

Sporotrix schenckii: Morfología y composición

por

Carlos Garrocho S.* Héctor Vázquez León* y Eva Pardo Arredondo*

(Recibido para su publicación el 21 de diciembre de 1973)

ABSTRACT: Lyophilized samples of the yeast form of *Sporotrix schenckii* are apparently richer in proteins, DNA and RNA than those of the mycelial form. This is probably related to the structural difference in the chemical disposition of the two phases.

Entre las micosis inicialmente tegumentarias, la esporotricosis es con seguridad la que con más frecuencia se observa en México. Una de las características más importantes del hongo causal es su dimorfismo, que se expresa por diferentes tipos de desarrollo según se cultive a 37 C o a temperatura ambiente (20-23 C).

El hongo aparece en forma de levadura en los tejidos animales. En el laboratorio crece a 37 C también en forma de levadura; pero a 22 C da lugar a la llamada "fase saprofítica", que es típicamente micelial, con microconidias piriformes dispuestas lateralmente a lo largo de las hifas, o pequeñas "rosetas" en los extremos de conidióforos cortos.

La diferente morfología que presentan ambas fases del crecimiento sugiere la posibilidad de una composición química distinta. Se ha emprendido el presente estudio con el propósito de someter a juicio experimental esta idea.

MATERIAL Y METODOS

Se usó una cepa de *Sporotrix schenckii* aislada de un caso de esporotricosis humana.

LIOFILIZACIÓN (4): Se hizo inoculaciones en caldo nutritivo en dos matraces, dejando uno a temperatura ambiente (micelial) y el otro a 37 C (levaduriforme). Al cabo de 10 días se hizo resiembras en 12 cajas de Colle

* Departamentos de Microbiología y Farmacología, Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Venustiano Carranza No. 2405, San Luis Potosí, S.L.P., México.

con medio de Sabouraud, incubándose la mitad a temperatura ambiente y la otra mitad a 37 C. Luego que aparecieron las colonias (3-5 días más tarde) se lavó el crecimiento con formalina al 3 % en solución salina en dos matraces (uno para cada forma del hongo). Al día siguiente se completó la inactivación en baño de temperatura constante (60 C) durante 30 minutos y se pasó el material concentrado de ambas fases a los frascos de liofilización. Se usó un aparato de liofilización Vir-Tis. El proceso se llevó a cabo durante 24 horas, con hielo seco y congelación inicial de las muestras. Una vez liofilizadas, se procedió a la determinación de la composición química de cada muestra.

ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO: Se decidió analizar el contenido de ADN, ARN y proteínas de las formas micelial y levaduriforme.

ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN): La determinación del contenido de ADN en alícuotas de las dos muestras liofilizadas se hizo mediante la extracción de este polímero con diez volúmenes de NaCl 1 M adicionado de citrato de sodio 0.01 M. El material extraído se centrifugó a 12,000 rev/min durante 7 minutos, descartando luego el precipitado en donde se acepta que sólo existían componentes celulares diferentes al ADN. Al líquido sobrenadante en donde quedó disuelto el polímero se añadió seis volúmenes de agua con lo que se obtuvo la precipitación del ADN y algunas proteínas. El precipitado se resuspendió en diez volúmenes de NaCl 1 M con citrato, y se volvió a centrifugar a alta velocidad, descartando otra vez el precipitado. El ADN se precipitó de nuevo con seis volúmenes de agua. Este precipitado se secó al vacío (205 mm Hg) y a temperatura constante (40 C) en un aparato desecador tipo Abderhalden.

La cantidad de ADN presente en cada una de las alícuotas se estimó mediante la coloración que se desarrolla al combinarse la desoxirribosa con difenil-amina. Cada muestra se disolvió en 20 ml de ácido tricloroacético al 50 % y se dejó en reposo por 10 minutos en baño de hielo; posteriormente se centrifugó y al precipitado se le añadió 3 ml de difenil-amina. El color desarrollado se leyó en un colorímetro Klett Summerson con filtro 52 (520 nm). La cantidad de ADN del que provenía la desoxirribosa se estimó comparando esta lectura con una curva estándar hecha con diferentes concentraciones de ADN sometidas al mismo proceso de desarrollo de color que las muestras.

