

Expresión de melanina en *Paracoccidioides brasiliensis*: inducción química con L-DOPA y L-epinefrina.

Melanin expression in *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical induction with L-DOPA and L-epinephrine.

Martha Eugenia Urán J.¹⁻², Lina Marcela Castañeda A.³, Ángela Restrepo M.¹, Luz Elena Cano R.¹⁻²⁻⁴.

Resumen

Introducción. *Paracoccidioides brasiliensis* es el agente etiológico de la paracoccidioidomicosis (PCM), una de las micosis más importantes en Latinoamérica, es un hongo dimórfico que crece a 36°C (levadura-forma parasítica) y a temperatura ambiente 18°C (moho-forma saprofítica).

Objetivo. Determinar la expresión in vitro de melanina por *P. brasiliensis* mediante el uso de factores químicos como L-DOPA y L-epinefrina.

Materiales y métodos. Cepa ATCC 60855 de *P. brasiliensis* crecida en medio sintético ajustado individualmente a pH 5,5 y suplementado con L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) 1mM o L-epinefrina 0,8 mg/ml.

Resultados. Se observó que la inducción química con 1mM de L-DOPA o con 0,8 mg/ml de L-epinefrina resultaba en la melanización de las levaduras de *P. brasiliensis*.

Conclusiones. Se vio que *P. brasiliensis* tiene la capacidad de crecer in vitro en medio ácido a pH 5,5 y sintetizar melanina a partir de inductores químicos externos como L-DOPA y L-epinefrina.

Palabras clave: Melanina, *Paracoccidioides*, Levodopa, Epinefrina, Paracoccidioidomicosis, Factores de virulencia.

Abstract

Introduction. *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most important mycoses in Latin America, it is a thermo dimorphic fungi that growth at 36°C (yeast-parasitic form) and 18°C (mycelia- saprophytic form).

Objective. To determine in vitro the expression of melanin by *P. brasiliensis* using L-DOPA and L-epinephrine chemical factors.

Materials and methods. ATCC 60855 *P. brasiliensis* strain growth in pH 5,5 synthetic media supplemented with L-dihydroxyphenylalanine or L-epinephrine.

Results. Was observed that chemical induction with L-DOPA 1mM or L-epinephrine 0,8 mg/ml generated melanization of the *P. brasiliensis* yeast.

¹ Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia.

² Escuela de Ciencias de la Salud, Maestría en Ciencias Médicas, programa de Microbiología, Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Medellín, Colombia.

³ Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

⁴ Facultad de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Martha Eugenia Urán Jiménez. muran@cib.org.co

Fecha de recibido: febrero 19 de 2008

Fecha de aprobado: junio 28 de 2008

Conclusions. *P. brasiliensis* yeast could growth in vitro in acid media (pH 5,5) and synthesizes melanin using external chemical induction as L-DOPA or L-epinephrine.

Key words: Melanins, *Paracoccidioides*, Levodopa, epinephrine, Paracoccidioidomycosis, Fungi, Virulence factors.

INTRODUCCIÓN

Paracoccidioides brasiliensis (*P. brasiliensis*) es el agente causal de la paracoccidioidomycosis (PCM), una de las micosis sistémicas más importantes de ciertas regiones de Latinoamérica¹. La infección es adquirida por la inhalación de los propágulos infectantes (conidias) producidos a partir de la fase miceliar de este hongo dimórfico; estas conidias se transforman en levaduras multigemantes, correspondientes a la fase tisular del hongo². Entre los factores de virulencia de *P. brasiliensis* se encuentran su capacidad para crecer a 37°C (termotolerancia), la producción de toxinas y de enzimas líticas, el cambio conformacional de los glucanos en la pared celular y la producción de melanina como posible factor asociado a la virulencia del hongo, en forma similar a lo que se ha encontrado en otros hongos patógenos³.

