

UN NUEVO ENFOQUE EN EL ESTUDIO DE LA ESPOROTRICOSIS: MUTANTES DE *Sporothrix schenckii*

Myrna Sabanero*; Guillermina Galindo*; Gloria Barbosa-Sabanero*
Gloria Sabanero**
Haydee Torres- Guerrero***

RESUMEN

Una cepa silvestre y cepas mutantes de *Sporothrix schenckii*, se han estudiado como un modelo experimental de los procesos de diferenciación y desarrollo que se presentan al ser invadidas las células huésped y causar la esporotricosis. Las cepas mutantes de *S. schenckii* fueron obtenidas por exposición a la luz ultravioleta y Nitrosoguanidina. Las mutantes morfológicas M-III y M-V fueron seleccionadas. Estas mutantes muestran una alteración colonial y un mayor desarrollo que las cepas silvestres. Además, las mutantes presentan mayor adhesión al sustrato. El análisis de componentes de la pared celular y la distribución de núcleos, indican que no existen diferencias significativas que implique un daño por la mutación. Los resultados indican que en las mutantes morfológicas existe una alteración en el patrón de crecimiento y su regulación. Son necesarios, estudios bioquímicos e inmunológicos, relacionados con la virulencia *S. schenckii* que puedan ser útiles en el diagnóstico y en un futuro contribuyan a medidas preventivas para la esporotricosis.

ABSTRACT

A wild-type strain and mutant strain of *Sporothrix schenckii* were studied as an experimental model in the process of differentiation and development which occurs when the host cell is invaded causing sporotrichosis. The mutant strains of *S. schenckii* were obtained by exposure to ultraviolet light and Nitrosoguanidine. The morphological mutants M-III and M-V were selected. These mutants showed a colonial alteration and a higher growth rate than the wild-type strains. Moreover, the mutants showed greater adhesion to the substratum. An analysis of the components of the cell wall and the distribution of nuclei indicate that significant differences do not exist which involve damage by mutation. The results suggest that in morphological mutants there is an alteration of growth and its regulation in the host cell. Biochemical and immunological studies related to the virulence of *S. schenckii* are needed for diagnosis and in the future to help prevent sporotrichosis.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, Mutantes, Esporotricosis.

Key words: *Sporothrix schenckii*, Mutants, Sporotrichosis.

ANTECEDENTES

S*porothrix schenckii* es un hongo saprófito, que se aísla con frecuencia del suelo, de la madera y plantas espinosas. El hongo produce la esporotricosis: micosis subcutánea o profunda generalmente crónica que es

de distribución mundial (Carrada-Bravo 1995., Vismar et al 1997).

S. schenckii vive en el suelo, detritus vegetal, madera, hojas, ramas, pajas y zacate que sirve para envolver la loza. El hongo también puede encontrarse en algunos animales que ac-

* Instituto de Investigación en Biología Experimental de la Facultad de Química. Universidad de Guanajuato. Apartado Postal 187, Guanajuato Gto.

*** Depto. de Parasitología y Microbiología. Facultad de Medicina. UNAM. Coyoacán 04510 México DF.

Recibido: 8 de Septiembre de 1999

Aceptado: 26 de Mayo de 2000

** Facultad de Química. Universidad de Guanajuato.

túan como vectores indirectos o pasivos v. gr. los insectos, los roedores, etc. (Werner y Werner 1994; Sabanero *et al.*, 1993).

La esporotricosis es una micosis de la que el hombre es el huésped accidental. Se manifiesta en campesinos, amas de casa, niños de edad escolar, cultivadores, mineros, pescadores, empacadores de vidrio y loza entre otros. El mecanismo de infección es traumatismo y escoriación con material contaminado; aunque en los individuos que viven en zonas endémicas, el hongo puede penetrar por vía respiratoria y presentar casos pulmonares primarios (Cameron *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 1986).

