

ACTIVIDAD INMUNOLOGICA DE ANTIGENOS MICELIALES Y
LEVADURIFORMES DE DIFERENTES FASES DE CRECIMIENTO
DE *Sporothrix schenckii*

por Gabina Arenas* y
Conchita Toriello*

IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF MYCELIAL AND YEAST ANTIGENS
FROM DIFFERENT GROWTH PHASES OF *Sporothrix schenckii*

SUMMARY

Sporothrix schenckii metabolic antigens are of great value in the diagnosis and prognosis of human sporotrichosis. The biological activity of these molecules may vary depending on the different strains and culture media used, antigen extraction methods and fungal morphology. In order to observe the effects of *S. schenckii* mycelial and yeast antigens from different growth phases on their immunological activity, the present study was undertaken. Metabolic antigens were obtained from culture medium filtrates from different fungal growth phases. They were tested by immunodiffusion (ID) and counterimmunoelectrophoresis (CIE) with sporotrichosis patients sera. Protein and carbohydrate concentrations were determined in all antigens. The results showed a gradual increase of the antigen's carbohydrate concentration during the logarithmic growth phase while the protein concentration remained constant. The immunological reactivity showed an increase in the number of precipitin bands with ID and CIE from antigens obtained from the initial stationary phase. Cross reactions were found only in ID with one histoplasmosis serum. The best results were observed with antigens from the late logarithmic growth phase.

RESUMEN

Los antígenos metabólicos de *Sporothrix schenckii* tienen gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la esporotricosis. La actividad inmunológica de estas moléculas antigénicas, puede variar dependiendo de la cepa utilizada, los medios de cultivo donde crece el hongo, la metodología empleada para su obtención y la morfología del hongo. En el presente trabajo se observa el efecto que tiene la fase de crecimiento de este microorganismo en la actividad inmunológica de antígenos metabólicos, obtenidos de sus formas micelial y levaduriforme. Estos

* Depto. de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, D.F. 04510.

fueron logrados con filtrados de cultivo en diferentes fases de crecimiento y se ensayaron en las pruebas de inmunodifusión (ID) y contraelectroforesis (CIE) con sueros de pacientes con esporotricosis. A todos se les determinó su contenido proteico y polisacárido. En ambas formas de crecimiento (micelial y levaduriforme) los resultados mostraron un aumento gradual en cuanto a la concentración de polisacáridos de los antígenos durante la fase logarítmica de crecimiento, mientras que la concentración de proteínas permaneció constante. La actividad inmunológica mostró un aumento en el número de bandas en la ID y CIE en los antígenos derivados del inicio de la fase estacionaria. Se encontró reacción cruzada en la ID con un suero de paciente con histoplasmosis. Los mejores resultados en ID y CIE se obtuvieron con los antígenos derivados del final de la fase logarítmica de crecimiento.

INTRODUCCION

Los antígenos fúngicos han sido utilizados en el diagnóstico y pronóstico de las infecciones micóticas (Mackenzie, 1983). Sin embargo, a la fecha no existe una regularización de ellos. Dentro de los factores que afectan su composición y actividad inmunológica se encuentran las cepas utilizadas en la producción, morfología y fase de crecimiento del hongo; condiciones de cultivo y metodología empleada (Huppert, 1983; Takata e Ishizaki, 1983; Toriello y Mariat, 1974). Todos estos factores ocasionan que exista una baja reproducibilidad entre diversos centros de producción. Debido a la frecuencia de esporotricosis en México, en el presente trabajo se trata de establecer el efecto que tiene la fase de crecimiento de *Sporothrix schenckii* en la actividad inmunológica del antígeno obtenido de éste hongo y de proponer un modelo de regularización, con el fin de encontrar las condiciones óptimas de producción y antigenicidad.

MATERIALES Y METODOS

HONGOS: Dos cepas de *Sporothrix schenckii* (116-83 y 705-78) fueron utilizadas en el trabajo. Se aislaron de casos humanos de esporotricosis, la primera del Hospital General, S.S. y la segunda del Centro Dermatológico Pascua, S.S., ambos en la Ciudad de México.

