

93
20J.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Obtención y Caracterización de Tricofitina para Reacciones Intradérmicas



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de:
Química Farmacéutica Bióloga

P R E S E N T A :

Silvia Edith Mendoza Villalobos

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	
A. Hongos	13
B. Medios de cultivo	13
C. Determinación de la fase logarítmica de crecimiento de los hongos	14
D. Obtención del antígeno	15
E. Geles de poliacrilamida	16
F. Infección experimental en cobayos	17
G. Prueba inmunológica (IDR)	18
H. Análisis estadístico	19
RESULTADOS	20
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	25
LISTA DE TABLAS.....	30
LISTA DE FIGURAS.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	48

INTRODUCCION

Las infecciones dermatológicas causadas por dermatofitos se han descrito desde la antigüedad. Los Griegos nombraron a este padecimiento herpes, debido a que el crecimiento fúngico en la piel y cuero cabelludo es aproximadamente igual en todas direcciones y las lesiones producidas tienden a expandirse en una forma circular o anillada. Los Romanos asociaron las lesiones con insectos y lo nombraron tinea, que significa cualquier larva de insecto pequeño. El término inglés "ring-worm" es la combinación de los términos griego y latino (38).

Una de las más desfigurantes infecciones por dermatofitos es el padecimiento del favus. La inflamación crónica, pérdida de cabello, reemplazamiento del cuero cabelludo por tejido cicatricial, y la formación de escútuas costrosas ha sido conocida en Europa y el área del Mediterráneo desde tiempos clásicos. En 1834, Remak (37) examinó material proveniente de favus y notó la presencia de filamentos que parecían mohos. Trató de reproducir el padecimiento en su brazo, frotando el organismo en su piel, pero falló. En 1839, Schoenlein (41) describió los filamentos y concluyó que el favus era un padecimiento causado por plantas. David Gruby (1841) (22) aisló al hongo del favus a partir de rebanadas de papa y produjo el padecimiento inoculando el hongo en piel normal; de esta manera, él fué el primero en establecer que un

microorganismo es responsable de un padecimiento humano (40 años antes de Koch). En 1890, Sabouraud (39) comenzó a publicar sus estudios sistemáticos y científicos en dermatofitosis. En 1910 publicó "Les Teignes" (40), en donde se incluyó un sistema de clasificación, reconociendo 3 géneros de dermatofitos: Microsporum, Trichophyton y Epidermophyton.

Durante los siguientes años, se describieron nuevas especies basadas en diferencias triviales como el color de la colonia, morfología, tamaño de las esporas o su arreglo, así como el tipo, extensión, topografía y respuestas del padecimiento inflamatorio y terapéutica; estas especies fueron aisladas de todo tipo de padecimientos humanos. Fue en 1920 cuando Hopkins y Benham comenzaron el estudio científico de la Micología médica. Gentles (12) en 1958, publicó la curación de dermatofitosis experimentales en un cobayo por medio de la administración oral de griseofulvina. Después se estandarizó la dosis y es hasta la fecha el tratamiento de elección para las tiñas de la cabeza.

Los dermatofitos han sido estudiados en México por varios micólogos como González-Ochoa (15), Lavalley (29,30) y Peniche (34).

Las dermatofitosis son infecciones producidas por hongos queratinofílicos en los tejidos queratinizados como uñas, pelo y estrato córneo de la piel. Es la micosis más ampliamente distribuida en el mundo e incluye varias

entidades clínicas, dependiendo del sitio anatómico y el agente etiológico involucrado, como las tiñas de la cabeza (Tinea capitis), de la barba o bigote (Tinea barbae), de los pies (Tinea pedis), etc.

La patología inducida en el hospedero inicialmente es una respuesta eczematosa, seguida de alergia y manifestaciones inflamatorias. El tipo y severidad de estas reacciones se relacionan con el estado inmunológico del hospedero, así como con la especie y cepa del organismo causante de la infección. Los géneros comprendidos en el grupo de hongos denominados dermatofitos son: Trichophyton, Microsporum y Epidermophyton.

Género Trichophyton (Malmsten 1845). Presenta abundantes microconidios que miden 2-4 μm y presentan diferentes formas (piriformes, esféricas o claviformes); tiene pocos macroconidios en forma de clava o puro que miden 40-50 μm de largo X 5-10 μm de ancho, tienen paredes delgadas y lisas (1-2 μm) con septos transversales (3-5 μm) dependiendo de la especie.

Género Microsporum (Gruby 1843). Presenta abundantes macroconidios con diferentes formas: fusiformes, claviformes, ovales, etc., que miden 40-60 μm de largo X 5-15 μm de ancho, con paredes gruesas (3-5 μm) y septos transversales que varían en número dependiendo de la especie.

Género Epidermophyton (Sabouraud 1907). Presenta macroconidios claviformes y achatados por la punta con una

pared delgada que miden 7-12 μm de ancho X 20-40 μm de largo y no presenta microconidios.

Existen 3 tipos de hábitat predominantes para los dermatofitos y de acuerdo a éste, se clasifican en geofílicos, zoofílicos y antropofílicos, teniendo en cuenta que no es exclusivo y que pudiera explicar la frecuencia de estas micosis en el mundo.

Debido a que estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en todos lados, siendo las dermatofitosis las micosis más frecuentes, los antígenos derivados de los dermatofitos denominados en forma general como tricofitinas, son una herramienta para medir respuesta inmune celular en el humano, y ésta aunada a otros antígenos proporcionan una batería de ellos para evaluar la inmunocompetencia en la población.

El antígeno denominado tricofitina, se obtiene a partir del filtrado del cultivo o del extracto micelial de los dermatofitos más comúnmente aislados del hombre. La composición química de antígenos de filtrados de cultivo producidos por una misma cepa, difiere dependiendo de las condiciones de crecimiento del hongo como lo son el sustrato, la tensión de oxígeno, etc (28). Esto mismo ha sido observado en antígenos preparados de otros hongos (1).

Diversos investigadores han identificado varios componentes de las tricofitinas, mediante técnicas físicas y químicas. Estas están compuestas básicamente de glicopéptidos (2-4), polisacáridos (5-8) y enzimas

proteolíticas (16).

Los primeros estudios enfocados hacia la separación y caracterización de los componentes antigénicos de estos hongos, fueron hechos por Bloch et al. (9) quienes identificaron como componente activo de la tricofitina a un polisacárido que contenía nitrógeno. También se han determinado fracciones proteicas (2) y enzimas proteolíticas (17) como responsables de la reacción de hipersensibilidad de tipo tardío.

Los estudios realizados por Bishop et al. (5-8) y más tarde por Grappel et al. (19), revelaron que las estructuras presentes en los polisacáridos correspondían a 2 galactomananas (I y II) y una glucana. Las galactomananas I tuvieron grupos terminales no reductores de D-galactofuranosa y D-manopiranososa, y enlaces 1-6 entre las D-manopiranosas. Sin embargo, las galactomananas II contenían un alto porcentaje de unidades D-manopiranososa 1-2 en las porciones lineares, las cuales no se presentaban en las galactomananas I.