Las melaninas son polímeros multifuncionales que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; son pigmentos típicamente oscuros, castaños o negros, cargados negativamente, hidrofóbicos y de alto peso molecular que son formados a través de la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos^{4, 5}. Se reconocen tres tipos de melanina: Eumelanina (formado por un proceso completo de polimerización que involucra quinonas y radicales libres), Faeomelaninas (derivados de tirosina y cisteína) y Alomelaninas (formados a partir de precursores libres de nitrógeno)^{4, 6, 7}. En los hongos se encuentran dos importantes tipos de melanina, la DHN-melanina (llamada así por una de las sendas intermedias de la^{1,8} dihidroxinaftaleno) y DOPA-melanina (llamada por uno de los precursores de la L-3,4-dihidroxifenilalanina). Ambos tipos de melanina están implicados en la virulencia de algunos hongos⁸.

Se ha observado que la melanina sintetizada por diferentes hongos patógenos, tiene la

habilidad de protegerlos contra una gran cantidad de agresiones como son oxidantes, temperaturas extremas, luz ultravioleta, anfotericina B, péptidos antimicrobianos e in vitro a la fagocitosis mediada por macrófagos^{9, 10}. Además su expresión le confiere una mayor virulencia en hospederos inmunocompetentes³. En algunos hongos patógenos tales como *Exophiala dermatitidis* y *Sporothrix schenckii*, la melanización está asociada a la capacidad de producir enfermedad. Además de los pigmentos producidos por *Aspergillus fumigatus* están asociados con la virulencia de sus conidias^{5, 11}. Recientemente, también se ha encontrado evidencia a favor de la producción de melanina por *Histoplasma capsulatum* durante la infección in vivo y en estudios in vitro donde tiene la habilidad de crecer y producir melanina en un medio mínimo con L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), lo que indica que posee las enzimas necesarias para los procesos de síntesis de los precursores requeridos para la formación de polímeros de melanina¹².

La melanización se ha estudiado más extensivamente en la levadura *Cryptococcus neoformans*, la que expresa melanina tanto in vitro como in vivo¹³, siendo su melanización catalizada por una lacasa^{14, 15}. Estas levaduras crecen en presencia de compuestos dihidroxifenólicos exógenos tales como la L-DOPA, la L-epinefrina y sales de bitartrato que inducen la melanización de estas células en que, a su vez, puede ser bloqueada por el agente químico glifosato¹³.

En *P. brasiliensis* se ha observado que cultivos del hongo en su fase miceliar producen, algunas veces, pigmentos oscuros que se difunden en el medio donde se encuentra el microorganismo^{1,3}. También se ha demostrado que tanto las conidias producidas en medios pobres como el agar agua, y las levaduras del *P. brasiliensis* cultivadas en medios con L-DOPA producen melanina in vitro

y durante la infección experimental (a las 12 semanas post - inoculación) ³.

Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estudios que indiquen o refieran las posibles vías metabólicas utilizadas por *P. brasiliensis* para producir la melanina. El objetivo del presente trabajo fue determinar si el estímulo con compuestos como L-DOPA y L-epinefrina, podrían inducir in vitro la producción de melanina en cultivos de *P. brasiliensis* en su fase levaduriforme.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa del hongo

Se usó la cepa ATCC 60855 de *P. brasiliensis*, es un aislamiento capaz de producir conidias, inicialmente aislada de un paciente de Colombia y registrada en la ATCC. La cepa es mantenida en forma de levadura a 35-37°C ¹⁶.

Crecimiento de las levaduras de *P. brasiliensis* en medio BHI-Glucosa 1%

El aislamiento de *P. brasiliensis* ATCC 60855 se cultivó en un medio sólido BHI (BBL, Sparks MD, N.Y.), glucosa (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) al 1%, Agar Bacto-Agar® (Difco Laboratories, Sparks MD, N.Y) al 1,3%. Para verificar la ausencia de contaminación, se realizaron pruebas de esterilidad, incubando los medios a 36°C y 18°C durante 72 horas antes de inocularlos. Los tubos inoculados con levaduras de *P. brasiliensis* se incubaron a 35-37°C por 7 días aproximadamente, hasta obtener un buen crecimiento.