La esporotricosis puede presentarse a cualquier edad aunque, según Carrada - Bravo (1995), el 30% de los casos son en niños y adolescentes en edad escolar (5-15 años) y un 50% en adultos jóvenes (20-35 años). La diseminación de la esporotricosis es rara, se ve más frecuentemente en pacientes inmunosuprimidos tales como los alcohólicos o los enfermos de SIDA (Shaw *et al.*, 1989).

La forma más común de infección se caracteriza por la aparición de un nódulo o úlcera en el punto de la inoculación y de abscesos que siguen las vías de drenaje de los linfáticos superficiales. La esporotricosis se inicia cuando el hongo penetra la piel a través de un traumatismo y ocasionalmente por inhalación repetida en el caso de una infección pulmonar primaria.

El hongo, *Sporothrix schenckii* crece a una temperatura óptima entre 27-32°C y una humedad relativa a 90%. Por no elaborar sus propios nutrientes requiere de una fuente de CO₂, H₂O, sales de nitrógeno y carbohidratos sobre todo glucosa, sacarosa y maltosa además de los iones inorgánicos más comunes.

En los cultivos in vitro de las cepa silvestre, la forma micelial se obtiene en medio Sabouraud y Micosel agar a 28°C, las colonias se desarrollan de 3 a 5 días presentándose un color blanco o crema con aspecto membranoso y radiadas, posteriormente se desarrolla micelio aéreo y se vuelve color oscuro o negro con consistencia de

cuero (Belknap, 1989). Microscópicamente las hifas de *S. Schenckii* tienen la forma filamentosa, habitualmente son ramificadas y tabicadas, producen delicados conidióforos que se originan en ángulo recto a partir de las hifas.

En los países del tercer mundo la epidemiología de las micosis, refleja la importancia de conocer los procesos de diferenciación de los hongos patógenos. En este sentido, es de interés el estudio de un modelo celular, tal como las cepas mutantes que permitan analizar la interrelación de las características morfológicas y bioquímicas, con la capacidad del hongo para producir daño al hospedero. Así, *Sporothrix schenckii* al ser expuesto a agentes mutagénicos puede expresar alteraciones a nivel molecular, bioquímico y estructural. Y posiblemente presente cambios en la virulencia del microorganismo, que pueden reflejarse en alteraciones del crecimiento de la cepa mutante.

En este trabajo, se estudiaron las características de cepas mutantes de *Sporothrix schenckii* en función de los cambios que sufren durante su diferenciación. A largo plazo el estudio permitirá avanzar en la búsqueda de las características bioquímicas e inmunológicas relacionadas con la virulencia de los hongos patógenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo: La cepa silvestre de *Sporothrix schenckii* (EH-36) se aisló de pacientes con esporotricosis. El hongo se adquirió del cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. El hongo fue cultivado en medio sólido de Sabouraud con 5 µg/ml de Nitrosoguanidina después de 3 días fueron expuestas a 90 ergs/cm² de luz ultravioleta. Las colonias resultantes se aislaron y clasificaron numéricamente como cepas M-I, M-II, M-III, M-IV y M-V.

Medios de Cultivo: Medio YPG Líquido: Este medio está constituido de 2% de extracto de levadura, 1% de peptona, 2% de glucosa.

Cuando se utilizó medio sólido se adicionó 2% de agar, (Bartnicki-García *et al.*, 1962). Medio de Sabouraud (Bioxon): Este medio está constituido por 40% de dextrosa, 10% de peptona y 15% de agar.

Propagación de las cepas mutadas de *S. schenckii*: Los cultivos se efectuaron tomando un inóculo de cada una de las mutantes. La propagación se efectúa tanto en medios sólido y líquido de YPG incubando a 27-32 °C durante 2 a 5 días en medio con agar, y 3 a 5 días en medio líquido.

Se efectuaron observaciones frecuentes para tener datos acerca del crecimiento colonial y del desarrollo micelial.

