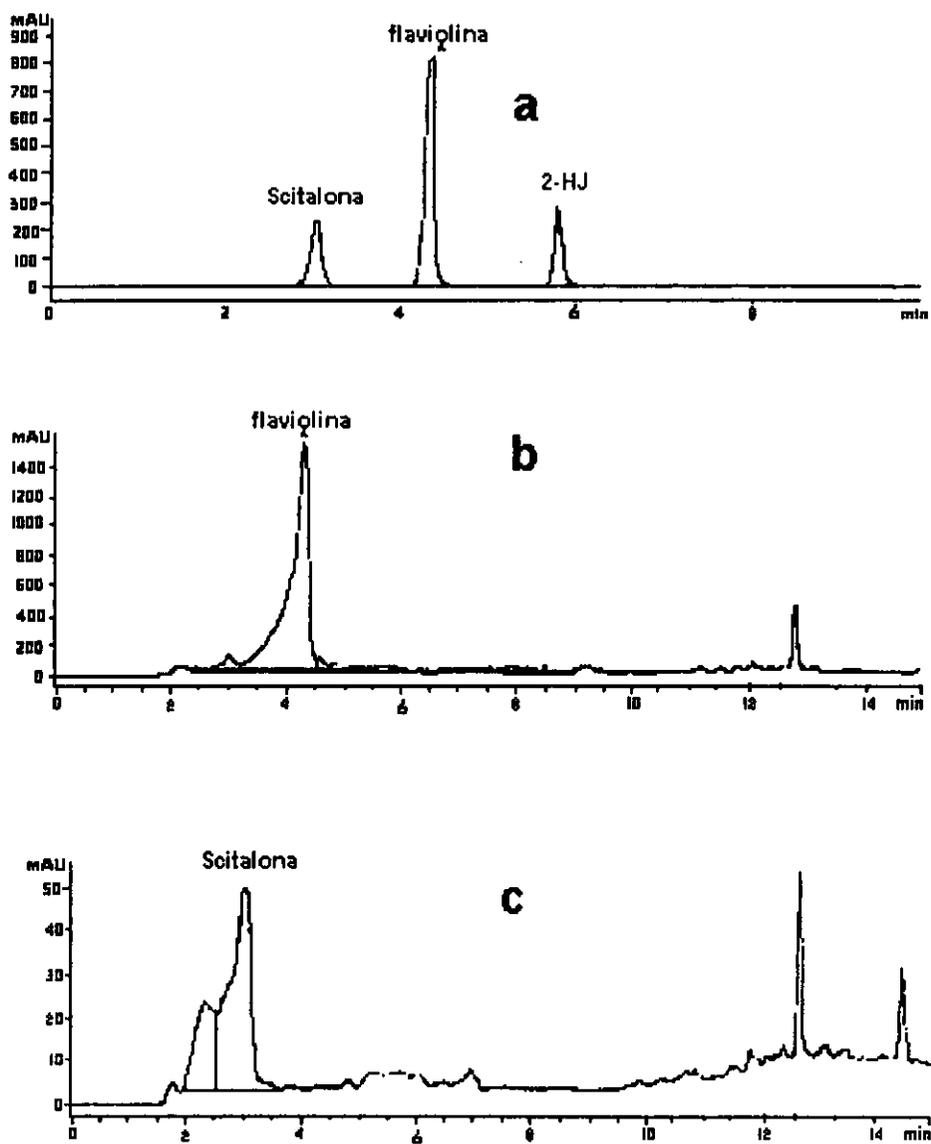


Fig. 7. HPLC de los estándares scitalona, flaviolina, 2-HJ y dos compuestos purificados de la cepa Mel10. a) Estándares: 1.-scitalona, 2.-flaviolina, 3.-2-HJ. b) flaviolina aislada de la mutante, c) scitalona aislada de la mutante.