ANTIGENOS: Los antígenos metabólicos de *S. schenckii* (esporotricinas) de la forma micelial y levaduriforme, se obtuvieron a partir del cultivo del hongo en los medios de cultivo semi-sintéticos empleados por Toriello y Mariat (1974). Las condiciones de incubación variaron dependiendo de la forma de crecimiento. Para la forma micelial, la temperatura de incubación fue de 26°C en condiciones estáticas

TABLA 1. INMUNODIFUSION DE ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS DE *Sporothrix schenckii* A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION.

SUEROS	ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
3	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa selección de su reactividad positiva en pruebas inmunes.

- 1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis
- 4-6 Sueros de pacientes con neumonía múltiples
- 7-9 Sueros de pacientes con histoplasmosis
- 10-12 Sueros de pacientes con aspergilosis
- 13 Suero de sujeto normal
- +
- ++

1 banda
2 bandas

TABLA 2. INMUNODIFUSION DE ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS DE *Sporothrix schenckii* A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION.

SUEROS	ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION									
	21	28	35	42	56	63	70	77	105	180
1	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+
2	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
3	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa selección de su reactividad positiva en pruebas inmunes.

- 1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis
 4-6 Sueros de pacientes con neumonías múltiples
 7-9 Sueros de pacientes con histoplasmosis
 10-12 Sueros de pacientes con aspergilosis
 13 Suero de sujeto normal
 + 1 banda
 ++ 2 bandas
 +++ 3 bandas

y para la forma de levadura, los cultivos se mantuvieron a 37°C en agitación. Para inocular cantidades constantes, se pesaron 200 mg de un macerado del hongo. El tiempo de incubación varió de 3 a 30 días en la forma levaduriforme y de 7 a 105 días en la fase micelial. Se tomaron muestras cada 3 y 7 días respectivamente, tanto para la obtención del antígeno como para la determinación de la curva de crecimiento por consumo de glucosa. Al finalizar el tiempo de incubación, los cultivos fueron tratados con formaldehído (al 2% de concentración final) por 24 hr. Para la obtención de los antígenos, los cultivos se centrifugaron y esterilizaron por filtración. Los filtrados fueron dializados y concentrados a una décima parte del volumen inicial. El concentrado se precipitó con 4 volúmenes de alcohol etílico al 95% en presencia de acetato de sodio al 1%. El precipitado se disolvió nuevamente en agua y esta operación se repitió tres veces. A todos los antígenos obtenidos se les determinó proteínas (Lowry *et al.*, 1951) y carbohidratos totales (Dubois *et al.*, 1951).

CURVAS DE CRECIMIENTO: Paralelamente a la obtención del antígeno se determinó el crecimiento del hongo por medio del consumo de azúcar (Dawes, 1971) del mismo medio de cultivo (Toriello y Mariat, 1974). Todos los experimentos de obtención de antígenos y curvas de crecimiento así como todas las muestras procesadas se realizaron por duplicado.

SUEROS: Para las pruebas inmunológicas se utilizaron sueros provenientes de pacientes con esporotricosis del Hospital General y del Centro Dermatológico Pascua. Además se probaron sueros de pacientes aspergilosos, histoplasmosos y de diversas neumopatías procedentes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S., así como sueros normales de personas sanas.

PRUEBAS INMUNOLOGICAS: La inmunodifusión (ID) se realizó según la técnica de Ouchterlony (1962) en una solución de glicina 7.5 g; NaCl 0.9%; azida de sodio 0.1% en agarosa al 1%. La técnica de contraínmuno-electroforesis (CIE) se realizó utilizando una solución amortiguadora de barbituratos, pH 8.2 con agarosa al 1% y un voltaje de 1 V/cm².

RESULTADOS

Las curvas de crecimiento de la forma levaduriforme y micelial de *S. schenckii* se pueden observar en las figuras 1 y 2 respectivamente. En la curva de crecimiento de la forma levaduriforme se observó que el hongo llega a la fase estacionaria el día 12, mientras que la forma micelial hasta el 35. Para ambas formas morfológicas, al inicio de la fase exponencial se vio escaso o nulo rendimiento de antígeno. En la figura 3 se muestra el contenido de proteínas y carbohidratos totales del antígeno de la fase levaduriforme. El porcentaje de carbohidratos varió de 32 a 73%, aumentando progresivamente hasta el inicio de la