Otros investigadores iniciaron estudios, para poder establecer alguna relación entre las estructuras de los componentes de la tricofitina y su actividad inmunológica.

Nozawa et al. (33) demostraron en pacientes con dermatofitosis 2 tipos de reacciones de hipersensibilidad (inmediata y tardía), hacia los complejos polisacárido-péptidos de T. mentagrophytes. Al realizar una digestión proteolítica, la hipersensibilidad de tipo tardío disminuyó

al 54% y casi no afectó la de tipo inmediato. También se probó suero de conejo con el extracto, y las reacciones de precipitación no se afectaron por la digestión proteolítica, lo que indicó la importancia de la fracción de carbohidratos de la molécula en la reacción serológica.

Grappel et al (16-21) utilizaron queratinasas I y II inactivadas con calor como antígenos en pruebas dérmicas. Las queratinasas utilizadas eran extracelulares y ligadas a la célula y ambas produjeron reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío, en cobayos sensibilizados por infección cutánea dorsal con T. mentagrophytes var. granulosum. Las reacciones que se produjeron fueron mayores a las producidas por tricofitinas comerciales.

Barker et al.(2), demostraron 2 tipos de reacciones de hipersensibilidad en cobayos sensibilizados con T. mentagrophytes y establecieron que las reacciones de hipersensibilidad inmediata y de tipo tardío estaban relacionadas a las fracciones carbohidrato y peptídica de sus glicopéptidos respectivamente, ya que se encontró que la degradación de la fracción carbohidrato de los glicopéptidos de T. mentagrophytes por oxidación con periodato, disminuyó la reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato; y la degradación de la fracción peptídica con enzimas proteolíticas, disminuyó la reacción de tipo tardío. Se concluyó que los glicopéptidos no eran específicos de cada especie, ya que animales sensibilizados con especies tanto homólogas como heterólogas dieron una reacción cutánea de

hipersensibilidad positiva.

En vista de la comprobación en modelos experimentales de que estos antígenos inducen una respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío (HTT) y dada la ubicuidad de estos hongos en la naturaleza, este tipo de antígeno ha venido siendo utilizado ampliamente en el hombre, para medir este tipo de respuesta inmune.

La HTT es una reacción inmunitaria mediada por células que puede ser provocada por la inyección intradérmica de un antígeno, con un infiltrado celular subsiguiente y edema que son máximos a las 24-48 h después del desafío con el antígeno. Esta reacción, cuando es utilizada para investigar una enfermedad infecciosa, no necesariamente implica la enfermedad con el agente con el cual está siendo provocada, sino un contacto inmunosensibilizante. La inducción de la HTT depende de múltiples factores como la ruta de inmunización, la dosis, la inmunogenicidad del antígeno y el grado de conjugación de haptenos con proteínas, ya que los antígenos que se utilizan generalmente son proteínas o conjugados hapteno-proteicos (16). Esta reacción se utiliza con gran diversidad de antígenos para medir la respuesta inmune celular en el hospedero.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la alta frecuencia de las dermatofitosis en el hombre, la ubicuidad de los dermatofitos en la naturaleza y la demostración de la reactividad inmunológica como una reacción de hipersensibilidad de tipo tardío a antígenos derivados de estos hongos, así como su utilización con antígenos de desafío para observar inmunocompetencia del individuo, y la ausencia de este tipo de antígenos en México, se planteó la necesidad de obtener antígenos aislados de los hongos que con mayor frecuencia causan dermatofitosis en el país, caracterizarlos para determinar las condiciones ideales de obtención de antígenos y demostrar su reactividad inmune.

OBJETIVOS

a) Determinar las condiciones óptimas para la obtención de antígenos de dermatofitos para su utilidad en la prueba de hipersensibilidad de tipo tardío.

b) Analizar diferencias y similitudes en la composición de los diferentes lotes de tricofitina.

c) Demostrar actividad inmunológica en los lotes de antígenos, por medio de la intradermoreacción en cobayos infectados y en diferentes poblaciones de individuos.

MATERIALES Y METODOS

A. Hongos

Para la obtención de la tricofitina se utilizaron los tres dermatofitos más frecuentes en México : Trichophyton rubrum (EH-150), T. mentagrophytes (EH-151) y Microsporum canis (EH-152). Las cepas provienen del cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, las cuales se aislaron de casos humanos de dermatofitosis en México. Estas se mantuvieron en medio de conservación (peptona 1%, glucosa 0.2% y agar 1.5%) a 4°C.

B. Medios de cultivo

Los hongos se sembraron y mantuvieron en medio sólido de Sabouraud (Bioxón de México). El medio utilizado en la obtención del antígeno fué el medio líquido de Sabouraud dializado. Para su preparación se disolvieron 10 g de peptona en 100 ml de agua destilada, y se dializó utilizando un tubo de diálisis de 12,000-14,000 de PM (Sigma ,St. Louis, MO) contra 300 ml de agua destilada durante 24 h a 4°C con agitación. Al dializado se le agregó 40 g de dextrosa anhidra (Sigma), se completó a un litro con agua destilada y se esterilizó a 121°C durante 15 min.

C. Determinación de la fase logarítmica de crecimiento de los hongos

Para conocer el tiempo en el cual los hongos se encontraban al final de su fase logarítmica y poder obtener los antígenos en esta fase, se realizaron curvas de crecimiento para cada uno de los hongos, por medio de la técnica del consumo de glucosa a través de su determinación por el método de Dawes et al. (11). Para estandarizar el inóculo, se sembraron precultivos en el medio de Sabouraud dializado. Al cabo de 15 días de incubación a 28°C, la masa micelial se fragmentó con un homogeneizador de tejidos Tekmar (Tekmar Co, OH) a velocidad media (No. 3) durante 2 min (44). Este micelio homogeneizado se inoculó a una concentración del 5% en matraces Erlenmeyer de un litro conteniendo 250 ml de medio de Sabouraud dializado. Para observar las mejores condiciones de cultivo, se incubaron 2 matraces en agitación y 2 en condiciones estáticas a 28°C. Se tomaron muestras diarias (2 ml) durante 15 días. Las muestras se centrifugaron y al sobrenadante se le determinó la concentración de glucosa. Todos estos experimentos se realizaron para cada hongo y se hicieron por duplicado.

D. Obtención del antígeno

El antígeno utilizado consistió en el filtrado del cultivo de cada hongo. Con base en los resultados de las curvas de crecimiento, se incubaron los cultivos durante 7 días para *M. canis* y *T. mentagrophytes* y durante 11 días para *T. rubrum* a 28°C en agitación. Al cabo de este tiempo, se les agregó una solución de 0.02% de timerosal (concentración final) durante 48 h a 28°C. Antes del porcesamiento del antígeno se hicieron pruebas de viabilidad y se confirmaron las características microscópicas del hongo. Se separó el micelio por medio de filtración con equipo Millipore (membranas 0.45 μ m, Millipore Co, Ma). El filtrado se dializó y concentró a 10 veces su volumen inicial, por medio de ultrafiltración con el equipo Minitan modelo 7015-21 (Millipore) con una membrana PK10,000. El concentrado así obtenido corresponde al antígeno. Este se esterilizó por filtración, se separó en alícuotas y se almacenó a -70°C hasta su utilización. Se obtuvieron 10 lotes por cada hongo en las condiciones establecidas. A todos los antígenos obtenidos se les determinó proteínas (31) y carbohidratos totales (13).

