

PROTEASAS (QUERATINASAS) EXTRACELULARES EN CEPAS FUNGICAS QUERATINOFILICAS AISLADAS DE SUELOS CHILENOS ESTUDIO PRELIMINAR

M. A. Toro S. M.*; E. Piontelli L.*; E. Fernandez B.**;
A. Siegel M.*; A. Solari Q.*

*Cátedra de Micología. Escuela de Medicina.
Universidad de Valparaíso. Casilla 92-V
Valparaíso - Chile

**Cátedra de Química Orgánica. Esc. de Química y Farmacia.
Universidad de Valparaíso. Casilla 92-V
Valparaíso - Chile

Palabras clave : Queratinasas, hongos queratinofílicos - líticos

Key words: Keratinases, keratinophilic - litic fungi.

RESUMEN

Se determina la presencia de proteasas extracelulares (queratinasas). "in vitro" en cepas de hongos queratinofílicos y queratinofílicos aislados de suelos chilenos.

Se cultivaron durante 15 a 30 días siete cepas de hongos queratinofílicos, tanto en agitación como en forma estática y seis cepas de hongos queratinofílicos sólo en forma estática, en medio líquido que contiene pelo humano tratado como sustrato queratinoso. Las proteasas extracelulares fueron aisladas y purificadas por cromatografía en columna sobre Sephadex G- 75. Mediante la electroforesis en gel de poliácridamida se detectan bandas de proteína de peso molecular entre 38000 y 40000 para *Scopulariopsis brumptii*, *Ulocladium atrum*, *Botryotrichum piluliferum*, *Auxarthron umbrinum* y *Gymnoascus reessii*, comparables con la obtenida para *Trichophyton mentagrophytes*, hongo utilizado como control, lo cual lleva a postular que las enzimas corresponden a queratinasas.

INTRODUCCION

La queratina presente en la naturaleza preferentemente en la piel y anexos de los vertebrados, es una proteína fibrosa, que difiere de otras por su alto contenido de cistina (sobre un

SUMMARY

[Extracellular proteases (keratinases) in Keratinophilic fungi isolated from Chilean soils. Preliminary study]

The production of extracellular proteases (keratinases) "in vitro" in strains of keratinolytic and keratinophilic fungi isolated from Chilean soils is evaluated.

The detection of these proteases in seven strains of keratinophilic fungi is determined by means of shaking and static cultures, and six strains of keratinolytic ones, only by static cultures. These fungi are inoculated in liquid medium with human hair treated as keratinous substrate.

The extracellular proteases are isolated and purified by Sephadex G- 75 column chromatography. The protein bands are detected by polyacrylamide-gel electrophoresis, and was compared in their molecular weights (estimations between 38000 and 40000) with the control strain used (*Trichophyton mentagrophytes*) and *Scopulariopsis brumptii*, *Ulocladium atrum*, *Botryotrichum piluliferum*, *Auxarthron umbrinum* and *Gymnoascus reessii*, it is concluded that: the presence of these enzyme would presumably be considered as keratinases.

18%). Se piensa que los puentes disulfuro presentes en la cistina serían los responsables de la estabilidad de la molécula de queratina haciéndola más resistente a la digestión enzimática. A pesar de esto, no se acumula en la naturaleza y ciertos agentes biológicos presumiblemente ocasionan su degradación (Deshmukh y Agrawal 1982; Noval y Nickerson 1959; Kunert 1975).

En la biodegradación del material queratinoso

* Proyecto financiado por la Dirección de Investigación Científica y Tecnológica U. de Valparaíso N° 9/86.

participan una variedad de microorganismos, entre los cuales algunas especies fúngicas son altamente especializadas como los Onygenales y taxa relacionados (Currah 1985). Los hongos que colonizan el tejido queratinizado inicialmente fueron denominados queratinofílicos (De Vries 1962). Es necesario hacer una distinción precisa entre aquellos hongos que son capaces de degradar la queratina y los que solamente utilizan derivados de su degradación parcial o sustancias asociada a ella (cemento intercelular y residuos protoplasmáticos). A los primeros se les denomina queratinolíticos y a los segundos queratinofílicos. Esta distinción es aún difícil de aplicar por la carencia de datos específicos sobre la capacidad degradativa de estas especies (Filipello y Luppi 1980-81).

Los dermatofitos (Onygenales y anamorfos relacionados) son un grupo de hongos que se caracterizan tanto fisiológica como ecológicamente por su habilidad para descomponer la queratina y usar este compuesto como fuente básica de carbono y nitrógeno. Mientras las especies saprofitas degradan los remanentes presentes en el suelo, las especies parásitas atacan principalmente al estrato córneo de la epidermis y anexos de los animales (incluyendo las aves y el hombre) (Kunert 1981; Wawrzekiewicz y col. 1987).

El mecanismo por medio del cual el dermatofito ataca y digiere este sustrato tan resistente, es uno de los problemas centrales de la fisiología de los hongos queratinolíticos.

Aunque algunos autores toman en consideración la acción mecánica de la penetración del micelio en la queratina insoluble (Raubitschek 1961), la mayoría han puesto más atención a los procesos químicos y enzimáticos (Deshmukh y Agrawal 1982; Yu y col. 1968, 1969 a y b, 1971). Es probable que en analogía a otros organismos queratinolíticos, los hongos sean capaces de denaturar el sustrato antes que ocurra la degradación proteica. El mecanismo de la denaturación fue investigado primeramente desde el punto de vista de la reducción enzimática de enlaces disulfuro que forman la base de la estructura de la queratina (Weary y Canby 1969; Weary y col. 1965). Sin embargo, la existencia de tal reducción no está claramente demostrada en los hongos. Otros autores consideran la deaminación de aminoácidos y péptidos una vía de reacción, que lleva a una denaturación gradual de la queratina por el medio alcalino producido (Ziegler 1964; Ziegler y Böhme 1969). Una nueva hipótesis se basa en el descubrimiento que los dermatofitos oxidan cistina no sólo a sulfato, sino también a sulfito. En un medio neutro y alcalino el sulfito rompe el enlace disulfuro de la cistina dando cisteína y S-sulfocisteína de acuerdo a la ecuación siguiente:



Este proceso denominado "sulfitolisis", tiene lugar con residuos de cistina en péptidos y proteínas. Dado que los dermatofitos son capaces de producir sulfito no solamente sobre cistina, sino aún cuando crecen sobre queratina, los enlaces disulfuro del sustrato pueden romperse precisamente por esta vía (Kunert 1972). En una etapa posterior a la sulfitolisis, la queratina sería degradada por acción enzimática (Alvarez y Bracalenti 1984).

Las enzimas degradadoras de sustratos queratinizados, descritas como queratinasas, han sido purificadas y caracterizadas en *Trichophyton mentagrophytes* (Yu y col. 1969a, 1971), *Microsporum canis* (Takiuchi y col. 1981, 1982, 1984), *Streptomyces fradiae* (Noval y Nickerson 1959; Nickerson y Durand 1963) y *Keratinomyces ajelloi* (Ruffin y col. 1971). Estas enzimas exocelulares pueden jugar un rol prominente no sólo en el crecimiento y multiplicación de los hongos (asegurando el abastecimiento de nutrientes desde componentes proteicos de la piel, pelo o uñas), sino que también en la infección de los tejidos del hospedero.

En investigaciones acerca del papel de estas queratinasas en enfermedades de la piel (dermatofitosis), se ha encontrado que ellas se producen durante la infección y que no sólo estos son importantes para la penetración e invasividad, sino que también en las reacciones de hipersensibilidad asociadas (Grappel y Blank 1972; Sanyal y col. 1985).