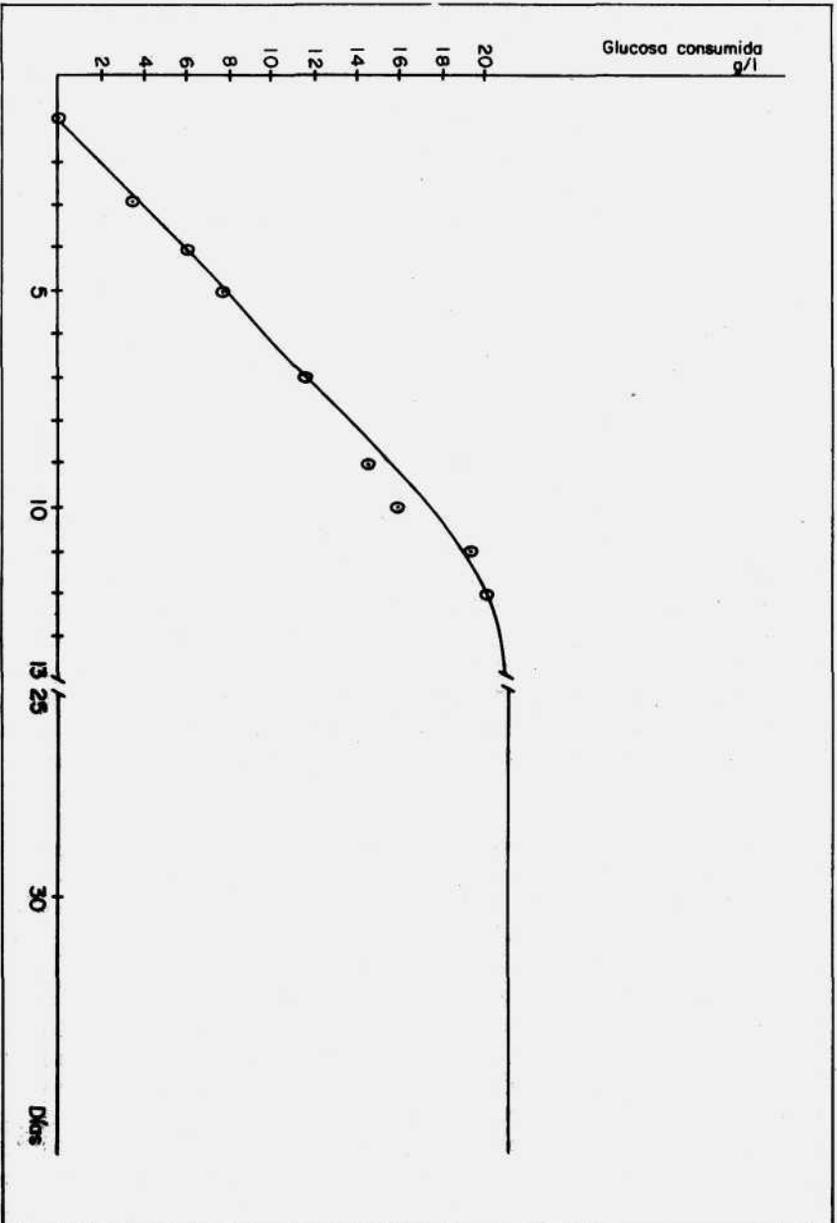


Fig. 1. Curva de crecimiento de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii* en relación al consumo de glucosa.