Curva de Crecimiento: Se realizó en matraces Erlenmeyer de 1 litro, conteniendo 300 ml de medio YPG. La inoculación se efectuó tomando alícuotas de 10 ml de los cultivos de 5 días. Se tomó la densidad óptica (550 nm) en un espectrofotómetro Beckman Du-650 y se observó la fase de crecimiento logarítmico en todas las cepas analizadas, en un lapso de tiempo entre 0 y 95 horas.

Fluorocromos Específicos para el estudio de la pared y el Núcleo de las Células: Las células se fijaron en formaldehído al 3.7% en solución salina de fosfatos (PBS) durante 15

minutos. Después se tiñeron los núcleos y la pared. Las células fueron incubadas con una solución que contenía 10 µg/ml de DAPI= 4', 6- diamidino-2 phenylindol ó 0.01 % de calcofluor white, (Sigma, Chemical, St. Louis Mo). Después de 5-10 minutos de incubación las células se montaron en medio PBS-Glicerol "Vectashield" (Vector Lab. Inc. Burlingame, CA.). Las preparaciones se observaron en microscopio de epifluorescencia con filtro UV (400-420 nm) y V(430-450 nm). Las fotografías se tomaron en película Kodak Tri X pan, 400 ASA.

RESULTADOS

CULTIVOS *IN VITRO* DE MUTANTES DEL HONGO *Sporothrix schenckii*.

Se aislaron cinco cepas mutantes que tenían características morfológicas diferentes, las mutantes se clasificaron numéricamente como M-I, M-II, M-III, M-IV y M-V.

Inicialmente se analizaron las cinco cepas mutantes. Sin embargo, las mutantes M II y IV crecieron lentamente y se perdieron. Las cepas mutantes M-I, III y V presentan características morfológicas muy diferentes como se muestra en la figura 1. De estas cepas la M-III y la M-V, presentan un crecimiento más rápido que la

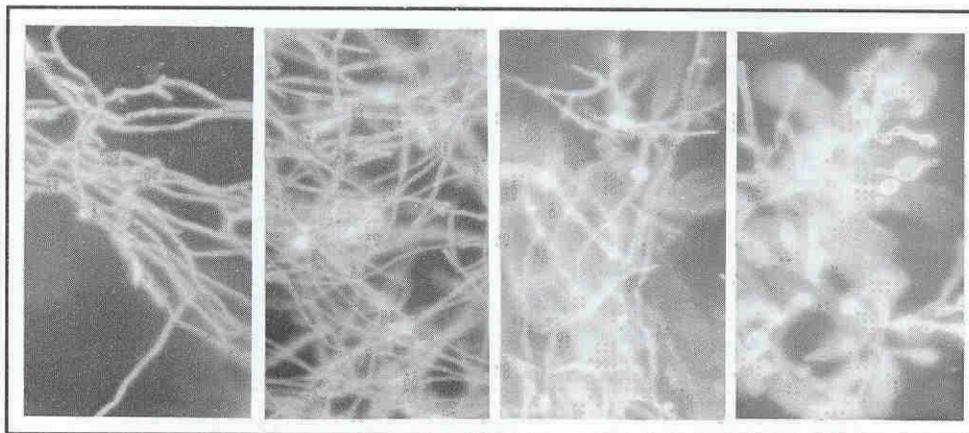


Figura 1. Características Fenotípicas de las Cepas Silvestre y Mutantes
(A) Cepa Silvestre, (B, C y D) cepas mutantes I, III y V.

cepa silvestre y fueron seleccionadas para efectuar este trabajo.

Los resultados obtenidos al sembrar los microorganismos en los medios seleccionados, se muestran en la tabla 1. Operacionalmente, se tomó como referencia del 100% a la cepa que tuvo el mayor crecimiento, esta fue la M-V.

Tabla 1. Cultivos de *S. schenkii* en diferentes medios.

CEPA	MEDIO SABOURAUD	MEDIO YPG
Silvestre	90 %	90 %
Cepa I	10 %	10 %
Cepa III	60 %	60 %
Cepa V	100 %	100 %

Los datos muestran que no existe una diferencia en el crecimiento que sea dependiente del medio en que se cultive. Por lo cual, los experimentos posteriores se efectuaron en el medio YPG.

