

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LEVADURAS DE
HISTOPLASMA CAPSULATUM

por Conchita Toriello*,
Teresa Mier*,
Elizabeth Ojeda*,
María del Rocío Reyes Montes*,
François Mariat** y
María Lucía Taylor*

ENZYMATIC ACTIVITIES FROM HISTOPLASMA CAPSULATUM YEASTS

SUMMARY

Enzymatic activities were determined in five strains of histoplasma capsulatum yeasts (EH46, EH50, EH51, EH52, EH53) by APIZYM microassay. From nineteen tested enzymes, alkaline phosphatase, esterase lipase C₈, acid phosphatase and phosphoamidase were found in all strains studied, while lipase C₁₄ and leucine arylamidase were present in only 4 strains. The last enzymes were absent in a high virulent strain of Histoplasma (EH53).

RESUMEN

Se determinaron actividades enzimáticas en 5 cepas de histoplasma capsulatum en fase levaduriforme (EH46, EH50, EH51, EH52, EH53) por el micrométodo del APIZYM. De las 19 enzimas probadas se encontraron actividades de fosfatasa alcalina, esterasa lipasa C₈, fosfatasa ácida y fosfoamidasa en todas las cepas estudiadas, mientras que la lipasa C₁₄ y la leucina arilamidasa, sólo se determinaron en 4 cepas. Estas últimas enzimas no aparecieron en la cepa EH53 de alta virulencia.

INTRODUCCION

El hongo dimórfico Histoplasma capsulatum Darling, agente etiológico de la micosis denominada histoplasmosis, se caracteriza por ser un parásito intracelular preferencial del sis

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

**Unité de Mycologie, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux,
Paris, Cedex 15, Francia.

tema fagocítico mononuclear. Dicha enfermedad se manifiesta en individuos susceptibles que presentan un estado desfavorable natural o circunstancial, que facilita la implantación del hongo. La relación macrófago/hongo juega un papel crucial en la definición del estado infeccioso. El destino del hongo en la estancia intramacrofágica en huéspedes aptos capaces de desarrollar una respuesta inmune celular eficiente, lleva a la eliminación del parásito con subsecuente limitación y curación del foco infeccioso. En ocasiones, la relación entre el binomio macrófago/hongo favorece a este último, dando como consecuencia la progresión del estado infeccioso hasta llegar a la enfermedad que puede cursar desde una forma leve, severa e incluso fatal. El mecanismo que define la sobrevivencia del hongo al ataque citocida de los macrófagos, no es claro. Entre sus explicaciones, se encuentra la que plantea la inhibición de la unión fagosoma-lisosoma en los fagocitos infectados con dosis altas del parásito (Taylor et al., 1988) y la de quienes demuestran que *H. capsulatum* inhibe el estadillo respiratorio en macrófagos peritoneales de ratones normales (Wolf et al., 1987). Los mecanismos de escape a la muerte intracelular, desarrollados por *Histoplasma*, empiezan a elucidarse, sin embargo, poco se conoce acerca de las enzimas del parásito que intervienen en el proceso fagocítico y que también pudieran participar en el mecanismo de daño al huésped. Considerando estos aspectos, en el presente trabajo se estudió el espectro enzimático del hongo a través del micrométodo del APIZYM, que ha sido empleado en la diferenciación bioquímica de otros hongos patógenos (Fromentin, 1982).

MATERIALES Y METODOS

HONGOS. Se utilizaron cinco cepas de *Histoplasma capsulatum*: EH46, EH50, EH51, EH52 y EH53, aisladas de casos humanos y mantenidas en el cepario del Departamento de Ecología Humana en agar micobiótico (Bioxón) a temperatura ambiente. La fase levaduriforme fue obtenida a 37°C en el medio de infusión cerebro corazón (Bioxón) adicionado de 1% de glucosa (Merck) y 0.1% de hidrócloruro de L-cisteína (Merck).

PREPARACION DE LEVADURAS DE HISTOPLASMA. Las levaduras crecidas en fase logarítmica en medio de infusión cerebro corazón, fueron cosechadas por centrifugación (800 g/10 min) y lavadas en solución balanceada de sales (SBS). Previa su utilización, se cultivaron por 24 hrs adicionales en medio sintético de Tewari y Kegel (1971) a 37°C y finalmente fueron ajustadas en SBS a una concentración de 5×10^6 lev/3 ml, para la determinación enzimática por el micrométodo APIZYM.