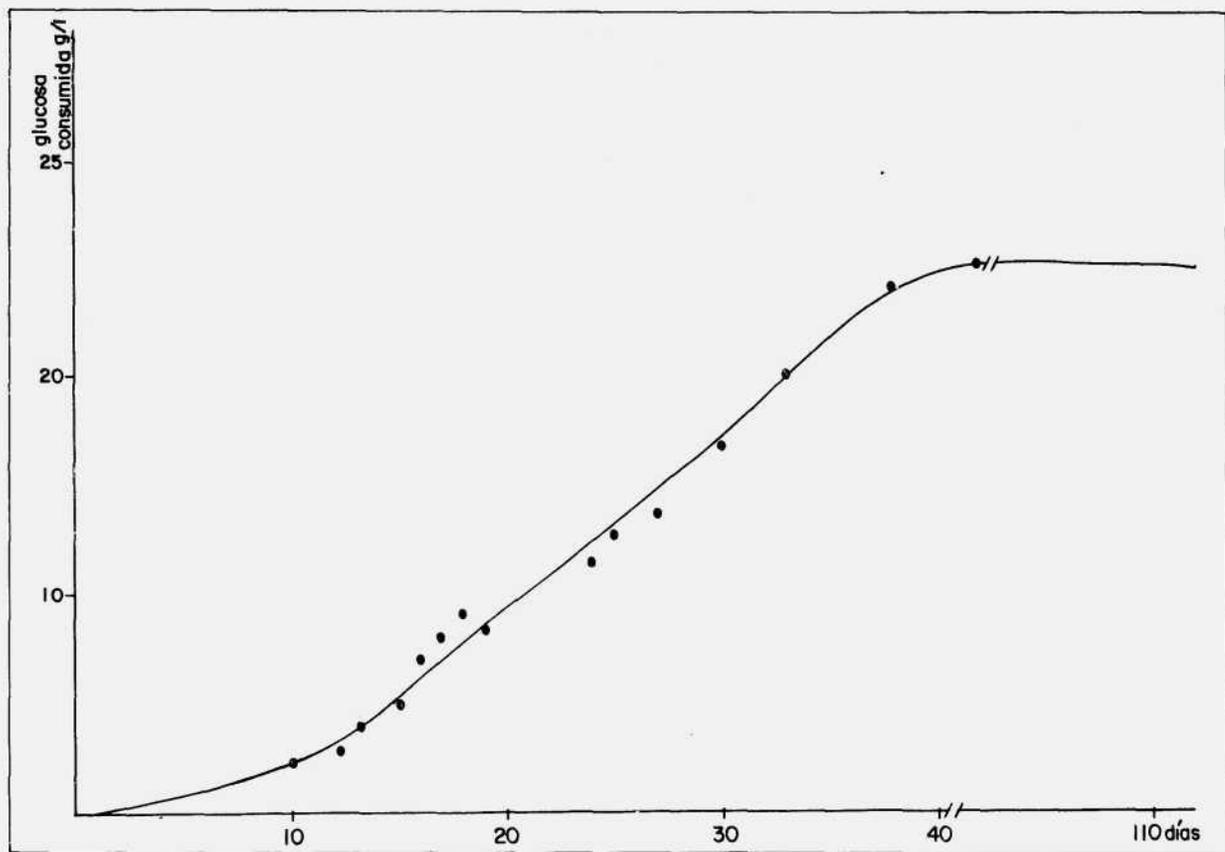


Fig. 2. Curva de crecimiento de la fase micelial de *Sporothrix schenckii* en relación al consumo de glucosa.

