

MORFOGENESIS DE HONGOS DEMATIACEOS V: ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN *FONSECAEA PEDROSOI* Y *WANGIELLA DERMATITIDIS* Y SUS CORRESPONDIENTES ALBINAS

Laura L. Ramos y Alfredo L. Borghi
Departamento de Microbiología (Area Micología)
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531,
Rosario (2000), Santa Fe, República Argentina

Palabras clave: Morfogénesis, ultraestructura, bioquímica, cepas albinas, *Fonsecaea pedrosoi* y *Wangiella dermatitidis*

Key words: Morphogenesis, ultrastructure, biochemistry, albino strains, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*

RESUMEN

Se sometió a la acción de los ácido cítrico y clorhídrico a pH = 1,5 una cepa de *Fonsecaea pedrosoi* (CMUR 263/74) y una de *Wangiella dermatitidis* (CMUR 104/81) productoras de cromoblastomycosis y faeohifomycosis respectivamente, lográndose producir sus mutantes albinas. Estas cepas fueron sometidas a pruebas bioquímicas, de susceptibilidad a agentes antifúngicos, al estudio de su ultraestructura, a la acción de la luz ultravioleta y a ensayos de recuperación en tierras estériles y no estériles.

Se encontraron diferencias en la utilización y en la fermentación de hidratos de carbono, y en la utilización de diversos aminoácidos y vitaminas entre las cepas originales y sus albinas correspondientes.

Las pruebas de susceptibilidad utilizando 5-FC, Ketoconazol y Anfotericina B mostraron diferencias entre éstas. También se observaron variaciones en la estructura de la pared en las cepas incluídas en este estudio, mientras que la luz ultravioleta no demostró producir alteraciones en el crecimiento.

Ambas cepas con sus correspondientes albinas se recuperaron de tierras estériles; en cambio esto no fue posible en las no estériles.

SUMMARY

[Morphogenesis in Dematiaceous fungi V: Biochemical and ultrastructural studies in *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis* and its albino strains.]

Fonsecaea pedrosoi (strain CMUR 263/74 and *Wangiella dermatitidis* (strain CMUR 104/81) which produce chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis respectively, were subjected to either chlorhidric or citric acid treatments (pH = 1,5) in order to obtain mutants. On the wild-type strains and their albino mutants thus obtained biochemical and antifungal susceptibility tests, ultrastructure assays, U.V. response and assays in order to test their recovery from sterilized or nonsterilized soils were carried out.

The results obtained indicate that:

- 1) The wild-type strains and their albino mutants showed differences in their use of carbohydrates, amino acids and vitamins and the fermentation of carbohydrates.
- 2) The original strains and their albino mutants showed differences in susceptibility test using 5-FC, Ketoconazol and Amphotericin B.
- 3) Several variations on the cell wall structure, were obtained between the wild-type strains and their albino mutants.
- 4) No differences were detected in their growth after ultraviolet treatment.

Se concluye que la acción de estos ácidos a pH muy bajo, produce cambios en las características bioquímicas, y ultraestructurales en los dos hongos observados.

INTRODUCCION

A pesar de la relativa frecuencia de la cromoblastomycosis, poco se conoce acerca de la composición química de la pared celular de los agentes productores de esta enfermedad y de los factores que influyen en la relación hospedador-parásito.

En los hongos patógenos, la presencia de melanina (considerada como un factor de resistencia a la lisis por fagocitosis), fue señalada para *P. verrucosa* (14), este pigmento oscuro forma parte de un complejo protéico de alto peso molecular, ubicado en la pared celular y puede ser secretado al medio durante su desarrollo.

Según Emmons y col. (6), la razón esencial para la patogenicidad de un hongo puede estar expresada en términos generales, en la tolerancia a temperaturas de 35-37° C, presencia de sistemas enzimáticos, los cuales permiten la parasitación de los tejidos del huésped, la exposición continua de este a los propágulos de dispersión (conidios) del hongo. El factor determinante de que algunos hongos patógenos humanos sean dimórficos, puede estar relacionado con la estructura de la pared celular. Manipulando la construcción de la pared celular, los hongos pueden asumir diferentes formas encuadradas en una amplia variedad de funciones incluyendo la penetración al hospedador.