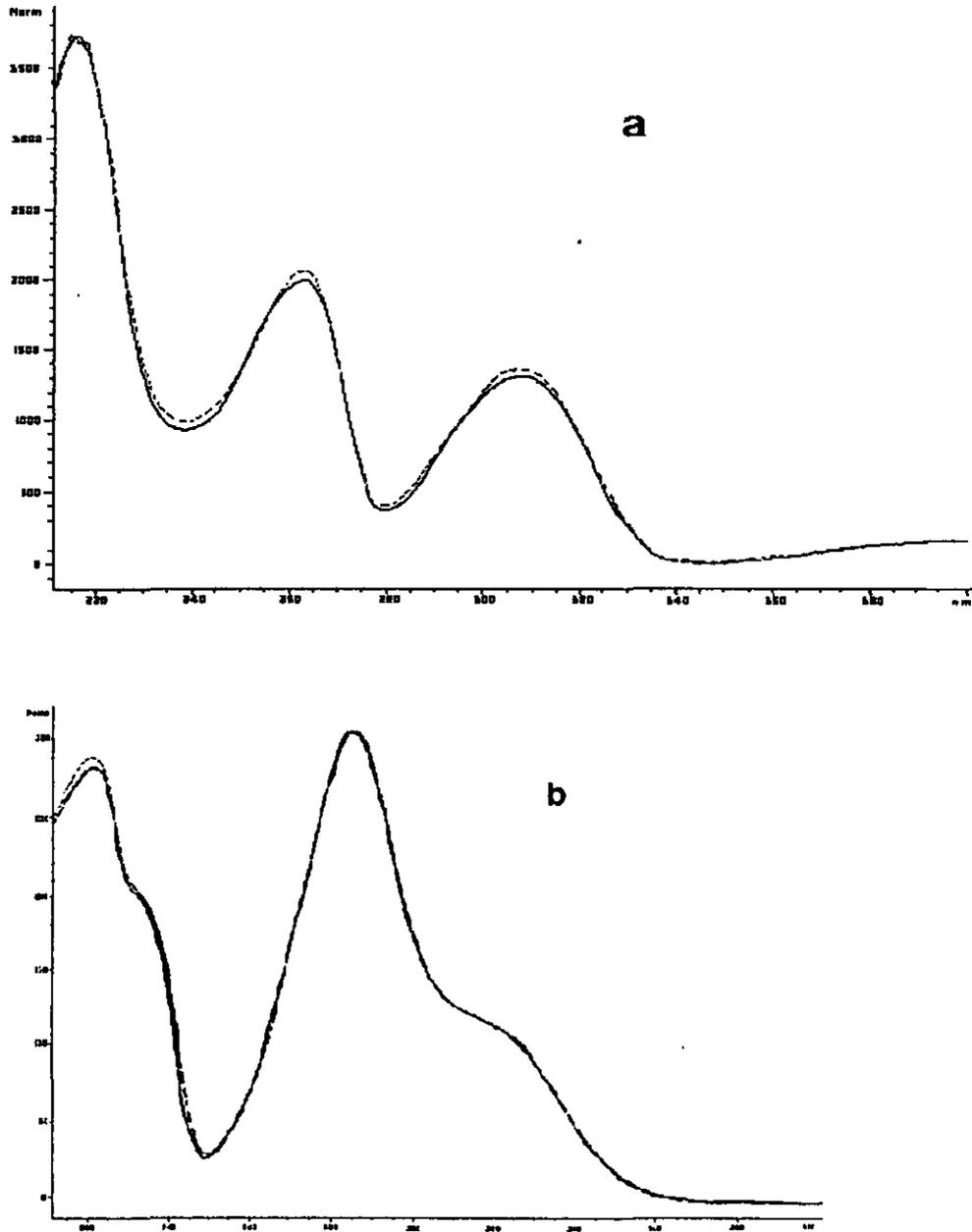


Fig. 8. Espectro de absorbancia de luz UV. a) estándar de flaviolina y compuesto purificado de la mutante Mel'10 y b) estándar de scitalona y compuesto purificado de la mutante Mel'10. La línea continua son los estándares y la línea punteada son los productos purificados de la mutante.

Microscopía de contraste de fases

Por microscopía óptica se analizaron dos características morfológicas de las mutantes Mel observaron la forma y la disposición de los conidios. La mutante Mel9, fue la única que presentó alteraciones morfológicas en sus conidios (Fig. 9), siendo éstos de mayor tamaño que los de la silvestre. Con una longitud promedio de 9 μm y un intervalo de 3.6 a 14.4 μm . Las otras mutantes no presentaron alteraciones microscópicas y son similares a la cepa silvestre.



