

11281

6  
Laj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO MOLECULAR DE PROTEINAS QUE UNEN  
HORMONAS ESTEROIDES EN HONGOS  
PATOGENOS

**T E S I S**  
Q U E P R E S E N T A  
LA M. EN C. FRANCISCA HERNANDEZ HERNANDEZ  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
( M I C O L O G I A )

BAJO LA ASESORIA DEL DR. MARCO ANTONIO CERBON  
Y LA COASESORIA DE LOS DOCTORES  
RUBEN LOPEZ MARTINEZ E IGNACIO CAMACHO ARROYO



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 1999

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

274245



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 esta 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.

PAGINACION  
DISCONTINUA

Este trabajo se llevó a cabo gracias a los siguientes apoyos:

- Beca-crédito otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Registro No. 92827.
- Donativo del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado, clave 012310, UNAM.
- Donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, clave 207095, UNAM.
- Instalaciones, equipo, material y reactivos de la Facultad de Química, UNAM.
- Instalaciones, equipo, material y reactivos de la Facultad de Medicina, UNAM.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Química y en el laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina.

Universidad Nacional Autónoma de México

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de continuar mi formación académica y por enseñarme el camino de sus buenos principios por los que lucharé hasta el final.
- ❖ Al Dr. Marco Antonio Cerbón, por haber aceptado ser mi tutor y permitirme pasar una agradable estancia en su laboratorio. Gracias por sus acertadas observaciones y por su gran amistad.
- ❖ A mis coasesores, los Dres. Rubén López Martínez e Ignacio Camacho Arroyo, por su gran apoyo académico durante el desarrollo de este trabajo. Gracias también por su amistad con la que espero contar siempre.
- ❖ A Charles Muralais, por su apoyo constante e incansable ayuda en los momentos más difíciles de mi vida. Agradezco también su colaboración en la elaboración de esta tesis.
- ❖ A mis sinodales: Dra. María de los Angeles Martínez, Dra. Lucia Taylor, Dr. Roberto Coria y Dr. Angel Manjarrez, por dedicar su preciado tiempo en la revisión de este manuscrito. Sus valiosas observaciones permitieron elevar la calidad de este trabajo.

- ❖ A mis compañeros y amigos del laboratorio de Endocrinología Molecular: Adriana y Mauricio, por su incondicional ayuda técnica y atinadas sugerencias durante este trabajo. A Isabel, Paola, Christian, Julia, Andrea, Gaby, Sara, José, Jesús, Lupita, Dr. García Tamayo y Dra. Quintero, por su amistad y por hacer doblemente agradable mi estancia en ese laboratorio.
  
- ❖ A mis compañeros y amigos del laboratorio de Micología Médica: Elva, Patricia, Rocío, Javier y Rubén, cuya amistad ha sido muy gratificante y necesaria para el desarrollo exitoso de este trabajo. Gracias a Elva Bazán y Rafael Romero, por su apoyo técnico.

## **DEDICATORIA**

❖ A MI GRAN FAMILIA, A QUIEN TENGO PRESENTE EN TODOS LOS

MOMENTOS DE MI VIDA.

❖ A MIS SOBRINOS, A QUIENES DESEO UNA TRAYECTORIA

DE GRAN ÉXITO.

❖ A TODOS LOS QUE CREEN EN MI.



## PRESENTACIÓN

El presente trabajo está organizado de la siguiente manera:

Inicialmente se encuentra una sección de **Antecedentes** en el que están incluidos algunos de los aspectos considerados más relevantes en el estudio de la interacción entre las hormonas sexuales, los hongos y el hospedero humano en las últimas décadas. Este trabajo es el producto de una revisión bibliográfica y ha sido enviado a la revista Archives of Medical Research para su evaluación y eventual publicación (Hernández-Hernández *et al.*, 1999. Biological interactions between sex hormones and fungi).

A continuación se encuentran los capítulos de **Justificación, Objetivos, e Hipótesis**.

La siguiente parte corresponde a los **Resultados Publicados**, integrados en un artículo que ha sido publicado en la revista Mycopathologia. Después se encuentran los **Resultados Enviados a Publicar** resumidos en un artículo que contiene información adicional y que ha sido enviado para su evaluación a la revista Fungal Genetics & Biology. En estos artículos se encuentra Material y Metodología, por lo que ya no se incluyen en la redacción de la tesis.

Después se presentan **Resultados no Publicados** que no fueron incluidos en los artículos previos y que proporcionan información adicional relevante sobre este trabajo.

Finalmente está la **Discusión** global de los resultados del trabajo de tesis, las **Perspectivas** posibles a desarrollar, las **Conclusiones** y las **Referencias** correspondientes.

## CONTENIDO

<b>I. ANTECEDENTES:</b> Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Cerbón MA. 1999. Biological Interactions between sex hormones and fungi. ....	1
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	35
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	36
<b>V. RESULTADOS PUBLICADOS</b> .....	37
Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Camacho Arroyo I, Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA. 1999. Detection and expression of corticosteroid binding gene in human pathogenic fungi. <i>Mycopathologia</i> 143:127-130.	
<b>VI. RESULTADOS ENVIADOS A PUBLICAR</b> .....	38
Hernández-Hernández F, Cerbón MA. 1999. Molecular analysis of steroid binding protein genes in human pathogenic fungi. <i>Fungal Genetics and Biology</i> .	
<b>VII. RESULTADOS NO PUBLICADOS</b> .....	39
1. Acidos nucleicos: material de partida.	
2. Estudio del gen que codifica para receptores nucleares a progesterona (RP) RT-PCR y Southern blot de productos de PCR.	
3. Estudio del gen que codifica para CBP: Southern blot de ADN digerido con las enzimas de restricción <i>BamH I</i> y <i>EcoR I</i> .	
4. Estudio del gen que codifica para la proteína que une estrógenos (EBP): Southern blot de productos de PCR y del ADN digerido con <i>BamH I</i> y <i>EcoR I</i> .	
5. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol en la expresión del gen que codifica para CBP y EBP.	
6. Detección de un gen para 5- $\alpha$ reductasa tipo 2.	
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	53
<b>IX. PERSPECTIVAS</b> .....	58
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>XI. REFERENCIAS</b> .....	60

## I. ANTECEDENTES

### INTERACCIONES BIOLÓGICAS ENTRE HORMONAS SEXUALES Y HONGOS

- I. **Introducción**
- II. **Aspectos filogenéticos de las hormonas**
- III. **Hormonas de mamíferos**
  - A. Aspectos estructurales y fisiológicos de las hormonas sexuales
  - B. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides
- IV. **Hormonas sexuales fúngicas**
  - A. Isoprenoides
  - B. Péptidos
- V. **Ligandos intracelulares de esteroides fúngicos**
- VI. **Efectos biológicos de las hormonas esteroides de mamíferos en los hongos patógenos**
  - A. Micosis superficiales
  - B. Micosis subcutáneas
  - C. Micosis sistémicas
  - D. Micosis oportunistas
- VII. **Proteínas que unen hormonas esteroides en hongos**
- VIII. **Estudios moleculares de la proteína que une corticosteroides y la proteína que une estrógenos**
- IX. **Biotransformación fúngica de esteroides**
- X. **Enzimas esteroides en hongos**
  - A. Esteroide-hidroxilasas
  - B. Citocromo P-450 Progesterona-hidroxilasa
  - C. Esteroide 5 $\alpha$ -reductasa
- XI. **Las hormonas esteroides como factores predisponentes en las infecciones micóticas**
- XII. **Diferente incidencia de las micosis humanas en ambos sexos**
- XIII. **Conclusiones**

## **I. Introducción**

En las últimas décadas varios grupos han explorado la relación entre las hormonas sexuales esteroideas y la biología de los hongos. A pesar del gran conocimiento obtenido, algunos resultados son controversiales. Numerosos trabajos han demostrado que los hongos: (1) biosintetizan hormonas esteroideas; (2) la estructura y función de estas hormonas son similares a las hormonas de mamíferos; (3) cambian su conducta biológica en presencia de hormonas sexuales de mamíferos; (4) poseen macromoléculas proteínicas que funcionan como receptores intracelulares esteroideas; y (5) biotransforman las hormonas esteroideas adicionadas al medio de cultivo. En los pocos estudios moleculares que se han realizados sobre este tema se ha demostrado que la levadura *Candida albicans* poseen genes que codifican para la proteína que une corticosteroides y otra que une estrógenos, los cuales no presentan homología con los genes que codifican para receptores a hormonas esteroideas de mamíferos. Así, se desconoce el papel de las proteínas que unen hormonas esteroideas en la biología celular fúngica, su regulación y su estructura química en estos organismos.

En este trabajo se presenta una revisión de los trabajos tanto pioneros como recientes respecto a la filogenia de los compuestos semejantes a las hormonas microbianas, la estructura y función de las hormonas sexuales fúngicas, proteínas que se unen a esteroideas y enzimas que participan en el metabolismo de los esteroideas. Finalmente se establecen algunas conclusiones sobre este sistema complejo de señalización en los hongos y su posible papel en la instalación de las infecciones micóticas.

## **II. Aspectos filogenéticos de las hormonas**

La existencia de sistemas de señalización intercelular en los organismos inferiores ha sido apoyada por diferentes trabajos y los sistemas hormonales se encuentran entre ellos. Una de las hormonas más estudiadas es la insulina, cuyo origen filogenético se creía que se encontraba en los primeros vertebrados en el momento en que aparece el páncreas. Sin embargo, estudios posteriores han puesto en evidencia la presencia de insulina en células específicas de la mucosa intestinal y se

cree que representan precursores filogenéticos de las células de los islotes pancreáticos. Otros estudios indican la presencia de insulina en tejidos relacionados con el intestino o en el tejido nervioso de invertebrados multicelulares complejos (Leibson, 1979).

En insectos, en gusanos, en el protozoario ciliado *Tetrahymena pyriformis*, en *Escherichia coli* (Le Roith *et al.*, 1981); y en los hongos *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* (Le Roith, 1980), *S. cerevisiae* (Lenard, 1992) y *Agaricus campestris* (Gray y Flatt, 1998) se ha confirmado la presencia de factores semejantes a la insulina.

Maruo *et al.* (1979) caracterizaron un factor semejante a la gonadotropina coriónica en bacterias, la cual tiene una actividad biológica e inmunológica similar a la de la hormona humana de origen placentario.

En *N. crassa*, se han detectado algunos factores que presentan actividad similar a las hormonas polipeptídicas como el glucagon (Flawia *et al.*, 1973). En *S. cerevisiae* se ha identificado una hormona liberadora de gonadotropinas conocido como factor  $\alpha$  (Loumaye *et al.*, 1982).

El hallazgo de hormonas similares a la gonadotropina coriónica o a la insulina en organismos unicelulares aumenta la posibilidad de que durante la evolución, algunos genes de mamíferos fueran introducidos por algún mecanismo de recombinación de ADN (Roth *et al.*, 1982). Otras evidencias bioquímicas indican que a pesar de la ausencia de un sistema endocrino anatómicamente complejo, los organismos unicelulares poseen una actividad hormonal (Le Roith *et al.*, 1980). Estos autores también han propuesto que mientras que las unidades anatómicas complejas como glándulas, células blanco diferenciadas y un sistema circulatorio han evolucionado, se ha conservado la bioquímica básica de la comunicación intercelular.