E. Geles de poliacrilamida

Para analizar las fracciones presentes en las preparaciones antigénicas, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en un aparato Phast System (Pharmacia LKB, Sweden) utilizando geles que medían 43x50x0.45 mm, con gradiente de 10-15% de poliacrilamida y un sistema de buffer de acetato 0.112M, Tris 0.112M, pH 6.4. Los antígenos se mezclaron con el buffer de la muestra en cantidades iguales; éste contenía Tris/HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0, SDS 2.5%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01%. Se calentaron a 100°C por 5 minutos, y se aplicaron en los pozos conteniendo 20 μ g prot/ μ l. Se utilizaron estándares de peso molecular con un rango de 66,000 - 14,200 para facilitar la comparación con las bandas obtenidas. La separación se llevó a cabo con una corriente de 10mA, 250V, 15°C hasta que el indicador hubiera recorrido casi en su totalidad el largo del gel. Posteriormente, se retiró el gel y se colocó en la cámara teñidora, donde se tiñó por el método de la plata (24). Para poder medir el peso molecular de las bandas obtenidas, se hizo una gráfica de los Rf (Rf=distancia de la banda desde el origen entre la distancia del origen al punto de referencia), contra los pesos moleculares de los estándares; en la cual se interpolaron los Rf de cada banda y así poder calcular su peso molecular.

F. Infección experimental en cobayos

Para probar la actividad inmunológica de los antígenos, se desarrollaron dos modelos experimentales en cobayos Hartley de 350-500 g. La primera según Poulain et al (36) y la segunda según Fujita et al (14). Se infectaron los animales con T. mentagrophytes y M. canis, dermatofitos zoofilicos, y se utilizó un cobayo sin infectar como testigo.

El método de Poulain et al (36) consistió de la masa micelial del hongo obtenido después de 2 semanas de incubación en medio de Sabouraud líquido a 28°C, se separó el crecimiento micelial y se machacó en un mortero con una cantidad de miel que le diera una consistencia pastosa a la mezcla y procurando que quedaran pedazos pequeños de micelio. Los cobayos fueron rasurados en una pequeña parte del lomo, para poder aplicar la mezcla preparada y después se cubrió esta parte con un pedazo de gasa y cinta adhesiva. Se dejó el inóculo en el animal durante 7 días, tiempo al cabo del cual, se descubrió el lomo del animal y se verificó la infección experimental por medio de examen directo con KOH y cultivo de las escamas en agar de Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida.

La segunda técnica de Fujita et al (14), consistió en preparar a partir de un cultivo de 15 días una suspensión de microconidios de T. mentagrophytes, en solución salina de fosfatos (PBS); se midieron 50 μ l de ésta y se colocaron en

un pequeño disco de papel filtro, el cual estaba cubierto con papel aluminio por una de sus caras. Se fijó con cinta adhesiva a la parte plantar de la pata del cobayo previamente limpia con alcohol etílico al 80%. Por un período de 7 días se mantuvo expuesta la pata del cobayo al hongo, para posteriormente poder observar las lesiones típicas de dermatofitosis de igual manera que la anterior.

G. Prueba inmunológica (Intradermoreacción-IDR)

Para la IDR se utilizaron los 10 lotes de tricofitina de cada especie estudiada, obtenidas de acuerdo a la técnica descrita anteriormente. Se empleó el antígeno de cada hongo, así como una mezcla de los tres en cantidades iguales (1:1:1). Se probaron tres concentraciones diferentes de proteína/0.1 ml de solución salina (2.5, 5 y 10 μ g) estéril para los antígenos y de 4 μ g proteína/0.1 ml para cada uno de los antígenos de la mezcla. Las pruebas se realizaron aplicando 0.1 ml del antígeno intradérmicamente en el lomo rasurado de cada animal, previamente infectado como se describió en el inciso anterior. Se leyeron las pruebas a las 24 y 48 h, considerándose positiva la reacción con un eritema e induración igual o mayor de 5 mm. Se aplicó también 0.1 ml de una solución salina testigo. Los antígenos también fueron ensayados en cobayos testigos normales.

H. Análisis estadístico

Los resultados de las IDR utilizando los antígenos derivados de cada hongo y las mezclas de los tres, se analizaron por medio de la prueba de análisis de varianza (10). Los datos se manejaron en 4 grupos con 10 valores cada uno y el método utilizado fué el de confianza de intervalos, con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

Los dermatofitos utilizados en el presente trabajo presentaron la morfología macro y microscópica característica de cada género:

T. mentagrophytes EH-151 presentó colonias pulverulentas de color blanco, forma irregular y algunos surcos irregulares en su superficie, en el reverso de la caja un color canela pálido; microscópicamente presentó abundante micelio delgado y tabicado, abundantes microconidios redondos o piriformes que nacen de las hifas dispuestas en forma alterna o en cruces de Lorena (Fig. 2).

T. rubrum EH-150 presentó colonias blancas algodonosas que conforme pasa el tiempo se vuelven pulverulentas y mostraron surcos radiales, además de producir un color rojo que se difunde en el medio de cultivo; microscópicamente presentó abundantes hifas delgadas, tabicadas, microconidios piriformes que se disponen en el micelio en forma alternada principalmente; tiene escasos macroconidios de forma alargada, con un extremo redondeado (Fig. 3).

M. canis EH-152 presentó colonias algodonosas irregulares y un color amarillo que se pudo observar en el reverso de la caja; microscópicamente presentó abundante micelio, hifas delgadas tabicadas y ramificadas, gran cantidad de macroconidios en forma de huso con una membrana

gruesa, equinulada y con varios septos (Fig. 4); los microconidios son muy escasos.

El método de estandarización del inóculo mediante la homogeneización por medio del homogeneizador de tejidos Tekmar, dió buen resultado para la obtención de curvas de crecimiento reproducibles, y la utilización del 5% de inóculo redujo la fase lag. Los resultados de las curvas mostraron que en condiciones de agitación, los 3 hongos estudiados alcanzaban mayor crecimiento (Figs. 5-7). Por lo tanto, el cultivo de los hongos para la obtención de antígenos se hizo a partir de los cultivos de los hongos en agitación. Así mismo, mostraron que el final de la fase logarítmica en las condiciones estipuladas en material y métodos se alcanzaba a los 7 días para T. mentagrophytes y M. canis (Figs. 5 y 7) y a los 11 días para T. rubrum (Fig. 6). De acuerdo a estos resultados, se obtuvieron 10 lotes de antígeno por cada hongo al final de la fase logarítmica de crecimiento, para obtener reproducibilidad en los antígenos.

La concentración de proteínas y carbohidratos de cada antígeno se muestra en la tabla 1, donde se puede observar variabilidad entre los diferentes lotes tanto para proteínas como para carbohidratos.