Considerando las experiencias y conclusiones logradas por diversos autores con cepas de hongos queratinolíticos, en la presente investigación se realiza un estudio comparativo de las proteinasas extracelulares en cepas fúngicas queratinolíticas y queratinofílicas, saprófitas, potencialmente patógenas y patógenas, propias de suelos chilenos o de origen zoofílico. La presencia de estas enzimas en una población fúngica enfrentada a un sustrato queratinico diverso, podría permitir su degradación en condiciones ambientales favorables y representar no sólo una ventaja nutricional esencial o adicional para el hongo, sino una fuente de contagio y por ende, un peligro epidemiológico de importancia en Salud Pública.

Por los antecedentes comentados se postula: la presencia de un complejo de proteasas extracelulares en hongos queratinofílicos de suelos chilenos, capaces de degradar la queratina "in Vitro".

MATERIALES Y METODOS

1. Se estudiaron trece cepas fúngicas aisladas de suelos chilenos mediante la técnica del anzuelo queratínico modificada (Orr 1969), de las cuales seis corresponden a cepas queratinolíticas y siete a cepas queratinofílicas.

Cepas queratinolíticas: *Trichophyton mentagrophytes* Blanchard 1826 var. *granulosum*; *Auxarthron umbrinum* Orr & Plunkett 1963; *Chrysosporium tropicum* Carmichael 1962; *Complex Microsporum gypseum-fulvum* Uriburu 1909; *Microsporum canis* Bodin 1902; *Gymnoascus reessii* Baran 1872

Cepas queratinofílicas: *Utiocladium atrum* Preuss 1852; *Scopulariopsis brumptii* Salvanet-Duval 1935; *Scopulariopsis candida* (Guéguen) Vuillemin 1911; *Phialophora verrucosa* Medlar 1915; (= *Phialophora americana* (Nannf.) Hughes 1958; *Botryotrichum piluliferum* Sacc. & March 1885; *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson 1974.

2. Activación de cepas fúngicas:

Se utilizaron como medio de activación Agar Corn-Meal y Agar Malta, en tubos extendidos, tanto para las cepas queratinolíticas como para las queratinofílicas. Los cultivos se incubaron a 27°C durante un tiempo de activación que varía de acuerdo a la especie.

Previo a la preparación del inoculum fúngico se realizó en cada cepa una observación macro y microscópica para comprobar su morfología, pureza y estado de crecimiento.

3. Preparación del inoculum fúngico:

De las cepas activadas se removieron las esporas o los conidios con agua destilada estéril, con ayuda de un asa y bajo suave agitación hasta formar una suspensión. El fluido obtenido se ajustó con agua destilada estéril a un 90% de transmitancia medida a 530 nm, lo que equivale aproximadamente a 10^6 unidades formadoras de colonias/ml (Mc. Ginnis 1982).

4. Siembra e incubación de las cepas fúngicas:

Al medio de cultivo líquido mineral, se aplicaron aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias por cada 100 ml de medio.

Las cepas queratinolíticas se mantuvieron en cultivo estático por 15 días a $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y las queratinofílicas durante 30 días con agitación

rotatoria a 175 rpm y $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (Yu y col. 1968, 1969) paralelamente en cultivo estático a $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

La cepa queratinolítica, *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum* se utilizó como cepa control en todas las experiencias realizadas.

5. Evaluación de la actividad queratinolítica en filtrados de los cultivos

La evaluación de la actividad queratinolítica se realizó en la mitad del período de crecimiento (7 días para las cepas queratinolíticas y 15 días para las cepas queratinofílicas), en una alícuota tomada desde el medio de cultivo. Previa filtración, se efectuaron las siguientes determinaciones:

- Concentración de ion Hidrógeno; determinada con un pH metro Orion Research Modelo 211.

- Concentración de proteínas totales; medida espectrofotométrica de acuerdo al Método de Layne (Layne 1957).

- Concentración de grupos sulfhidrilos libres; determinada mediante la metodología colorimétrica de Saville (Saville 1958).

- Daño estructural del pelo; el pelo obtenido desde el filtrado del medio, se examina bajo microscopio óptico en una preparación con azul de algodón (English 1965, Deshmukh y Agrawal 1982).

Las determinaciones de la actividad queratinolítica se realizaron nuevamente al final del período de crecimiento (15 días para cepas queratinolíticas y 30 días para cepas queratinofílicas).

6. Ensayos y purificación enzimáticas:

En el liofilizado del filtrado de cultivo se realizó la medición de la actividad específica queratinolítica de las enzimas presentes en este extracto crudo (Yu y col. 1968, Takiuchi y col. 1982), según el protocolo detallado a continuación:

| TUBOS | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------------------|----|----|-----|-----|
| Sustrato* (mg) | -- | 50 | -- | 50 |
| Material enzimático (mg) | -- | -- | 1.5 | 1.5 |
| Buffer fosfato** (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 |

* Como sustrato se utilizó pelo tratado (Yu y col. 1968, 1969).

** Buffer fosfato 0.028 M que contiene MgSO_4 0.001 M (pH. 8.0).

El set de tubos se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua durante una hora, al cabo de lo cual se detiene la reacción sumergiéndolos en agua helada por 5 minutos. El sustrato remanente es removido por filtración midiéndose la absorbancia a 280 nm, utilizando como blanco al tubo 1 (tubos 2 y 3 son controles). Los valores de absorbancia corregida fueron convertidos en Unidades de Queratinasa (1 KU = 0.1 de absorbancia corregida), y la actividad específica se expresa como KU/mg de proteínas (Takiuchi y col. 1981). El contenido de proteínas de las soluciones fue determinado por espectrofotómetro a 280 y 160 nm de acuerdo al método de Layne (Layne 1957).

Del liofilizado del extracto crudo se pesó 0.5g, disueltos en 0.5 ml de buffer fosfato salino 0.028M, conteniendo NaCl 0.1 M (pH 7.55). La solución obtenida fue purificada a través de una columna cromatográfica de Sephadex G-75 (Takiuchi y col. 1982, Ansari y Stevens 1983). La columna (6x125 mm) se equilibró y eluyó con buffer fosfato salino con un flujo de 12 ml h^{-1} , recogiendo fracciones de 0.5 ml. A cada fracción se adicionó 2 ml de buffer, midiéndose la absorbancia a 280 nm y determinándose las Unidades de Queratinasa de acuerdo al siguiente protocolo:

| TUBOS | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------------------|----|------|-----|------|
| Sustrato* (mg) | -- | 12.5 | --- | 12.5 |
| Extracto enzimático (ml) | -- | --- | 0.5 | 0.5 |
| Buffer fosfato** (ml) | 5 | 5 | 4.5 | 4.5 |

* Como sustrato se utilizó pelo tratado (Yu y col 1968, 1969).

** Buffer fosfato 0.028 M que contiene MgSO_4 0.001 M (pH 8.0).

El set de tubos recibió el mismo tratamiento que fue aplicado a la determinación de Actividad Específica.

Las fracciones que contienen la enzima fueron combinadas, dializadas contra agua destilada durante 48 horas, con recambio de agua a las 24 horas y liofilizadas.

En el liofilizado del extracto purificado fue determinada la Actividad Específica Queratinolítica siguiendo el mismo esquema usado en el extracto crudo.

7. Caracterización electroforética del extracto enzimático crudo y purificado

La electroforesis monodimensional se desarrolló en gel de poliacrilamida al 10% a pH 8.0 a 5mA por placa durante 18 horas, según el Método de Laemmli (Laemmli 1970).

Alicuotas de 50 μl , de soluciones de extractos enzimáticos crudo y purificado, y de una proteína estándar se incorporaron al gel laminar el cual se desarrolló con buffer Tris 0.025 M que contenía glicina 0.348 M y SDS 0.1% (pH 8.3). La detección fue realizada tiñendo el gel completamente con azul brillante Coomassie R-250.