San Blas G. (12), expresa que la pared celular es importante en la regulación de los eventos de contacto entre el parásito y el hospedador y la presencia de otros factores en estos, pueden ser importantes para la invasión del hongo en los tejidos. Esos factores pueden ser internos (capacidad del microorganismo a desarrollar bajo condiciones nutricionales provistas por el tejido hospedador, la producción de toxinas, etc.), o externos (influencia del ambiente a inducir al parásito a sintetizar materiales que de otro modo no pueden ser producidos, mecanismos de defensa del hospedador, etc.). Los factores reguladores en las especies, suelen jugar un rol en la relación hospedador-parásito y la pared fúngica puede ser una primera subestación que regula las señales. La comprensión de estos mecanismos se traduce en un incremento del conocimiento de los eventos

5) *F. pedrosoi* and *W. dermatitidis* an their albiness mutants were recovered from sterilized soils. However, only the wild-type strains were recovered from non-sterilized soils.

According to the obtained results, we conclude that the action of these acids at a very low pH produce changes at the biochemical and ultrastructural levels in the two described fungi.

bioquímicos involucrados en la invasión y el daño producido de los tejidos.

Los resultados obtenidos por el tratamiento a pH ácido de los *F. pedrosoi* y *W. dermatitidis* comunicados en un trabajo anterior (10) nos llevó a estudiar comparativamente algunas de las modificaciones bioquímicas y ultraestructurales producidas.

MATERIALES Y METODOS.

1) Pruebas bioquímicas.

a Test nutricional Trichophyton Agar (Difco) (7)

Se utilizó este test para determinar los requerimientos nutricionales entre *F. pedrosoi*, *W. dermatitidis* y sus correspondientes albinas midiendo el diámetro de sus colonias.

b. Efecto de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento fúngico

Se realizaron las técnicas de auxanograma para hidratos de carbono y sustancias nitrogenadas según Rippon (11), y la de fermentación de sustancias hidrocarbonadas según Wickerham (15) modificado por Bracalenti y Col. (3).

2) Pruebas de susceptibilidad con agentes antifúngicos.

La determinación de 5-Fluorocitosina (5-FC) se realizó según la técnica dada por Smith y col. (13) y la Anfotericina B y Ketoconazol según Negroni R. (9).

3) Estudio de la ultraestructura.

Las dos cepas de estudio con sus correspondientes albinas se fijaron en glutaraldehído al 3% en buffer de fosfato 0,1 M pH = 7,4, luego, en

tetróxido de osmio al 1.5% en buffer de fosfato, seguido de impregnación en bloque con acetato de uranilo al 2%. Deshidratación en alcohol decreciente en óxido de propileno. Inclusión en Epon 812, corte con ultramicrotomo Porter blue MT2B y coloración de contraste con citrato de plomo según Reynolds.

Observación en microscopio electrónico Jeol-Jem 100 C.

4. Estudio de la velocidad de crecimiento

- Para los hongos de desarrollo filamentoso se realizó la curva de crecimiento sembrando en los medios de Agar-Sabouraud Glucosa (ASG) y Agar-Papa-Dextrosa (APD) a 27° C. y 37° C. durante 19 días y los resultados se expresaron midiendo el diámetro de la colonia.

- En tubos de hemólisis que contenían 2 cm³ de caldo Sabouraud-Glucosa se agregó 0,1 cm³ de una suspensión de *W. dermatitidis* en agua destilada estéril que contenían 4 x 10⁷ levaduras/cm³, incubándose a 27° C. y 37° C. La determinación del peso seco se realizó a 105° C. haciéndose pesadas cada 48 horas llegando a peso constante a los 15 días, considerando hora cero, los tubos recién inoculados.

5) Acción de la luz ultravioleta.

Las colonias desarrolladas en los medios ASG y APD de *F. pedrosoi*, *W. dermatitidis* y sus correspondientes albinas se colocaron a 15cm. de distancia de la luz ultravioleta (Sterisol F 1140 Original Hanan NN 15/44 UK entre 200-300 nm) durante 1, 5, 10, 30, 90 minutos y 4 horas de exposición. Luego se sembraron en el medio de ASG para observar la acción de la luz ultravioleta en cuanto al crecimiento de estos hongos.

6) Recuperación de las cepas de *F. pedrosoi*, *W. dermatitidis* y sus correspondientes albinas en tierras estériles y no estériles.