La infección experimental en los cobayos se llevó a cabo solamente con T. mentagrophytes, que corresponde a uno de los dermatofitos zoofílicos estudiados. El primer método desarrollado con una suspensión del hongo en miel (36), les

causó las lesiones típicas de la enfermedad como son lesiones circulares con bordes activos que se van extendiendo, descamando y por último se presenta una pseudoalopecia. Estas lesiones se obtuvieron a los 7-10 días de la inoculación. Se observaron filamentos característicos en el examen directo de las escamas y se realizó T. mentagrophytes de las lesiones.

Con el segundo método según Fujita et al (14), utilizando los parches con conidios, no se pudieron obtener las lesiones típicas de dermatofitosis. Para el ensayo de las preparaciones antigénicas, en la IDR sólo se utilizaron los cobayos infectados con la técnica de Poulain et al (36).

Se probó la reactividad inmunológica de los antígenos obtenidos, así como mezclas de ellos en los animales con la dermatofitosis experimental. Inicialmente se probaron diferentes dosis (2.5, 5 y 10 μg proteína/0.1ml) para determinar la dosis óptima. Los resultados de las primeras pruebas mostraron que la mejor dosis fué la de 10 μg prot./0.1ml y por consiguiente, esta dosis fué la que se aplicó con el resto de los antígenos. Las mezclas se aplicaron en dosis de 4 μg prot/0.1 ml por hongo. Los resultados de las IDR se observan en la Tabla 2, considerando una induración de ≥ 5 mm, de 10 lotes de T. mentagrophytes 5 fueron positivas; de 10 lotes de T. rubrum 8 fueron positivas; de 10 lotes de M. canis 3 fueron positivas; y de 10 lotes de las diferentes mezclas 7 fueron positivas.

La tricofitina derivada de T. rubrum fué ensayada en diversos grupos de individuos voluntarios. Los resultados se pueden observar en la Tabla 3. Se encontró que en personas sanas, un 30.1% mostró positividad a la intradermoreacción con tricofitina; en pacientes con dermatofitosis crónica un 24%; en un grupo VIH (+) SIDA un 12%; en un grupo de homosexuales VIH (-) un 25% y en un grupo de heterosexuales un 35%.

El análisis estadístico a través de la prueba de análisis de varianza (10), mostró que no había diferencia significativa al aplicar la IDR en los cobayos infectados, al utilizar la tricofitina derivada de un sólo hongo, o al utilizar una mezcla de los tres.

Posteriormente se hizo un análisis de los lotes de antígeno por electroforesis, en geles de poliacrilamida para observar las diferentes fracciones en los antígenos. Los resultados representativos de los lotes 110, 115, 116 y 124 de T. mentagrophytes, 112, 119, 133, 135, 136 y 139 de T. rubrum y 111 y 118 de M. canis, se muestran en las Figs. 8 y 9 en donde se pueden observar la presencia de múltiples bandas en todos los lotes de antígeno que corresponden a fracciones de 14 a 66 kDa . Aparecen además otras bandas de pesos moleculares superiores a 66 kDa. Al tefir los geles de acrilamida con la coloración de azul de Coomassie para proteínas, no se observó ninguna banda. Por el contrario, cuando se utilizó la coloración de plata se encontró una

gran diversidad de bandas presentes en los antígenos, las cuales están ennumeradas en la tabla 4.

En los diferentes lotes de cada hongo, que presentaron la prueba de intradermoreacción positiva en los cobayos infectados, se pudieron observar múltiples bandas en el rango de 66 a 14 kDa de peso molecular. Los lotes de antígenos de *T. rubrum* y *M. canis*, presentaron una mayor diversidad de patrones electroforéticos que los correspondientes a *T. mentagrophytes*. Sin embargo, no se pudo correlacionar la presencia de alguna(s) banda(s) con la actividad de intradermoreacción.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Recientemente Vincent et al (43), a través del análisis de fragmentos de restricción del DNA nuclear y mitocondrial demostraron tres grupos diferentes en 25 cepas de Histoplasma capsulatum. Uno de ellos incluye una sola cepa de baja virulencia, otro que engloba cepas de Norteamérica y el tercero con cepas de Centro y Sudamérica. Este estudio viene a corroborar el hecho ampliamente conocido, sobre las diferencias entre cepas de diversas regiones del mundo que pueden manifestarse a través de un comportamiento antigénico diversificado. Por ésto, las cepas utilizadas en este estudio fueron aisladas de casos autóctonos y seleccionadas por su estabilidad para producir moléculas con actividad biológica, para estandarizar la tricofitina y su utilización en la prueba inmunológica de intradermoreacción en centros hospitalarios del país.

Haan (23) observó en los dermatofitos y en especial T. rubrum, que presenta un mejor crecimiento en condiciones de agitación. Este autor sugiere que la agitación provee una mayor tensión de oxígeno en el medio, lo que incide en un crecimiento mayor de los hongos. Este mismo comportamiento se observó en los tres hongos estudiados a través del análisis de sus curvas de crecimiento. Tomando en consideración los trabajos de Arenas y Toriello (1) y Pérez-Mejía y Toriello (35) con

antígenos de Sporothrix schenckii y Aspergillus spp respectivamente, donde obtienen la mayor reactividad inmunológica al final de la fase logarítmica de crecimiento, se obtuvieron los antígenos de esta misma fase de crecimiento de los hongos.

La variación encontrada en la concentración de proteínas y carbohidratos de los diferentes lotes del mismo antígeno, a pesar de utilizar las mismas condiciones de cultivo, impide su correcta estandarización, lo cual ha sido observada en otros hongos (25).

En los trabajos realizados por Tucker y Noble (42) sobre patrones electroforéticos en diversas especies de Microsporium, encontraron bandas de pesos moleculares entre 16 y 132 kDa, las cuales tiñeron con azul de Coomassie. En este trabajo no se observaron bandas con el uso de este colorante, y la explicación podría ser que Tucker y Noble (42), utilizaron un cóctel de inhibidores de proteasas al momento de preparar sus extractos fúngicos, lo cual no fué realizado por nosotros, ya que estas preparaciones serían utilizadas en pruebas de IDR. Estos autores pusieron de manifiesto los problemas particulares concernientes a las proteínas de los dermatofitos, debido a que las proteasas intrínsecas de cada uno degradan las preparaciones; todavía faltaría elucidar un cóctel de inhibidores para minimizar la alteración en la posición de las bandas. En nuestro estudio se observaron gran diversidad de bandas en los geles de

poliacrilamida. No se observó ningún patrón electroforético específico para cada hongo estudiado, sin embargo, en general se pudieron observar un menor número de bandas electroforéticas para los lotes de T. mentagrophytes que para T. rubrum y M. canis (Tabla 4). El análisis de las bandas de los 10 lotes de antígeno de cada especie, mostró que T. mentagrophytes fué el que presentó la menor reproducibilidad.