8. Protocolo de trabajo

(ver Página 51).

9. Análisis estadísticos

La actividad fisiológica de los hongos queratinofílicos y queratinolíticos fue analizada mediante técnicas de (ANVA) de Varianza a uno y dos criterios de clasificación para cada una de las variables que miden la actividad consideradas como respuesta: pH, proteínas y grupos sulfhídricos. Estas variables fueron medidas en dos tiempos: a los 15 y 30 días de crecimiento en los hongos queratinofílicos y a los 7 y 15 días en los queratinolíticos. Los modelos de ANVA utilizados se postularon para la diferencia de esas variables respuestas entre los dos tiempos considerados.

La actividad de los hongos queratinofílicos fue comparada con la de un hongo queratinolítico, (*T. mentagrophytes*) considerado como control y fue estudiado bajo dos condiciones: con o sin agitación. La actividad de los queratinolíticos, en cambio fue comparada sólo entre ellos y se estudió en cultivo estático.

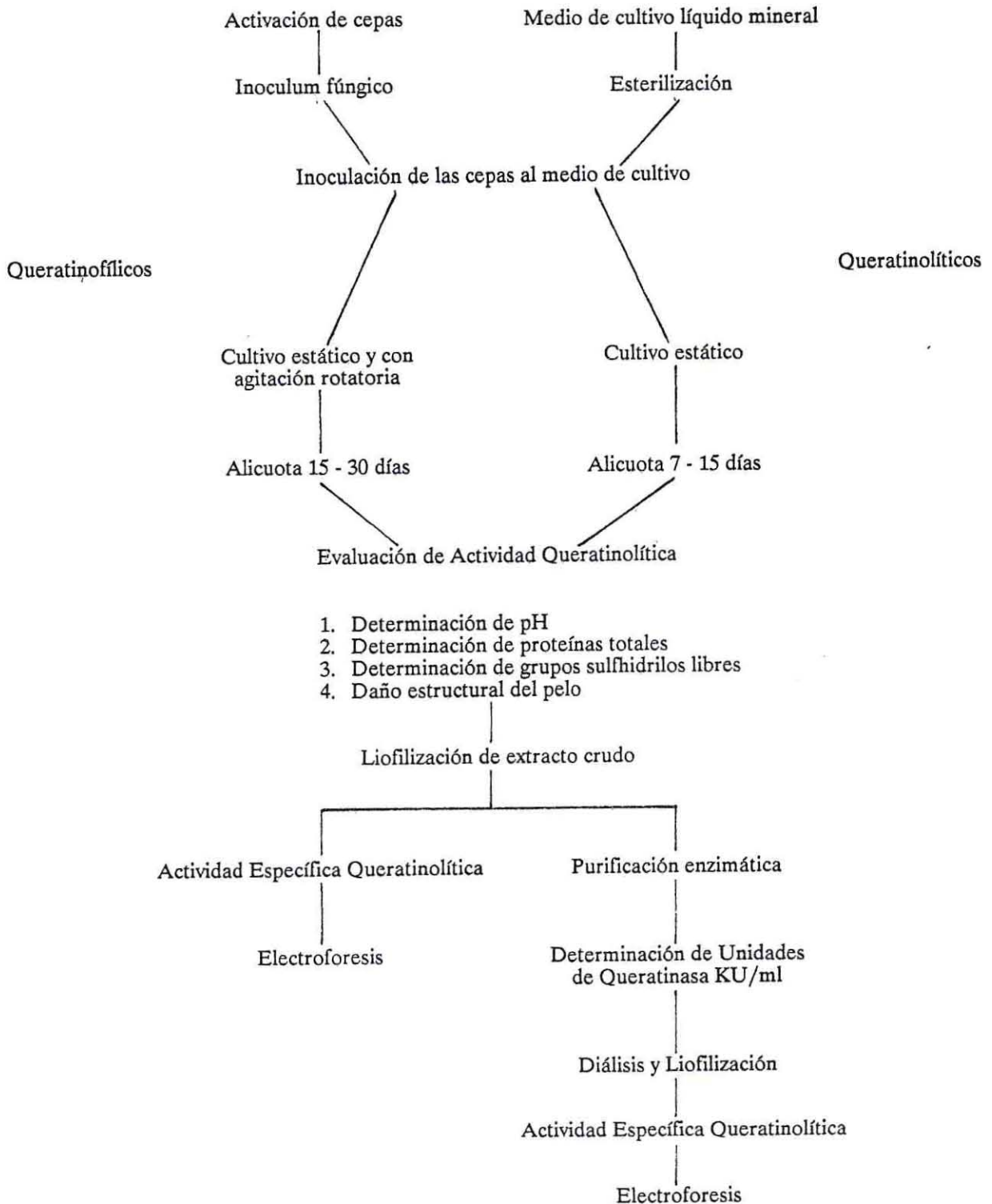
RESULTADOS

1. Cepas Queratinolíticas

Para todas las cepas en el período de estudio el pH se mantuvo sin variaciones apreciables, las proteínas mostraron un incremento mientras que la concentración de los grupos sulfhídricos decrecieron (Fig. 1, Tabla 1). *Ch. tropicum* fue la especie que más difiere en pH respecto al control (*T. mentagrophytes*) ($p < 0.001$). Las otras, en menor medida fueron *A. umbrinum*, *M. gypseum*, y *M. canis* ($0.01 < p < 0.05$) *G. reessii*, no difiere significativamente (Tabla 1).

En cuanto al incremento de proteínas entre los 7 y 15 días, este resultó en general significativo

8. Protocolo de trabajo



($0.01 < p < 0.05$), siendo mayor en los hongos saprófitos que en los patógenos (Tabla 1).

De las cinco cepas queratinolíticas cuya actividad se comparó con el control, sólo presentaron diferencias estadísticamente significativas *Ch. tropicum* ($p < 0.001$ para pH y $p = 0.004$ para proteínas), *M. gypseum* ($p = 0.011$ para pH y $p = 0.003$ para proteínas) y *A. umbrinum* ($p = 0.021$ para pH). Para los grupos sulfhidrilos no se observaron diferencias significativas.