Se sembraron en placas de Petri 10 g. de tierra estéril y no estéril, agregándole 100 mg. de una suspensión de micelio de *F. pedrosoi* y su albina y por otro lado 10⁶ células levaduriformes/cm³ de *W. dermatitidis* y su albina incubándolas a 27° C y a los 10 días se tomaron muestras de las placas de tierra estéril y no estéril por cada hongo, repitiéndose lo mismo a los 20 días.

La técnica de procesamiento fue la siguiente: se colocaron los 10 g. de tierra nombrados anteriormente en 19 cm³ de agua destilada estéril en un erlenmeyer de 250 cm³ al que se le agregaron una gota de Tween 80. Se agitó 15 minutos y se dejó reposar 10 minutos. Se realizaron diluciones de esta solución madre hasta 1/128. Se tomó 1 cm³ de cada dilución y se colocó en una placa Petri con 0,1 cm³ de Rosa de Bengala, 0,1 cm³ de una solución (50 g/cm³) de cloranfenicol y 10 cm³ de APD, incubándose a 27° C durante 10 días.

Se observó el grado de recuperación que se obtuvo en las placas.

RESULTADOS.

1) Pruebas bioquímicas.

a) Test nutricional de *Trichophyton* Agar.

Los resultados de este test mostraron que la cepa albina de *F. pedrosoi* creció mejor que su original en medios con caseína, caseína-tiamina y caseína-ácido nicotínico y muy poco en medios con NH₃ NO₃ como fuente nitrogenada.

Con respecto a *W. dermatitidis* se observó mejor crecimiento de su cepa albina en los medios conteniendo caseína-inositol, caseína-inositol-tiamina, caseína-tiamina, caseína-ácido nicotínico y NH₄ NO₃-histidina.

b) Efecto de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento fúngico.

- Auxanograma de hidratos de carbono.

Las únicas diferencias observadas fueron la utilización de rafinosa por parte de *W. dermatitidis* albina, mientras que su correspondiente pigmentada utilizó celobiosa; en cuanto a la utilización de sustancias carbonadas por *F. pedrosoi* y su correspondiente albina no mostraron diferencia alguna.

- Auxonograma de sustancias nitrogenadas.

W. dermatitidis y *F. pedrosoi* con sus correspondientes albinas no mostraron diferencias en la utilización de sustancias nitrogenadas.

- Fermentación de sustancias hidrocarbonadas.

La cepa de *W. dermatitidis* albina fermentó glucosa, maltosa y sacarosa mientras que *W. dermatitidis* no fermentó ninguno de los azúcares empleados.

2) **Pruebas de susceptibilidad con agentes anti-fúngicos: 5-FC, Anfotericina B y Ketoconazol.**

Los resultados obtenidos con esta experiencia mostraron que el poder fungistático para *F. pedrosoi* con 5-FC es de 50 ug/cm³ y con Ketoconazol de 100 ug/cm³, mientras que el poder fungicida con 5-FC fue nulo para esas concentraciones y para Ketoconazol fue total a la concentración de 100 ug/cm³.

Para *F. pedrosoi* y su albina con Anfotericina B el poder fungistático fue nulo para la máxima concentración igual que su poder fungicida.

Las observaciones realizadas sobre *W. dermatitidis* y su albina mostraron que el poder

fungistático y fungicida fueron nulos para los tres antifúngicos probado a esas concentraciones.

3) **Estudio de la ultraestructura.**

El estudio de la ultraestructura de *F. pedrosoi* y *W. dermatitidis* mostró una pared rugosa con dos capas: una externa muy rugosa y densa y una interna gruesa, poco densa. Sus mutantes albinas mostraron la pérdida de la capa B2, lugar en que se produce la melanización. Fotos 1, 2, 3, 4.

4) **Estudio de la velocidad de crecimiento.**

Tabla Nº 1

Diámetro de las colonias (cm) a 27° C y 37° C después de 19 días de incubación en los medios de ASG y APD.

CEPAS	Medios de Cultivo			
	ASG		APD	
	27° C	37° C	27° C	37° C
<i>F. pedrosoi</i>	2.1	1.4	2.3	1.5
<i>F. pedrosoi</i> (var. albina)	3.3	2.5	0.9	0.6
<i>W. dermatitidis</i> (var. albina)	3.0	0.6	3.0	0.6

Se observa en Tabla Nº 1 que no hubo diferencias con respecto a la temperatura y los medios utilizados en *F. pedrosoi*, mientras que su variedad albina tuvo mejor desarrollo en ASG que en APD a ambas temperaturas, siendo la óptima de 27° C.