MORFOLOGÍA COLONIAL DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES

Se analizaron las características de cada una de las cepas mutantes tomando como referencia a la cepa silvestre. Los resultados se muestran en la tabla 2, y los fenotipos del crecimiento colonial se muestran en la figura 2.

Tabla 2. Características del Cultivo de *S. schenkii*.

CEPA	CRECIMIENTO COLONIAL	OBSERVACIÓN
Silvestre	Radial, pequeñas colonias	Aspecto liso y algodonoso
Cepa I	Radial, colonias pequeñas	Pigmento naranja
Cepa III	Radial	Color hueso, aspecto granuloso, superposición de colonias, gran adhesión al medio
Cepa V	Colonias grandes	Aspecto granuloso, color blanco al inicio y pigmentado después, gran adhesión al medio

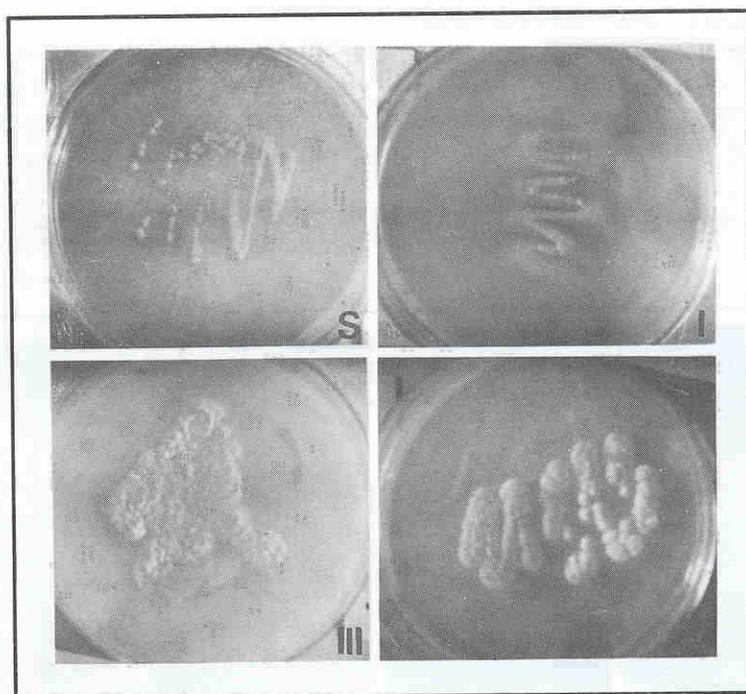


Figura 2. Características Morfológicas del Desarrollo Colonial de las Mutantes de *S.schenkii*. Se muestran los cultivos de *S.schenkii* desarrollados durante cinco días en medio YPG-agar. Se muestra la cepa silvestre y las mutantes I, III y V.

CURVAS DE CRECIMIENTO

La figura 3 muestra las curvas de crecimiento de las mutantes y de la cepa silvestre, cultivadas en medio líquido a diferentes tiempos.

Los cultivos presentan una fase de crecimiento progresivo en las cepas analizadas. La gráfica 1 muestra la curva de crecimiento que se inicia al adicionar el inóculo a tiempo cero y se observa el crecimiento hasta las 95 horas. Es evidente que la mutante M-V presenta mayor crecimiento que M-III y la cepa silvestre.