1.1. Actividad Específica

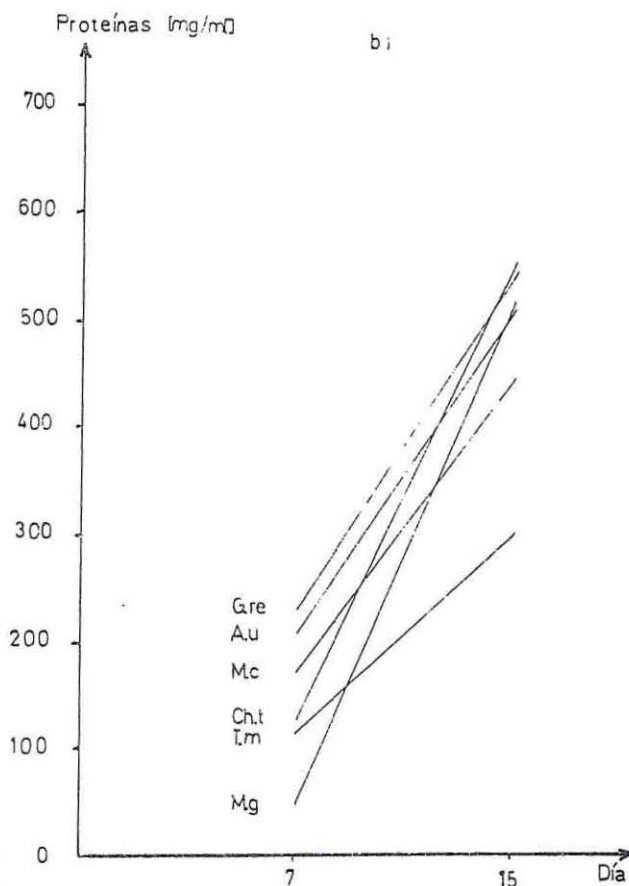
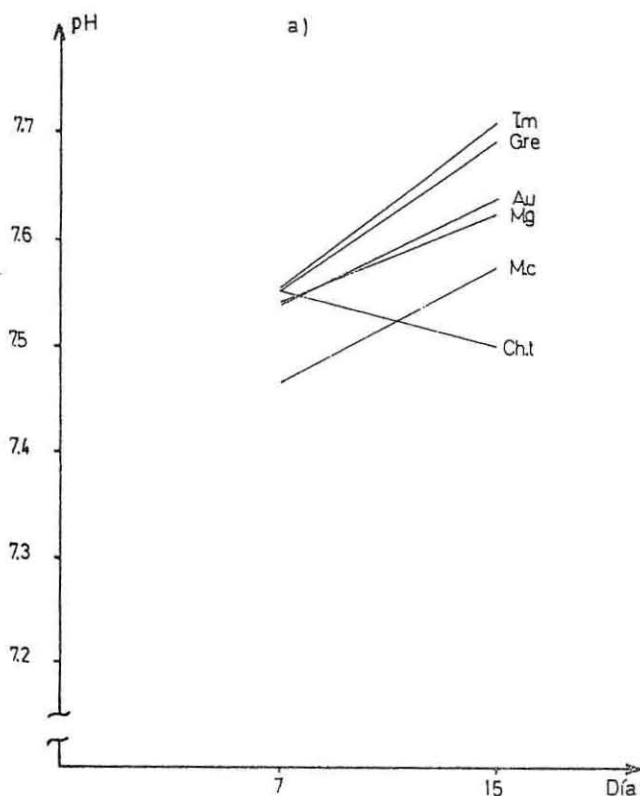
En las seis cepas queratinolíticas se observó un incremento de la actividad específica desde el extracto crudo al purificado,

siendo la cepa control la que presentó un mayor incremento (Tabla 2). La diferencia de la actividad específica entre los 7 y 15 días fue significativa en general ($p < 0.001$). Tanto los incrementos de actividad específica como los promedios de KU/mg para el extracto purificado fueron, en general estadísticamente significativos ($p < 0.001$). Por otra parte sólo *M. gypseum* no presentó diferencias significativas de incremento (entre crudo y purificado) respecto al control. Las demás cepas obtuvieron significaciones de $p < 0.001$. Sólo *A. umbrinum* no presentó diferencias significativas de KU/mg en promedio de KU/mg para el extracto purificado, respecto al control. Las demás cepas obtuvieron significaciones de $p < 0.002$.

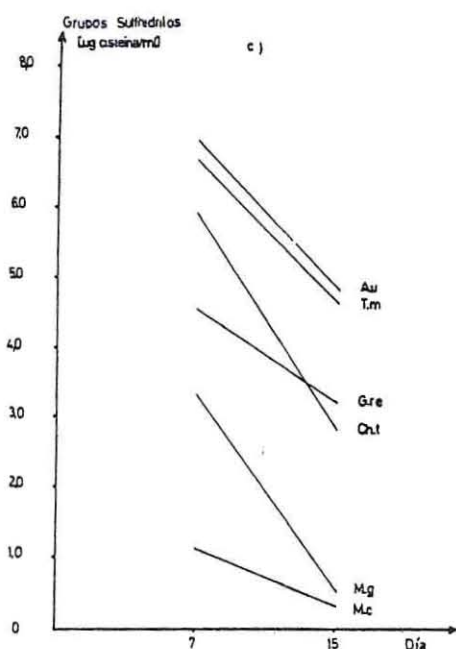
FIGURA 1

Valores promedios de pH (a), proteínas (b), grupos sulfhidrilos (c), registrados a los 7 y 15 días de cultivo (*T. mentagrophytes* como control).

1.b



1.c



1.2. Daño estructural del pelo

Entre los 7 y 15 días todas las cepas se adherieron al pelo. Sólo evidencias de marcada erosión se observaron en la cepa control y de moderada erosión en *A. umbrinum*, *Ch. tropicum* y *M. gypseum*.

1.3. Electroforesis en gel

La cepa control presentó una fuerte banda ubicada en la zona de peso molecular 34700 - 45000, estimándose su peso entre 38000 y 40000. Para *A. umbrinum* se observó una banda con características similares, en tanto que *Ch. tropicum* la presentó entre 40000 y 45000 y *G. reessii* (muy débil) en posición similar a la del control (Fig. 2).

Abreviaturas:

T.m. *Trichophyton mentagrophytes*; A.u. *Auxarthron umbrinum*; Ch.t. *Chrysosporium tropicum*; M.g. *Microsporum gypseum*; M.c. *Microsporum canis*; G.re *Gymnoascus reessii*; B.p. *Botryotrichum piluliferum*; G.ro. *Gliocladium roseum*; P.l. *Paecilomyces lilacinus*; P.v. *Phialophora verrucosa*; S.c. *Scopulariopsis candida*; S.b. *Scopulariopsis brumptii*; U.a. *Ulocladium atrum*

TABLA Nº 1

Promedios de pH, Proteínas (mg/ml) y grupos Sulfhídricos (ug. cisteína/ml) a los 7 y 15 días de cultivo para las cepas de hongos queratinolíticos

| Cepa de Hongos | Nº de muestra | pH | | | Proteínas | | | Grupos sulfhídricos | | |
|----------------|---------------|--------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------------------|---------|---------|
| | | 7 días | 15 días | Variac. | 7 días | 15 días | Variac. | 7 días | 15 días | Variac. |
| * T. m. | 3 | 7,553 | 7,710 | 0,157 | 116,033 | 301,567 | 185,533 | 6,679 | 4,652 | -2,027 |
| A. u | 3 | 7,537 | 7,637 | 0,100 | 209,033 | 509,467 | 300,433 | 6,964 | 4,832 | -2,132 |
| Ch. t. | 3 | 7,550 | 7,497 | -0,053 | 128,300 | 553,800 | 425,500 | 5,932 | 2,831 | -3,101 |
| M.g. | 2 | 7,540 | 7,625 | 0,085 | 49,800 | 514,250 | 464,450 | 3,346 | 0,510 | -2,836 |
| * M.c. | 2 | 7,465 | 7,575 | 0,110 | 172,800 | 443,500 | 270,700 | 1,143 | 0,319 | -0,823 |
| G.re | 3 | 7,550 | 7,693 | 0,143 | 232,467 | 544,800 | 312,333 | 4,566 | 3,290 | -1,276 |

* hongos patógenos

2. Cepas queratinofílicas

Para todas las cepas el pH se mantuvo más o menos constante; las proteínas presentaron un incremento y los grupos sulfhidrilos lo contrario en el período de 15 a 30 días. Al comparar la condición (sin y con agitación) en las variables en estudio, se observó un incremento notorio en el caso de las proteínas. (Tabla 3).

La interacción entre cepa y agitación resultó significativa (pH $0.01 < p < 0.05$; proteínas $0.01 < p < 0.05$; grupos sulfhidrilos $p < 0.01$).

Las diferencias entre las combinaciones de cepa y agitación resultaron también altamente significativas: para pH ($p < 0.001$); proteínas ($p < 0.001$); grupos sulfhidrilos ($p < 0.01$).