Fig. 9. Microscopía de contraste fases. a) cepa silvestre y b) mutante Mel9. (1000 X)

Microscopía electrónica de transmisión

Los estudios de microscopía electrónica se realizaron en las colonias de la cepa EH-217 y la cepa Mel14 albina, crecidas en PDA y de colonias de la misma

mutante albina, crecida en el medio con scitalona. En las imágenes obtenidas de la cepa EH-217, se observó que la pared celular de los conidios está constituida por dos capas. El grosor de la capa interna, electrotranslúcida, es de 200 nm y la capa externa, electrodensa, es de 45 nm. Sobre la capa externa de la pared celular de los conidios se observaron gránulos electrodensos de diferente diámetro, de 40 a 106 nm. En la cepa albina Mel14, se observó que el grosor de las paredes de los conidios fue similar al observado en la cepa silvestre crecida en PDA o en PDA con scitalona. Sin embargo, esta mutante albina no mostró los gránulos cuando creció en PDA; los gránulos de melanina se observaron cuando al medio se agregó scitalona 10 mM. La distribución de los gránulos de melanina en la mutante crecida en el medio con scitalona fue similar a la silvestre (Fig. 10).

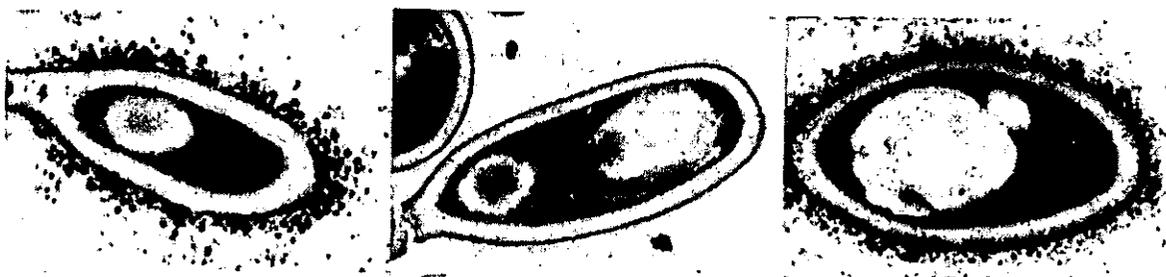


Fig. 10. Microscopía electrónica de transmisión. a) *Sporothrix schenckii* EH-217 b) mutante Mel14 sembrada en PDA y c) Mel14 en medio PDA+scitalona.

V. DISCUSION

Sporothrix schenckii es un hongo patógeno que sintetiza melanina en algunos medios de cultivo. La pigmentación se localiza exclusivamente en sus conidios; las hifas y los conidióforos son hialinos (Kwon-Chung y Bennett, 1992). En este trabajo se dan a conocer evidencias experimentales que permiten concluir cual es la vía de síntesis del pigmento en este hongo.

La pigmentación de *S. schenckii* en PDA, y no en el medio de dopamina, indicó que este hongo no puede utilizar la dopamina del medio de cultivo para la elaboración de la melanina. En cambio, la formación de colonias de color pardo oscuro en un medio con papa y dextrosa sugiere que la biosíntesis del pigmento puede corresponder a la vía de melanina DHN. La ausencia de pigmentación en el medio de conservación YEPD sugiere que la pigmentación en este hongo es inducible. Las fuentes de carbono ejercen una fuerte regulación del metabolismo secundario. Fuentes de carbono de baja eficiencia son los polisacáridos y los oligosacáridos, sin embargo resultan ser las mejores fuentes de carbono para la producción de metabolitos secundarios (Griffin, 1994; Santana *et al.*, 1994). El medio de cultivo de papa y dextrosa está compuesto por un elevado porcentaje de almidón aportado por la papa. El almidón es una fuente pobre de carbono si es hidrolizado deficientemente. Si *S. schenckii* no lo hidroliza a monosacáridos fácilmente utilizables, se favorecería la producción de metabolitos secundarios. En este caso sería inducida la biosíntesis de la melanina por la sintetasa de policétidos.