Con respecto a *W. dermatitidis* (var. albina) no hubo diferencias en cuanto a los medios empleados y la temperatura óptima fue de 27° C.

6) **Recuperación de las cepas de *F. pedrosoi*, *W. dermatitidis* y sus albinas en tierras estériles y no estériles.**

Bajo las condiciones de trabajo expuestas anteriormente, las cepas albinas solamente fueron recuperadas de tierra estéril mientras que las cepas pigmentadas lo fueron de tierra estéril y no estéril hasta la dilución 1/128 ensayada.

5) **Acción de la luz ultravioleta.**

Las cepas estudiadas, y sus albinas que fueron expuestas a la radiación ultravioleta no tuvieron diferencias significativas con respecto al crecimiento en el medio de ASG.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En un trabajo anterior (10) se sometió a la acción del ácido clorhídrico y cítrico a pH = 1,5 una cepa de *F. pedrosoi* (CMUR 263/74) y una de *W. dermatitidis* (CMUR 104/81) productoras de

cromoblastomicosis y faechifomicosis obteniéndose sus correspondientes mutantes albinas y que a través de sucesivos subcultivos nunca revirtieron a sus formas originales. En dicho trabajo también se analizó la macro y micromorfología de estas cepas albinas comparadas con sus respectivas cepas patrones y la patogenicidad en ratones.

Las pruebas bioquímicas mostraron diferencias entre la cepa albina y su correspondiente pigmentada ya sea en la utilización de sustancias carbonadas, nitrogenadas y en la fermentación de hidratos de carbono para *W. dermatitidis*. Con respecto a *F. pedrosoi* no se encontraron diferencias con su cepa albina en cuanto a la capacidad de utilización de sustancias carbonadas y nitrogenadas.

El test de Trichophyton Agar (Difco) se utilizó para caracterizar la capacidad metabólica de las cepas estudiadas encontrándose que las cepas albinas utilizaron con más eficacia vitaminas y aminoácidos esenciales para su desarrollo que las cepas testigo. En cambio, la cepa albina de *F. pedrosoi* tuvo menor capacidad para utilizar NH_4NO_3 .

Las pruebas de susceptibilidad a los tres antifúngicos empleados demostraron que para *W. dermatitidis* testigo ninguno de ellos produjo efecto en cambio su albina fue inhibida por Anfotericina B.

Con respecto a *F. pedrosoi*: Anfotericina B. inhibió la cepa testigo y su albina, 5-FC no produjo inhibición y Ketoconazol inhibió solamente a la cepa testigo.

La presumible distribución de la melanina en las paredes de los conidios fue revelada por estudios con microscopía electrónica (5). De acuerdo con nuestras observaciones podemos inferir que la acción de los ácidos cítrico y clorhídrico a pH muy ácidos actúan a nivel de la capa B, fundamentalmente en la región B2 donde se produce la melanización y por consiguiente una de las causas de la aparición de las mutantes albinas podría deberse a dicha acción.

La acción de la luz ultravioleta sobre la parte visible del espectro (380 - 720 nm) tiene relativamente poco efecto sobre el crecimiento vegetativo de los hongos, sin embargo puede tener acciones significativas sobre la esporulación. Estas pueden ser mucho más pronunciadas sobre el crecimiento vegetativo, cuando son producidas por la radiación ultravioleta en la región de 200-300 nm, causando mutaciones y daño letal al DNA. Se forman uniones covalentes entre nucleótidos de pirimidina adyacentes dando dímeros de timina y citosina, los cuales inhiben la síntesis de DNA normal. Si las células son subsecuentemente expuestas a las radiaciones entre 360 y 420 nm, muchos de los daños inducidos por la luz ultravioleta son revertidos debido a que la actividad de enzimas específicas pueden descomponer los dímeros formados in situ. La melanización confiere un alto grado de protección contra el daño producido por la luz ultravioleta sobre el protoplasma (4). Esta situación se comprobó con las cepas testigo de ambos hongos, los cuales no sufrieron daño después de la exposición a la radiación ultravioleta.

Sus correspondientes albinas tampoco lo sufrieron, probablemente debido a los mismos mecanismos reparadores señalados anteriormente.