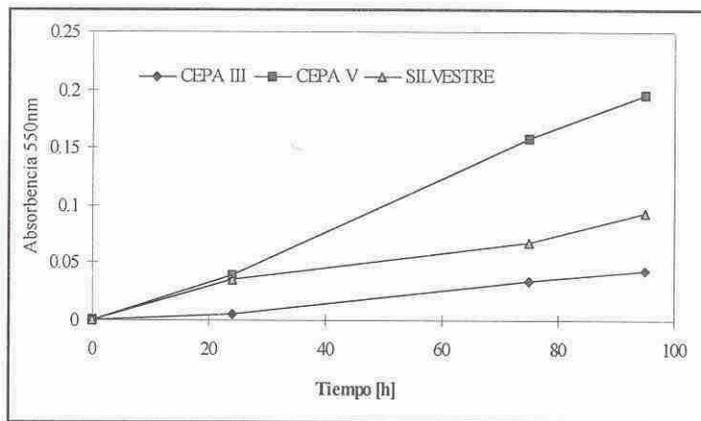


Figura 3. Curva de Crecimiento de *S. Schenckii*. Las lecturas representan el desarrollo del cultivo al tiempo indicados. Cada punto es la media de tres experimentos. Note el mayor crecimiento de la cepa V con respecto a la cepa silvestre.

LA PARED CELULAR Y DISTRIBUCION DE NÚCLEOS

La distribución de los núcleos en las cepas mutantes y silvestre se muestra en la figura 4. Se observan núcleos a lo largo de las hifas como puntos fluorescentes y las microconidias presentan una gran fluorescencia por el acumulo de núcleos dentro de ellas. Sin embargo, la distribución nuclear en las cepas mutantes es muy similar a la que muestra la cepa silvestre.

Por otra parte la tinción con calcofluor, en la figura 5 muestra que la estructura de la pared celular de *S. schenckii* en la cepa silvestre es muy similar a la estructura de las cepas mutantes. Aunque en las paredes celulares de la cepa silvestre la fluorescencia es más intensa que en la mutante M-III y es similar a la de M-V.

DISCUSIÓN

Los objetivos de esta investigación a largo plazo, se fundamentan en relacionar cambios bioquímicos y morfológicos de *Sporothrix schenckii* con el grado de patogenicidad del hongo. Para ello utilizamos mutantes morfológicas de *S. schenckii* obtenidas al exponer el hon-

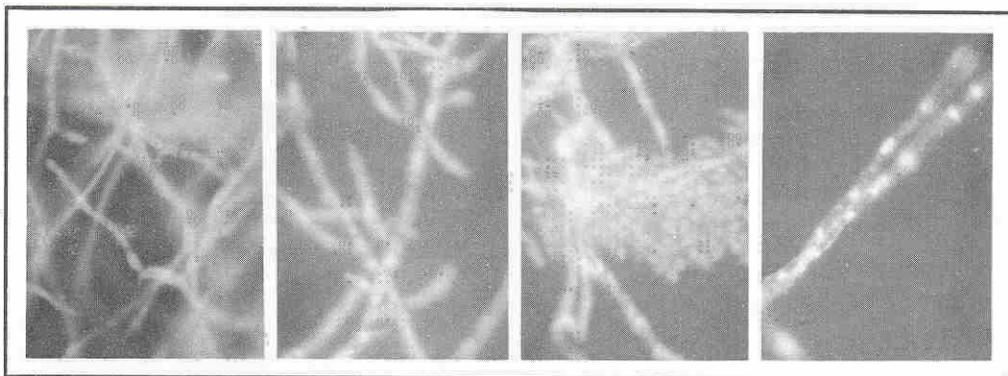


Figura 4. Distribución de Núcleos en *S. schenckii*.

Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se muestra los núcleos de: (A) la cepa Silvestre, (B y C) cepa M-III y M-V. Note la distribución de núcleos que es similar en las tres cepas. En (D) un detalle de los núcleos a lo largo de las hifas de la cepa M-V. A, B y C X 250, D X 450.