Para determinar la vía de producción de la melanina en algunos hongos se han utilizado inhibidores específicos que bloquean la biosíntesis del pigmento. El triciclazol es uno de los compuestos que inhibe la actividad de la reductasa del 1,3,6,8-THN y del 1,3,8-THN. Su utilización en el bloqueo de la producción del pigmento y el aislamiento de los metabolitos del tipo naftoquinona como la flaviolina y 2-hidroxijuglona (2-HJ), derivados del 1,3,6,8-THN y de 1,3,8-THN, se consideran como evidencias concluyentes de la síntesis de la melanina por la vía de DHN en los hongos dematiaceos de importancia médica: *Cladosporium carrioni*, *Exophiala jeanselmei*, *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Pheoanellomyces werneckii*, *Phialophora verrucosa*, *P. richardsiae*, *Wangiella dermatitidis* y *Xylohypha bantiana* (Taylor et al., 1987).

En *S. schenckii*, la inhibición de la síntesis del pigmento con triciclazol y la acumulación de un pigmento pardo rojizo que difundió al medio, fueron evidencias que mostraron que la vía de síntesis del pigmento de este hongo es por la vía de policétidos. La extracción y purificación de los metabolitos producidos por la cepa silvestre crecida en PDA con triciclazol y su comparación con los estándares de scitalona, flaviolina y 2-HJ en las placas de TLC, no mostró la presencia de los compuestos esperados la flaviolina y/o el 2-HJ. La exposición a la luz UV de las placas de TLC mostró gran cantidad de compuestos que fluorecieron con color amarillo o azul. Esto indicó, según Wheeler y Stipanovic (1979), la presencia de naftoquinonas. En general, los hongos sintetizan diversos metabolitos del tipo de las naftoquinonas. Estos metabolitos pueden variar dependiendo tanto de las

condiciones nutricionales y fisicoquímicas del medio en que crecen, de la fase de crecimiento del hongo así como de la especie fúngica (Medentsev y Akimenko, 1998). La presencia de compuestos fenólicos en los metabolitos de la cepa crecida con el inhibidor, fue revelada por el cloruro férrico aplicado a la placa de TLC.

La fase sexual en *S. schenckii* se desconoce por lo que no se pueden formar grupos de complementación por medio de la cruce entre las mutantes alteradas en la producción del pigmento. La estrategia seguida para tratar de formar grupos de complementación química en este hongo fue utilizando el cultivo de pares de mutantes en PDA. La complementación química entre las cepas Mel⁻1 (albina) y Mel⁻10 (pardo rojiza) y entre las mutantes albinas Mel⁻9 y Mel⁻14, sugiere que no son alélicas. De la mutante Mel⁻10 se aisló scitalona, este compuesto podría haber sido utilizado por la mutante Mel⁻1 para la síntesis de la melanina. Esto sugiere que la cepa Mel⁻1 está alterada en la SPC y la Mel⁻10 tendría alterada la deshidratasa de la scitalona. La complementación observada entre las dos mutantes albinas Mel⁻9 y Mel⁻14, sugiere que estas mutantes están alteradas en la SPC, pero en sitios catalíticos diferentes. Esto explica, también, porque ambas sintetizan melanina en presencia de la scitalona. La falta de complementación entre las demás mutantes podría deberse: a) las mutaciones son alélicas, b) la concentración de los metabolitos es muy baja y por lo tanto no hay suficiente sustrato para sintetizar melanina, c) los intermediarios y los

derivados se modifican antes de difundir al medio, d) el transporte de los metabolitos o de las enzimas de la vía de síntesis esté alterada en el hongo.

Para aumentar la concentración de los metabolitos se cultivaron las cepas mutantes en medio de PDA en presencia de los liofilizados de cada una de las otras mutantes. Los liofilizados son crudos y se considera que contienen algunos compuestos químicos y factores de la síntesis de la melanina. La complementación observada por este sistema fue diferente a lo que se observó por el sistema de cultivo por pares de mutantes.