Los microorganismos inoculados en suelos estériles se desarrollaron rápidamente obteniéndose poblaciones de gran tamaño, inoculaciones similares en suelos no estériles derivan en un pobre desarrollo y frecuentemente las especies introducidas son eliminadas en un período de días o semanas. La diferencia es enteramente el resultado de interacciones biológicas de naturaleza injuriosa (1) (2) (8). Las cepas testigo fueron recuperadas tanto de tierra estéril como de no estéril, mientras que las mutantes albinas solo de las tierras estériles, lo que indicó que estas cepas no resisten las condiciones de competencia del ambiente.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) ALEXANDER, M. (1977): Introduction to soil Microbiology, 410-421, 2ds.ed. John Wiley and Sons. New York. Chichester. Brisbane. Toronto.
- 2) BLOONFIELD, B. J. AND ALEXANDER, M. (1967): J. Bacteriol. 93: 1276-1280.
- 3) BRACALENTI, B. J. C. DE; BORGHI, A. L.; ALVARES, D. P. Y LOPEZ, C. E. (1981): Identificación de levaduras de importancia clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

- 4) DEACON, J. C. (1984): Introduction to Modern Mycology Basic Microbiology. Vol. 57: 112-113. Seacon edition. Ed. K. F. Wilkinson-Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. Boston. Palo Alto. Melbourn.
- 5) BURRELL, L. W. (1964): The composition and structure of walls of dark fungus spore. Mycopathol. Mycol. App. 23: 339-345.
- 6) EMMONS, C. W.; BINGORD, C. H.; UTZ, P. J. AND KWON-CHUNG, K. J. (1977): Medical Mycology, 592. 3ra. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- 7) GERG, L. CAMP L. B. (1957): Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. J. Bact. 74: 113-121.
- 8) KUO, M. J. AND ALEXANDER M. (1967): J. Bacteriol. 94: 624-629.
- 9) NEGRONI, R. (1977): Acción antifúngica de nuevos compuestos imidazólicos. Actas de las VIII Jornadas y Primer Congreso Argentino de Micología, 166-174.
- 10) RAMOS, L., BORGHI, A. L. (1987): Morfogénesis de hongos dematiáceos IV: Influencia del medio ácido sobre la morfología de *Fonsecaea pedrosoi* y *Wangiella dermatitidis*. Presentando en el III Congreso Argentino de Micología y XIII Jornadas Argentinas de Micología. Mar del Plata 28-31/10/87. República Argentina.
- 11) RIPPON, J. W. (1982): Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes, 774-775, W. B. Saunders Company, Philadelphia. London. Toronto. México City. Río de Janeiro. Sydney. Tokio.
- 12) SAN BLAS, G. (1982): The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. Mycopathologia 79: 159-184.
- 13) SMITH, SHADOMY Y ANA ESPINEL INGROFF (1982): Pruebas de susceptibilidad con agentes antifúngicos. Manual de Microbiología Clínica. Lennett E., 776-784, 3ra. edición. Lennett E., Balows A., Hansler W. Truvant J. Editorial Médica Panamericana.
- 14) SZANISZLO, P. J., COOPER, B. H. AND VOGES H. S. (1972): Chemical composition of the hyphal walls of three chromomycosis agents. Sabouraudia 10: 94-102.
- 15) WICKERHAM, L. J. (1951): Taxonomy of yeast. Technical Bulletin Nº 1029 V. S. Department of Agricultura. Washington D. C.