DETERMINACION ENZIMATICA. El APIZYM (API System, La Balme-les-Grottes, France) permite la detección simultánea de 19 actividades enzimáticas diferentes. Este método utiliza 19 pozos en tiras preparadas con los sustratos apropiados para cada enzima: 2-naftil-fosfato para fosfatasa alcalina; 2-naftil-butirato para esterasa-C₄; 2-naftil-caprilato para esterasa lipasa-C₈; 2 naftil-miristato para lipasa-C₁₄; L-leucil-2-naftilamida para leucina arilamidasas; L-valil-2-naftilamida para valina arilamidasas; L-cistil-2-naftilamida para cistina-arilamidasas; N-benzoil-DL-arginina 2-naftilamida para tripsina; N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida para α -quimiotripsina; 2-naftil fosfato para fosfatasa ácida; naftol AS-B1 fosfodiamida para fosfoamidasa; 6-Br-2naftil- α -D-galactopiranosido para α -galactosidasa; 2-naftil- β -D-galactopiranosido para β -galactosidasa; naftol AS-B1- β -D-glucuronato para β -glucuronidasa; 2-naftil- α -D-glucopiranosido para α -glucosidasa; 6-Br-2-naftil- β -D-glucopiranosido para β -glucosidasa; 1-naftil-N-acetil- β -D-glucosamina para N-acetil- β -glucosaminidasa; 6-Br-2-naftil- α -D-manopiranosido para α -manosidasa; 2-naftil- α -L-fucopiranosido para α -fucosidasa.

Las pruebas se realizaron por duplicado y al mismo tiempo se procesaron controles sin sustrato. Se agregó 65 μ l de cada suspensión de levaduras preparadas (5×10^6 lev/3 ml SBS) a los pozos de cada tira y se incubó a 37°C durante 4 horas. Después, se añadió a cada pozo 37 μ l del reactivo ZYM A (TRIS 250 g, HCL 37% 110 ml, Laurilsulfato 100 g, agua destilada cbp 1000 ml) y 37 μ l del reactivo ZYM B (Fast Blue BB 3.5 g, 2-metoxi-etanol cbp 1000 ml). Se llevó a cabo la reacción, se observó el resultado por medio de la aparición de color (5 min) y se procedió a la lectura. Esta se realizó de acuerdo a la escala de colores del sistema APIZYM.

RESULTADOS Y DISCUSION

La determinación enzimática en las 5 cepas de *H. capsulatum* mostró la presencia de fosfatasa alcalina, esterasa lipasa-C₈, fosfatasa ácida y fosfoamidasa en todas ellas (Tabla 1). La lipasa-C₁₄ y la leucina arilamidasas fueron determinadas sólo en 4 cepas EH46, EH50, EH51 y EH52 ya que no aparecieron en la cepa EH53 que corresponde a la cepa más virulenta de *Histoplasma*, la cual fue aislada de una histoplasmosis fulminante. Otras dos enzimas, la β -glucosidasa y la N-acetil- β -glucosaminidasa se observaron solamente en 3 cepas, EH46, EH50 y EH52, respectivamente (Tabla 1).

Entre los escasos trabajos donde se relacionan enzimas y patogenicidad en *H. capsulatum*, se encuentra el de Watson y Lee (1978), quienes aislaron dos aminopeptidasas citoplásmi-

TABLA 1

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN CELULAS LEVADURIFORMES DE
DIFERENTES CEPAS DE HISTOPLASMA CAPSULATUM

ENZIMAS	CEPAS DE <u>H. capsulatum</u>				
	EH 46	EH 50	EH 51	EH 52	EH 53
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+
Esterasa-C4	-	-	-	-	-
Esterasa lipasa-C8	+	+	+	+	+
Lipasa-C14	+	+	+	+	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	-
Valina arilamidasa	-	-	-	-	-
Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-
α -quimiotripsina	-	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	+	+
Fosfoamidasa	+	+	+	+	+
α -galactosidasa	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	-	-	-	-	-
β -glucuronidasa	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	-	-	-	-	-
β -glucosidasa	+	+	-	+	-
N-acetil- β -glucosaminidasa	+	+	-	+	-
α -manosidasa	-	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó por el sistema APIZYM.

+ indica color característico de la reacción enzima/sustrato.