La síntesis de la melanina por la mutante Mel⁵ en presencia de los metabolitos liofilizados de la mutante Mel¹⁰ sugiere que la scitalona acumulada en esta mutante se excreta al medio, de donde es tomada por la mutante Mel⁵ para producir melanina. Sin embargo, esta mutante, Mel⁵, no sintetiza pigmento cuando se le adiciona la scitalona. Esto sugiere que los liofilizados de la mutante Mel¹⁰ contiene además de la scitalona algún compuesto químico o algún factor que facilita la síntesis de la melanina en la mutante Mel⁵. Es probable que las mutante Mel¹, Mel², Mel¹⁴, Mel¹⁵ y Mel¹⁹ contengan el mismo factor de la mutante Mel¹⁰, lo que permitiría la síntesis de la melanina cuando se adiciona cada uno de sus liofilizados a la mutante Mel⁵. La síntesis de la melanina por la mutante parda en presencia de los metabolitos liofilizados de la cepa Mel⁵ indicaría que en el liofilizado se encuentran compuestos intermediarios derivados de la scitalona, éstos podrían ser el 1,3,8-THN, vermelona y DHN.

El cultivo de las cepas mutantes en medio PDA adicionado con scitalona mostró que algunas de éstas recuperaron la capacidad de sintetizar el pigmento. Lo que sugiere que estas mutantes están alteradas en la SPC que forma a la 1,3,6,8-THN. Estos resultados, también sugieren que las cepas complementadas con la scitalona en el medio de PDA tienen la reductasa y la deshidratasa para la biosíntesis de la melanina.

La síntesis del pigmento en las mutantes albinas en el medio PDA con scitalona también indicó que la melanina en *S. schenckii* es del tipo de DHN. En estas cepas la mutación probablemente está localizada en la SPC, similar a las mutantes albinas *alm*, de *V. dahliae* (Bell y Wheeler, 1986), *Alternaria alternata* (Takano *et al.*, 1997) y *Pks* de *Colletotrichum lagenarium* (Kubo *et al.*, 1991) La mutación en la SPC impide la formación del primer compuesto fenólico el 1,3,6,8-THN y de los derivados que le podrían otorgar un fenotipo pigmentado. En este trabajo el aislamiento de la mutante Mel¹⁴ nos indica que probablemente esta cepa esté alterada en la SPC. Esta observación es reforzada porque esta mutante sintetiza melanina en presencia de la scitalona. Lo que indicaría que todas las enzimas posteriores a la SPC en la vía de la síntesis son funcionales.

En el resto de las mutantes albinas y grisáceas que en un medio con scitalona son poco pigmentadas, esto sugeriría que el transporte de las enzimas de la vía de síntesis de la melanina no sean eficientemente acarreadas a la pared celular por lo que no producen pigmento como la silvestre en el medio PDA o como la mutante Mel¹⁴ en presencia de scitalona.

En los hongos la síntesis de los heteropolímeros de la melanina es en general extracelular (Ellis y Griffith, 1974). La acumulación de gránulos electrodensos en la pared celular o sobre la parte externa de la misma es común en una gran diversidad de hongos pigmentados. En las imágenes obtenidas por MET, se observó que *S. schenckii* acumuló gránulos electrodensos en la parte externa de la pared de los conidios como había sido descrito por Mariat *et al.* (1978). La cepa albina, Mel⁻14, no presentó estos gránulos; sin embargo, cuando se creció en medio de PDA adicionado scitalona, se formaron los gránulos de melanina con un patrón similar a los de la cepa silvestre. La acumulación de los gránulos de melanina en la superficie externa de la pared celular de los hongos permite suponer que algunos intermediarios pueden ser sintetizados extracelularmente o que el monómero (DHN) es transportado desde el citoplasma hasta el exterior de la célula.

En la mayoría de las mutantes Mel⁻ la producción y la viabilidad de los conidios están reducidos. La mutante Mel⁻14 fue la que presentó las menores alteraciones. Esta mutante fue la que sintetizó melanina, como la silvestre, en presencia de scitalona. En la mutante Mel⁻9, los conidios fueron de mayor longitud que los de la silvestre. Esto sugiere que todas las mutantes, además, de la alteración en la vía de síntesis de la melanina tienen otra u otras mutaciones que provocan disminución en la producción de conidios y en su viabilidad.

En *S. schenckii* la pigmentación se localiza únicamente en los conidios y la síntesis del pigmento es inducible por los sustratos en el medio de cultivo. Este

comportamiento es similar a lo que se ha observado para la producción de los metabolitos secundarios en procariotes (Chater, 1992; Horinouchi y Beppu, 1992; Beppu, 1995) y en algunas especies del género *Aspergillus* (Hicks *et al.*, 1997; Guzman de Peña y Ruiz Herrera, 1997; Guzman de Peña *et al.*, 1998). Estas evidencias permiten sugerir que en *S. schenckii* la producción de la melanina requiere de la formación del conidio.