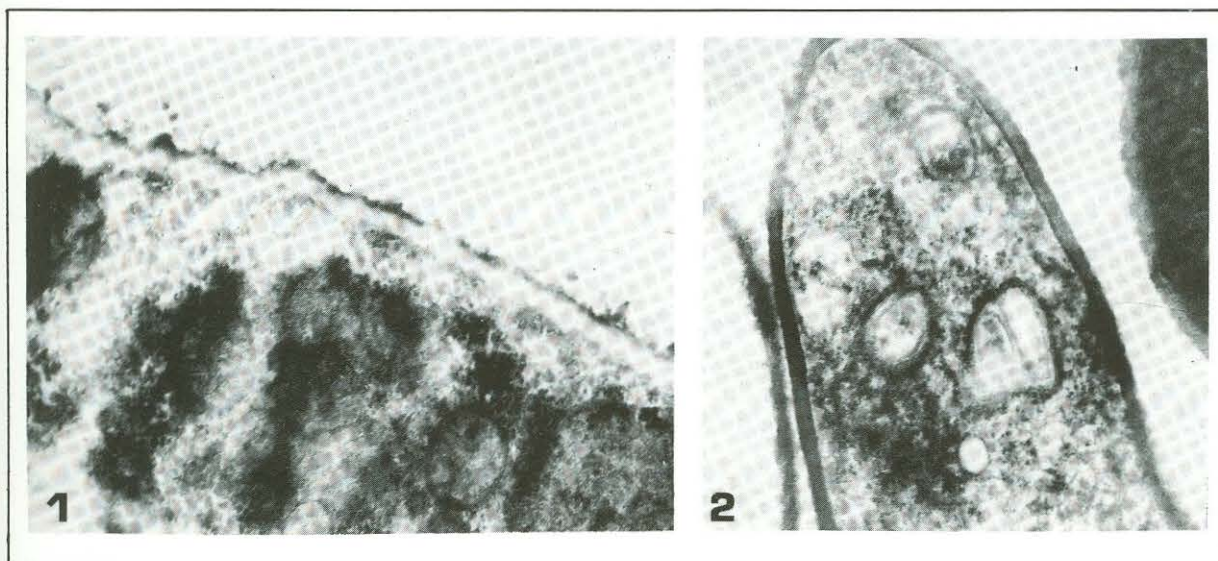


Foto N° 1: *F. pedrosoi* por 150.000: se observa la pared celular rugosa con dos capas, una externa muy rugosa, densa; y una interna gruesa, poco densa. Foto N° 2: *F. pedrosoi* albina por 100.000: se observa una única capa externa, densa en un filamento.

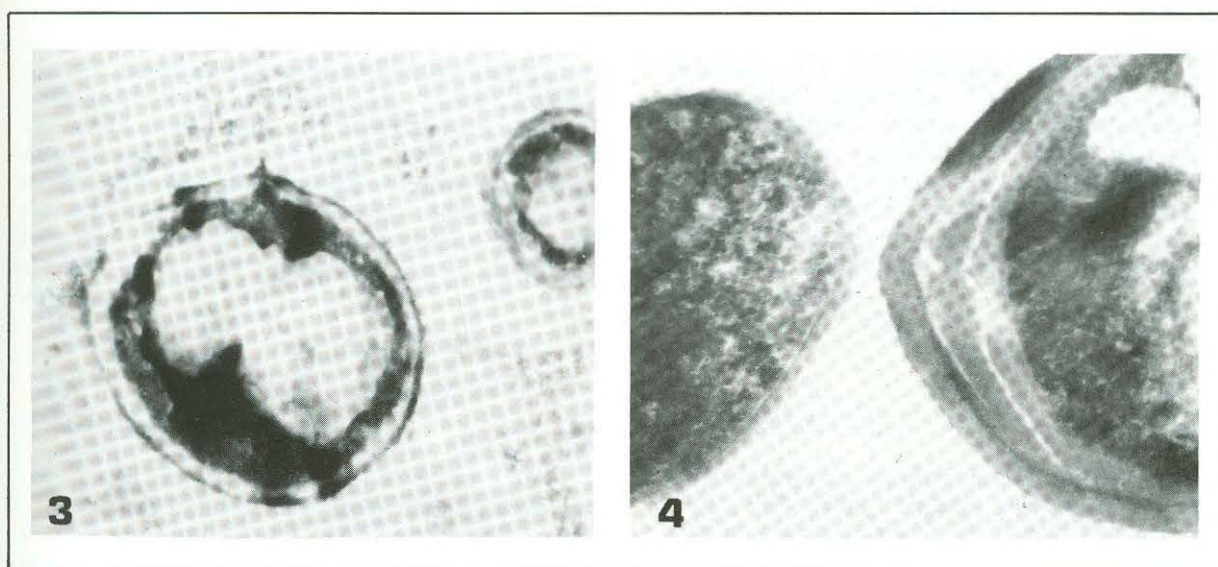


Foto N° 3: *W. dermatitidis* por 37.500: se observa en la pared celular una capa externa regularmente densa, sugosa, y una capa interna muy poco densa. Foto N° 4: *W. dermatitidis* albina por 100.000: se observa la formación de tres capas.