El contenido de ADN también se estimó mediante la determinación del fósforo proveniente de esta sustancia, siguiendo el método de Fiske y Subarow modificado (3), que consiste en la digestión de alícuotas de la sustancia que se había obtenido después del proceso de purificación ya descrito. La digestión se hizo con H₂SO₄ 5 N y calor, continuándose este proceso hasta obtener un líquido claro y transparente previa adición de agua oxigenada. El producto de la digestión se diluyó con agua destilada y desmineralizada hasta un volumen de 10 ml. De ahí se tomó 0.1 ml, al que se le agregó 1 ml de la mezcla metabisulfito-bórax, más 0.25 ml de la solución de molibdato y 0.25 ml de la

mezcla hidroquinona-ácido ascórbico. Después de un reposo de 15 min se le añadió 2.5 ml de la mezcla bisulfito-carbonato. Se reposó nuevamente durante 10 minutos y se leyó contra su blanco el color producido a 578 nm de longitud de onda. El fósforo presente se calculó al comparar esta lectura con la de un estándar de fósforo de 5 mg %, y el proveniente del ADN se expresó en relación al peso seco de la alícuota liofilizada del cultivo.

ACIDO RIBONUCLEICO (ARN): Se suspendió alícuotas de 1 g de los cultivos desecados de *Sporotrix* (micelial y levaduriforme) en $\frac{1}{2}$ ml de NaOH al 1 % más 2.5 ml de agua y se hirvió en baño maría por 30 min, agitándose ocasionalmente, se filtró en caliente y se enfrió; se acidificó a pH 5.0 y se filtró nuevamente. El filtrado final se extrajo con 2 ml de etanol al 95 % a 40 C con una gota de ácido clorhídrico concentrado; el precipitado se desecó a temperatura constante (40 C) al vacío (2) en el aparato de Abderhalden, y se determinó los pesos del residuo seco de ambas alícuotas.

Se disolvió 54 mg de la fase micelial con 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se ajustó el volumen con agua hasta 25 ml.

De cada una de ambas muestras se tomó un volumen de 0.1 ml, al que se le agregó 2 ml de orcinol al 1 % en cloruro férrico al 0.1 % en ácido clorhídrico concentrado y se hirvió por 30 min.

Se ajustó su volumen con agua destilada hasta 10 ml. El color desarrollado se leyó en colorímetro Klett Summerson con filtro 660. El contenido de ARN se estimó al comparar las lecturas obtenidas con una curva estándar hecha con ribosa.

PROTEINAS (2): Se estimó las proteínas totales de las dos formas del hongo, en muestras de 30 mg, mediante la cuantificación del nitrógeno liberado por digestión de un precipitado de proteínas de los cultivos deshidratados por liofilización. Cada muestra se suspendió y se homogeneizó con una pequeña cantidad de solución salina fisiológica. A este homogeneizado se le agregó 1 ml de tungstato de sodio al 10 % y 1 ml de ácido sulfúrico 0.66 N. El precipitado resultante se centrifugó y lavó con solución salina fisiológica; después de una segunda centrifugación el precipitado se transfirió a un frasco de digestión que contenía 1 g de sulfato de potasio, 1 ml de una mezcla de sulfato mercúrico (12 ml de ácido sulfúrico concentrado, más 10 g de óxido mercúrico diluidos hasta 100 ml con agua destilada), 2 ml de ácido sulfúrico concentrado y perlas de vidrio.

El frasco de digestión se calentó en un aparato Kjeldahl con una llama de poca intensidad hasta que aparecieron vapores blancos; se continuó la digestión intensificando el color de la llama hasta que la mezcla presentó un aspecto claro y transparente. Cuando las mezclas estuvieron completamente digeridas, se las transfirió de los frascos de digestión a un aparato de destilación con arrastre de vapor en donde se les agregó 5 ml de NaOH 15 M y 1 g de zinc granulado. El vapor de agua producido en un generador se hizo burbujear

en esta mezcla, recogiéndose el destilado en un recipiente que contenía 10 ml de ácido bórico al 4 %; se cuidó que el destilado goteara dentro del ácido bórico y no estuviera en contacto con el aire. Se recogió 20 ml del destilado, y se tituló con ácido sulfúrico 0.107 N en presencia de 5 gotas de un indicador hecho con 50 mg de verde bromocresol, 10 mg de rojo metilo y 60 ml de etanol desnaturalizado.

Se digerió en duplicado alícuotas de los cultivos desecados con un estándar de albúmina. Además, se incluyó blancos de agua destilada. El cálculo de nitrógeno liberado en cada una de las muestras se hizo multiplicando los mililitros de sol. de H_2SO_4 empleados para la titulación, por la normalidad del ácido y por 14, que es el peso molecular del nitrógeno. El valor de los mililitros gastados se corrigió sustrayéndosele los mililitros empleados en titular el blanco. El estándar de albúmina sirvió para cuantificar nuestro error, que fue de 1.5 % del valor teórico de la albúmina.

RESULTADOS

Los resultados de la determinación de ácidos nucleicos y proteínas en las dos formas de desarrollo de *Sporotrix* están anotados en el Cuadro 1.