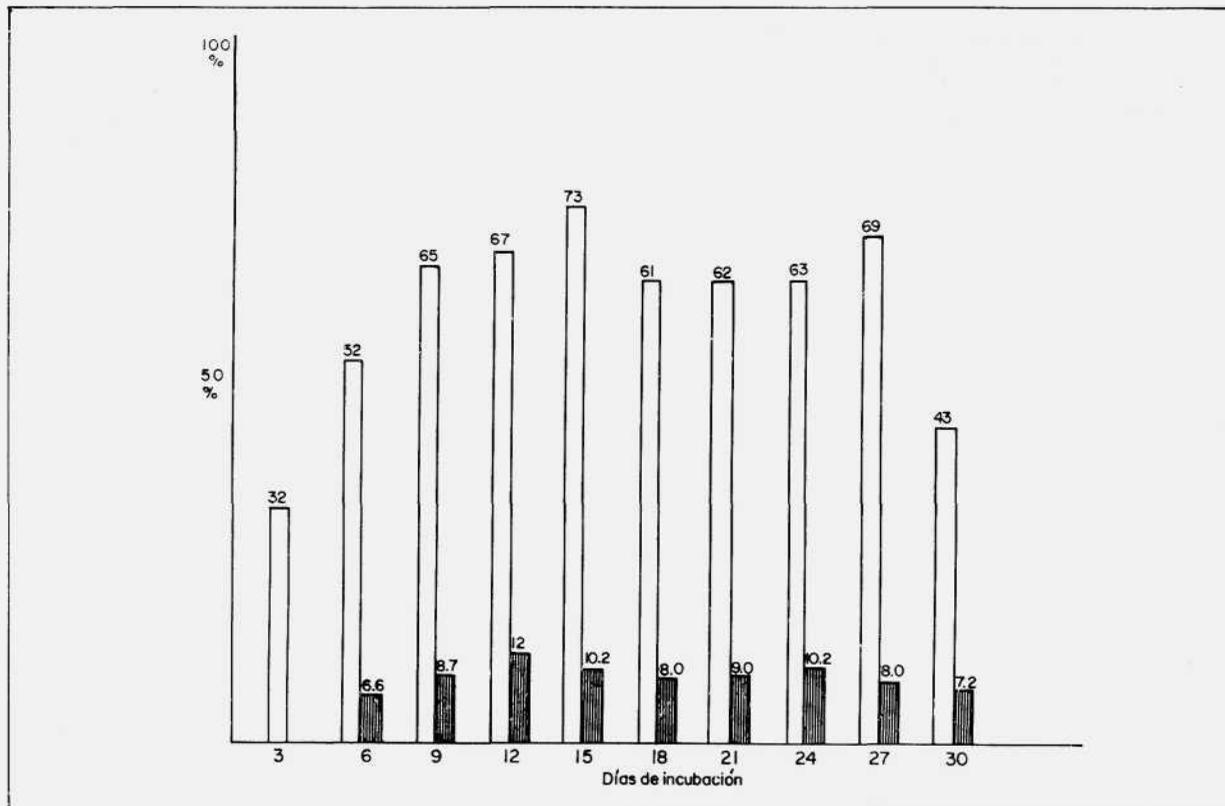


Fig. 3. Porcentaje de carbohidratos y proteínas en los antígenos derivados de la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii* a diferentes días de incubación (columnas blancas: carbohidratos; columnas rayadas: proteínas)

fase estacionaria (15 días). Los valores de proteínas fueron muy similares durante los 30 días. La fase micelial (Fig. 4) mostró una similitud en cuanto a porcentajes de proteínas y carbohidratos totales con la fase levaduriforme. En las tablas 1 y 2 se presenta la reactividad inmunológica de los antígenos levaduriformes y miceliales a diferentes tiempos de incubación o sea en diferentes fases de crecimiento en la prueba de ID, con sueros de pacientes con esporotricosis, histoplasmosis, aspergilosis y neumonías múltiples, además de un suero de persona sana. La concentración óptima antigénica para esta prueba fue de 2 mg/ml. Al probar sueros de pacientes con esporotricosis, se observó una mayor reactividad con los antígenos obtenidos del inicio de la fase estacionaria de crecimiento de ambas formas del hongo. Con respecto a reacciones cruzadas, se encontró que un suero histoplasmoso mostró reactividad con el antígeno de la forma micelial obtenido el día 21, que corresponde al inicio de la fase logarítmica.

En contraímmunoelectroforesis la concentración óptima antigénica fue de 1 mg/ml. La reactividad en CIE de los antígenos levaduriformes (Tabla 3) y miceliales (Tabla 4) fue similar a la prueba de ID. Los sueros de pacientes histoplasmosos y normales no presentaron reactividad cruzada en esta prueba.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A pesar del gran número de trabajos sobre antígenos de hongos realizados hasta la fecha, solo recientemente se ha logrado conocer la estructura química fina de algunos componentes antigénicos fúngicos, por ejemplo: las ramnomananas de *Sporothrix schenckii* (Travassos y Lloyd, 1980). Por lo tanto la estandarización de ellos se encuentra en sus etapas iniciales y se requiere todavía mucha investigación al respecto. Entre los factores que se investigaron en este trabajo, se encuentran los tiempos de incubación y morfología del hongo. Takata e Ishizaki (1983) investigaron el efecto que tiene el tiempo de incubación con respecto a la actividad y composición química de antígenos miceliales de *S. schenckii* y encontraron que el tiempo de incubación era una variante que alteraba la composición y actividad inmunológica. En las curvas de crecimiento obtenidas en este trabajo, se observa que ambas formas del hongo se comportan de manera similar y que los carbohidratos totales de los antígenos aumentan progresivamente a medida que transcurre la fase logarítmica, posiblemente debido a la liberación paulatina de los componentes de pared celular y solubilización de los mismos en el medio de cultivo (Toriello y Mariat, 1974). El comportamiento antes descrito mostró gran parecido con lo establecido previamente por Takata (1983). De acuerdo a nuestros resultados, las curvas de crecimiento muestran que los antígenos obtenidos tradicionalmente son extraídos de la fase estacionaria por lo que posiblemente se encuentren constituidos de componentes de pared celular, productos metabólicos secretados al medio de cultivo y componentes de autólisis del hongo (Mackenzie, 1983).