Perspectivas del trabajo

Las primeras tareas en esta línea de trabajo serían:

- a) Complementar las mutantes utilizando una biblioteca genómica.
- b) Identificar y caracterizar los fragmentos obtenidos.
- c) Conocer la organización de estos genes dentro del genoma del hongo.
- d) Secuenciar los genes y compararlos en un banco de genes.

VI. CONCLUSIONES

1. La melanina que sintetiza *S. schenckii* es por la vía de DHN.
2. Los resultados observados en la complementación con la scitalona sugieren que la mutante albina Mel 14 tiene una alteración en la SPC involucrada en la producción del 1,3,6,8-THN.
3. Por los metabolitos acumulados y aislados de la mutante Mel 10 se propone que la mutación está localizada en la deshidratasa de la scitalona.
4. La melanina en *S. schenckii* sólo se acumula en forma de gránulos extracelulares.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Bell, A. A. and M. H. Wheeler. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24: 411-451.
2. Bell, A. A., J. E. Puhalla, W. T. Tolmsoff and R. D. Stipanovic. 1976a. Use of mutants to establish (+)-scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.*, 22: 787-789.
3. Bell, A. A., R. D. Stipanovic and J. E. Puhalla. 1976b. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*. Identification of (+)-scytalone as a natural precursor to melanin. *Tetrahedron*, 32: 1353-1356.
4. Beppu T. 1995. Signal transduction and secondary metabolism: prospects for controlling productivity. *TIBTECH*, 13:264-269.
5. Chang, P. K., J. W. Vcary, J. Yu, D. Bhatnagar and T. E. Cleveland. 1995. The *Aspergillus parasiticus* poliketide synthase gene *pkSA*, a homolog of *Aspergillus nidulans* *wA*, is required for aflatoxin B-1 biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 248: 270-277.
6. Chater, K. F. 1992. Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces*, *Ciba Found. Symp.*, 171: 144-156.
7. Chumley, F. G. and B. Valent. 1990. Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Micr. Interact.*, 3(3): 135-143.
8. Dimroth, P., E. Ringelmann and F. Lynen. 1976. 6-methylsalicylic acid Synthase from *Penicillium patulum*. *Eur. J. Biochem.*, 68: 591-596.
9. Ellis, D. H. and D. A. Griffiths. 1974. The location and analysis of melanins in the cell walls of some fungi. *Can. J. Microbiol.*, 20: 1379-1386.
10. Emery, H. S., C. P. Shelburne, J. P. Bowman, P. G. Fallon C. A. Schultz and E. S. Jacobson. 1994. Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, 62(12): 5694-5697.
11. Feng, G. H. and T. J. Leonard. 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6): 2275-2277.

12. Fling, M., N. H. Horowitz and S. F. Heinemann. 1963. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 238: 2045-2052.
13. Fogarty R. V. and J. M. Tobin. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 19: 311-317.
14. Fox, D. L. 1983. Biochromy of the mollusca. In: Wilbur, K. M. (Ed.). *The Mollusca, vol 2. Enviromental Biochemistry and Physiology*. Academic Press. Florida. pp.281-303.
15. Ghidalia, W. 1985. Structural and biological aspects of pigments. In: Blis, D. E. and Mantel L. A. (Eds.). *Integument, pigments and hormonal processes*. Academic Press, Inc. New York. pp 301-393.
16. Gramajo, H: C., J. White, R. Hutchinson and M. J. Bibb. 1991. Overproduction and localization of components of the polyketide synthase of *Streptomyces glaucescens* involved in the production of the antibiotic tetracenomycin. *Can. J. Bacteriol.*, 173: 6475-6483.
17. Griffin, D. H. 1994. *Fungal physiology*. Wiley-Liss. New York. Pp 246-274.
18. Guzmán-de-Peña and J. Ruiz-Herrera. 1997. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet. Biol.*, 21: 198-205.
19. Guzmán-de-Peña, J. Ruiz-Herrera and J. Aguirre. 1998. Correlation between the regulation of sterigmatoxystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emeryella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 199-205.
20. Hicks, J. K., J. H. Yu, N. P. Keller and T. H. Adams. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein dependent signaling pathway. *EMBO J.* 16(16): 4916-4923.
21. Hopwood, D. A. and D. H. Sherman. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 24: 37-66.
22. Horinouchi, S and T. Beppu. 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46: 377-398.
23. Horowitz, N. H. and S. C. Shen. 1952. *Neurospora* tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 197: 513-520.
24. Howard, R. J. and M. A. Ferrari. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.*, 13: 403-418.