Curvas de crecimiento de *P. brasiliensis* en el medio Sintético Mc Veigh Morton (SMV) suplementado con tiamina, pH 5,5 y 7,0.

Las levaduras del hongo crecidas en BHI sólido fueron removidas utilizando una pipeta pasteur estéril y todo el crecimiento obtenido fue barrido con 2 ml de SMV líquido 17 para realizar la inoculación de Erlenmeyers que contenían 10 ml de medio SMV líquido pH diferente (pH 5,5 o pH 7,0 dependiendo de la curva a realizar). Se utilizó una concentración del inóculo de $1,5 \times 10^6$

unidades micóticas/ml para todos los frascos, los cuales se incubaron a 35-37°C en agitación constante a 150 rpm (G24 Environmental Incubator Shaker. New Brunswick Scientific Co., Inc. New Brunswick, N.J.), durante 8 días. El contenido de cada erlenmeyer fue recolectado en períodos predeterminados (0 horas; 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 días post-inoculación) y depositado en tubos cónicos plásticos de 50 ml (Falcon) los cuales se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta completar la curva. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Diluciones y recuento en cámara de Neubauer de las unidades micóticas de *P. brasiliensis*

A partir de las muestras obtenidas y almacenadas previamente se realizaron diluciones seriadas (1:2 hasta 1:64) en Buffer fosfato salino (PBS 1X) estéril. El recuento de las unidades micóticas (levaduras) de cada dilución fue hecho por duplicado y se seleccionaron las diluciones 1:8, 1:16 y 1:32 por presentar mejor distribución del material celular para el recuento. Para los recuentos celulares se determinó como una unidad micótica a cualquier levadura aislada, con una sola gema o multigemante. El porcentaje de células melanizadas se determinó por el número de células melanizadas en un recuento total de cien células contadas en cada dilución de los cultivos realizados.

Crecimiento de las levaduras de *P. brasiliensis* en medio SMV con diferentes concentraciones de L-DOPA y de L-epinefrina

El aislamiento de la levadura de *P. brasiliensis* ATCC 60855 crecida en BHI-glucosa 1% se transfirió a medios de cultivo SMV líquido con pH 5,5 suplementados con: a) 10, 1 y 0,1 mM de L-DOPA (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) respectivamente; o con b) 0,8 y 0,35 mg/ml de L-epinefrina (Laboratorios Baxter, Cali – Colombia). Para ambos sustratos los cultivos fueron incubados por un total de 8 días a 35-37°C en agitación constante a 150 rpm (G24 Environmental Incubator Shaker. New Brunswick Scientific co., inc. New Brunswick,

N.J.), protegiéndolos de la autopolimerización, recubriendo el agitador y los erlenmeyer con papel aluminio. Además, se realizaron controles de contaminación (medios son hongo), control de crecimiento del hongo (sin L-DOPA o L-epinefrina) y control de autopolimerización de los químicos (medios de cultivo sin el hongo, los cuales fueron adicionados con L-DOPA o L-epinefrina para cada concentración). Los experimentos fueron repetidos durante dos ocasiones en diferentes tiempos, siempre por duplicado; la determinación del número de células totales y de células melanizadas por ml de medio de cultivo se realizó por determinación microscópica y recuento celular, como fue descrito previamente.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en las curvas de crecimiento a diferentes pH se tabularon a través del programa de Microsoft® Excel 2000 y se analizaron estadísticamente utilizando el programa GraphPad Software, Prism 3.0.

RESULTADOS

Curvas de crecimiento de *P. brasiliensis* en el medio Sintético Mc Veigh Morton (SMV) suplementado con tiamina con pH 5,5 y 7,0.