CUADRO 1

*Proporciones de algunos constituyentes de Sporotrix schenckii en sus dos fases de crecimiento**

	Levaduriforme %	Micelial %	Relación Lev/Mic
Proteínas (N x 6.25)	5.30	3.43	1.5
ADN	5.65	1.85	3.0
Fósforo del ADN	0.48	0.11	4.4
Ribosa del ARN	0.35	0.25	1.4
Fósforo del ARN	0.033	0.013	2.5

*Expresadas como % del peso seco (liofilizado) de cada uno de los cultivos.

DISCUSION

Los resultados de los análisis que se muestran en el Cuadro 1 sugieren que la forma levaduriforme contiene mayor concentración de proteínas, en relación al peso seco, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

Los métodos de extracción de proteínas, ADN y ribosa del ARN que se emplean en este trabajo no son completamente exactos, pues en las extracciones se pierde un pequeño porcentaje de cada una de las sustancias; a pesar

de lo anterior, nuestros datos son muy posiblemente significativos, puesto que ambas formas del hongo se sujetan a los mismos procedimientos, efectuados simultáneamente y con los mismos reactivos. Las diferencias observadas, por lo tanto, reflejan consistentemente la mayor cantidad de estos elementos (absoluta o relativa al peso) existentes en la forma levaduriforme.

La concentración relativa del ADN y del ARN en cada una de las formas no puede evaluarse directamente, puesto que en el caso del ADN nuestra curva patrón se hizo con ADN puro, mientras que en el caso del ARN se hizo con ribosa, por lo que seguramente el valor porcentual de ARN debe ser mayor que el apuntado en el Cuadro 1 para las dos formas (0.35% para la levaduriforme y 0.25% para la micelial). Los valores relativos de fósforo nos dan una mejor idea de la concentración de ADN y ARN, puesto que en ambos casos nuestras cifras fueron obtenidas con el mismo método.

Si analizamos estos últimos datos nos encontramos con que en ambas formas existe una mayor cantidad de ADN que de ARN. En la forma levaduriforme hay 14.5 veces más ADN que ARN $\frac{0.48}{0.033}$ y en la forma micelial la relación es aproximadamente de $8.5 \frac{0.11}{0.013}$. Si aceptamos que las diferentes formas

del ARN están relacionadas de una manera o de otra con la síntesis de proteínas, así como que la concentración de ADN también refleja la cantidad de información que el genoma puede aportar para la estructuración de las diferentes formas operacionales del ARN, esta proporción de ADN y de ARN (14.5 y 2.5 veces más) en la forma levaduriforme es un argumento que apoya la idea de la mayor infectividad de la forma levaduriforme.

Las relaciones de proteínas, ADN, fósforo del ADN, ribosa del ARN y fósforo del ARN entre las dos formas que aparecen en el Cuadro 1, son todas del mismo orden de magnitud; el valor más grande corresponde al fósforo del ADN (4.4) y el más pequeño a la ribosa del ARN (1.4).

Las diferencias entre estas relaciones son aún más pequeñas si se comparan entre los diferentes componentes analizados de cada sustancia, y así observamos que la relación del ADN (3.0) se aproxima a la relación del fósforo del ADN (4.4), y que las relaciones de la ribosa y del fósforo proveniente del ARN son 1.4 y 2.5.

Independientemente de que los métodos empleados no evalúan exactamente el contenido de cada una de estas sustancias en las dos formas del hongo, consideramos altamente significativa la consistencia de nuestros resultados, puesto que la forma levaduriforme arrojó mayores valores en todas y cada una de las determinaciones efectuadas. Ante este hecho, se puede concluir con bastante certeza que la forma levaduriforme del hongo contiene, proporcionalmente a su peso, mayor cantidad de proteínas y ácidos ribo y desoxirribonucleicos. Esto tiene muy probablemente relación con la diferencia en la disposición estructural que existe entre la fase micelial y la fase de levadura de *Sporotrix schenckii*.

RESUMEN

El estudio sobre la composición química de muestras liofilizadas de *Sporotrix schenckii* arroja una concentración aparentemente mayor de proteínas y de ácidos ribo y desoxirribonucléicos en la forma levaduriforme que en la micelial. Esto se debe probablemente a la diferente disposición estructural entre las dos fases del hongo.

REFERENCIAS

1. GLICK, D.
1961. *Quantitative chemical techniques of histo and cytochemistry*. Vol. I. Interscience Publ. New York.
2. HAWK, P. B., B. L. OSER, & W. H. SUMMERSON
1945. *Practical physiological chemistry*. 13a ed. McGraw-Hill, New York.
3. HENRY, R. J.
1964. *Clinical chemistry*. Harper and Row, New York.
3. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS
1957. *Manual of microbiological methods*. McGraw-Hill, New York. 101 pp.