El origen de los sistemas de transducción de señales de los vertebrados ha sido controversial. Los últimos hallazgos establecen algunos principios generales sobre la organización estructural y funcional de estos sistemas de señalización en

las células de eucariotes superiores (Janssens 1987, 1988) o incluso en procariotes (Pertseva, 1990)

### **III. Hormonas de mamíferos**

#### **A. Aspectos estructurales y funcionales de las hormonas esteroides humanas**

En los organismos superiores, las hormonas son sustancias secretadas por diferentes glándulas endocrinas y actúan como mensajeros químicos que son transportados en la corriente sanguínea hasta sus órganos-blanco donde regulan una gran variedad de actividades fisiológicas y metabólicas. La información aquí presentada fue tomada de Gore-Lancon y Amstrong, 1988.

Desde el punto de vista químico hay tres tipos de hormonas:

I. Las derivadas de la tirosina que incluyen la tiroxina, la triyodotironina, la adrenalina y noradrenalina

II. Proteínas o péptidos, representados por las hormonas producidas en la hipófisis anterior, la hormona antidiurética, la oxitocina, la insulina, el glucagon y la parathormona.

III. Esteroides, hormonas que pertenecen a un grupo ampliamente distribuido en los organismos vivos y poseen una composición química similar. El ciclofenantreno representa el núcleo esteroideo básico, el cual está formado por tres anillos fusionados de ciclohexano llamados A, B y C, y un anillo de ciclopentano denominado D. En este núcleo existen 17 átomos de carbono. Todas las hormonas esteroides se derivan del acetato o acetyl coenzima A, formando también escualeno, un triterpeno lineal que forma fácilmente estructuras cíclicas. El primer producto cíclico importante derivado del escualeno es el lanosterol, un precursor del colesterol. Eliminando su cadena lateral, el colesterol se transforma en pregnenolona; a partir de este punto, las vías sintéticas de los grupos esteroides son diferentes. El colesterol, lanosterol, los ácidos biliares y la vitamina D y sus metabolitos son miembros de un subgrupo de esteroides llamados esteroles. Los esteroles son alcoholes esteroideos que contienen un grupo hidroxilo en C3 del anillo A y una cadena ramificada de ocho o más átomos de carbono en C17. En las plantas superiores la presencia de colesterol es rara; en su lugar hay otros esteroles

conocidos como fitosteroles incluyendo el estigmasterol y el sitostrol. En los hongos existe otro tipo de esteroides llamado micosteroides, incluyendo el ergosterol el cual es transformado en vitamina D bajo la acción de la luz solar.

Los principales grupos de hormonas esteroides son: estrógenos, andrógenos, progestágenos y corticosteroides. Las hormonas esteroides más simples son los estrógenos, los cuales presentan un átomo de carbono en la posición 18 unido al carbono 13, y son designados esteroides C18. Estos compuestos son producidos en el ovario y la placenta. El 17  $\beta$ -estradiol es el principal estrógeno secretado por el ovario. Los estrógenos estimulan el desarrollo y la función de los órganos sexuales y las características secundarias en la mujer, además de tener un papel metabólico.

Los andrógenos o esteroides C19 son formados por adición de un átomo de carbono en la posición 19, unido al carbono 10. Son sintetizados en los testículos y en menor cantidad, en la corteza suprarrenal y en el ovario. La testosterona es el principal andrógeno en la sangre, pero en los tejidos esta hormona se transforma en dihidrotestosterona, un andrógeno más potente. En los hombres, los andrógenos controlan el desarrollo y función de los órganos sexuales, así como las características sexuales secundarias. Estas hormonas también participan en la conducta afectiva. En las mujeres los andrógenos influyen en la actividad sexual. En ambos sexos juegan un importante papel en las actividades metabólicas como el anabolismo proteico.

Los progestágenos o esteroides C21 tienen dos átomos de carbono en la posición 17. Estas hormonas femeninas se sintetizan en el ovario, glándula suprarrenal, placenta y testículos. En este grupo, la progesterona es la hormona más importante. Su función es estimular la actividad secretoria del endometrio, preparar el útero para la implantación del óvulo fertilizado y mantener la actividad secretoria del endometrio durante el embarazo.

Los corticosteroides también son esteroides C21 sintetizados en las glándulas suprarrenales y, de acuerdo a sus funciones, se dividen en dos grupos: glucocorticoides (los más importantes son cortisol o hidrocortisona y corticosterona) los cuales participan en el metabolismo de los carbohidratos; y mineralocorticoides

(principalmente aldosterona) que controlan el equilibrio de los minerales por medio de la excreción de sodio y potasio.

La primera parte de la **Figura 1** muestra un esquema de la vía de síntesis y estructura química de las principales hormonas esteroides de mamíferos. La segunda parte (**Figura 1 Cont.**), muestra la estructura de dos hormonas esteroides de *Achlya* spp.

#### B. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides

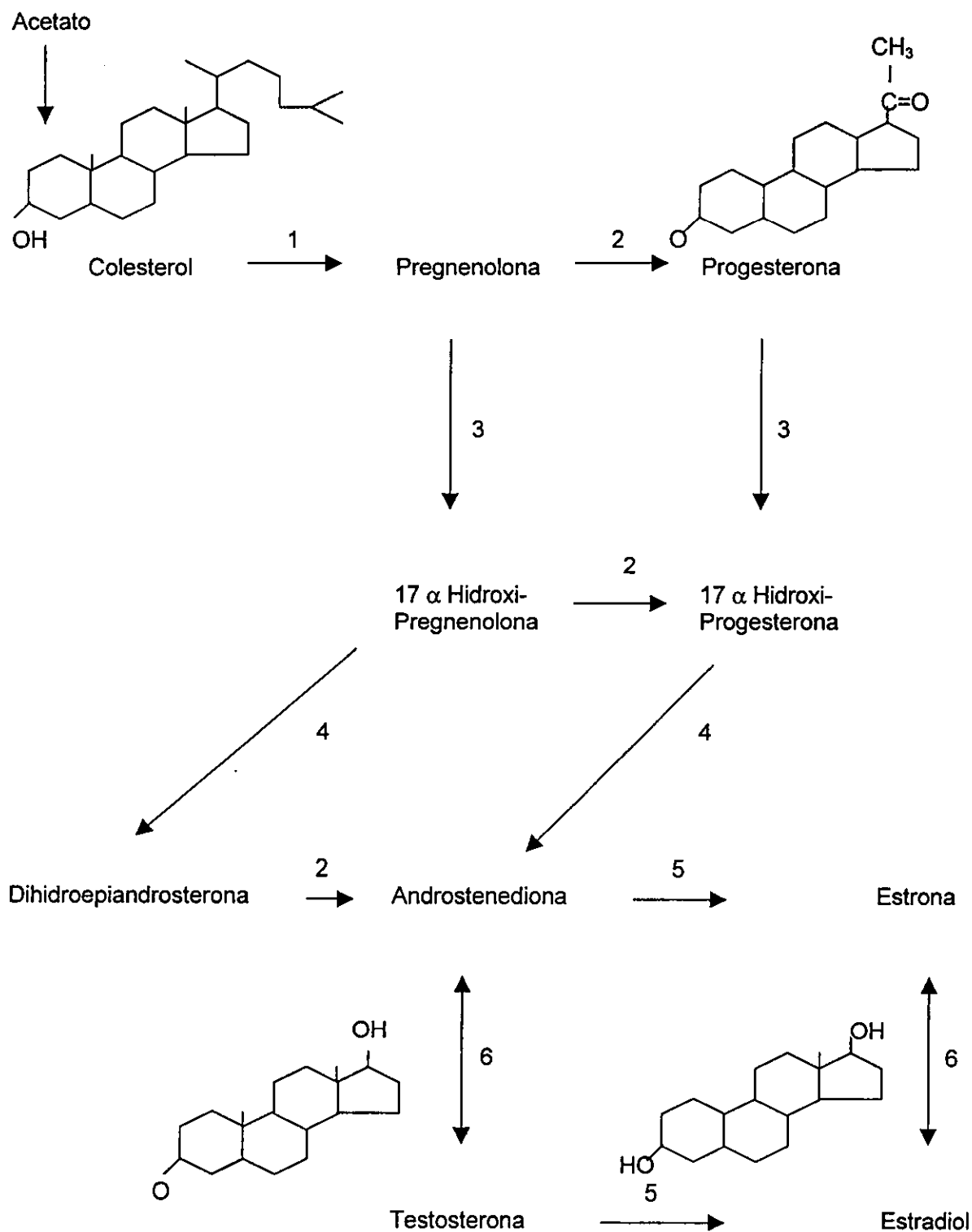
El mecanismo de acción de las hormonas esteroides fue inicialmente propuesto de manera independiente por Gorski *et al.* (1968) y por Jensen *et al.* (1968). Recientemente se ha logrado información molecular más detallada. Brevemente, se consideraba que los esteroides libres difundían pasivamente hacia las células, ya que no había evidencia de un transporte activo de estas moléculas. Los esteroides son preferencialmente retenidos en las células blanco formando complejos estables con proteínas receptoras intracelulares específicas que son esteroide- y tejido-específicas. Cada receptor se une reversiblemente y con alta afinidad a su respectivo esteroide. La unión del esteroide induce una activación conformacional/oligomérica de la molécula receptora, lo cual le permite unirse con alta afinidad a sitios específicos del ADN, llamados sitios aceptores nucleares. Unido al sitio aceptor nuclear, el complejo esteroide-receptor activado actúa como un regulador transcripcional, alterando la transcripción de los genes de respuesta a esteroides y/o, en algunos casos, alterando los pasos post-transcripcionales causando un cambio en los niveles basales de ARN mensajeros específicos y de proteínas. En la **Figura 2** se muestra un esquema del modelo actualmente aceptado sobre el mecanismo de acción de las hormonas esteroides.

#### IV. Hormonas sexuales fúngicas

En los hongos se han estudiado varios compuestos con actividad hormonal y que por lo tanto participan en su reproducción sexual. Estos compuestos reguladores han sido llamados hormonas debido a que las células fúngicas que responden a



**Figure 1.** Vía sintética de las principales hormonas esteroideas de mamíferos.

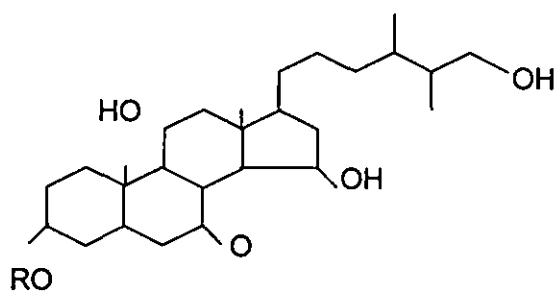


Enzimas: 1) 20, 22 desmolasa; 2) 3  $\beta$ -hidroxidihidrogenasa; 3) 17  $\alpha$ -hidroxilasa;  
 4) 17, 20 esteroide-liasa; 5) Aromatasa; 6) 17  $\beta$ -hidroxidihidrogenasa  
 (Gore-Lancon y Armstrong, 1988).