Diversos estudios sobre la composición de antígenos de dermatofitos, han demostrado que contienen carbohidratos unidos a proteínas. Entre los primeros estudios realizados al respecto, fué el de Bloch et al (9) quienes identificaron el componente activo de la "tricofitina" como un polisacárido conteniendo nitrógeno. Desde entonces se han realizado diversos trabajos, que han mostrado las fracciones de polisacáridos con proteína en la tricofitina, que provocan reacciones de hipersensibilidad tardía en animales sensibilizados (2). Ito (26,27) mostró la complejidad de la tricofitina, aislando 22 fracciones del filtrado del cultivo de T. mentagrophytes var. asteroides por extracción con fenol y cromatografía en Sephadex. Barker et al (3,4) aislaron glicopéptidos de dermatofitos, entre ellos, un péptido-galactomanana del micelio de T. mentagrophytes y demostraron reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía en cobayos sensibilizados con micelio completo de T. mentagrophytes (reacción tipo tricofitina). Así mismo,

Moser y Pollack (32) aislaron glicopéptidos de T. mentagrophytes, T. rubrum y M. canis por cromatografía de intercambio iónico. Las pruebas con los glucopéptidos y manopéptidos en cobayos sensibilizados, indicaron que sólo los manopéptidos inducían una reacción de hipersensibilidad de tipo tardía. Estos investigadores observaron que infecciones repetidas o la duración de la misma, no tenía efecto en el tamaño de la respuesta cutánea. Los manopéptidos no dieron respuesta cruzada entre géneros cuando se probaron en cobayos infectados con Trichophyton y con Microsporium.

En este trabajo se puso de manifiesto la reactividad inmunológica de las tricofitinas obtenidas en los cobayos infectados con T. mentagrophytes, a través de la IDR. Al igual que Moser y Pollack (32), se observó reacción cruzada entre los tres hongos estudiados, ya que las tricofitinas aisladas de los otros dos dermatofitos, T. rubrum y M. canis, dieron IDR positiva al probarlas en el cobayo infectado con T. mentagrophytes. En este experimento se volvió a detectar la falta de reproducibilidad por lote. Sin embargo, se pudo observar que el mayor número de lotes con respuesta en la IDR fué la tricofitina derivada de T. rubrum (Tabla 2), a pesar que los cobayos fueron infectados experimentalmente con T. mentagrophytes por ser éste zoofílico.

Para probar si los antígenos estudiados tenían utilidad para medir hipersensibilidad de tipo tardía en el hombre, se

tomó una población de adultos voluntarios y se probó la tricofitina derivada de T. rubrum. Se observó que el 30% de esta población sana daba una IDR positiva. Esto contrasta con la respuesta de IDR a otro antígeno para medir respuesta inmune celular in vivo como lo es la candidina, que en una población normal presenta un 60 a 80% de positividad (Lechuga y Toriello, com. pers.). Esto se explica por el comensalismo de Candida albicans en el cuerpo humano, lo que no sucede con los dermatofitos que son patógenos primarios.

En conclusión, se demostró que la tricofitina aislada de los dermatofitos T. mentagrophytes, T. rubrum y M. canis, presenta reactividad inmunológica a través de la IDR en los cobayos infectados, así como en grupos de voluntarios humanos. El análisis de sus componentes a través de la inmunoelectroforesis en geles de acrilamida, presentó bandas de pesos moleculares de 14 a 66 kDa, sin embargo no se pudo correlacionar ninguna con la reactividad en IDR. El análisis estadístico de los resultados de las IDR, mostró que no había diferencia significativa al utilizar solamente la tricofitina de un sólo hongo o una mezcla de los tres. Sin embargo, la tricofitina derivada de T. rubrum, fué la que mostró una mayor frecuencia de positividad en el modelo animal utilizado.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de carbohidratos y proteínas en antígenos de dermatofitos.

Tabla 2. Resultados de las intradermoreacciones en los cobayos infectados.

Tabla 3. Resultados de las IDR en diferentes grupos de individuos.

Tabla 4. Pesos moleculares de las bandas encontradas en la electroforesis de los antígenos.

T A B L A S

TABLA 1. Concentración de proteínas y carbohidratos en los lotes de antígenos estudiados

Núm. lote	Proteínas mg/ml	Carbohidratos mg/ml
<u>Trichophyton mentagrophytes</u>		
T110	2.7	2.5
T114	6.5	2.0
T116	4.4	1.0
T115	5.7	2.2
T120	7.2	3.7
T122	5.6	3.4
T123	3.9	3.7
T124	6.6	4.1
T125	3.8	3.6
T126	5.4	3.8
<u>T. rubrum</u>		
T112	1.5	1.2
T119	5.2	1.4
T132	7.4	3.9
T133	7.6	4.3
T134	8.6	3.9
T135	7.9	4.2
T136	5.8	4.3
T137	8.6	5.1
T138	5.1	1.3
T139	2.9	2.5
<u>M. canis</u>		
T111	3.4	2.1
T113	7.5	3.4
T117	2.9	1.7
T121	6.2	5.4
T118	4.3	2.7
T127	4.8	2.4
T128	8.7	5.7
T129	8.0	3.9
T130	8.3	4.4
T131	5.6	2.8

Tabla 2
Resultado de las pruebas de intradermoreacción
(IDR) con las tricofitinas obtenidas en cobayos infectados
Trichophyton mentagrophytes

Antígeno No. lote	IDR (mm)
<u>T. mentagrophytes</u>	
110	5.6
114	4.4
116	4.1
115	6.0
120	neg
122	2.9
123	5.3
124	5.6
125	3.5
126	7.6
<u>T. rubrum</u>	
112	5.3
119	4.1
132	3.6
133	8.5
134	6.3
135	7.0
136	7.9
137	8.1
138	8.8
139	7.8
<u>M. canis</u>	
111	2.4
113	9.5
117	neg
121	4.8
118	6.2
127	5.9
128	1.9
129	neg
130	2.2
131	4.2

Tabla 2 (Continuación)

Mezclas	IDR (mm)
M1	10.6
M2	9.4
M3	10.1
M4	9.3
M5	5.1
M6	neg
M7	6.6
M8	neg
M9	3.7
M10	12.3

*La reacción se consideró positiva cuando el diámetro de la induración fué ≥ 5 mm. El resultado que aparece corresponde al promedio de tres experimentos.

Tabla 3
Intradermoreacción con tricofitina en
diferentes grupos de individuos

Población	Antígeno <u>T. rubrum</u> & positivo
Personas sanas n=63	30.1
Pacientes con dermatofitosis crónica n=25	24
Pacientes VIH (+) SIDA n=82	12
Grupo homosexual VIH (-) n= 20	25
Heterosexuales n= 40	35

Tabla 4
Pesos moleculares de las bandas mostradas
en los geles de poliacrilonida en los
tricotifinas estudiadas

Antigeno No. lote	Pesos moleculares (kDa) de bandas									
<u><i>I. pentagrammytes</i></u>										
110								27		
114 62 58		48		40	36	34			20	18 16
116 63		50							19	14
115							29			14
120						32		27 25	19	15
122		48		42		30				16
123 63	55	47								
124		52		40	34			25 22		
125	55			40						
126 62	55	47		40		30				
<u><i>I. rubrum</i></u>										
112 63				42 40	37		29			
119 63					37		29 27		19	14
132					37	32	28 27		20 19	
133	59		48				29			18 14
134			47			36 32	28		20	
135				46		36 32	27			18 14
136 63 61			47				29		19	14
137		53 52	48			36 34	30 28 27		20	18 16
138 62		53 52	48	44			32 28 27		20	18
139			48		40	36 32	29			18
<u><i>M. canis</i></u>										
111 63 61			50				29		20 19	14
113	61	55 53 52	48 47 46	42	37		29 28 27		22	19 18
117	59 58 55 53 52	48 47 46	42	37			29 28 27		22	19 18
121						36 32 30	27		20	16
118 63	58 55	52	47				32		22 20	15
127						36 32				16
128						36 32	27		20	
129 62	58	52	47	40		32				
130		52	47	40		32				
131		52	47	40		32				

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Diseño experimental para la obtención de antígenos de dermatofitos.