Para realizar los experimentos de inducción de la melanización con químicos (L-DOPA o L-epinefrina) es necesario que el pH del medio esté a 5,5 para un mejor metabolismo de éstos, aunque en *P. brasiliensis* ya se había realizado un estudio previo utilizando este pH 3, se hacía necesario determinar si el pH podría estar alterando el crecimiento del hongo y de manera similar se debía determinar cuál era el agente químico (L-DOPA o L-epinefrina) y la concentración más apropiada para inducir melanización en levaduras de *P. brasiliensis*.

La curva de crecimiento se realizó en medios de cultivo a dos pH diferentes (5,5 y 7,0) y por un período de 8 días con el fin de determinar cuál sería el mejor pH y el día de cultivo en el que se obtenía un crecimiento óptimo del hongo. Se hizo, en primera instancia, un experimento preliminar para determinar por cuánto tiempo era necesario observar los cultivos, para la

realización de las curvas de crecimiento, la cantidad de medio y el inóculo a utilizar (datos no incluidos aquí). Los resultados preliminares mostraron que se debía usar 10 ml de medio SMV, con un inóculo de $1,5 \times 10^6$ unidades micóticas de levadura/ml, al cual se le haría seguimiento durante 8 días.

Las curvas de crecimiento a pH 7,0 mostraron un punto máximo de crecimiento entre el 3^{er} y 4^o día, con una media para el cuarto día 6,90 del log del número de unidades micóticas/ml, mientras que las curvas a pH 5,5 tardaron aproximadamente 1 día más en tener el punto máximo (5^o día), con una media de 6.90 del log del número de unidades micóticas/ml, dicho resultado fue igual que para el pH 7,0 (Figura 1). De esta manera se comprobó que el pH 5,5 no afectaba el crecimiento del hongo, y permitió el uso de éste en la inducción de melanina, como se ha reportado previamente^{12, 18, 19}.

Melanización de *P. brasiliensis* con el inductor L-DOPA

La pigmentación de las levaduras se presentó después del 5 día de cultivo en el medio mínimo líquido adicionado con L-DOPA (10, 1 y 0,1mM). Se realizó un análisis semi-cuantitativo por recuento de unidades micóticas con presencia de pigmento en las levaduras, y se observó que a mayor concentración de L-DOPA había una mayor pigmentación de las levaduras; así mismo, había una mayor autopolimerización del medio, lo que fue visto de modo cualitativo de manera indirecta en las láminas en las que se recontaron las unidades micóticas pigmentadas (Figuras 2 y 3). Sin embargo, se notó que en la mínima concentración (0.1mM), el porcentaje de células melanizadas no superaba el 10% y aunque no existía autopolimerización del medio, la capacidad de inducir melanización era menor que en 1mM en el cual se había determinado un promedio de 30% de células melanizadas. No ocurrió pigmentación en el control de crecimiento de las levaduras sin L-DOPA, sin embargo, en el control sin levaduras pero con el inductor L-DOPA, el proceso de autopolimerización fue mayor al incrementar las concentraciones de éste en el sobrenadante de la suspensión de la autopolimerización.

Melanización del *P. brasiliensis* con el inductor *L-epinefrina*

La pigmentación de las levaduras con la L-epinefrina fue detectada en el medio líquido después de 5 días de incubación a una concentración de 0,8 mg/ml, pero no ocurrió así a la concentración de 0,35 mg/ml (Figura 2). En los controles sin L-epinefrina no se observó presencia de pigmentación y los controles sin levaduras no presentaron ningún tipo de autopóimerización.

DISCUSIÓN

Para hacer los experimentos de inducción de la melanización con químicos (L-DOPA o L-epinefrina) es necesario que el pH del medio esté a 5,5 para un mejor metabolismo de estos compuestos por el microorganismo, estudios previos en otros hongos como *C. neoformas* habían demostrado que el pH de 5.5 y la concentración de 1mM de L-DOPA eran los adecuados para realizar la inducción de melanina en células levaduriformes del hongo¹⁹, aunque en *P. brasiliensis* ya se había hecho un estudio previo utilizando este pH³, se hacía necesario determinar si el pH podría

estar alterando el crecimiento del hongo y de manera similar se debía definir cuál era el agente químico (L-DOPA o L-epinefrina) y la concentración más apropiada para inducir la melanización en levaduras de este hongo. En *P. brasiliensis* es conocido que el pH óptimo para realizar el crecimiento de las levaduras es de 7,0²⁰; sin embargo, cuando se hicieron curvas de crecimiento a pH 5,5 los resultados fueron similares a los obtenidos con pH 7,0. Así mismo, se encontró reproducibilidad en la determinación del punto máximo de crecimiento, siendo de 5 días para todos los experimentos (Figura 1).