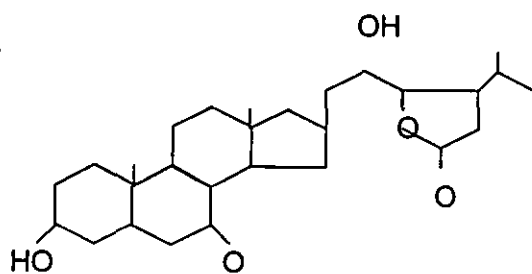
**Figura 1 (Cont).**

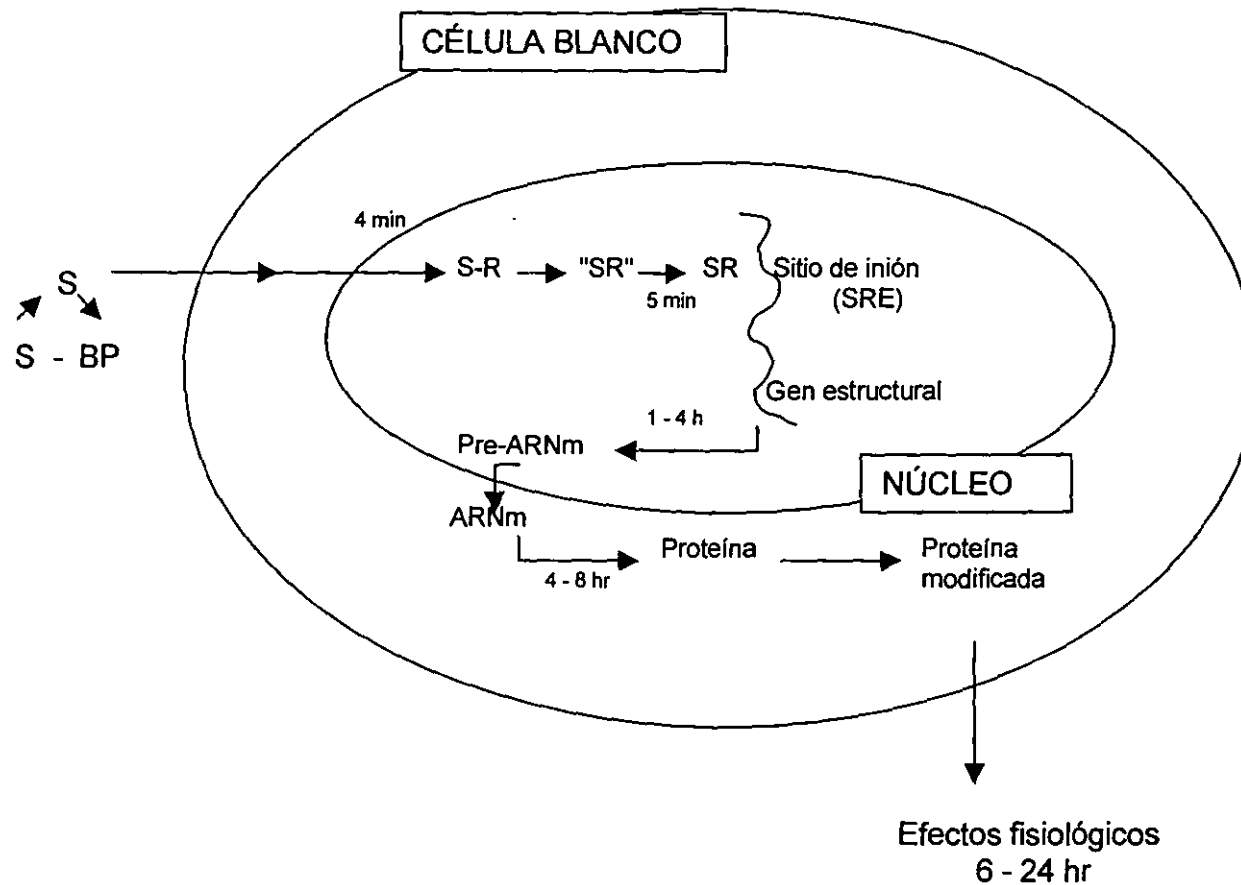
Estructura química de las hormonas fúngicas oogoniol y anteridiol de *Achlya ambisexualis*.

Oogoniol



Anteridiol





**Figura 2.** Esquema general del mecanismo de acción de las hormonas esteroides. **S:** esteroide; **SBP:** proteína de unión a esteroides; **R:** receptor; **SRE:** elemento de respuesta a esteroides.

Tomada y modificada de Landers y Spelsberg (1992).

estas moléculas están espacialmente aisladas de aquellas que las secretan (Barksdale, 1969).

Las hormonas fúngicas presentan una gran diversidad en su estructura química, pero pueden agruparse en dos clases: (a) isoprenoides, que incluyen sesquiterpenos, esteroides y apocarotenoides, y (b) péptidos hidrofóbicos.

#### A. Isoprenoides

Una de las hormonas más estudiadas en los hongos ha sido el anteridiol, un esteroide secretado por las hormonas femeninas de algunas especies de *Achlya*. La diferenciación sexual en estos hongos es regulada por hormonas complementarias que difunden de hifa a hifa. Las células femeninas liberan anteridiol que cambia el crecimiento vegetativo de las células masculinas a la producción de muchas ramas anteridiales cortas y finas. Las células masculinas liberan una segunda hormona, el oogoniol, el cual difunde hacia las células femeninas, cambiando su crecimiento vegetativo a la producción de primordios oogoniales. Poco después de que se forma el primordio oogonial, la rama anteridial empieza a crecer hacia él. Al alcanzar el primordio femenino, la rama se flexiona rodeándolo, y el anteridio es delimitado por una pared transversa que se forma cerca de la punta de la rama. Una pared transversa en la base del primordio oogonial delimita al oogonio, y dentro de este órgano se producen de una a 20 oosferas uninucleadas (Barksdale 1969; Gooday 1974; McMorris *et al.*, 1989). El anteridiol ha sido caracterizado como un derivado oxigenado del fucosterol, un esteroide común en las plantas (McMorris y Barksdale, 1967; Arsenault *et al.*, 1968). El oogoniol y hormonas análogas se derivan del fucosterol, el principal esteroide de *Achlya* spp; sin embargo, el anteridiol y los oogonios se encuentran en dos vías sintéticas diferentes del fucosterol (McMorris, 1978). Las estructuras químicas del oogoniol y del anteridiol están representadas en la **Figura 1** (Cont.).

Riehl *et al.* (1984) y Riehl y Toft (1984) identificaron una proteína de unión específica en el citosol de las células masculinas de *Achlya*. Los ensayos de competencia con diferentes esteroides incluyendo progesterona, estradiol y testosterona, mostraron que la unión es específica para el anteridiol y 7-desoxy-7-

dihidroanterioriol. El receptor a anterioriol es similar a otros receptores esteroides en especificidad, alta afinidad, presencia de estados monoméricos y multiméricos con coeficientes de sedimentación de 4S y 8S; y su estructura y función son estabilizadas con molibdato de sodio. Como en otros receptores, la forma 8S del receptor a anterioriol puede disociarse en una mitad 4S de unión al anterioriol y en una proteína de unión al receptor de 85 Kd. Esta proteína muestra reactividad inmunológica cruzada con una variedad de receptores hormonales de 90 Kd de vertebrados (Riehl *et al.*, 1985; Riehl y Toft, 1986) y con las proteínas de choque térmico de 85 kDa detectadas en *Achlya* spp. (Brunt *et al.*, 1990).

Otro sistema hormonal complejo ha sido descrito en *Allomyces macrogynus* donde los gametos femeninos producen un potente atrayente para los gametos masculinos llamado sirenina. Las células femeninas son atraídas por una hormona complementaria producida por las células masculinas llamada parisina, la cual también es un isoprenoide y sus propiedades son similares a las de la sirenina (Barksdale 1969; Gooday 1974). De los cinco tipos de células producidos por *A. macrogynus* (zoosporas haploides y diploides, gametos masculinos y femeninos y zigotes) solamente los gametos masculinos responden a la sirenina, y solamente los gametos femeninos la producen (Carlile y Machlis, 1965).

En *Mucor mucedo*, *Blakeslea trispora* y *Phycomyces blakesleeanus*, se han identificado diversos ácidos trispóricos (designados A, B, C, D, E) y que corresponden a ácidos carboxílicos terpenoides C18. El principal efecto fisiológico de estos compuestos es la formación de zigóforos que manifiestan tropismo. Dos zigóforos de signo opuesto crecen uno hacia el otro hasta encontrarse y fusionarse, previa protrusión lateral localizada en el sitio de fusión. Así, cuando un zigóforo encuentra a otro de signo opuesto, al ponerse en contacto detiene inmediatamente su crecimiento y empieza a formar un progametangio el cual después se transforma en zigospora (Barksdale, 1969; Gooday, 1974; Gooday y Adams, 1993).

### C. Péptidos

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura en la cual se han logrado los mayores avances genéticos y bioquímicos y representa el sistema de hormonas y

feromonas entre los hongos mejor estudiado. *S. cerevisiae* forma células haploides de los dos tipos de apareamiento,  $\alpha$  y **a**. Las células **a** producen un factor **a**, y este tiene actividad recíproca sobre las células  $\alpha$ . Las células **a** responden al factor  $\alpha$  produciendo estructuras copulatorias elongadas (Levi, 1956). Después de llevarse a cabo la plasmogamia para formar zigotes diploides y esporular, ocurre la meiosis con formación de cuatro ascosporas haploides.

El factor  $\alpha$  y el factor **a** pueden reconocerse por sus receptores específicos. En cada tipo celular, el receptor, una proteína integral de la membrana, está acoplado a una misma proteína G heterotrimérica, y la unión del factor  $\alpha$  o del factor **a** a su receptor, inicia el proceso de transducción de señales. El receptor del factor  $\alpha$  está codificado por el gen *STE2*, el cual solamente se expresa en las células **a**. El receptor del factor **a**, está codificado por el gen *STE3* y se expresan sólo en las células  $\alpha$ . La actividad biológica del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* no es especie-específico. En las células  $\alpha$  de especies estrechamente relacionadas como *S. kluyveri*, *S. exiguus*, *Hansenula wingei* y *H. anomala*, también puede inducirse la formación de estructuras de conjugación por medio del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. Estas especies tienen sus propios factores  $\alpha$  y **a**, y hay reactividad cruzada entre sus factores  $\alpha$  y células **a**, pero no entre sus factores **a** y células  $\alpha$  (Gooday y Adams, 1993).

*Schizosaccharomyces pombe* tiene células haploides que son de dos tipos de apareamiento, *P* y *M*, y bajo condiciones de depleción de nitrógeno se conjugan para formar un cigote *P/M*. Cada tipo de apareamiento produce una hormona difusible de apareamiento que produce un crecimiento quimiotrópico y la formación de tubos de conjugación en las células de signo opuesto. Las dos hormonas se llaman factor *M* producido por las células *M* y que actúa sobre las células *P*, y factor *P*, producido por las células *P* que actúa sobre las células *M*.

La levadura *Tremella mesenterica* crece vegetativamente como células gemantes haploides, las cuales son de uno u otro signo, células A y células a, las cuales producen factores difusibles que detienen la gemación en las células de signo opuesto e inducen la formación de tubos de conjugación. Se sabe que estas hormonas son dos lipopéptidos, principalmente el tremerógeno A-10, producido por las células de tipo A, y el tremerógeno a-13, producido por las células de tipo a. El tremerógeno A-10 es un dodecapéptido, mientras que el tremerógeno a-13 es un tridecapéptido. Estos dos péptidos no tiene homología.

En *Rhodosporidium toruloides* la formación de los tubos de conjugación está regulada por la rodotorucina A, una hormona constitutivamente producida por las células A, y la rodotorucina a producida por las células a. La rodotorucina A es un lipodecapéptido y es específicamente degradado por las células a. La respuesta de las células a la rodotorucina A incluye la inhibición de la gemación, inhibición de la síntesis de ADN, formación de tubos de conjugación y secreción de rodotorucina a. La secuencia de eventos en las etapas tempranas de la diferenciación sexual inducida por la rodotorucina A ha sido descrita por Tsuchiya *et al.*, (1978). Se han identificado principalmente tres genes, RHA1, RHA2 y RHA3 que codifican para cuatro, cinco y tres copias de rodotorucina A respectivamente.