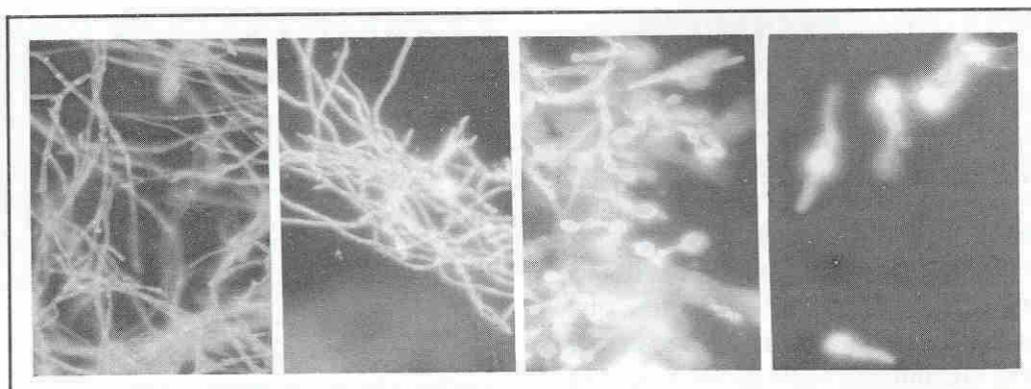


Figura 5. Distribución de calcofluor en la pared celular en *S. schenckii*.

Se muestra en: (A) la cepa silvestre y (B y C) las mutantes III y V. Note la fluorescencia mas intensa en la pared de la cepa silvestre. En (D) germinulas de las cepas silvestre con intensa fluorescencia.

go a mutágenos químicos como la Nitrosoguanidina y físicos como la luz UV. Un esquema similar de mutación se ha utilizado en *Candida albicans* para estudiar el proceso de dimorfismo, (Gow, 1997. Morrow *et al.*, 1989). En este trabajo se obtuvieron cinco cepas mutantes de *Sporothrix schenckii*. Operacionalmente, las cepas obtenidas fueron denominadas M-I, M-II, M-III, M-IV y M-V.

Normalmente, *Sporothrix schenckii* crece a una temperatura de 27 a 32 °C, requiere CO₂, H₂O, sales de nitrógeno y carbohidratos como glucosa y maltosa, para su desarrollo en forma de micelio. En anaerobiosis se desarrolla como levadura. El medio Sabouraud cumple con estos requisitos para el crecimiento de *S. schenckii* pero es un medio costoso. Nosotros ensayamos en medio YPG, rico en glucosa, peptona y extracto de levadura y el hongo es capaz de crecer como lo demuestra la similitud de los porcentajes de crecimiento.

En *Cryptococcus neoformans* se atribuye la patogenicidad a cepas pigmentadas por la melanina que producen, Torres y Edman (1994) utilizaron mutantes albinas para comprobar lo antes mencionado. En este sentido, las mutantes de *S. schenckii* no muestran cambio en su coloración pero sí tienen alteraciones en sus características coloniales y morfológicas.

Se observó que existe una diferencia fenotípica notable de cada una de las cepas

mutantes M-III y M-V, esta última crece más rápido que la silvestre y morfológicamente, muestra cambios fenotípicos característicos. Rustchenko *et al* (1990) sugieren que la alta frecuencia de mutantes morfológicas podría estar dada por pérdida o rearrreglos cromosomales, este comportamiento daría al hongo una variación genética. Es posible que en *S. schenckii* se presente un fenómeno similar, sin embargo, es necesario hacer otro tipo de experimentos para fundamentar el comportamiento genético.

Estudios previos en *Candida albicans*, muestran alteraciones en su adhesión y virulencia (Watts, 1998), en el caso de las mutantes de *S. schenckii*, la cepa M-V muestra mayor adhesión que la cepa M-III, pero ignoramos si existe correlación entre adhesión y virulencia. Los próximos estudios serán encaminados a probar este hecho.

Al exponer un organismo a mutágenos existen variaciones en su genotipo como ha sido demostrado en diferentes microorganismos, estos cambios se pueden reflejar a nivel bioquímico y estructural. En *Candida albicans* (Morrow *et al.*, 1989; Gow, 1997), al utilizar dosis bajas de UV y buscar mutantes auxótrofas no observaron la diversidad esperada, pero mostró una alta frecuencia de variación fenotípica. En nuestro estudio, tenemos dos mutantes morfológicas que reflejan la variación fenotípica de *S. schenckii*.