De la comparación entre las diferencias de las variables a los 30 y 15 días para cepas cultivadas en forma estática y en agitación, *B. piluliferum*, *P. lilacinus*, *S. candida* y *S. brumptii* se comportaron estadísticamente iguales para pH, en tanto que *G. roseum* es la que más difirió ($p < 0.01$); las restantes presentaron un comportamiento intermedio, detectándose diferencias significativas en *T. mentagrophytes* y *P. verrucosa* ($0.01 < p < 0.05$) y *U. atrum* ($0.05 < p < 0.10$). Para *T. mentagrophytes* y *P. lilacinus* las proteínas difieren entre una u otra condición ($p < 0.001$), mientras que el resto no presenta diferencias significativas excepto para *S. candida* ($0.005 < p < 0.10$).

En los grupos sulfhidrilos se observan discrepancias significativas del comportamiento en agitación y estático, sólo para *G. roseum* y *S. candida* ($p < 0.01$).

La variación de pH para todas las cepas en agitación, excepto *S. brumptii* fue estadísticamente igual al control. Para las cepas cultivadas en forma estática sólo *S. brumptii* ($p < 0.001$), *B. piluliferum* ($p < 0.01$) y *P. lilacinus* ($p < 0.05$) presentaron diferencias significativas respecto al control. En cuanto a las proteínas para el (cultivo estático), todas las cepas se comportaron estadísticamente igual al control, en cambio, en agitación sólo *P. lilacinus* no tuvo diferencia significativa. En el comportamiento de los grupos sulfhidrilos en cultivo estático fue estadísticamente igual al control sólo *B. piluliferum*, *S. candida* y *U. atrum*. En agitación todas las cepas fueron estadísticamente igual al control, excepto *G. roseum* ($0.05 < p < 0.10$) y *S. candida* ($0.01 < p < 0.05$). (ver Tabla 3).

2.1. Actividad específica

En todas las cepas estudiadas tanto en la condición de estático como agitación, la actividad es-

pecífica aumenta desde el extracto crudo al purificado (Tabla 4). Las cepas incubadas bajo agitación presentaron en general una mayor actividad que las de cultivo estático; en ambas condiciones *T. mentagrophytes* presentó la mayor actividad tanto para el extracto crudo como para el purificado, mientras que en *P. verrucosa* y *G. roseum* no se presentó en ninguna condición, para ambos extractos.

La interacción entre hongo y condición resultó altamente significativa ($p < -0.001$) tanto para la diferencia de Actividad Específica, como para la actividad específica en el extracto purificado. Para la diferencia de actividad específica, sólo *G. roseum*, *P. verrucosa* y *S. candida*, se comportan estadísticamente iguales. Un comportamiento similar se observa en la comparación de la actividad específica del extracto purificado para las cepas en estudio. Al contrastar cada cepa para ambas variables (diferencia y actividad específica en el extracto purificado) con el control, todas tuvieron un comportamiento estadísticamente diferente ($p < 0.001$), en ambas condiciones (sin y con agitación).

Se presenta el perfil cromatográfico de filtración en gel sobre Sephadex G-75 para *U. atrum* y la cepa control en la Fig. 3 determinándose la absorción en cada volumen eluido.

TABLA Nº 2

Promedios de actividad específica (Ku/mg) en el extracto crudo - purificado y diferencias entre ellos para las 6 cepas de hongos queratinolíticos.

| Cepa de Hongo | Nº de Muestra | Crudo | Purificado | Diferencia |
|-------------------|---------------|-------|------------|------------|
| T.m. (Control) | 3 | 1,813 | 3,197 | 1,383 |
| A.u. | 3 | 0,837 | 3,127 | 2,290 |
| Ch.t | 3 | 2,460 | 3,063 | 0,603 |
| M. g. | 2 | 1,525 | 2,920 | 1,395 |
| M. c. | 2 | 2,095 | 3,010 | 0,915 |
| G. re | 3 | 1,207 | 3,053 | 1,846 |

2.2. Daño estructural del pelo

Las cepas en cultivo estático tienden a alterar menos el pelo que el control, lo mismo ocurre en agitación. Para el parámetro erosión *P. verrucosa* y *G. roseum* discreparon totalmente del control (ya sea en agitación como estático) y *P. lilacinus*, *S. brumptii* y *U. atrum* bajo agitación son similares al control. (Tabla 5).

FIGURA 2

Electroforesis en Gel de poliacrilamida, para las cepas: *T. mentagrophytes* (control). *A. umbrinum*, *Ch. tropicum* y *G. reessii*.

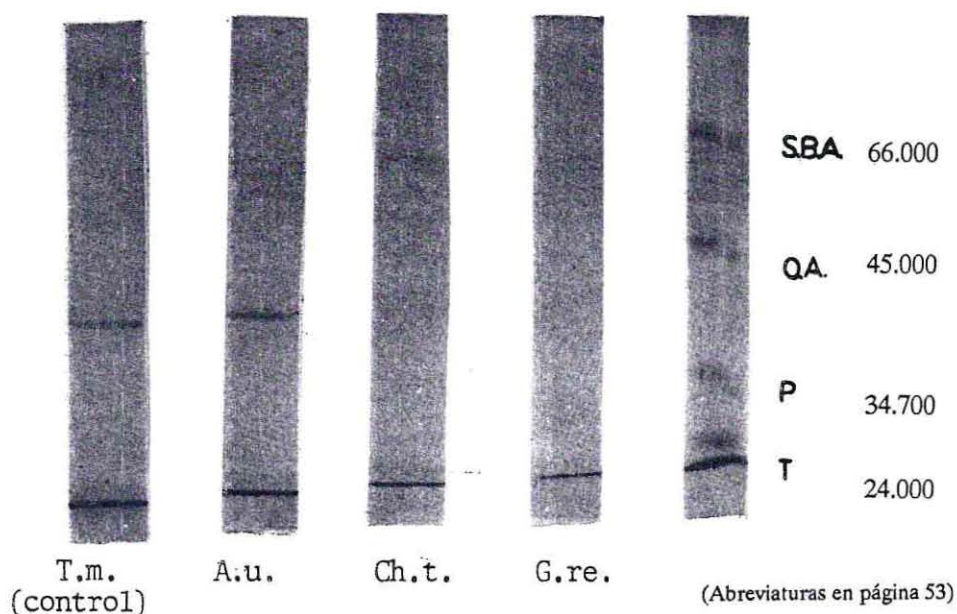


TABLA Nº 3

Promedios de pH, Proteínas (mg/ml) y grupos sulfhídricos (ug. cisteína/ ml) a los 15 y 30 días de cultivo y su variación para las 7 cepas de hongos queratinofílicos y el control sin y con agitación.