Estos resultados de crecimiento del hongo a pH 5,5 nos permitieron utilizar este pH, en los experimentos de inducción de la melanización con L-DOPA y L-epinefrina, como fue sugerido ya por otros autores^{3, 12, 14}. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran, por primera vez, que el estímulo con compuestos como L-DOPA (1mM) y L-epinefrina (0,8mg/ml), a pH 5,5 inducen la producción de melanina en *P. brasiliensis* durante su fase levaduriforme (Figuras 2 y 3).

Por otra parte, en *P. brasiliensis* se ha observado la producción de pigmentos bajo ciertas condiciones pero la naturaleza química de dicho pigmento no es aún bien conocida⁵. En artículos

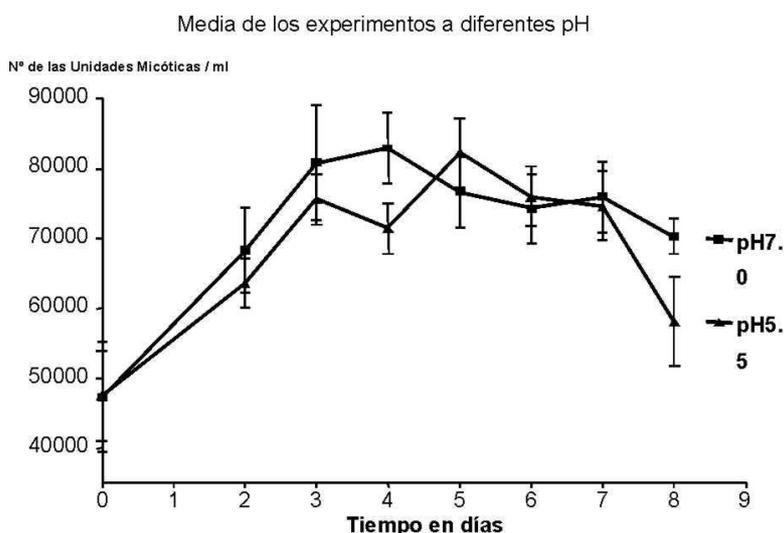


Figura 1. Curvas de crecimiento de las levaduras de *P. brasiliensis* en medio sintético Mc Veigh Morton (SMV), pH 5,5 y 7,0.

ya publicados se sugiere que los pigmentos producidos por *P. brasiliensis*, tanto in vitro como in vivo, son de tipo de melanina, ya que se aíslan partículas de tipo “melanina-ghost” (fantasmas), que presentan por espectroscopia de resonancia (ESR) un patrón similar a melanina; así mismo, estas partículas tienen la capacidad de reaccionar con anticuerpos monoclonales contra la melanina de *C. neoformans* ³.

Igualmente, se advirtió que al utilizar varias concentraciones de L-DOPA (10, 1 y 0,1mM) era posible establecer una relación directa entre la concentración del compuesto y la presencia de melanina, así pues, cuando se vieron las levaduras de *P. brasiliensis* obtenidas con la concentración intermedia (1mM) se encontró que había una cantidad apreciable de levaduras melanizadas (30%), y que no había restos de autopolimerización del medio. Este hallazgo confirma la utilización de la concentración de 1mM de L-DOPA en *P. brasiliensis* para inducir melanización, así como ha sido descrito en los estudios con *H. capsulatum* y *C. neoformans* ^{12, 18}. Así mismo, se observó una mayor melanización de las levaduras de *P. brasiliensis* cultivadas en presencia de la concentración más alta (10mM) de L-DOPA; sin embargo, esta concentración indujo una alta autopolimerización del medio; al disminuir la concentración del sustrato, se redujo