Además de los compuestos hormonales descritos previamente, hay otras sustancias que no inducen una reproducción sexual fúngica, pero interactúan con las células de mamíferos. Uno de estos compuestos fue aislado de maíz infectado con *Fusarium*, y el cual parecía ser responsable del síndrome estrogénico en animales (hipertrofia vulvar, eversión vaginal y crecimiento de glándulas mamarias). Esta sustancia es un macrólido no esteroide, miembro de una clase rara de productos naturales, las lactonas del ácido  $\beta$ -resorcílico. A pesar de la naturaleza química única de estas lactonas del ácido resorcílico, estas interactúan directamente con el receptor a estrógenos y desencadenan muchas de las mismas respuestas biológicas y bioquímicas que desencadena el estradiol natural (Katzenellenbogen *et al.*, 1979).

## V. Ligandos intracelulares de esteroides fúngicos

Después de la caracterización de la proteína que une corticosteroides en *C. albicans*, se identificó la existencia de un ligando endógeno para este esteroide. Un extracto crudo de *C. albicans* produjo un material con capacidad para competir con  $^3\text{H}$ -corticosterona por el sitio de unión fúngico. Además, este extracto tiene la capacidad de desplazar competitivamente la  $^3\text{H}$ -dexametasona del receptor clásico de glucocorticoide en el citosol de timo de rata, así como la  $^3\text{H}$ -corticosterona de la globulina de unión a corticosteroide plasmática humana (CBG). Sin embargo, el extracto de levadura fue más potente al inhibir la unión a la proteína fúngica. La molécula de unión manifiesta propiedades fisicoquímicas similares a las de un receptor (Loose *et al.*, 1981).

En *S. cerevisiae*, además de su proteína de unión a estrógenos, posee un producto natural que se une competitivamente a los sitios de unión a  $^3\text{H}$ -estradiol en la levadura y a los receptores de estrógenos del útero de rata. Como en el caso de *C. albicans*, se postula que *S. cerevisiae* tiene componentes de un sistema hormona-receptor (Feldman *et al.*, 1982). El extracto de levadura induce una respuesta estrogénica en los sistemas de mamífero; este extracto induce la formación de receptores a progesterona en cultivo de células cancerígenas de mama humana MCF-7 y una respuesta uterotrópica y formación de receptores a progesterona después de su administración a ratones ovariectomizados (Feldman *et al.*, 1984a). El ligando purificado y altamente activo manifiesta un solo pico cromatográfico idéntico al del  $17\beta$ -estradiol. Así, se considera que este  $17\beta$ -estradiol también es un producto de levadura (Feldman *et al.*, 1984b). En otros estudios se ha detectado la presencia de estrógenos en el medio de cultivo de *S. cerevisiae* (Miller *et al.*, 1986).

Lenasi y Hudnik-Pleynik (1996) encontraron en *Rhizopus nigricans* dos sitios de unión a progesterona que podrían funcionar como receptores para los esteroides inducidos por el citocromo P-450. Después de varios estudios, se asumió que la progesterona, o un compuesto semejante a un esteroide, representa el ligando endógeno fúngico.



## VI. Efectos biológicos de las hormonas esteroides de mamíferos en los hongos patógenos

En esta sección se presentan los efectos de algunas hormonas sexuales esteroides sobre diferentes hongos patógenos agrupados de acuerdo al tipo de micosis humana.

### A. Micosis superficiales

En este grupo de enfermedades que afectan la piel y sus apéndices, las dermatofitosis son las infecciones fúngicas más comunes. Consecuentemente, estas micosis son el motivo más frecuente de consulta dermatológica.

Desde hace varias décadas se sabe que las hormonas esteroides influyen en la evolución clínica de las dermatofitosis por una disminución de la resistencia durante el tratamiento con cortisona, o por cambios hormonales durante la pubertad en que la tinea capitis desaparece espontáneamente sin tratamiento. Chattaway *et al.* (1959) determinaron el efecto de las hormonas esteroides sobre algunos dermatofitos; estos autores observaron que la desoxicorticosterona aumenta el crecimiento *in vitro* de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *T. mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum*. En *T. rubrum* el efecto de la testosterona y progesterona fue menor. Casas-Campillo *et al.*, (1961) observó el efecto inhibitor de treinta análogos de la progesterona sobre el crecimiento radial de *Curvularia lunata* y *T. mentagrophytes*. La dimetoxi-progesterona, la progesterona, la 19-norprogesterona y la desoxi-corticosterona mostraron la máxima actividad inhibitoria sobre *T. mentagrophytes*. En contraste, Brasch y Gottkehaskamp (1992) encontraron un efecto inhibitor a altas concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol sobre el crecimiento de *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*. En otro estudio, el crecimiento de los cinco agentes más comunes de dermatofitosis fue inhibido por altas concentraciones de testosterona, 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona, dihidroepiandrosterona y androstenediona dependiente de la dosis (Brasch y Flader, 1996).

## B. Micosis subcutáneas

El micetoma es una infección que involucra la piel y el tejido subcutáneo y que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. Esta enfermedad puede ser causada por hongos (eumicetoma) o por bacterias (actinomicetoma). Estudios *in vitro* indican que la progesterona reduce el crecimiento de *Madurella mycetomatis* y de *Pyrenochaeta romeroi* (Méndez-Tovar *et al.*, 1991). Respecto al actinomicetoma, Hernández-Hernández *et al.* (1995a) demostraron un efecto inhibitorio de la progesterona y de la testosterona sobre el crecimiento de *Nocardia brasiliensis*. Durante el actinomicetoma experimental en ratones tratados con tres diferentes hormonas, se observó que el 17  $\beta$ -estradiol limita el curso clínico de la infección manifestado por un menor diámetro de la almohadilla plantar, menor índice de invasión y un menor número de retrocultivos positivos.

*Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi* son los agentes más comunes de cromoblastomicosis en el mundo. Esta infección es el resultado de la implantación traumática del hongo en la piel y las lesiones se desarrollan en ésta y en el tejido subcutáneo del individuo susceptible. Estudios *in vitro* han demostrado que la progesterona y testosterona inhiben el crecimiento de *F. pedrosoi* (datos no publicados) y de *P. verrucosa* (Hernández-Hernández *et al.*, 1995 b).

## C. Micosis sistémicas

*Coccidioides immitis* probablemente es el hongo más virulento que se conoce y es el agente causal de la coccidioidomicosis, enfermedad adquirida por vía respiratoria. Inicialmente la infección se instala en los pulmones y de ahí puede diseminarse a cualquier órgano. Como en otras infecciones sistémicas, las mujeres rara vez padecen la infección en su forma diseminada, pero cuando el embarazo y la coccidioidomicosis coinciden, la diseminación es la regla. En *C. immitis* se ha observado que la progesterona y la testosterona estimulan su crecimiento. Además, el estradiol estimula la maduración de artroconidios (forma infectante) y endosporas (forma parasitaria inmadura) a esférulas (fase parasitaria madura) (Drutz *et al.*,

1981). Estos datos podrían explicar la elevada incidencia de diseminación en las mujeres embarazadas (Powell *et al.*, 1983).

*Paracoccidioides brasiliensis* también es un agente causal de micosis pulmonar. La infección empieza por la inhalación de microconidios del hongo, los cuales se establecen en los tejidos del hospedero, en donde ocurre la transformación a levadura. Estudios *in vitro* realizados por Salazar *et al.* (1988) demostraron que el 17  $\beta$ -estradiol inhibe la conversión de conidio a levadura. Este fenómeno no ocurre con otras hormonas o análogos esteroides. También se ha reportado que el 17  $\beta$ -estradiol inhibe la transformación de micelio a levadura *in vitro*. Otras funciones como la transición de levadura a micelio, el crecimiento o la gemación de levaduras no son alteradas por este esteroide (Restrepo *et al.*, 1984).

Durante la paracoccidioidomicosis experimental producida en ratones hembra inoculados con conidios por vía intranasal, la transición de conidio a levadura no se observó, comparado con los ratones macho donde la las levaduras estuvieron presentes en el líquido de lavado broncoalveolar de las 24 a 96 h después de la inoculación (Aristizabal *et al.*, 1998). Un estudio reciente confirmó el efecto inhibitorio del estradiol sobre el crecimiento de la levadura de *P. brasiliensis*. Además, comparando grupos de ratones BALB/c machos y hembras adultos en diferentes etapas de su ciclo estral, inoculados por diferentes vías, Sano *et al.* (1999) observaron que las hembras tienen un aclaramiento mayor que los machos. Este aclaramiento fue particularmente notorio en los ratones hembra durante el estro.

La histoplasmosis representa la micosis pulmonar más común en Latinoamérica. Considerando que los corticoides sirven de substratos, Frenkel (1962) puso a crecer *Histoplasma capsulatum* en placas de agar conteniendo cristales de cortisol, precursores del cortisol o corticoides modificados, y encontró que la desoxicorticosterona (21-OH progesterona) y su 21-acetato inhibieron el crecimiento de este hongo.

#### D. Infecciones oportunistas

Una característica que tradicionalmente ha sido atribuida a las micosis oportunistas es la ausencia de predominio genérico en humanos. Sin embargo, hay reportes de que algunas de estas micosis predominan en hombres, como es el caso de la criptococosis (Mohr *et al.*, 1972). Además, hay estudios sobre el efecto hormonal en algunos hongos considerados oportunistas. El modelo más y mejor conocido es *Candida albicans*, una levadura que forma parte de la biota normal. Sin embargo, en condiciones de inmunosupresión, el hospedero puede desarrollar una infección mucocutánea o sistémica originada por esta levadura. Respecto a la interacción hormonas esteroides y *C. albicans*, se sabe que el 17  $\beta$ -estradiol adicionado al medio de cultivo, estimula el crecimiento de la colonia (Gujjar *et al.*, 1997). La transición de levadura a micelio se ha asociado a virulencia. White y Larsen (1997) investigaron los papeles del estradiol, colesterol y testosterona en la formación de tubos germinativos de *C. albicans*. Los resultados mostraron que el estradiol induce notablemente la germinación de esta levadura.

*Cryptococcus neoformans* es una levadura encapsulada que vive asociada a una gran variedad de habitats, en particular a excretas de pichón. Esta levadura requiere de una deficiencia en el sistema inmune del hospedero para iniciar una infección. La infección se adquiere por inhalación de levaduras, desencadenando una infección respiratoria a menudo asintomática, pero con una elevada probabilidad de diseminación al sistema nervioso central. Mohr *et al.* (1972) observaron que el dietilestilbestrol y el estradiol suprimen completamente el crecimiento de tres aislamientos de *C. neoformans*. La importancia de este hallazgo consiste en la posibilidad de usar el dietilestilbestrol como un recurso terapéutico, ya que se comprobó que 5 mg de este compuesto dado a los pacientes con meningitis criptocócica aumentan el índice de fagocitosis de esta levadura. La concentración inhibitoria mínima del estradiol o del dietilestilbestrol, en combinación con anfotericina B es mucho menor que la usada con esteroides o anfotericina B solos (Mohr *et al.*, 1973).

*Aspergillus fumigatus* y *A. flavus* son agentes frecuentes de aspergilosis en pacientes inmunocomprometidos y en individuos con corticoterapia. La hidrocortisona estimula el crecimiento de *A. fumigatus* en 44% comparado con el control. Este efecto es especie-específico y dosis-dependiente. La concentración que favoreció el crecimiento máximo ( $10^{-6}$  M) es equivalente al nivel sérico máximo en humanos después de la administración intravenosa de 20 mg de hidrocortisona (Ng TTC *et al.*, 1994).