En las mutantes de *S. schenckii*, exploramos la posibilidad de que se presentaran cambios a nivel de la distribución de núcleos y en los constituyentes de la pared celular. En estos experimentos utilizamos fluorocromos como el DAPI, que se une a las bases pirimidínicas, específicamente a la timina para visualizar los núcleos, y el Calcofluor white que se une a la N-acetil glucosamina componente principal de la pared celular (Gooday *et al.*, 1995). Los resultados indican que ninguna de las mutantes presenta diferencias en la distribución de núcleos o en el decorado de la pared celular, sugiriendo que la mutación no se presenta a este nivel. Otra alternativa es que con esta metodología no se detectan los cambios que pudieran existir a nivel ultraestructural. Esto es muy probable, puesto que mutantes obtenidas de diversos hongos presentan alteraciones en la migración nuclear y en la constitución de la pared celular, (Sengbusch *et al.*, 1983). Así, es necesario efectuar otros estudios comparativos, a nivel bioquímico e inmunológico que puedan contribuir en el futuro a medidas preventivas de las micosis.

CONCLUSIONES

Se presentan mutantes morfológicas del hongo patógeno *Sporothrix schenckii* como un modelo biológico con alteraciones en el procesamiento de la señal que induce el cambio de patrón de crecimiento, su regulación y posiblemente entre el proceso morfogenético y la virulencia de *S. schenckii*.

REFERENCIAS

- Barnicki-García S. and Nickerson W. (1962). Nutrition growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal of Bacteriology*. 84 :841-858.
- Belknap, B. S. (1982). Sporotrichosis. *Dermatology Clinical*. 7:193-202
- Cameron R. C, Mueller U. G. and Mallorch D. (1999). The agricultural Pathology of ant fungus gardens. *Proceedings National Academic Science USA* 96: 7998-8002.
- Carrada-Bravo T. (1995). Update on Sporotrichosis. *Austin. Family Physician*. 24:1070-74.
- Gooday, G. W. and Schofield D. A. (1995) Regulation of chitin synthesis during growth of fungal hyphae: The Possible Participation of membrane stress. *Canadian Journal of Botany* 73: S114-121.
- Gow. N. A. (1997). Germen Tube growth of *Candida Albicans*. *Current Topic Medical Mycology* 8:43-55.
- Itoh M, Okamoto S, Kariya H. (1986). Survey of 200 cases of sporotrichosis, *Dermatologica*. 172:209-13.
- Morrow B.; Anderson J.; Wilson J.; and Soll R. (1989). Biodireccional stimulation of the white-opaque transition of *Candida albicans* by ultraviolet irradiation. *Journal Genetic Microbiology* 135:1201-08.
- Rustchenko Bulgac E. P, Sherman F. Hicks J. B. (1990). Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants Provide a means for genetic variation of *candida albicans*. *Journal Bacteriology* 172: 1276-1283.
- Randhawa H. S. Budimulga V. Bazaz-Malik G., (1994). Recent development in the diagnosis and treatment of subcutaneous mycoses. *Journal Medical Veterinary Mycology*. 32:299-307.
- Sabanero M.; Tapia Noriega C.; Rivera Garay; Trejo Basurto R.; Sabanero G. (1993). *Sporothrix schenckii*: Cultivos en diferentes suelos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 35:191-94.
- Sengbusch P. V., Hechler J., Muller U. (1983). Molecular Architecture of fungal Cell Wall. An Approach By Use of Fluorecent Markers. *European. Journal of Cell Biology* 30:305-311.
- Shaw J. C., Levinson W., Montanaro A. (1989). Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Journal American Academic Dermatology* 21:1145-1147.
- Torres Guerrero H. and Edman J. C. (1994). Melanin-Deficient mutants of *Criptococcus Neoformans*. *Journal Medical Veterinary Mycology*, 32:303-13
- Vismar HF and Hull P. R. (1997). Prevalence epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng South Africa, *Mycopathologia* 137:137-43.
- Watts H. J. (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiology Letters* 159:129-35.
- Werner A. H, and Werner B. E. (1994). Sporotrichosis in man animal *International Journal Dermatology* 33:692-700.