- ausencia de reacción.

cas del hongo, las cuales pudieran actuar sobre el huésped causando destrucción tisular, después de la lisis o degradación de la célula fúngica. Howard (1975, 1981) estableció una relación entre virulencia y presencia de catalasa, sin embargo, debido a los contradictorios niveles de catalasa encontrados en cepas de *Histoplasma* con diferentes grados de virulencia (Howard y Dabrowa, 1982), este parámetro no se considera útil para definir su patogenicidad. En los resultados con el método APIZYM no se pudo comprobar la presencia de catalasa y aminopeptidasas, ya que los sustratos respectivos para estas enzimas no estaban contenidos en las tiras del sistema utilizado.

Debido a la importancia de la fagocitosis en la histoplasmosis, se realizó un ensayo preliminar para determinar las mismas actividades enzimáticas descritas en materiales y métodos. Este ensayo se llevó a cabo en levaduras recuperadas después de la fagocitosis en macrófagos peritoneales de ratón (datos no presentados). Los resultados mostraron que la β -galactosidasa y la β -glucuronidasa, que no aparecieron en las levaduras solas previo a la fagocitosis, fueron evidentes en levaduras recuperadas de macrófagos y mantenidas por 24 hrs adicionales en medio de Tewari y Kegel (1971). Dicha observación sugiere que estas enzimas pudieran ser inducidas en el hongo durante la estancia intramacrofágica, o bien, son de origen macrofágico y aparecen como remanentes recuperadas después de la fagocitosis, aunque esto último parece poco probable, pues la prueba enzimática se realizó con levaduras mantenidas en cultivo por 24 hrs adicionales.

Hasta la fecha no existen estudios relacionados a la descripción del espectro enzimático de *H. capsulatum* en sus dos formas morfológicas, aunque se han investigado aisladamente algunas enzimas importantes en su metabolismo y en particular aquellas asociadas al dimorfismo de este hongo, como son la cistina reductasa (Maresca et al., 1978) y la sulfito reductasa (Bogulawski et al., 1976). Sin embargo, la obtención de datos sobre las enzimas presentes en *Histoplasma*, particularmente las de la fase parasitaria y en especial las que se manifiestan en la interacción macrófago/hongo, abriría la posibilidad de investigar nuevos caminos en los estudios de la relación huésped/parásito en la histoplasmosis.

LITERATURA CITADA

- Bogulawski, G., J.M. Akagi y L.G. Ward, 1976. Possible role for cysteine biosynthesis in conversion from mycelial to yeast form in *Histoplasma capsulatum*. *Nature* 261: 336-338.

- Fromentin, H., 1982. Enzymatic characterization with the APIZYM system of Entomophthorales potentially pathogenic to man. Curr. Microbiol. 7: 315-318.
- Howard, D.H., 1975. The role of phagocytic mechanisms defense against Histoplasma capsulatum. In: Mycosis Scientific Publication 304, Pan American Health Organization, Washington, D.C.
- Howard, D.H., 1981. Comparative sensitivity of Histoplasma capsulatum conidiospores and blastospores to oxidative antifungal systems. Infect. Immun. 32: 381-387.
- Howard, D.H. y N. Dabrowa, 1982. Antifungal systems derived from phagocytic cells. In: Baxter, M., Human and Animal Mycology, Proceedings of the 8th Congress of ISHAM, Massey University, Palmerston North (Nueva Zelandia).
- Maresca, B., E. Jacobson, G. Medoff y G. Kobayashi, 1978. Cystine reductase in the dimorphic fungus Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol. 135: 987-992.
- Taylor, M.L., M.E. Espinosa-Schoelly, R. Iturbe, B. Rico, J. Casasola y F. Goodsaid, 1988. Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with Histoplasma capsulatum. Clin. Exp. Immunol. (en prensa).
- Tewari, R.P. y H. Kegel, 1971. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for Histoplasma capsulatum. Mycopathol. Mycol. Appl. 44: 231-240.
- Watson, R.R. y K.L. Lee, 1978. Isolation of aminopeptidases from Histoplasma capsulatum. Sabouraudia 16: 69-78.
- Wolf, J.E., V. Rerchberger, G.S. Kobayashi y J. Russell Little, 1987. Modulation of the macrophage oxidative burst by Histoplasma capsulatum. J. Immunol. 138: 582-586.