Aunque algunos de los estudios antes mencionados han usado hormonas a altas dosis, es evidente que los hongos son capaces de desencadenar una respuesta biológica en presencia de estas sustancias hormonales.

## **VII. Proteínas fúngicas que unen hormonas esteroides**

Se han descrito varias proteínas citosólicas de hongos capaces de unirse a hormonas esteroides de mamíferos. Estas proteínas se han encontrado en muchos hongos con diferente grado de patogenicidad para el humano. Estas proteínas tienen una elevada afinidad y especificidad por las hormonas esteroides. En la **Tabla 1** se encuentra una recopilación de algunas características bioquímicas de estas moléculas estudiadas en los hongos patógenos.

Por medio de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica, Xi Zhao *et al.*, (1995) demostraron que la EBP está particularmente asociada con las vacuolas en *C. albicans*.

**Tabla 1.** Características bioquímicas de las proteínas que unen hormonas esteroides de mamíferos estudiadas en hongos patógenos (Modificado de Gooday GW y Adams DJ, 1993).

Hormona	Especies	Kd (nM)	N <sub>max</sub> (pmol /mg proteína <sup>-1</sup> )	Competidores fuertes	Competidores débiles	Competidor endógeno
Corticosterona	<i>C. albicans</i> micelio (1)	6.3	0.65	ND	ND	ND
	<i>C. albicans</i> levadura (1-5)	4.9-32.9	0.004-2.41	Corticosterona, Progesterona	11β-Cortisol, Prednisolona, R5020, Ketoconazol, Miconazol, Econazol, Ergosterol	Sí
	<i>Candida</i> spp (3)	6.0-38.0	0.08-6.53	ND	ND	ND
17β-Estradiol	<i>C. albicans</i> levadura (6-8)	6.0-110.0	0.04-13.24	17β-Estradiol, Estrone, Estriol	17α-Estradiol	ND
	<i>C. glabrata</i> (6)	23.0-25.9	0.66-5.4	ND	ND	ND
	<i>C. immitis</i> (9)	21.0-37.0	0.5-1.56	17β-Estradiol, Estrone, Estriol, Dietilestilbestrol	17α-Estradiol, Testosterona, Progesterona, R5020, Dexametasona, Corticosterona, Ergosterol	ND
	<i>P. brasiliensis</i> micelio (10)	13	0.078	17β-Estradiol	Dietilestilbestrol	ND
	<i>P. brasiliensis</i> levadura (10-12)	8.5-17.0 150.0	0.12-0.59 1.7-2.6	17β-Estradiol, Estrone, Estriol, Progesterona	17α-Estradiol, Dihidrotestosterona, Testosterona, Dietilestilbestrol	ND
	<i>S. cerevisiae</i> (13)	1.6-1.8	2.0-2.8	17β-Estradiol, Estrone, Estriol	17α-Estradiol, Progesterona, Tamoxifen, Dietilestilbestrol	Sí

Tabla 1. (Cont.).

Hormona	Especies	Kd (nM)	N <sub>max</sub> (pmol /mg proteína) <sup>-1</sup>	Competidores fuertes	Competidores débiles	Competidor endógeno
Progesterona	<i>A. benhamie</i> (+) (14)	162.0	8.89	ND	ND	ND
	<i>A. benhamie</i> (-) (14)	173.0	14.38	ND	ND	ND
	<i>M. canis</i> (14)	190.0	15.56	Progesterona, Desoxicorti- costerona	Dihidrotestos- terona, Desoxicortisol Corticosterona	ND
	<i>T. mentagrophytes</i> (14, 15)	95.0	4.98	Progesterona, R5020, Androstene- diona, Deoxycorti- costerona	Dihidroepi- androsterona, Dihidrotestos- terona, Testosterona, 17 $\alpha$ -OH- progesterona, 18-OH- desoxicorticoste- rona, Aldosterona	ND
	<i>T. rubrum</i> (14)	16.0	0.2	ND	ND	ND
	<i>P. verrucosa</i> (16)	6.02	0.12	Progesterona	Testosterona	ND
	<i>R. nigricans</i> (17)	2.1-7.0	0.036-0.218	Progesterona	Progesterona, Testosterona, 11 $\alpha$ -OH- Progesterona, Estrona, Colesterona	Si
R5020 (progestina sintética)	<i>C. immitis</i> (18)	1.24-36.0	0.014-0.2	R5020	Progesterona, Dihidrotestos- terona	Si
Testosterona	<i>C. immitis</i> (9)	28.0- 150.0	15.8-38.9	Testosterona, Dihidrotestos- terona	Metiltrienolona, 17 $\beta$ -Estradiol	ND

ND: No determinado

Referencias: (1) Loose y Feldman, 1982; (2) Loose *et al.*, 1981; (3) Loose *et al.*, 1983a; (4) Stover *et al.*, 1983; (5) Powell y Drutz, 1983; (6) Powell *et al.*, 1984; (7) Othman *et al.*, 1988; (8) Skowronski y Feldman, 1989; (9) Powell y Drutz, 1984; (10) Stover *et al.*, 1986; (11) Loose *et al.*, 1983b; (12) Restrepo *et al.*, 1984; (13) Burshell *et al.*, 1984; (14) Clemons *et al.*, 1988; (15) Schar *et al.*, 1986; (16) Hernández-Hernández *et al.*, 1995b; (17) Lenasi y Hudnik-Plevnik, 1996; (18) Powell *et al.*, 1983.

Los sistemas de unión a hormonas esteroides resumidos en la Tabla 1 presentan algunas características que vale la pena mencionar: (a) cada sistema es altamente específico y solo responde a compuestos con potencia esteroidea conocida; (b) cuando se han estudiado varias cepas de una misma especie, responden de manera diferente, lo que probablemente sugiere que la producción de proteínas de unión a esteroides es variable y que podría estar relacionada con la virulencia; (c) en algunos casos la  $K_d$  de las proteínas fúngicas es similar a aquella reportada en los sistemas de unión a esteroides de mamíferos (estradiol y progesterona en mujeres embarazadas: ca.  $10^{-8}$  M (Batra *et al.*, 1979); testosterona en hombres normales: ca.  $10^{-10}$  M (Dunn *et al.*, 1981), sugiriendo la posibilidad de una interacción significativa entre las proteínas fúngicas y los niveles fisiológicos de esteroides no conjugados en la sangre durante el embarazo; (d) los valores reales de  $K_d$  en los sistemas intactos probablemente sean superiores a los reportados; (e) la presencia de dos o más proteínas fúngicas con diferente capacidad de unión a esteroides, podría reflejar la existencia de una familia de proteínas con propiedades similares o complementarias; (f) la existencia de ligandos endógenos (como se ha reportado en *C. albicans* y *S. cerevisiae*) podría mostrar efectos aditivos con los ligandos exógenos usados por los diferentes investigadores.

El papel de estas proteínas fúngicas de unión a hormonas esteroides en la patogenicidad y virulencia fúngicas aún no se ha determinado. Sin embargo, continua nuestro interés y el de otros grupos en esta importante línea de investigación.

### **VIII. Estudios moleculares de la proteína que une corticosteroides y la proteína que une estrógenos**

Los avances más relevantes en el estudio molecular de las proteínas fúngicas que unen hormonas esteroides, se han logrado con la proteína de unión a corticosteroides (Corticosteroid Binding Protein, CBP) y con la proteína de unión a estrógenos (Estrogen Binding Protein, EBP), ambas de *C. albicans*.

Utilizando técnicas de unión a  $^3\text{H}$ -corticosterona en *C. albicans* se identificó una CBP (Loose y Feldman, 1982; Powell y Drutz, 1983; Loose *et al.*, 1983a).



Inicialmente se pensó que esta proteína podría estar relacionada con el receptor a glucocorticoides de mamíferos. Esta CBP fue purificada y secuenciada. El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló un motivo de unión a dinucleótidos altamente conservado Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly (aminoácidos 13-18) presente en las proteínas de unión a NAD y FAD (Wierenga, 1983; Moller y Amons, 1985).

La presencia de una secuencia de impresión digital (fingerprint sequence) en un pliegue  $\beta\alpha\beta$  para la unión al nucleótido y un residuo de ácido glutámico en el carbono terminal de esta región (aminoácidos 8-41) el cual está asociado a la unión a FAD, sugiere que CBP puede ser una proteína de unión a flavina. Un segundo motivo potencial de unión a nucleótidos que es compatible con la secuencia consenso Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Lys, está presente en los aminoácidos 347-353. Ya que las proteínas de unión a NAD/FAD a menudo son oxidoreductasas, deshidrogenasas u oxidasas de función mixta, es posible que CBP tenga esa actividad enzimática y que los esteroides que se unen a CBP representen substratos o efectores alostéricos para esa enzima (Malloy *et al.*, 1993). La secuencia de proteínas fue utilizada para sintetizar oligonucleótidos degenerados y usarlos en las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El estudio genético reveló un marco de lectura abierta de 1467 pb que codifican para una proteína con peso molecular de 55 545 Da. Este gen se localiza en un locus único en el cromosoma R y se expresan como un transcrito de 1.8 Kb. El estudio comparativo con la biblioteca genómica no mostró relación entre el gen de CBP y los miembros de la superfamilia de receptores esteroides descritos actualmente (Malloy *et al.*, 1993).

Recientemente, utilizando las técnicas de transcripción inversa seguida por PCR, se detectó el gen de CBP en los hongos patógenos *Madurella grisea*, *P. verrucosa*, *Sporothrix schenckii* y *T. mentagrophytes*, así como en *S. cerevisiae*. Un fragmento de 125 pb del gen de CBP de *T. mentagrophytes* fue secuenciado y comparado con el de *C. albicans*; se encontró una identidad de 98%, sugiriendo que el gen de CBP está altamente conservado entre los hongos estudiados. El análisis de Southern blot mostró dos o tres bandas de hibridación indicando probablemente

la existencia de más de una copia del gen de CBP o la presencia de genes estructuralmente relacionados (Hernández-Hernández *et al.*, 1999).

El papel funcional de CBP en *C. albicans* aún no se conoce y en el futuro deberá determinarse si esta proteína participa en la patogenicidad de este organismo. Sin embargo, el ketoconazol e imidazoles antifúngicos relacionados desplazan la corticosterona del sitio de unión de CBP (Stover *et al.*, 1983). El mecanismo de acción antifúngica de estos agentes es la inhibición de enzimas metabólicas específicas, principalmente el citocromo P-450 (Feldman, 1986).

A partir de la purificación y secuenciación de aminoácidos de dos fragmentos peptídicos de EBP (EBP1 y EBP2) de *C. albicans*, fueron diseñados oligonucleótidos degenerados y usados para la amplificación de ADN por PCR. Los autores amplificaron un producto de 800 pb y éste fue utilizado para rastrear una biblioteca genómica de *C. albicans*. El fragmento EBP1 muestra un marco de lectura abierta de 1221 pb que codifica para una proteína con 407 aminoácidos de 46 073 Da, el tamaño estimado de EBP1 (Skowronski y Feldman, 1989). El análisis de Northern blot reveló un solo transcrito de aproximadamente 1.6 Kb, mientras que por Southern blot se identificaron tres fragmentos de hibridación. La búsqueda en la base de datos de proteínas mostró que EBP1 comparte un 46% de identidad con los aminoácidos de la Old Yellow Enzyme (OYE), una oxidorreductasa de *S. cerevisiae*, pero no está relacionada con el receptor a estrógenos como se especuló previamente. Una región de EBP1 es 34% idéntico y 62% similar al citocromo P-450 XXIB (esteroide 21-hidroxilasa), una enzima involucrada en la vía esteroidogénica humana. Es interesante señalar que esta región de aminoácidos se superpone con una área conservada entre las flavoproteínas, incluyendo la OYE. La sobreexpresión de EBP1 en *S. cerevisiae* mostró actividad de oxidorreductasa que fue inhibida por el 17  $\beta$ -estradiol *in vitro*. Los autores sugieren que los estrógenos sirven como sustratos para EBP1 el cual los convierte en otros compuestos, o bien los estrógenos se unen a EBP1 y modulan la actividad de oxidorreductasa (Madani *et al.*, 1994).