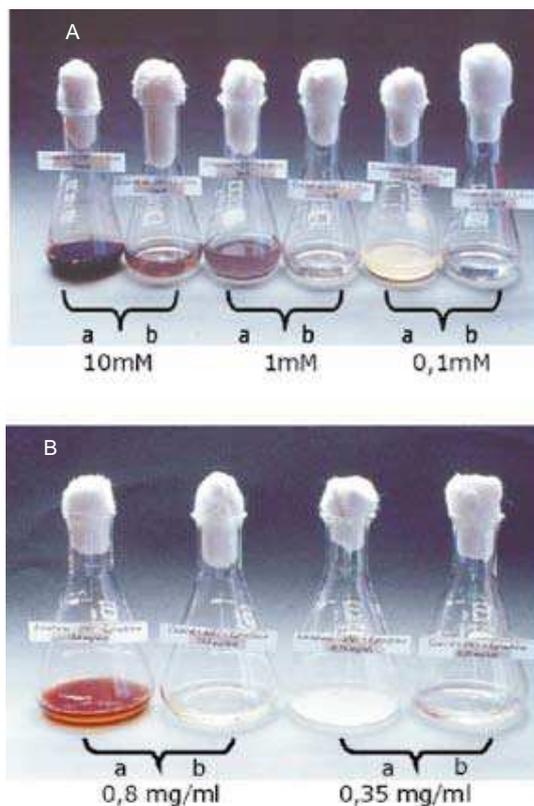


Figura 2. Levaduras melanizadas de *P. brasiliensis* en presencia de 10mM, 1mM y 0,1mM de L-DOPA.

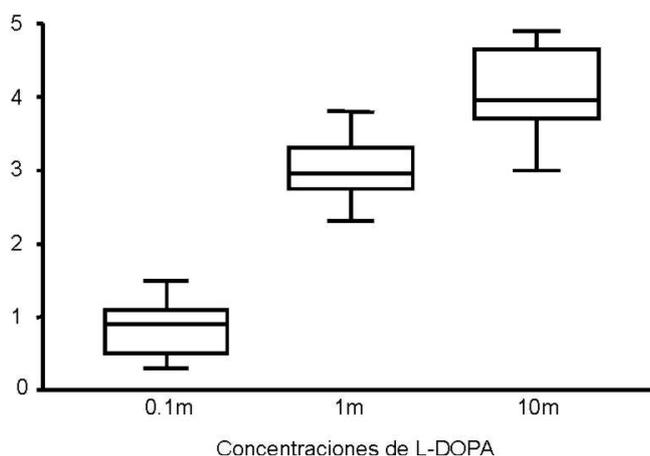


Figura 3. Porcentaje de células melanizadas de *P. brasiliensis* en presencia de L-DOPA.

también la presencia de melanina; la menor concentración utilizada (0,1 mM), indujo poca melanización de las levaduras, por lo que esta concentración no fue óptima para determinar dicho fenómeno en *P. brasiliensis*. Así mismo, no ocurrió pigmentación en el control de crecimiento de las levaduras sin L-DOPA, sin embargo en el control sin levaduras pero con el inductor L-DOPA, el proceso de autopolimerización fue mayor al incrementar las concentraciones de éste.

Con la L-epinefrina, los resultados indicaron que la concentración de 0,8 mg/ml inducía la melanización de las levaduras de *P. brasiliensis*; en cambio, con la concentración de 0,35 mg/ml este fenómeno no se produjo, al menos por observación microscópica. Estos datos son llamativos puesto que se indujo melanización en *P. brasiliensis* al utilizar una concentración mucho menor, de 0.8 mg/ml, que es equivalente a 0.44 mM, cuando con *H. capsulatum* se utilizaron concentraciones de 1mM de L-epinefrina¹².