| Cepa de Sulfhídricos Hongo | | Nº de | | | | pH | | Proteínas | | Grupos | |
|----------------------------|-----|---------|--------|--------|-----------|---------|---------|-----------|--------|--------|-----------|
| | | muestra | 15 ds. | 30 ds. | variación | 15 ds. | 30 ds. | variación | 15 ds. | 30 ds. | variación |
| T.m. | sin | 3 | 7,553 | 7,710 | 0,017 | 111,033 | 301,567 | 14,867 | 6,679 | 4,652 | -0,714 |
| | con | 2 | 7,565 | 7,720 | 0,155 | 213,800 | 474,650 | 260,850 | 5,642 | 5,086 | -0,555 |
| (Control) | | | | | | | | | | | |
| B.p. | sin | 2 | 7,555 | 7,725 | 0,170 | 239,400 | 244,150 | 4,750 | 3,977 | 3,431 | -0,546 |
| | con | 7 | 7,560 | 7,673 | 0,113 | 246,186 | 326,286 | 80,100 | 4,332 | 3,799 | -0,533 |
| G.ro | sin | 2 | 7,715 | 7,740 | 0,025 | 180,650 | 214,150 | 33,500 | 3,555 | 3,443 | -0,112 |
| | con | 5 | 7,494 | 7,704 | 0,210 | 192,900 | 232,240 | 39,340 | 3,577 | 2,507 | -1,070 |
| P.l. | sin | 2 | 7,560 | 7,725 | 0,165 | 162,700 | 244,150 | 81,450 | 2,683 | 2,664 | -0,019 |
| | con | 5 | 7,688 | 7,876 | 0,188 | 369,940 | 696,120 | 326,180 | 4,202 | 3,618 | -0,585 |
| P.v. | sin | 2 | 7,600 | 7,575 | -0,025 | 97,600 | 118,550 | 20,950 | 3,296 | 3,181 | -0,115 |
| | con | 3 | 7,520 | 7,617 | 0,097 | 259,433 | 361,567 | 102,133 | 3,609 | 3,107 | -0,502 |
| S.c. | sin | 2 | 7,600 | 7,685 | 0,085 | 213,150 | 244,750 | 31,600 | 3,826 | 3,565 | -0,260 |
| | con | 4 | 7,533 | 7,642 | 0,110 | 234,950 | 373,875 | 138,925 | 4,528 | 3,201 | -1,328 |
| S.b. | sin | 2 | 7,580 | 7,845 | 0,265 | 243,250 | 274,800 | 31,550 | 3,622 | 2,301 | -1,321 |
| | con | 5 | 7,530 | 7,782 | 0,252 | 211,800 | 269,100 | 57,300 | 3,646 | 2,868 | -0,778 |
| U.a. | sin | 2 | 7,670 | 7,705 | 0,035 | 145,550 | 184,000 | 38,450 | 4,195 | 3,642 | -0,553 |
| | con | 3 | 7,613 | 7,753 | 0,140 | 460,133 | 570,367 | 110,233 | 4,399 | 3,489 | -0,910 |

FIGURA 3

Perfil cromatográfico de filtración en Gel, según condición (sin y con agitación) para la cepa queratinofílica *U. atrum* y para el control (*T. mentagrophytes*).

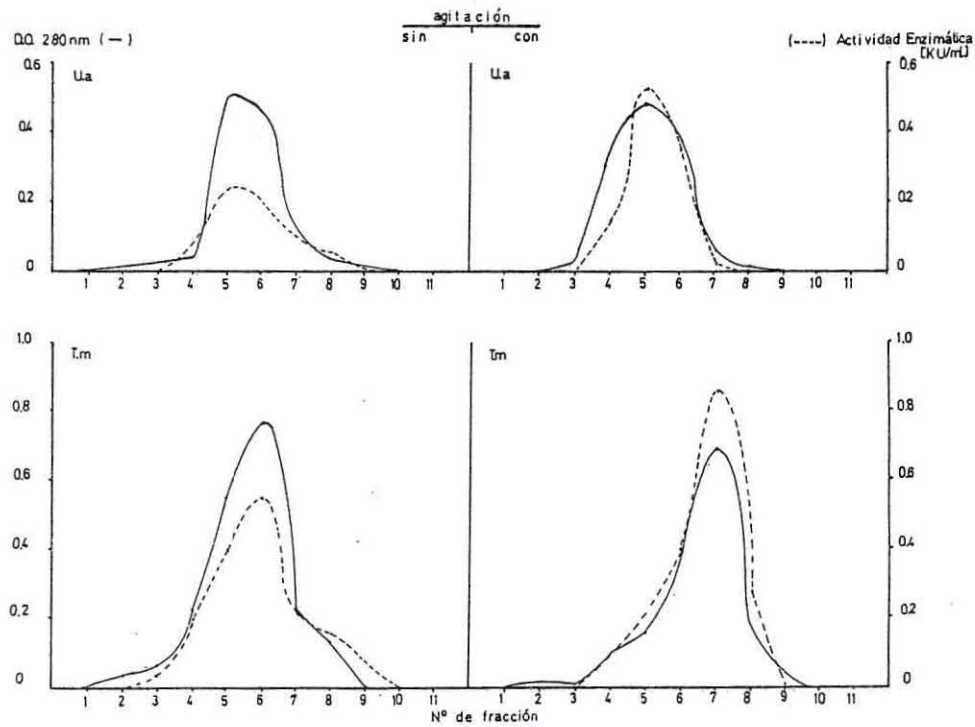
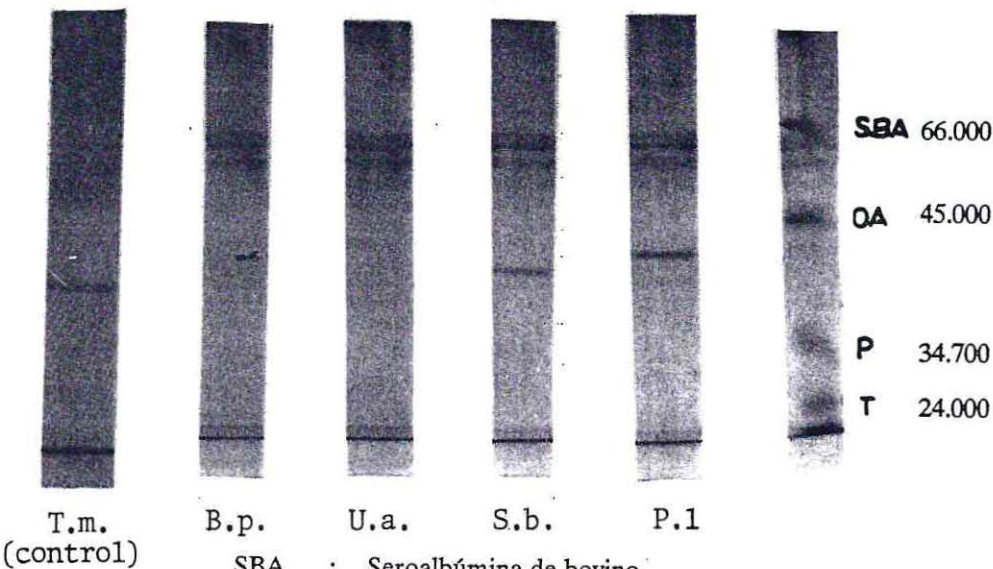


FIGURA 4

Electroforesis en Gel de policrilamida, para las cepas queratinofílicas *B. piluliferum*, *U. atrum*, *S. brumptii* y *P. lilacinus*, y para el control (*T. mentagrophytes*).



(Abreviaturas en página 53)

| | | |
|-----|---|------------------------|
| SBA | : | Seroalbúmina de bovino |
| OA | : | Ovoalbúmina |
| P | : | Pepsina |
| T | : | Tripsinógeno |

TABLA Nº 4

Promedio de actividad específica en extracto crudo y purificado para las 7 cepas de hongos queratinofílicos y el control, sin y con agitación

| Condición de Agitación | Cepa de Hongo | Nº de Muestras | Extracto | |
|------------------------|-------------------|----------------|----------|------------|
| | | | Crudo | Purificado |
| Sin | T.m. (Control) | 3 | 1,887 | 3,213 |
| Con | (Control) | 2 | 2,030 | 3,275 |
| Sin | B.P. | 2 | 0,420 | 0,965 |
| Con | | 7 | 0,443 | 1,029 |
| Sin | G.ro | 2 | 0,000 | 0,000 |
| Con | | 5 | 0,000 | 0,000 |
| Sin | P.l. | 2 | 0,385 | 0,925 |
| Con | | 5 | 0,754 | 1,374 |
| Sin | P.v. | 2 | 0,000 | 0,000 |
| Con | | 3 | 0,000 | 0,000 |
| Sin | S.c. | 2 | 0,080 | 0,250 |
| Con | | 4 | 0,100 | 0,272 |
| Sin | S.b. | 2 | 0,235 | 1,065 |
| Con | | 5 | 0,280 | 1,330 |
| Sin | U.a. | 2 | 0,600 | 1,255 |
| Con | | 3 | 1,303 | 2,787 |

(Abreviaturas en página 53)

Al comparar en la Fig 4 la migración electroforética de las cepas queratinofílicas con el control observamos que *S. brumptii* muestra una banda similar a la de éste, estimándose su PM entre 38000 y 40000, en cambio para *U. atrum* y *B. piluliferum* se observó un conjunto de bandas entre 35000 y 40000, las cuales son más intensas para *U. atrum*. En *P. lilacinus* pudo apreciarse una banda muy nítida entre 40000 y 45000 y además una mucho más leve entre 38000 y 40000.