La proteína de unión a estrógenos recombinante (EBP1) fue purificada usando un esquema de afinidad modificado previamente desarrollado para la OYE

de *S. cerevisiae*. Se demostró que como la OYE, la proteína se une a una variedad de compuestos con una estructura fenólica, incluyendo el 17  $\beta$ -estradiol y compuestos con una estructura ceto  $\alpha,\beta$ -no saturado o aldehído. EBP1 tiene actividad de NADPH oxidorreductasa, y transfiere electrones del NADPH a todas las cetonas  $\alpha,\beta$  no saturadas y aldehídos estudiados, por medio del cofactor FMN. La inhibición de la reacción estable por el 17  $\beta$ -estradiol, con una  $K_i$  de 10 nM, indica unión exclusiva de este esteroide a la enzima en su estado oxidado. Se ha concluido que EBP manifiesta muchas funciones y se ha identificado como un miembro de la familia de enzimas OYE (Buckman y Miller, 1998).

### **IX. Biotransformación fúngica de esteroides**

El interés de la transformación de esteroides se remonta a la época de la Segunda Guerra Mundial, cuando se sospechaba que la fuerza aérea alemana administraba corticosteroides a sus pilotos para aumentar su resistencia al shock, mejorar su visión nocturna y, así mismo, mejorar su tolerancia a las grandes altitudes. El impacto fisiológico de estas sospechas llegó en 1949, cuando varios científicos de la Clínica Mayo en Estados Unidos, anunciaron que la cortisona tenía propiedades anti-inflamatorias útiles en el tratamiento de las enfermedades articulares degenerativas como la artritis reumatoide. En vista de que estos compuestos serían ampliamente utilizados y a su elevado costo, muchos laboratorios invirtieron recursos para sintetizar esteroides a un menor costo. La solución a esta situación fue dada por un hongo. En 1952 en los laboratorios Upjohn, Peterson y Murray encontraron que *Rhizopus arrhizus* y *R. nigricans* hidroxilan la progesterona en la posición 11 $\alpha$ . Este y muchos otros estudios adicionales mejoraron los productos transformados y a su vez, disminuyeron unas 100 veces el costo de la producción de la hidrocortisona. (Smith *et al.*, 1993). La importancia fisiológica de la hidroxilación de esteroides en los mamíferos radica en que representa un mecanismo de desintoxicación de los esteroides exógenos o a la activación de otras drogas. La transformación microbiana es una fuente de

información útil sobre el metabolismo de los esteroides sintéticos en los mamíferos, debido a que la vía metabólica a menudo es similar en los microorganismos (Brzezowska *et al.*, 1996).

Varios hongos, especialmente del orden *Mucorales*, introducen un grupo hidroxilo en la posición 14  $\alpha$  de la progesterona y otros esteroides; la configuración 14  $\alpha$ -hidroxi puede ser después químicamente transformada a 14  $\beta$ -hidroxi que se encuentra normalmente en los esteroides cardioactivos. Otro derivado del 14  $\alpha$ -hidroxi, el 14 $\alpha$ -hidroxiandrost-4-eno-3,6,17 triona, inhibe la actividad de la aromatasas y la formación de estrógenos en tumores de placenta y útero humanos (Hu *et al.*, 1995). *Absidia coerulea* fue utilizada para investigar las transformaciones de la testosterona, androstenediona, progesterona y derivados de la testosterona. Todos los substratos fueron principalmente hidroxilados en la posición C-14. La testosterona y androstenediona produjeron principalmente 14  $\alpha$ -hidroxitestosterona y 14  $\alpha$ -hidroxiandrostenediona. La progesterona fue transformada a 7  $\alpha$ , 14  $\alpha$ -dihidroxiprogesterona. El sitio y estequiometría del grupo hidroxilo introducido dependen de la estructura del substrato (Brzezowska *et al.*, 1996). Los estudios con *Cochliobolus lunatus* revelaron que el hongo hidroxila la progesterona en las posiciones 7 $\alpha$ , 11 $\beta$  y 14 $\alpha$  y oxida el grupo 11 $\beta$ -hidroxi a cetona (Vita *et al.*, 1994).

La biotransformación de esteroides ha sido también estudiada en *Fusarium culmorum* (Kolek y Swizdor, 1998), *Aspergillus flavus* (citado por Brzezowska *et al.*, 1996), *Aspergillus niger* (Mostafa, 1995) y *Penicillium decumbens* (Holland *et al.*, 1995).

Respecto a los hongos patógenos hay pocos estudios. Schar *et al.* (1986) y Clemons *et al.* (1988) observaron que la progesterona y en menor grado la 11-desoxicorticosterona y la dihidrotestosterona, inhiben el crecimiento de *T. mentagrophytes* en forma dosis-dependiente. También observaron que con el tiempo disminuye el efecto inhibitorio y que fraccionando la hormona y adicionándola a intervalos de 24 h se incrementa la potencia del efecto inhibitorio. En 1971, Capek y Simek consideraron que *T. mentagrophytes* metabolizaba la progesterona a 15- $\alpha$  y

15- $\beta$  hidroxiprogesterona. Algunos años después, Clemons *et al.* (1989) confirmaron estos resultados y además, demostraron que *T. mentagrophytes* transforma la progesterona también a 1-dihidroprogesterona y 11  $\alpha$ - hidroxiprogesterona.

En un estudio con *C. neoformans* incubado con  $^3\text{H}$ -progesterona, se detectó que este hongo transforma la progesterona a estradiol, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, testosterona, androstenediona y dihidrotestosterona (Vartivarian, 1992).

## X. Enzimas esteroides en hongos

### A. Esteroide hidroxilasas

Diversos estudios indican que las hidroxilasas esteroides fúngicas son mono-oxigenasas del citocromo P-450 sitio-selectivas (Breskvar y Hudnik-Plevnik, 1977, 1981; Jayanti *et al.*, 1982; Samanta y Ghosh, 1987) que son diferentes de la citocromo P-450 lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilasa, una enzima que cataliza la desmetilación oxidativa del lanosterol en la biosíntesis del ergosterol, un esteroide de la membrana fúngica

La participación del citocromo P-540 de los hongos filamentosos en la hidroxilación exógena fue reportada por primera vez en un sistema microsomal inducible, unido a la membrana, de progesterona 11  $\alpha$ -hidroxilasa de *R. nigricans* (Breskvar y Hudnik, 1977). El sistema transportador de electrones que contiene citocromo P-450 está formado de tres componentes similares a los sistemas bacterianos y mitocondriales. Consiste de citocromo P-450 (46 Kd) como oxigenasa terminal, una ferredoxina hierro-azufre (rizoporedoxina) y una FAD-flavoproteína (NADPH-rizoporedoxina reductasa) como acarreador de electrones (Cresnar *et al.*, 1985; Breskvar *et al.*, 1987).

Los sistemas de hidroxilasas no han sido totalmente estudiadas y los citocromos P-450 no han sido purificados. Los verdaderos substratos fisiológicos de estas enzimas se desconocen (Smith *et al.*, 1993).

## B. Citocromos P-450 progesterona-hidroxilasa

Muchos investigadores han centrado su interés en la citocromo P-450 esteroide 14  $\alpha$ -desmetilasa de *A. fumigatus* debido a su inhibición por los fungicidas azólicos. Los datos disponibles ponen en evidencia una gran heterogeneidad del citocromo P-450 en este organismo. Cuando los microsomas de *A. fumigatus* son incubados a 22°C en presencia de  $\text{NaIO}_4$ , catalizan la hidroxilación eficiente de la progesterona produciendo solamente 7  $\beta$ -, 11  $\alpha$ - y 15  $\beta$ -hidroxiprogesterona. La ebullición, la adición de monóxido de carbono y la incubación con el fungicida azólico ketoconazol inhiben totalmente la hidroxilación, como se esperaba del sistema catalizado con citocromo P-450. La 7  $\beta$ -hidroxilación de la progesterona es más sensible al ketoconazol que la 11  $\alpha$ - o la 15  $\beta$ -hidroxilación. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  del ketoconazol sobre la esteroide hidroxilasa están entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a la inhibición sobre la lanosterol desmetilasa. La progesterona hidroxilasa cambia rápidamente en la membrana. Los microsomas preparados de micelio preincubados con cicloheximida y progesterona cambian muy poco comparada con los controles no preincubados. El requerimiento de  $\text{NaIO}_4$  para la hidroxilación de la progesterona puede ser substituida por otros compuestos peroxi- y por NADPH y  $\text{O}_2$ , pero no por NADH (Smith *et al.*, 1993).

## C. Esteroide 5 $\alpha$ -reductasa

La esteroide 5  $\alpha$ -reductasa es una enzima que cataliza la reducción dependiente de NADPH de una variedad de esteroides que contienen dobles enlaces 3 ceto,  $\Delta$  4,5. (Wilson *et al.*, 1993). Los primeros estudios propusieron que esta enzima participa en el catabolismo de los esteroides, terminando la acción hormonal (Schneider, 1952). Estudios posteriores revelaron que la 5  $\alpha$ -reductasa también juega un papel anabólico, catalizando la conversión de testosterona a un andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (Bruchovsky y Wilson, 1968). Los estudios de expresión y clonación han identificado ADNc que codifican para dos

isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa humana (Andersson y Russell, 1990; Andersson *et al.*, 1991). Las dos enzimas (designadas tipo 1 y 2, por el orden en que fueron clonadas) son aproximadamente 46% idénticas en su secuencia, comparten preferencias de sustrato y tienen perfiles de hidropatía y estructura genética similar (Andersson *et al.*, 1991; Jenkins *et al.*, 1992; Thigpen y Russell, 1992). Son diferentes en sus niveles de expresión en la próstata, en el pH óptimo y en la sensibilidad a ciertos inhibidores (Andersson *et al.*, 1991; Jenkins *et al.*, 1992).

Utilizando técnicas de PCR y Southern blot en varios hongos patógenos y no patógenos, recientemente se identificó en nuestro laboratorio un gen relacionado con el gen de la 5  $\alpha$ -reductasa tipo 2 de humano en algunos de ellos (Ver la sección Resultados No Publicados de esta tesis). El trabajo actual está enfocado a la clonación y secuenciación de este fragmento para establecer la homología con otros genes para 5  $\alpha$ -reductasa reportados y desde luego, abordar el papel que tiene esta enzima en los hongos.

## **XI. Las hormonas esteroides como factores predisponentes de las infecciones micóticas**

Sin considerar el agente etiológico de cualquier proceso infeccioso, la evolución clínica de la enfermedad se modifica por la presencia de hormonas esteroides exógenas o endógenas. El resultado final de la interacción entre estas hormonas y los agentes infecciosos es la anulación o el establecimiento de una enfermedad, muchas veces grave, de mayor incidencia en hombres o mujeres.

La severidad de algunas infecciones inducida por el tratamiento con esteroides, ha sido particularmente atribuida a la inmunomodulación ejercida por esas hormonas. Sin embargo, muchos estudios sugieren que esta severidad podría estar relacionada con la interacción entre hormonas esteroides y los microorganismos infecciosos.