Fig. 2. Aspecto microscópico de Trichophyton mentagrophytes (EH-151) (400x).

Fig. 3. Aspecto microscópico de Trichophyton rubrum (EH-150) (100x)

Fig. 4. Aspecto microscópico de Microsporum canis (EH-152) (1000x)

Fig. 5. Curva de crecimiento de Trichophyton mentagrophytes

Fig. 6. Curva de crecimiento de Trichophyton rubrum.

Fig. 7. Curva de crecimiento de Microsporum canis.

Fig. 8 y 9. Patrones electroforéticos de antígenos de dermatofitos.

FIGURAS

Fig.1 Diseño Experimental

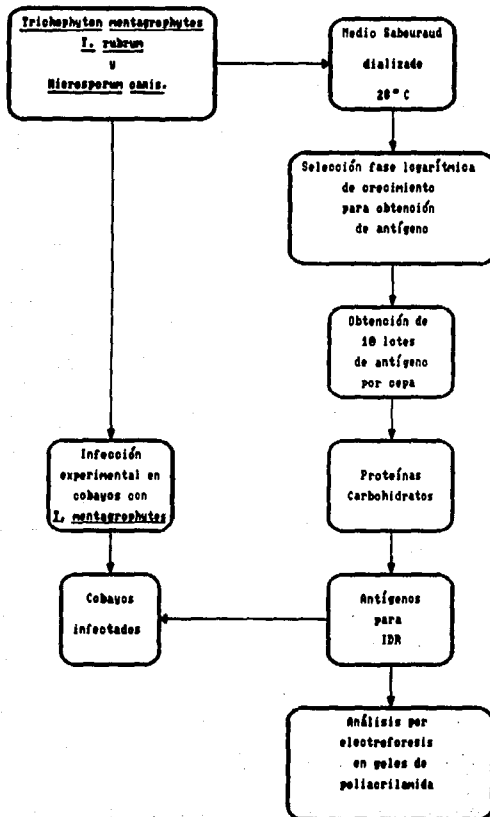




Fig. 2. Aspecto microscópico de Trichophyton mentagrophytes (EH-151) (400x).

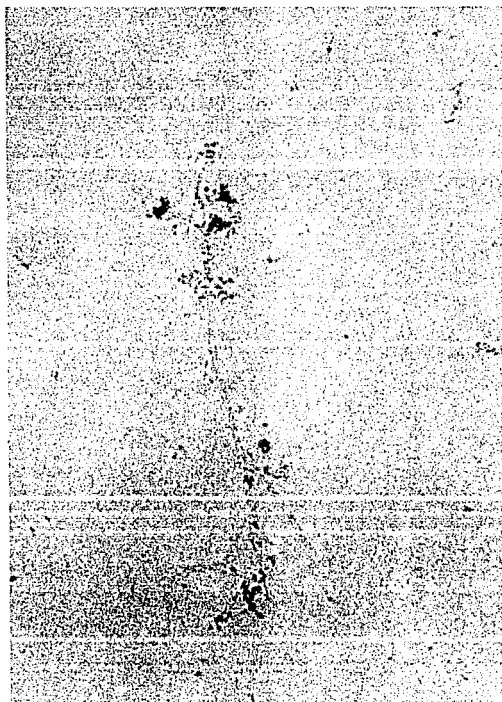


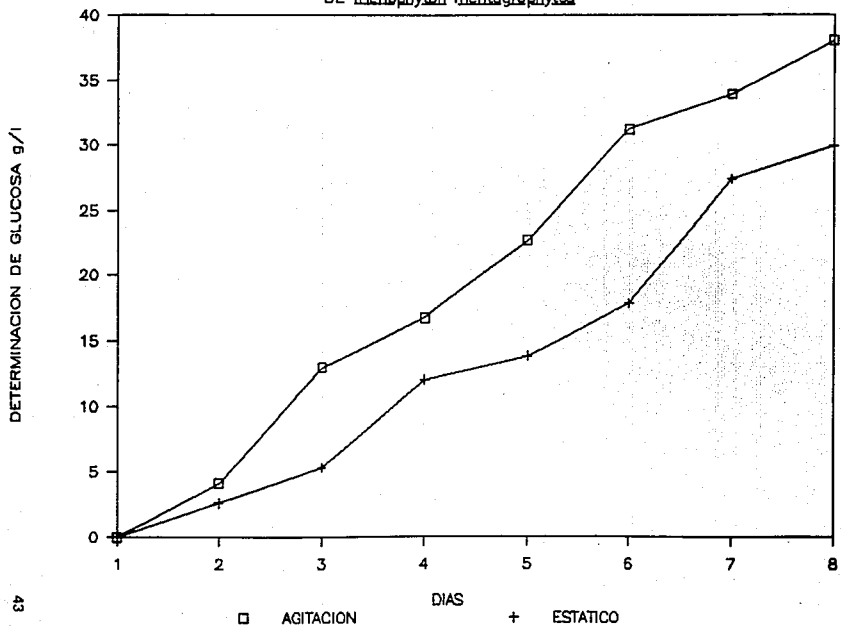
Fig. 3. Aspecto microscópico de Trichophyton rubrum (EH-150) (100x).



Fig. 4. Aspecto microscópico de Microsporium canis (EH-152).
(1000x)