25. Huber, M. and K. Lerch. 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters*, 219(2): 335-338.
26. Hutchinson C. R. and I. Fujii. 1995. Polyketide synthase gene manipulation: A structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 201-238.
27. Ichinose K. J. Kiyono, Y. Ebizuka and U. Sankawa. 1993. Post-aromatic deoxygenation in polyketide biosynthesis: reduction of aromatic rings in the biosynthesis of fungal melanin and anthraquinone. *Chem. Pharm. Bull.*, 41(11): 2015-2021.
28. Jacobson, E. S. and S. B. Tinnell. 1993. Antioxidante function of fungal melanin. *J. Bacteriol.*, 175(21): 7102-7104.
29. Jordan, P. M. and J. B. Spencer. 1993. The biosynthesis of tetraketides: enzymology mechanism and molecular programing. *Biochem Soc. Trans.*, 21: 222-228.
30. Kawamura, C., J. Moriwaki, N. Kimura. Y. Fujita. S. Fuji, T. Hirano, S. Koizimu and T. Tsuge. 1997. The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant. Microb. Interact.*, 10(4): 446-453.
31. Kimura, N. and T. Tsuge. 1993. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J. Bacteriol.*, 175(14): 4427-4435.
32. Korner A. and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 217: 1163-1165.
33. Kubo, Y., H. Nakamura, K. Kobayashi, T. Okuno and I. Furusawa. 1991. Cloning of a melanin biosynthetic gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant. Micro. Interact.*, 4(5): 440-445.
34. Kuo, M. J. and M. Alexander. 1967. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.*, 94(3): 624-629.
35. Kwon-Chung, K. J. and J. E. Bennett. 1992. *Medical Mycology*. Lea & Febiger. Philadelphia. pp 707-729.
36. Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck and T. J. Popkin. 1982. Melanin- lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.*, 150(3): 1414-1421.
37. Lavalley, P. and F. Mariat. 1983. Sporotrichosis. *Bull. Inst. Pasteur*, 81: 295.

38. Longuet-Higgins, H. C. 1960. On the origin of the free radical property of melanins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 86: 231-232.
39. Lundqvist, T., P. C. Weber, C. N. Hodge, E. H. Braswell, J. Rice and J. Pierce. 1993. Preliminary crystallographic studies on scytalone dehydratase from *Magnaporthe grisea*. *J. Mol. Biol.*, 232: 999-1002.
40. Mariat F., R. G. Garrison, K. S. Boyd, B. M. Rouffaud, et H. Fromentin. 1978. Premières observation sur les macrospores pigmentées de *Sporothrix schenckii*. *Mycologie*. 285: 1429-1432.
41. Mason, H. S. 1948. The chemistry of melanin. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 172(1): 83-99.
42. Mason, H. S., D. J. E. Ingram and B. Allen. 1960. The free radical property of melanins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 86: 225-230.
43. Medentsev, A. G. and V. K. Akimenko. 1998. Naphtoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*, 47(6): 935-959.
44. Motoyama, T. K. Imanishi and I. Yamaguchi. 1998. cDNA cloning, expression, and mutagenesis of scytalone dehydratase needed for pathogenicity of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(3): 564-566.
45. Norton, R. A. 1999. Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* by anthocyanidins and related flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 47(3):1230-1235.
46. Nurudeen, T. A. and D. G. Ahearn. 1979. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*, 10(5): 724-729.
47. Piattelli M., E. Fattorkusso, S. Magno and R. A. Nicolaus. 1963. *Ustilago* melanin, a naturally occurring catechol melanin. *Tetrahedron Lett.*, 15: 997-998.
48. Polacheck I., V. J. Hearing and K. J. Kwon-Chung. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.*, 150(3): 1212-1220.
49. Polacheck, I., Y. Platt and J. Aronovitch. 1990. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, 58(9): 2919-2922.
50. Polak, A. 1989. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses*, 33(5): 215-224.