Desde hace muchos años se sabe que la adherencia de los microorganismos infecciosos a los tejidos del hospedero es el paso crucial para que se establezca y desarrolle un proceso infeccioso (Alkan *et al.*, 1977; Aly *et al.*, 1977; Kimura y

Pearsall, 1978; King *et al.*, 1980; Klotz *et al.*, 1983; Svandborg-Eden *et al.*, 1976). En lo que se refiere a los hongos, Segal *et al.* (1984) encontraron una correlación entre el nivel de adherencia de *C. albicans in vitro* a las células epiteliales de exfoliación vaginal (CEV) y el estado hormonal de las donadoras. Kalo y Segal (1988) investigaron la influencia de las hormonas sexuales en el nivel de adhesión de las levaduras a las células HeLa después de exponer las células a las hormonas. Estos autores observaron que la exposición a la progesterona y a la testosterona aumenta significativamente la adherencia de las levaduras a las células HeLa, mientras que el estriol y el estradiol no tuvieron efecto, comparado con los respectivos controles. La exposición de las CEV a la progesterona bajo tres condiciones experimentales (adicionando la mezcla de adhesión con las hormonas, exponiendo las CEV a las hormonas durante 18 h antes de la prueba de adhesión y exponiendo las levaduras a las hormonas 1 h antes de la prueba) condujo a un aumento de la adherencia, mientras que la testosterona tuvo tal efecto solamente cuando se encontraba en la mezcla de adherencia. Además, la exposición al  $17 \beta$ -estradiol o al estriol no tuvo efecto sobre el nivel de adherencia de las levaduras o incluso la redujo (Kalo y Segal, 1988).

Los cambios hormonales predisponen a las mujeres a la candidosis vaginal, condición patológica muy frecuente en la consulta ginecológica durante el embarazo. Cuando mujeres embarazadas y no embarazadas fueron experimentalmente inoculadas con *C. albicans*, una gran incidencia de infección ocurrió en las mujeres embarazadas (Bland *et al.*, 1937). Por otro lado, las mujeres embarazadas son portadoras de *Candida* con mayor frecuencia que las mujeres no embarazadas (Odds FC, 1979). Un elevado porcentaje de mujeres que toman anticonceptivos orales ha desarrollado candidosis vaginal (Apisarnthanarax *et al.*, 1974).

Los factores predisponentes de la rata a la infección vaginal con *C. albicans*, incluyen la presencia de un epitelio cornificado y la ausencia de leucocitos. Estas condiciones están presentes durante el estro o después de la ovariectomía y la administración de estrógenos. Cuatro horas después de la infección vaginal con una suspensión de blastosporas de *C. albicans*, se observó un mayor número y longitud



de los tubos germinativos en el líquido de lavado vaginal en las ratas que estaban en estro, comparados con aquellas que estaban en diestro. En las ratas ovariectomizadas y después tratadas semanalmente con estrógenos, progesterona o ambos, los resultados indicaron que los estrógenos promueven el mantenimiento de la infección, mientras que la progesterona no la promueve (Kinsman y Collard, 1986). El mantenimiento de la infección sólo es posible cuando los filamentos de la levadura logran penetrar la capa cornificada y, por lo tanto, no son fácilmente eliminados con el recambio celular (Sobel *et al.*, 1985).

El elevado índice de colonización vaginal asintomática con *Candida spp* se asocia con diferentes factores que incluyen el embarazo, el uso de anticonceptivos bucales que contienen estrógenos y una diabetes mellitus descompensada. El bajo índice de aislamiento de *Candida spp* en mujeres premenárquicas y la baja prevalencia de vaginitis por *Candida* después de la menopausia enfatizan la dependencia hormonal de la infección (Sobel, 1993).

Las hormonas esteroides producen notables cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos *in vitro* y/o *in vivo* en prácticamente todos los hongos patógenos descritos en este documento. Además, los esteroides exógenos producen cambios en el microambiente del hospedero, particularmente en el sistema inmune. De cualquier manera, ambas condiciones coinciden favoreciendo el establecimiento de una infección muchas veces severa o incluso mortal.

### **XIII. Diferente incidencia de las micosis humanas en ambos sexos**

A través de la mayoría de los reportes clínico-epidemiológicos se ha puesto de manifiesto que las infecciones de cualquier etiología, incluyendo las causadas por hongos, se presentan con una diferente incidencia entre hombres y mujeres. Esta diferencia ha sido básicamente atribuida a factores genéticos, laborales e inmunes (Kernbaum *et al.*, 1976). En los últimos años se han tomado en consideración los factores hormonales, basados en los estudios sobre la interacción hormonas sexuales-microorganismos. Cualquiera de las condiciones expuestas previamente o, con mayor probabilidad, dos o más de ellas, están participando en el resultado aparentemente simple, como es el establecimiento de una infección micótica. Una

lista de las micosis humanas más frecuentes, con el predominio por sexo correspondiente, se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Distribución por sexo de las micosis humanas más comunes.

MICOSIS	PREDOMINIO POR SEXO	REFERENCIA
Pitiriasis versicolor	Hombres Ninguno	Roberts , 1969 Kwon-Chung, 1992
Exofialosis (Tinea nigra)	Mujeres	Rippon , 1988
Piedra blanca	Hombres	Rippon , 1988
Dermatofitosis	Hombres Ninguno	Sentamilselvi <i>et al.</i> , 1998 Devliotou-Panagiotidou <i>et al.</i> , 1995
Cromoblastomicosis	Hombres	Brygoo y Destombes, 1976
Feohifomicosis	Hombres	Bennett <i>et al.</i> , 1973
Esporotricosis	Hombres Mujeres	Auld y Beardmore, 1979 Rippon , 1988
Micetoma	Hombres	López-Martínez <i>et al.</i> , 1992
Lobomicosis	Hombres	Lacaz y Rose, 1969
Rinosporidiosis	Hombres	Karunaratne, 1964
Basidiobolomicosis	Hombres	Tio <i>et al.</i> , 1966
Conidiobolomicosis	Hombres	Martinson y Clark, 1967
Histoplasmosis capsulati	Hombres	Rippon , 1988
Histoplasmosis duboisii	Hombres	Ajello , 1983
Coccidioidomicosis	Hombres	Stevens , 1981
Forma diseminada	Hombres y embarazadas	Smale y Waechter, 1970
Blastomicosis	Hombres	Furcolow <i>et al.</i> , 1970
Paracoccidioidomicosis	Hombres	Restrepo y Gutiérrez, 1970

Finalmente, serán mencionados algunos procesos infecciosos no micóticos con diferente distribución por sexo. El absceso hepático amibiano es más común en hombres que en mujeres (Biagi y Beltrán, 1969). El paludismo es más severo en mujeres que en hombres (Solomon, 1969). Ambas enfermedades se agravan con el embarazo (Wagner *et al.*, 1975; Abioye y Edington, 1972; Solomon, 1969). Los estrógenos a concentraciones fisiológicas inhiben el crecimiento de *Trichomonas vaginalis* y su adherencia a células de mamífero *in vitro*; además estas hormonas actúan como quimiorepelentes (Sugarman y Mummaw, 1988).

Una interesante estrategia de feminización usada por *Taenia crassiceps* en la cisticercosis experimental murina fue descrita por Larralde *et al.* (1995). Los niveles de hormonas sexuales fueron determinados después de diferentes periodos de infección, se contó el número de parásitos colectados de la cavidad peritoneal y se pesaron las gónadas, el útero y las vesículas seminales. En los ratones macho, el estradiol sérico aumentó aproximadamente a 200 veces sus valores normales, mientras que la testosterona disminuyó 90% comparado con los controles. Las vesículas seminales y los testículos disminuyeron en 50% su peso húmedo. El número de parásitos es mayor en las hembras en las primeras etapas de la infección; sin embargo, la carga parasitaria es igualada después en los machos. Estos resultados sugieren que el parásito utiliza algún mecanismo de feminización del hospedero, quizá produciendo su propio estradiol como lo hacen otros parásitos.

#### **XIV. Conclusiones**

Este documento de revisión ha incluido algunos aspectos relacionados con la interacción hongos patógenos-hospedero-hormonas sexuales, haciendo énfasis en la importancia de estos últimos factores en el establecimiento de las micosis humanas. Las hormonas sexuales representan moléculas mensajeras, que forman parte de un sorprendente sistema de señalización que los hongos han desarrollado o conservado y que los sitúa en un nivel comparativo al de otros eucariotes superiores. La capacidad de los hongos para responder a las hormonas exógenas, que eventualmente pueden provenir de un hospedero humano, les permitirá sobrevivir y probablemente proliferar en un ambiente que muchas veces hemos considerado

equivocadamente inhóspito para cualquier agente infeccioso. Los estudios moleculares nos permitirán en un futuro conocer y comprender a profundidad la verdadera participación de las hormonas sexuales en la fisiopatogenia de las micosis.

## II. JUSTIFICACIÓN

- La incidencia de la mayoría de micosis es diferente entre hombres y mujeres.
- Las hormonas esteroides desencadenan ciertos cambios biológicos como la estimulación o inhibición del crecimiento, alteraciones del metabolismo o de la morfología en algunos hongos, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*.
- En los hongos existen proteínas que se unen a hormonas esteroides de eucariotes superiores, las cuales se comportan como receptores de alta afinidad y especificidad.
- Los estudios moleculares hasta hoy realizados aun no han aportado pruebas concluyentes de que las moléculas fúngicas que unen hormonas esteroides presenten similitudes con los receptores a hormonas esteroides de vertebrados superiores.

## III. HIPÓTESIS

- En *Candida albicans*, *Madurella grisea*, *Phialophora verrucosa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichophyton mentagrophytes* se encontrarán genes que codifican para el receptor nuclear a progesterona de útero de rata.
- En *M. grisea*, *P. verrucosa*, *S. cerevisiae*, *S. schenckii* y *T. mentagrophytes* se encontrarán genes que codifican para las proteínas que unen corticosteroides y estrógenos reportados en *C. albicans*.

- El gen o los genes que codifican para la proteína que une corticosteroides o para la proteína que une estrógenos que se logren secuenciar de *M. grisea*, *P. verrucosa*, *S. cerevisiae*, *S. schenckii* o *T. mentagrophytes* tendrán una elevada similitud con sus contrapartes en vertebrados superiores o con *C. albicans*.
- La expresión de los genes que codifican para la proteína que une corticosteroides y para la proteína que une estrógenos será modificada por la presencia de hormonas esteroides.

#### IV. OBJETIVOS

- Localizar genes que codifican para receptores a progesterona en seis especies de hongos: *C. albicans*, *M. grisea*, *P. verrucosa*, *S. cerevisiae*, *S. schenckii* y *T. mentagrophytes*, reportados en útero de rata.
- Localizar genes que codifican para la proteína que une corticosteroides y para la proteína que une estrógenos en *M. grisea*, *P. verrucosa*, *S. cerevisiae*, *S. schenckii* y *T. mentagrophytes*, previamente identificados en *C. albicans*.
- Determinar la homología de los genes fúngicos identificados con los genes correspondientes descritos en otros organismos eucariotes.
- Estudiar el efecto del 17  $\beta$ -estradiol en la expresión del gen que codifica para la proteína que une corticosteroides y del gen que codifica para la proteína que une estrógenos.