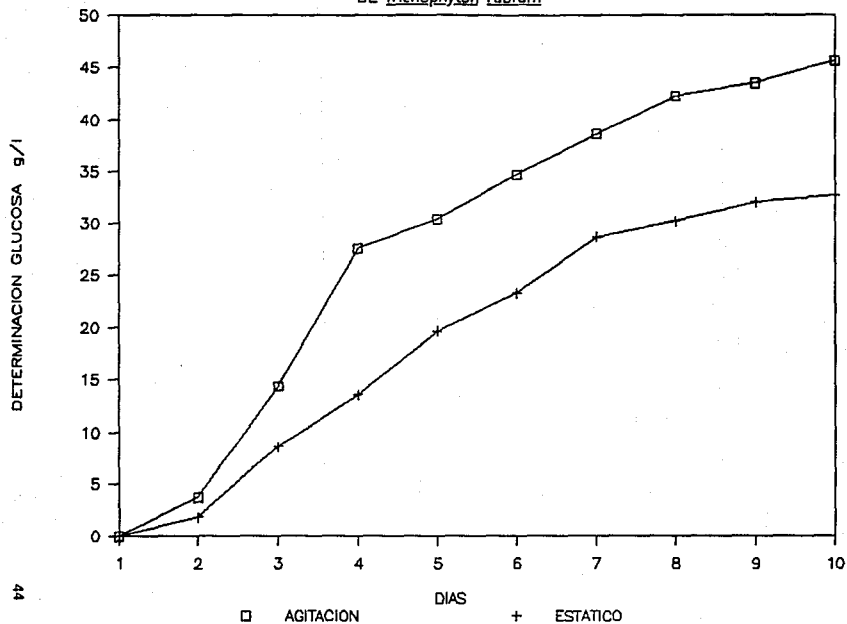
CURVA DE CRECIMIENTO

DE *Trichophyton mentagrophytes*



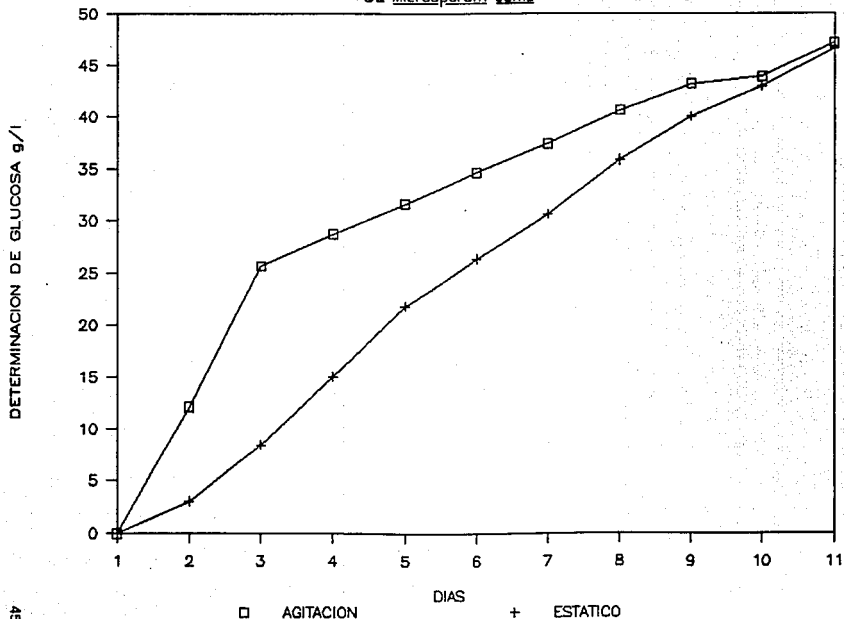
CURVA DE CRECIMIENTO

DE Trichophyton rubrum



CURVA DE CRECIMIENTO

DE *Microsporium canis*



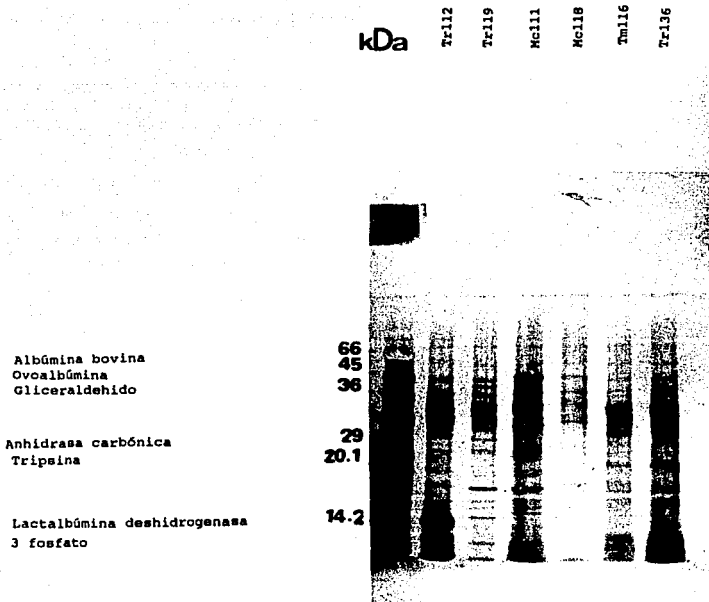


Fig. 8. Patrones electroforéticos de antígenos de dermatofitos

Tm = Trichophyton mentagrophytes

Tr = Trichophyton rubrum

Mc = Microsporum canis

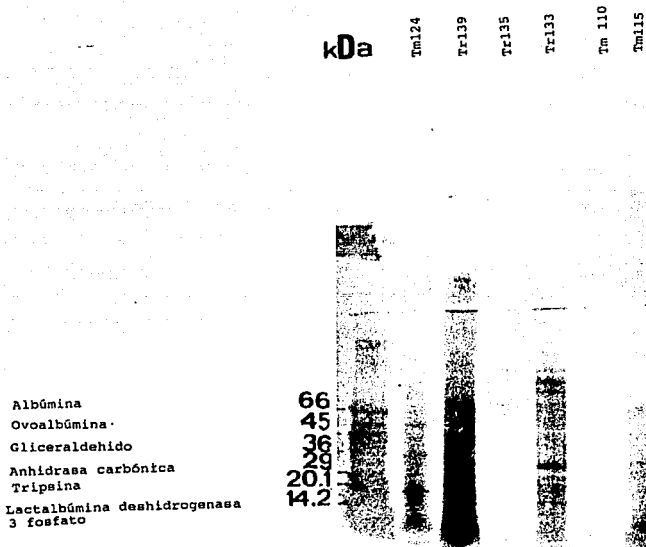


Fig. 9. Patrones electroforéticos de antígenos de dermatofitos

Tm = Trichophyton mentagrophytes

Tr = Trichophyton rubrum

Mc = Microsporum canis

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Arenas G, C Toriello. 1986. Actividad inmunológica de antígenos miceliales y levaduriformes de diferentes fases de crecimiento de Sporothrix schenckii. Rev Mex Mic. 2:131-144.
- 2.-Barker S A, C N D Cruickshank, J H Morris, S R Wood. 1962. The isolation of trichophytin glycopeptide and its structure in relation to the immediate and delayed reactions. Immunology. 5:627-632.
- 3.-Barker S A, C N D Cruickshank, J H Holden. 1963. Structure of a galactomannan-peptide allergen from Trichophyton mentagrophytes. Biochim Biophys Acta. 74:239-246.
- 4.-Barker S A, O Basarab, C N D Cruickshank. 1967. Galactomannan-peptides of Trichophyton mentagrophytes. Carbohyd Res. 3:325-332.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

5.-Bishop C T, F Blank, M Hranisavljevic-Jakovljevic. 1962. The water-soluble polysaccharides of dermatophytes. I. A galactomannan for Trichophyton granulosum. Can J Chem. 40:1816-1825.

6.-Bishop C T, M B Perry, F Blank. 1966. The water-soluble polysaccharides of dermatophytes. V. Galactomannans II from Trichophyton granulosum, Trichophyton interdigitale, Microsporium quinckeanum, Trichophyton rubrum, and Trichophyton schoenleinii. Can J Chem. 44:2291-2298.

7.-Bishop C T, M B Perry, F Blank, F P Cooper. 1965. The water-soluble polysaccharides of dermatophytes. IV. Galactomannans I from Trichophyton granulosum, Trichophyton interdigitale, Microsporium quinckeanum, Trichophyton rubrum, and Trichophyton schoenleinii. Can J Chem. 43:30-39.