51. Rast, D. M., H. Stussi, H. Hegnauer and L. E. Nyhlen. 1981. *Melanins*. In: Turian G., and Hohl H. R. (Eds.). *The fungal spore: morphogenetic controls*. Academic Press.
52. Rhodes, J. C. I. Polacheck and K. J. Kwon-Chung. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, 36: 1175-1184.
53. Rippon, J.. 1988. *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Ascomycetes*. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
54. Santana, C., D. Segura & S. Sánchez. 1994. Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.*, 36: 139-158.
55. Sherman, D. H., F. Malpartida, M. J. Bibb, H. M. Kieser, M. J. Bibb and D. A. Hopwood. 1989. Structure and deduced function of the granacitin producing poliketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22. *EMBO J.*, 8:2717-2725.
56. Slawinska, D, J. Slawinska and T. Sarna. 1975. Photoinduced luminescence and EPR signals of polyphenol and quinone polymers. *Photochem. Photobiol.*, 21: 393-396.
57. Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. New-York, U.S.A.. pp 463-482.
58. Takano, Y., Y. Kubo, C. Kawamura, T. Tsuge and Iwao Furusawa. 1997. The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appresorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficiente albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. *Fungal Genet. Biol.*, 21: 131-140.
59. Takano, Y., Y. Kubo, K. Shimizu, K. Mise, T. Okuno and I. Furusawa. 1995. Structural analysis of *PKS1*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 162-167.
60. Taylor, B. E., M. H. Wheeler and P. J. Szaniszló. 1987. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. *Mycologia*, 79(2): 320-322.
61. Tsai, H. F., R. G. Washburn, Y. C. Chang and K. J. Kwon-Chung. 1997. *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol. Microbiol.*, 26: 175-183.

62. Tsai, H. F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler and K. J. Kwon-Chung. 1998. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.*, 180(12): 3031-3038.
63. Vartivarian. S. E. 1992. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clin. Infect. Dis.*, 14(Suppl 1):S30-6
64. Vidal-Cros A., F. Viviani, G. Labesse, M. Boccara and M. Gaudry. 1994. Polyhydroxynaphthalene reductase involved in melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. *Eur. J. Biochem.*, 219: 985-992.
65. Vining, L. C. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity – a review. *Gene*, 115: 135-140.
66. Viviani, F., J. P. Vors, M. Gaudry and A. Marqueta. 1993. Deoxygenation of polyphenoles by ascomycetes: kinetic behavior of the NADPH-dependent naphthol dehydrogenase and inhibition by tricyclazole and its analogues. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 130: 395-404.
67. Wang. I. K., C. Reeves and G. M. Gaucher. 1990. Isolation and sequencing of a genomic DNA clone containing the 3' terminus of the 6-methylsalicylic acid polyketide synthetase gene of *Penicillium urticae*. *Can. J. Microbiol.*, 37: 86-95.
68. Wheeler M. H., W. J. Tolmsoff and S. Meola. 1976. Ultrastructure of melanin formation in *Verticillium dahliae* with (+)-scytalone as a biosynthetic intermediate. *Can. J. Microbiol.*, 22:702-711.
69. Wheeler, H. M. and R. D. Stipanovic. 1979. Melanin biosynthesis in *Thielaviopsis basicola*. *Exp. Mycol.*, 3:340-350.
70. Wheeler, M. H., and A. A. Bell. 1988. Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 2:338-387.
71. Wieser, J. J. H. Yu and T. H. Adams. 1997. Dominant mutation affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Curr. Genet.*, 32(3): 218-224.
72. Zhdanova, N. N., A. V. Melezhik, A. V. and A. Y. Vasilevskaya. 1980. Thermostability of some melanin-containing fungi. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR*, 7: 305-310.
73. Zhdanova, N. N., A. V. Melezhik, A. V., A. Y. Vasilevskaya and V. D. Pokhodenko. 1978. Formation and destruction of photoinduced paramagnetic centers in melanin-containing fungi. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR*, 5: 453-458.