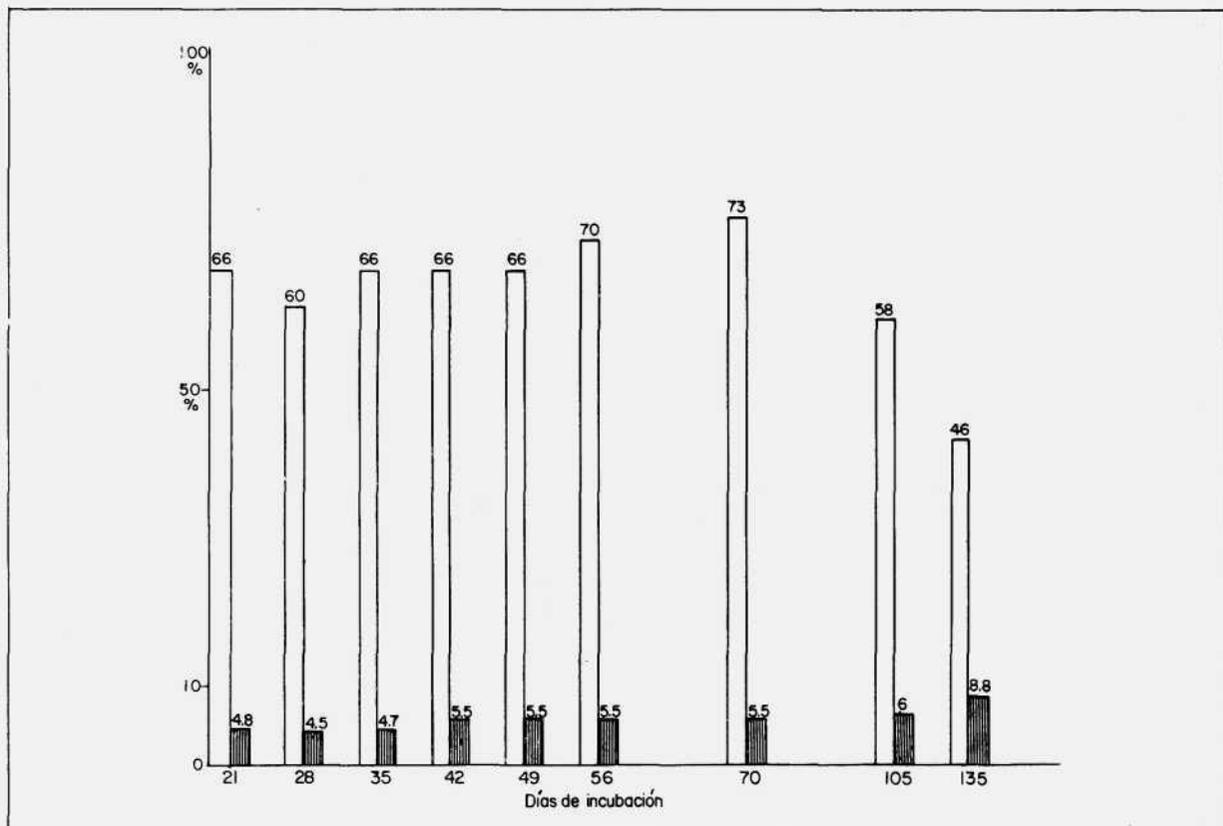


Fig. 4. Porcentaje de carbohidratos y proteínas en los antígenos derivados de la fase micelial de *Sporothrix schenckii* a diferentes días de incubación (carbohidratos: columnas blancas; proteínas: columnas rayadas).