8.-Bishop C T, M B Perry, R K Mulyalkar, F Blank. 1966. The water-soluble polysaccharides of dermatophytes. VI. Glucans from Trichophyton granulosum, Trichophyton interdigitale, Microsporium quinckeanum, Trichophyton rubrum, and Trichophyton schoenleinii. Can J Chem. 44:2299-2304.

- 9.-Bloch B, A Labouchere, F Schaaf. 1925. Versuche einer chemischen Charakterisierung und Reindarstellung des Trichophytins (des aktiven, antigenen Prinzips pathogener Hautpilze). Arch Dermatol Syph. 148:413-424.
- 10.-Bowker A H, G J L Lieberman. 1981. Estadística para Ingenieros. Prentice Hall Hispanoamericana. México. pp. 387-447.
- 11.-Dawes R A, D J McGrill, M Widley. 1971. Determination of glucose. In: Norris J R, D W Ribbons (Eds). Methods in Microbiology. Vol. 6. Academic Press, London. 6:178.
- 12.-Dawson C O, J C Gentles. 1959. The perfect stage of keratinomyces ajelloi. Nature (Lond.). 183:1345-1346.
- 13.-Dubois M, K A Giles, J K Hamilton, P A Rebers, F Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and related substances. Anal Chem. 28:350-356.
- 14.-Fujita S, T Matsuyama. 1987. Experimental tinea pedis induced by non-abrasive inoculation of Trichophyton mentagrophytes arthrospores on the plantar part of a guinea pig foot. J Med Vet Mycol. 25:203-213.
- 15.-González-Ochoa A. 1974. Frecuency of principal dermatophytoses and their causative agents observed in.

Mexico city. Int J Dermatol. 13:303-309.

16.-Grappel S F, C T Bishop, F Blank. 1974. Immunology of Dermatophytes and Dermatophytosis. Bacteriol Rev. 38:222-250.

17.-Grappel S F, F Blank. 1972. Role of keratinases in dermatophytosis. I. Immune responses of guinea pigs infected with Trichophyton mentagrophytes and guinea pigs immunized with keratinases. Dermatologica. 145:245-255.

18.-Grappel S F, F Blank, C T Bishop. 1967. Immunological studies on dermatophytes. I. Serological reactivities of neutral polysaccharides with rabbit antiserum to Microsporium quinckeanum. J Bacteriol. 93:1001-1008.

19.-Grappel S F, F Blank, C T Bishop. 1968. Immunological studies on dermatophytes. II. Serological reactivities of mannans prepared from galactomannans I and II of Microsporium quinckeanum, Trichophyton granulosum, Trichophyton interdigitale, Trichophyton rubrum and Trichophyton schoenleinii. J Bacteriol. 95:1238-1242.

20.-Grappel S F, F Blank, C T Bishop. 1968. Immunological studies on dermatophytes. III. The reactivities of neutral polysaccharides with rabbit antisea to Microsporium guinckeanum, Trichophyton schoenleinii, Trichophyton rubrum, Trichophyton interdigitale, and Trichophyton granulosum. J Bacteriol. 96:70-75.

21.-Grappel S F, F Blank, C T Bishop. 1969. Immunological studies on dermatophytes. IV. Chemical structures and serological reactivities of polysaccharides from Microsporium praecox, Trichophyton ferrugineum, Trichophyton sabouraudii and Trichophyton tonsurans. J Bacteriol. 97:23-26.

22.-Gruby D. 1841. Sur les mycodermes que constituent la teigne faveuse. C R Acad Sci. 13:309-312.

23.-Haan P de, Van der Raay H, Boorsma DM. 1987. Diversity of Antigenic Extracts from the Dermatophyte Trichophyton rubrum. Mycosen. 30:427-433.

24.-Heukeshoven J, R Dernick. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis. 6:103-112.

25.-Huppert M. 1982. Antigens used for measuring immunological reactivity. In: Howard, D H (Eds). Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Part B. Pathogenicity and Detection: II. Marcel Dekker, New York. pp. 219-301.

26.-Ito Y. 1965. On the immunologically active substances of dermatophytes. I. J Invest Dermatol. 45:275-284.

27 .-Ito Y. 1965. On the immunologically active substances of dermatophytes. II. J Invest Dermatol. 45:285-294.

28.-Jones H E, W M Artis. 1981. Dermatophytosis. In: Immunodermatology, Eds Satam B, R A Goods, Plenum Medical Book Company, London.

29.-Lavalle P. 1963. Tifa de los pies. Datos estadísticos clínicos y micológicos en 100 casos estudiados. Dermatología Rev Mex. 7:63.

30.-Lavalle P. 1968. Granuloma por Epidermophyton floccosum. Dermatología Rev Mex. 12:369.

31.-Lowry O H, N J Rosebroug, A L Farr, R J Randall. 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. J Biol Chem. 193:265-275.

- 32.-Moser S A, J D Pollack. 1978. Isolation of glycopeptides with skin test activity from dermatophytes. Infect Immun. 19:1031-1046.
- 33.-Nozawa Y, T Noguchi, H Uesaka, Y Ito. 1970. Studies on the immunologically active substances of the dermatophytes. Enzymatic digestion of polysaccharide-peptide complexes isolated from Trichophyton mentagrophytes and their immunochemical properties. Jap J Med Mycol. 11:159-165.
- 34.-Peniche R J. 1964. Tricoficia generalizada. Dermatología Rev Mex. 8:304.
- 35.-Pérez-Mejía A, C Toriello. 1989. Condiciones óptimas para la producción de antígenos de Aspergillus fumigatus, A. niger y A. flavus para el diagnóstico serológico de la aspergilosis. Rev Mex Mic. 5:261-271.
- 36.-Poulain D, G Tronchin, A Vernes, M Delabre, J Biguet. 1980. Experimental study of Resistance to Infection by Trichophyton mentagrophytes: Demonstration of Memory Skin Cells. J Invest Dermatol. 74:205-209.
- 37.-Remak R. 1840. Zur kenntnis von der pflanzlichen Natur der parrigo lupinasa. Med. Zertug. 9:73-74.
- 38.-Rippon J W. 1990. Tratado de Micología. Nueva Editorial

Interamericana, México. pp 186-280.

39.-Sabouraud R. 1894. Les Trichophytens Humaines. Paris, Rueff et Cie.

40.-Sabouraud R. 1910. Les Teignes. Paris, Masson et Cie.

41.-Schoenlein J L. 1839. Zur pathologie der impetigenes. Archiv fur Anat Phys Wiss Med. 82.

42.-Tucker W D L, W C Noble. 1990. The value of electrophoretic protein patterns for the study of Microsporium canis. J Med Vet Mycol. 28:117-123.

43.-Vincent R D, Goewert R, Goldman W E, Kobayashi G S, Lambowitz A M, Medoff G. 1986. Classification of Histoplasma capsulatum Isolates by Restriction Fragment Polymorphisms. J Bacteriol. 165:813-818.

44.-Zweck S, A Hüttermann, I Chet. 1978. A convenient Method for Preparing Inocula of Homogenized Mycelia. Exp Mycol. 2:377-378.