DISCUSION

Al estudiar las cepas queratinolíticas y queratinofílicas no observamos una alcalinización del medio como postula Ziegler (1964) y Ziegler y Böhme (1969), lo cual nos induce a pensar que la degradación de queratina no ocurriría por este mecanismo. Todas las cepas queratinolíticas tuvieron un comportamiento diferente al del control (*T. mentagrophytes*), salvo *G. reessii*, llama la atención en

este hecho que un hongo zoo-antropofílico tenga un comportamiento similar a un geofílico. En cambio para las queratinofílicas el comportamiento es similar tanto en los cultivos en agitación como estáticos. Las discrepancias posiblemente se deben a los patrones de crecimiento individuales de cada cepa (que influye en la variación de pH). Las similitudes para nosotros no tienen una clara interpretación por la metodología aplicada en este caso.

El incremento en la concentración de proteínas para las cepas queratinolíticas y queratinofílicas se atribuye a la liberación de proteasas por parte del hongo y a la acción de éstas sobre el pelo.

En las cepas queratinolíticas se muestran las diferencias en la concentración de proteínas entre las cepas parásitas (menor) y las saprofíticas (mayor), debido quizás a una restricción enzimática por la dependencia hacia el hospedero de las primeras. En cambio a las cepas saprofíticas su mayor dotación enzimática les permite enfrentar en mejor forma cambios nutricionales.

Al comparar la cepa *T. mentagrophytes* con las cepas queratinofílicas se observó una mayor concentración de proteínas en el control, esto se debe presumiblemente a su capacidad demostrada de queratinólisis (Yu y col. 1968, 1969, 1971).

Pensamos que la mayor concentración de proteínas que alcanzan *U. atrum* y *P. lilacinus* se debe a la activación de sistemas enzimáticos, con el fin de aprovechar el único sustrato que se encuentra en el medio como fuente de carbono y nitrógeno, lo que se explicaría por su ubicuidad y presencia constante en variados sustratos en la naturaleza que les confiere una alta capacidad de competencia, casi como las cepas especializadas para la degradación de este sustrato (queratina).

En la comparación de los cultivos en agitación y estáticos en cuanto a proteínas, la condición primera es significativa para *T. mentagrophytes* y *P. lilacinus*, lo que demostraría que para estas cepas en particular, la agitación es un factor que influye en la liberación de ellas, además *P. lilacinus* es comparable en cuanto a su incremento de proteínas a *T. mentagrophytes* (cepa clasificada como queratinolítica).

Sin embargo, en los grupos sulfhidrilos se observa una disminución de su concentración entre la primera y segunda alícuota (correspondiente a los 7 y 15 días para las queratinolíticas y a los 15 y 30 días para las queratinofílicas), atribuible a la oxidación de estos grupos tanto a sulfato como a sulfito, además de la oxidación de cisteína a cistina.

Lo anterior se comprueba al comparar las variaciones experimentadas por estos grupos para las cepas queratinolíticas y queratinofílicas respectivamente. Esta variable se ve influenciada por el proceso de agitación debido a que éste facilita la oxigenación en el medio de cultivo. Este hecho avala la hipótesis formulada por Kunert (1972) de

TABLA Nº 5

Daño estructural del pelo observado a microscopía óptica (100X) a los 15 y 30 días de cultivo en hongos queratinofílicos sin y con agitación, según acción del hongo*

| Condición | Cepa de Agitación Hongo | Nº de Muestra | Acción del Hongo | | | | | |
|-----------|-------------------------|---------------|------------------|-----------|--------|------------|--------|--------|
| | | | Intacto | Adeherido | | Erosionado | | |
| | | | 15 ds. | 30 ds. | 15 ds. | 30 ds. | 15 ds. | 30 ds. |
| Sin | T.m. | 3 | - | - | + | + | + | + |
| Con | | 2 | - | - | + | + | + | + |
| Sin | B.p. | 2 | - | - | + | + | - | ± |
| Con | | 7 | - | - | + | + | ± | ± |
| Sin | G.ro. | 2 | - | - | ± | + | - | - |
| Con | | 5 | - | - | + | + | - | - |
| Sin | P.l. | 2 | - | - | ± | + | - | ± |
| Con | | 5 | - | - | ± | + | - | + |
| Sin | P.v | 2 | + | - | - | + | - | - |
| Con | | 3 | - | - | ± | ± | - | - |
| Sin | S.c. | 2 | - | - | + | + | - | ± |
| Con | | 4 | - | - | + | + | - | + |
| Sin | S.b. | 2 | - | - | + | + | + | + |
| con | | 5 | - | - | + | + | + | + |
| Sin | U.a. | 2 | - | - | + | + | ± | + |
| Con | | 3 | - | - | + | + | + | + |

(-): negativo

(+): positivo

() : leve

* Se consideran los términos Intacto (no hay acción del hongo), Adherido (el hongo se observa rodeando el pelo o sobre él) y Erosión (evidencia de ruptura en la continuidad de la corteza).

que la sulfitolisis es un proceso previo a la acción enzimática, lo que ha sido demostrado además por otros autores (Alvarez Y Bracalenti 1984; Ruffin y col 1971 y Ragot 1969).

La observación microscópica del pelo, parámetro un tanto subjetivo, arrojó resultados que deben interpretarse con cautela. En los tiempos en que se efectuaron las observaciones, no se detectaron órganos perforadores (English 1965) seguramente debido a la agitación y a las características del medio de cultivo. Ante esto y sobre la base de los resultados anteriormente mencionados pensamos que la degradación de sustratos queratínicos no se basa sólo en la acción mecánica de penetración del micelio, sino que debe existir una acción conjunta con procesos proteolíticos y químicos.

Respecto a la actividad específica de las proteinas cabe hacer notar que se utilizó como sustrato pelo humano por su alto contenido en queratina. Analizando las cepas queratinolíticas se observó que todas presentan una actividad enzimática comparable a la del control, para el extracto purificado, pero ellas difieren estadísticamente. Sus valores fluctúan alrededor de 3.0 KU/mg. lo cual no es comparable con lo descrito en la literatura para las

cepas que han sido previamente estudiadas, (*M. canis* 7.7 KU/mg y *T. mentagrophytes* 4.02 KU/mg), realizados bajo la condición de agitación (Yu y col. 1969,1971; Takiuchi y col. 1981,1982,1984).

En las especies queratinofílicas en ambas condiciones de cultivo, se observa que la actividad específica es mucho menor que el control; en *P. verrucosa* y *G. roseum* no se detectó actividad enzimática lo que estaría indicando que bajo estas condiciones no producirían un complejo de proteasas capaz de degradar la queratina "in vitro".

Es importante destacar que las cepas queratinofílicas estudiadas en el presente trabajo no han sido analizadas desde este punto de vista por otros investigadores, de ahí que los valores de actividad específica no pueden ser comparados con una cepa queratinofílica como control.