TABLA 3. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DE ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS DE *Sporothrix schenckii* A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION.

SUEROS	ANTIGENOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
1	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa selección de su reactividad positiva en pruebas inmunes.

- 1-3 Suero de pacientes con esporotricosis
- 7 Suero de paciente con histoplasmosis
- 13 Suero de sujeto normal
- +
- ++ 1 banda
- ++ 2 bandas

TABLA 4. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DE ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS DE *Sporothrix schenckii* A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION.

SUEROS	ANTIGENOS MICELIALES OBTENIDOS A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION										
	21	28	35	42	49	56	63	70	77	105	150
1	+	+	+	++	+++	++	++	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se utilizaron sueros previa selección de su reactividad positiva en pruebas inmunes.

- 1-3 Sueros de pacientes con esporotricosis
 7 Suero de paciente con histoplasmosis
 13 Suero de sujeto normal
 + 1 banda
 ++ 2 bandas
 +++ 3 bandas

La síntesis de determinado polisacárido de la pared celular depende de la morfología celular de *S. schenckii* (Travassos y Lloyd, 1980), ya que en las levaduras y conidias se encuentran principalmente ramnomananas de cadenas laterales monoramnosil y en el micelio cadenas diramnosil. Por lo tanto, se podría pensar que la presencia de una u otra forma predominante originaría una mayor concentración de alguno de estos dos componentes. En la obtención de nuestros antígenos se observó que en la fase estacionaria de ambas formas del hongo, se encuentran mezclas morfológicas que pudieron ocasionar el aumento de reactividad dadas por ambas formas.

El caso de la reactividad cruzada que se observó con un suero de paciente histoplasmoso, con el antígeno obtenido del inicio de la fase logarítmica, podría ser originado por la síntesis de mananas que son producidas en las etapas iniciales de crecimiento de *S. schenckii* (Travassos y Lloyd, 1980) y que serían compartidas por *Histoplasma capsulatum*.

De acuerdo a los resultados, se sugiere que el momento adecuado para la obtención de los antígenos sería al final de la fase logarítmica de crecimiento, en donde se encuentra el mayor porcentaje de carbohidratos y se presenta la mayor cantidad de bandas de precipitación y no se encuentran reacciones cruzadas. Otra ventaja adicional sería que se evitarían las mezclas morfológicas que se presentan en la fase estacionaria.

Las condiciones para la elaboración de antígenos de *S. schenckii* utilizadas en éste estudio, podrían ser aplicada a otros hongos y servir como bases para un modelo de estandarización.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la gentileza del Q.F.B. Alejandro Bonifaz y Dr. Roberto Arenas por habernos proporcionado las cepas de *Sporothrix schenckii*, así como sueros de pacientes con esporotricosis.

LITERATURA CITADA

- Dawes, R.A., D.J. McGill y M. Widley, 1971. Determination of glucose, *In: Norris, J.R. and D.W. Ribbons (Eds.), Methods in Microbiology*, Vol. 6, Academic Press, Londres.
- Dubois, M., K. Giles, K. Hamilton, P.A. Reber y F. Smith, 1951. A colorimetric method for the determination of sugar. *Nature* 168: 167.
- Huppert, M., 1983. Antigens used for measuring immunological reactivity. *In: Howard, D.H. (ed.). Fungi pathogenic for human and animals*, Vol. 3 Marcel Dekker, Nueva York.
- Lowry, K.O., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

- Mackenzie, D.W., 1983. Serodiagnosis. In: Howard, D.H. (Ed.), *Fungi pathogenic for human and animals*, Vol. 3, Marcel Dekker, Nueva York.
- Ouchterlony, O., 1962. Diffusion in gel methods for immunologic analysis. *Prog. Allergy* 6: 30.
- Takata, M. y H. Ishizaki, 1983. Correlation among culture times, sugar composition and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. *Mycopathologia* 84: 31-39.
- Toriello, C. y F. Mariat, 1974. Etude comparée de polyosides des champignons *Ceratocystis stenoceras* et *Sporothrix schenckii*. Composition chimique et analyse immunologique. *Ann Microbiol. (Inst. Pasteur)* 125 A: 287-307.
- Travassos, L.R. y K.O. Lloyd, 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol. Rev.* 44: 683-721.