Estos resultados servirán de base para futuros proyectos en los que se pueda determinar con mayor precisión y de una manera cuantitativa, el efecto de la L-epinefrina como inductor, así como de otros compuestos similares, tales como norepinefrina y metildopa, tal y como se ha realizado en los estudios de *C. neoformans*²¹.

Similar a lo reportado por Arraes et al., 2005²², mediante análisis de transcriptómica del metabolismo del micelio y de las levaduras del hongo, fue posible detectar que la vía metabólica del corismato es activa en el micelio, mientras que la vía metabólica completa de la DOPA-melanina se encuentra presente en la levadura y está compuesta por cinco enzimas diferentes. Estos datos de transcriptómica sustentan nuestros resultados al comprobar que el hongo dimórfico *P. brasiliensis* tiene la maquinaria enzimática necesaria para producir pigmentos tipo melanina a partir de sustratos específicos como L-DOPA y L-Epinefrina in vitro que se usaron en este estudio.

Conflicto de interés

Los autores no tienen ningún conflicto de interés qué declarar.

Financiación y agradecimientos

Esta revisión hace parte de la tesis de Maestría en Ciencias Médicas, programa de Microbiología de la Universidad Pontificia Bolivariana de la estudiante Martha E. Urán J. quien es financiada por: el Centro Integrado para el Desarrollo de la Investigación, CIDI -UPB., y el convenio CIB - Fundación Bancolombia y del Trabajo de grado de Lina Marcela Castañeda como Bacterióloga y Analista Clínico del Colegio Mayor de Antioquia. La Doctora Cano es financiada por la Universidad de Antioquia. Proyectos: COLCIENCIAS, código No. 1115-04-11823, CIDI radicado: 904-05/06-52.

REFERENCIAS

1. Restrepo A, Tobón AM. Paracoccidioides brasiliensis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6. ed. Philadelphia: Elsevier ; 2005. p.3062 - 8.
2. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. J Med Vet Mycol. 1987 Jun;25(3):165-75.
3. Gomez BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis in vitro and during infection. Infect Immun. 2001 Sep;69(9):5760-7.
4. Hamilton AJ, Gómez BL. Melanins in fungal pathogens. J Med Microbiol. 2002 Mar;51(3):189-91.
5. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol. 2003 Apr;5(4):203-23.
6. Hill HZ. The function of melanin or six blind people examine an elephant. Bioessays. 1992 Jan;14(1):49-56.
7. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct;13(4):708-17.
8. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol. 2003 Mar;38(2):143-58.
9. Wang Y, Casadevall A. Growth of Cryptococcus neoformans in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Nov;38(11):2648-50.
10. Da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic

- fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006 Jan;8(1):197-205.
11. Gómez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.* 2003 Apr;16(2):91-6.
 12. Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancope-Oliveira RM, et al. Histoplasma capsulatum synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5124-31.
 13. Nosanchuk JD, Rosas AL, Lee SC, Casadevall A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet.* 2000 Jun 10;355(9220):2049-50.
 14. Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol.* 1998 Mar;180(6):1570-2.
 15. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1214-8.
 16. Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 1985 Dec;23(6):407-14.
 17. Restrepo A, Jiménez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* 1980 Aug;12(2):279-81.
 18. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. Melanin, melanin "ghosts," and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1996 Jul;64(7):2420-4.
 19. Nosanchuk JD, Casadevall A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology.* 2003 Jul;149(Pt 7):1945-51.
 20. Arango M, Restrepo A. Determination of the growth curves of the mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* 1976 Oct 22;59(3):163-9.
 21. García-Rivera J, Eisenman HC, Nosanchuk JD, Aisen P, Zaragoza O, Moadel T, et al. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. *Fungal Genet Biol.* 2005 Dec;42(12):989-98.
 22. Arraes FB, Benoliel B, Burtet RT, Costa PL, Galdino AS, Lima LH, et al. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res.* 2005; 4(2):290-308.