Del electroforetograma para *T. mentagrophytes*, se deduce que la banda observada podría asignarse al complejo de enzimas extracelulares, queratinasas, descritas por Yu y col. (1969) ya que se encuentra en un rango de peso molecular semejante al definido por este autor. Este complejo enzimático fue utilizado como patrón electroforético,

ya que uno de queratinasa pura fue para nosotros imposible de obtener. La comparación con la cepa control indicó que *A. umbrinum* y *S. brumptii* presentan una banda que es prácticamente igual a la de éste; una levemente diferente (P.M. algo superior) se observó para *P. lilacinus*, además de bandas difusas para *Ch. tropicum*, *G. reessii*, *B. piluliferum* y *U. atrum*. En general, todas estas bandas por sus características electroforéticas y por lo descrito en la literatura, corresponden a una similar a la queratinasa aislada para *T. mentagrophytes*. Las diferencias obtenidas pueden deberse al proceso de purificación o las características intrínsecas de la cepa analizada.

Debido al número de cepas analizadas, no fue posible trabajar con cantidades mayores de medio de cultivo como se describe en la literatura. Esto fue una gran limitante, en la mejor caracterización de la enzima.

Las cepas queratinofílicas se cultivaron bajo dos condiciones; estática, que emula la condición saprofítica, y en agitación, que semeja la condición parasítica (Raubitschek 1962). Está última, favoreció la producción enzimática tanto para el control como para las cepas estudiadas.

CONCLUSIONES

Para la degradación de sustratos queratinosos,

en los hongos, parece ser necesaria la acción conjunta del efecto mecánico de penetración, un efecto químico ("sulfitolisis"), y uno enzimático por la acción de proteasas extracelulares.

Todas las bandas de migración electroforética analizadas pueden corresponder a queratinasas extracelulares, comparable al obtenido para *T. mentagrophytes*.

Las cepas queratinolíticas analizadas mostraron una actividad enzimática comparable (3.0 KU/mg), en cambio cinco de las siete queratinofílicas lo hicieron en menor grado.

La presencia de queratinasas en *A. umbrinum* y *G. reessii*, dos miembros de las *Onygenales* con un marcado hábitat coprófilo y por lo tanto con capacidades celulolíticas francas, confirmaría su actividad queratinolítica no descrita con anterioridad, aunque es conocida su filia por este sustrato.

Al parecer la competencia por la queratina no es exclusiva de las *Onygenales* y especies relacionadas, sino compartida por otros taxa como es el caso de *U. atrum* y *P. lilacinus*, especies de amplia difusión en diversos hábitats geofílicos. La presencia de hongos queratinofílicos en una gran variedad de suelos nos permite catalogar a algunos, como seguramente a muchos otros aún no estudiados enzimáticamente, como buenos competidores con especies más especializadas en varios sustratos proteicos semejantes o diferentes a la queratina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la aplicación del análisis estadístico por el Prof. Carlos F. Enríquez R. del Instituto de Matemática y Física de la Universidad de Valparaíso.

REFERENCIAS

- ALVAREZ, D. y BRACALENTI, B. (1984). Aislamiento de cepas queratinolíticas con modificación del anzuelo queratinoso. *Bol. Micol.* 2: 1 - 4.
- ANSARI, H. and STEVENS, L. (1983). Purification and properties of two neutral proteinases from *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microb.* 129: 1637 - 1644.
- CURRAH, R. (1985). Taxonomy on the *Onygenales*: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. In *Mycotaxon* 24: 1 - 216.
- DEHMUKH, S. and AGRAWAL, S. (1982). In vitro degradation of human hair by some keratinophilic fungi. *Mykosen* 25: 454 - 458.
- ENGLISH, M. (1965). The saprophytic growth of non-keratinophilic fungi on keratinised substrata, and a comparison with keratinophilic fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 48: 219 - 235.
- FILIPPELO, V. y LUPPI, A. (1980-81). Attività cheratinolitica in vitro di miceti isolati dalle sabbie di un arenile in un parco giochi. *Allione* 24: 127 - 131.
- GRAPPEL, S. and BLANK, F. (1972). Role of keratinases in dermatophytosis. *Dermatologia* 145: 245 - 255.
- KUNERT, J. (1972). Keratin decomposition by dermatophytes: Evidence of the sulphitolysis of the protein. *Experientia* 1025 - 1026.

- KUNERT, J. (1975). Formation of sulphate, sulphite and S-sulphocysteine by the fungus *Microsporium gypseum* during growth on cystine. *Folia Microbiol.* 20: 142 - 151.
- KUNERT, J. (1981). Organic sulphur sources for the growth of the dermatophyte *Microsporium gypseum*. *Folia Microbiol.* 26: 201-206.
- LAEMMLI, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680-685.
- LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In *methods in enzymology* (Edited by Colowick, S. and Kaplan, N.) Ed. Academic Press New York: 447 - 454.
- MC GINNIS, M. (1982). *Clinical Mycology Laboratory Procedure Manual*. North Carolina Memorial Hospital Chapel Hill, North Carolina.
- NICKERSON, W. and DURAND, S. (1963). Keratinase II. Properties of the crystalline enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 77: 87 - 99.
- NOVAL, J. and NICKERSON, W. (1959). The decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 77: 251 - 263.
- ORR, G. (1969). Keratinophilic fungi isolated from soil by modified hair bait technique. *Sabouraudia* 7: 129 - 134.
- RAGOT, J. (1966). Activité kératolytique du *Keratinomyces ajelloi* Vanbr. sur la laine non dénaturée. *C. R. Acad. Sc. Paris*. 262: 412 - 415.
- RAUBITSCHKE, F. (1962). Organic sulphur and the keratinophilia of dermatophytes. Preliminary report. *Sabouraudia* 2: 40 - 42.
- RUFFIN, M., ANDRIEU, M., MOSCHATTO, Y. et Biserte, G. (1971). Les enzymes kératolytiques de *Keratinomyces ajelloi*: étude électrophorétique comparative en fonction du temps de culture et de la nature du substrat. *C.R. Acad.Sc. Paris*. 272: 1908-1911.
- SANYAL, A., DAS, S. and BANERJES, A. (1985). Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia* 23: 165 - 178.
- SAVILLE, B. (1958). A scheme for colorimetric determination of microgram amount of thiols. *Analyst* 83: 670 - 672.
- TAKIUCHI, I., IGUCHI, D. and MAKOTO, N. (1981). The effect of keratinase on human epidermis, especially on stratum corneum. *Jap. J. Dermatol.* 91: 119 - 125.
- TAKIUCKI, I., SEI, Y., TAKAGI, H. and NEGI, M. (1984). Partial characterization of the exocellular keratinase from *Microsporium canis*. *Sabouraudia* 22: 219 - 294.
- VRIES, G. de (1962). Keratinophilic fungi and their action. *Antonie van Leeuwenhoek* 28: 112 - 123.
- WAWRZKIEWICZ, K., LOBARZEWSKI, J. and WOLSKI, T. (1987). Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 261 - 268.
- WEARY, P. and CANBY, Ch. (1969). Further observations on the keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleinii* and *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.* 53: 58 - 63.
- WEARY, P., CANBY, CH. and CAWLEY, E. (1965). Keratinolytic activity of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. *J. Invest. Dermatol.* 44: 300 - 310.
- YU, R., HARMON, S. and BLANK, F. (1968). Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* 96: 1435 - 1436.
- YU, R., HARMON, S. and BLANCK, F. (1969a). Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Invest. Dermatol.* 53: 166 - 171.
- YU, R., HARMON, S., GRAPPEL, S. and BLANCK, F. (1971). Two cellbound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Invest. Dermatol.* 56: 27 - 32.
- ZIEGLER, H. und BÖHME, H. (1969). Über die aktive Alkalisierung des Terrains als physiologisches Prinzip bei der Keratinolyse durch Dermatophyten. *Dermatol. Mschr.* 155: 178 - 181.