## **V. RESULTADOS PUBLICADOS**



## Detection and expression of corticosteroid binding protein gene in human pathogenic fungi

Francisca Hernández-Hernández<sup>1</sup>, Rubén López-Martínez<sup>1</sup>, Ignacio Camacho-Arroyo<sup>2</sup>, C. Adriana Mendoza-Rodríguez<sup>2</sup> & Marco A. Cerbón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina;

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Received 9 April 1998; accepted in revised form 22 December 1998

### Abstract

Participation of steroid hormones in the growth of several fungal species has been widely reported. The aim of the present study was to detect the presence and expression of the corticosteroid binding protein (CBP) gene in different pathogenic fungal isolates from human clinical specimens. Genomic DNA and total RNA were obtained from six different pathogenic fungal species and submitted to Southern blot and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction respectively. The results indicated that all the fungi studied presented and expressed CBP gene. The sequence of a PCR product of CBP gene fragment corresponding to the carboxyl terminal region in *Trichophyton mentagrophytes*, which presented the highest CBP expression, showed an identity of 98% as compared to the previously reported gene sequence from *Candida albicans*. The overall results indicate that CBP is a highly conserved gene in fungi and suggest that steroid hormones should play an important physiological role in these eukaryotic organisms.

**Key words:** corticosteroids, pathogenic fungi, steroid binding proteins, *Trichophyton mentagrophytes*

### Introduction

The role of steroid hormones in many fungal species has been widely studied. It has been reported that the incidence and recurrence of infections produced by *Candida* significantly increases during therapeutic corticosteroid and oral contraceptive administration, premenstrual phase and pregnancy [1–3]. Clinical and laboratory information about steroid hormones and their relation to human fungal infections suggests that these hormones should modify fungi pathogenicity [4–6].

The existence of various steroid binding proteins such as estrogen-binding protein and progesterone-binding protein has been demonstrated in different fungal species [7–9]. The presence of a corticosteroid-binding protein (CBP) has been described in *Candida albicans* [10–12]. CBP gene has been cloned and sequenced in this species [13]. The aim of the present work was to study the presence and expression of CBP gene in different human pathogenic fungal species.

### Materials and methods

#### Fungi

Five isolates obtained from human clinical specimens have been included in this study: *Candida albicans* (IP-884.65), *Madurella grisea* (IP-970), *Phialophora verrucosa* (IP-273), *Sporothrix schenckii* (FM-307) and *Trichophyton mentagrophytes* (FM-296). One strain of *Saccharomyces cerevisiae* (FM-147) was an environmental isolate. All isolates were grown in Sabouraud Dextrose Broth in a shaker at 25 °C. *C. albicans* and *S. cerevisiae* were grown for 48 h; *S. schenckii*, for 3 days and *M. grisea*, *P. verrucosa* and *T. mentagrophytes*, for 5 days. Yeasts were harvested by centrifugation and mycelial fungi by paper filtration.

#### DNA extraction and quantitation

DNA extraction was performed according to the protocol used by Hoffman and Winston with minor mod-



ifications [14]. Briefly, frozen mycelium was ground with mortar and pestle in liquid nitrogen until a fine powder was obtained. The powder was transferred to a 1.5 ml microfuge tube containing 200  $\mu$ l of lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris.Cl, pH 8.0, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) and 200  $\mu$ l of phenolchloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). DNA was gently vortexed for 2 min and centrifuged for 5 min at 12000  $\times$  g. The aqueous layer containing DNA was transferred to a fresh tube. DNA was precipitated with 1 ml absolute ethanol. After centrifugation two consecutive washes with 75% ethanol were performed. The pellet was resuspended in 50  $\mu$ l TE containing 3  $\mu$ l of RNase A solution (10 mg/ml). After incubating for 5 min at 37 °C, DNA was precipitated with absolute ethanol. Finally, DNA quality was verified on 0.8% agarose gels and quantified by spectrophotometry at 260 nm.

#### *Southern blot analysis*

Total DNA (10  $\mu$ g) was double digested with 2 U/ $\mu$ g of either EcoR I and BamH I overnight using the buffers as described by the supplier (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA). DNA was separated by electrophoresis on 1% agarose gels in 1X TBE buffer at 70 V for 3 h. DNA was transferred to Gene Screen membranes (New England Nuclear Corp., Boston, USA) in 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0), washed with 6X SSC buffer for 3 min. Membranes were crosslinked in a UV Stratilinker 1800 for 40 s (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Membranes were prehybridized overnight in 1X Denhart's solution (1% bovine serum albumin, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% Ficoll 400) that contained 50% formamide, 0.2% SDS, 10 mM EDTA, 120 mM phosphate buffer and 50  $\mu$ g/ml denatured DNA salmon sperm. Hybridization was performed in prehybridization solution (0.2 ml/cm<sup>2</sup>) with a 125 bp CBP cDNA probe obtained from *C. albicans* by PCR. cDNA was labeled by the random primer method [15] (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) with <sup>32</sup>P-dCTP (specific activity of 2.0  $\times$  10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g of DNA). After hybridization membranes were washed twice with 2X SSC at room temperature followed by two washes under high stringency conditions (0.1X SSC, 0.1% SDS at 60 °C) for 15 min. Membranes were then exposed to a Kodak X-AR film (Eastman Kodak Co. Rochester) for 48–72 h at –70 °C.

#### *Fungal RNA extraction and reverse transcription followed by PCR*

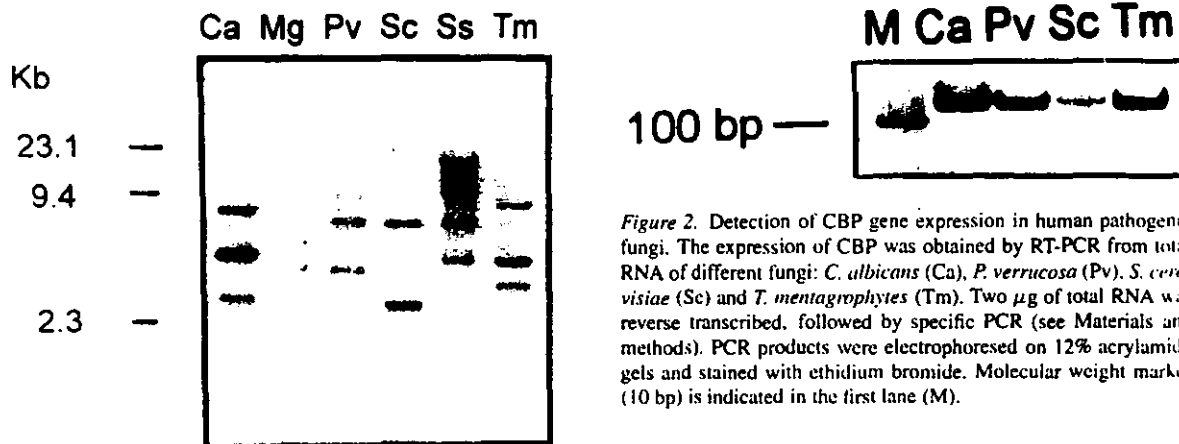
Total RNA was isolated from all fungal strains with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction [16] using Trizol reagent (Gibco-BRL, Inc., Gaithersburg, MD, USA). RNA concentration was determined by absorbance measurement at 260 nm, and its integrity was verified by electrophoresis on 1.0% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize a single strand cDNA. Briefly, 2  $\mu$ g of total RNA were incubated at 37 °C for 1 h with 400 units of M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, Inc) in 10  $\mu$ l reaction volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM for each dNTP and 2.5  $\mu$ M oligo (dT) primers (Gibco-BRL, Inc).

Ten  $\mu$ l of the RT reaction product were subjected to PCR in order to amplify a fragment of the 3' coding CBP gene region. The sequences of the oligonucleotide used were 5'-[CATCCTGATCAAGCTTGG]-3' and 5'-[GAACCCATATATCCGTGG]-3' for the sense and the antisense primers respectively. These sequences were obtained from *C. albicans* which is the only fungus where CBP gene has been cloned [13]. The 50  $\mu$ l PCR reaction included 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M each dNTP, 2.5 units of Taq DNA polymerase (Quantum, Biotechnologies Inc., Laval, Quebec), and 0.5  $\mu$ M of each primer. After an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, the PCR reaction was performed for 30 cycles. The cycling profile was: 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; and 72 °C, 30 s. A final extension cycle was performed at 72 °C for 7 min. All experiments were performed in triplicate.

Twenty five  $\mu$ l of the RT-PCR reaction products of each sample were electrophoresed on 12% acrylamide gel stained with ethidium bromide. The amplification product from *T. mentagrophytes* was excised directly from the gel, and purified by electroelution.

#### *DNA-sequencing*

Purified DNA from PCR products were sequenced with the chain termination sequencing method [17] by using the AmpliCycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Cetus) following the instructions described by the supplier.



**Figure 1.** Southern blot analysis of pathogenic fungal species DNA. Genomic DNA from *C. albicans* (Ca), *M. grisea* (Mg), *P. verrucosa* (Pv), *S. cerevisiae* (Sc), *S. schenckii* (Ss) and *T. mentagrophytes* (Tm) was digested with 2 U/μg of EcoR I and BamH I endonucleases, electrophoresed on 1% agarose gels, and transferred to nylon membranes. The blot was probed with the <sup>32</sup>P-labelled cDNA fragment of the *C. albicans* CBP gene.

## Results

Detection of CBP gene in genomic DNA from pathogenic fungal species was determined by Southern blot using a CBP PCR product from *C. albicans* as a probe. All studied fungi presented a hybridization signal. A different hybridization pattern was evident among the different studied fungi. This indicates that some variations exist in CBP gene structure (Figure 1).

CBP gene expression was detected by RT-PCR. In the analyzed samples a single product of 125 bp corresponding to the expected fragment of CBP gene was obtained (Figure 2). Thus, CBP was expressed in the fungi studied. PCR product from *T. mentagrophytes* was purified and sequenced in both senses. An identity of 98% in this DNA fragment in relation to CBP gene from *C. albicans* (position 1711–1835 in relation to the start transcription site) [13] was observed. Differences were due to the presence in *T. mentagrophytes* of two nucleotide changes at position 1740–1741 related to the start transcription site (data not shown).

## Discussion

In this study we demonstrated the presence and expression of CBP in human pathogenic fungal species by Southern blot, RT-PCR and DNA sequencing analyses. In the genomic DNA from all fungal strains

**Figure 2.** Detection of CBP gene expression in human pathogenic fungi. The expression of CBP was obtained by RT-PCR from total RNA of different fungi: *C. albicans* (Ca), *P. verrucosa* (Pv), *S. cerevisiae* (Sc) and *T. mentagrophytes* (Tm). Two μg of total RNA was reverse transcribed, followed by specific PCR (see Materials and methods). PCR products were electrophoresed on 12% acrylamide gels and stained with ethidium bromide. Molecular weight marker (100 bp) is indicated in the first lane (M).

studied we found several bands in Southern blot analysis. Although the meaning of these bands is yet unknown it is possible that they correspond to CBP isoforms, different copies of this gene or other CBP related genes.

CBP, a cytosolic protein, has been previously found in *C. albicans* by binding and molecular techniques [10, 13]. However, in other species such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Paracoccidioides brasiliensis*, CBP was not detected by binding techniques [12]. It is possible that in the latter species CBP exhibits a very low expression that cannot be detected by binding techniques. Therefore, in our study we decided to detect CBP gene expression in various human pathogenic fungal species by using RT-PCR which is a very sensitive technique.

The DNA sequence of CBP amplification PCR product obtained in *T. mentagrophytes* presented 98% of identity as compared with CBP sequence from *C. albicans* [13], indicating that CBP is a highly conserved gene among fungi.

Interestingly, it has been demonstrated that CBP from *C. albicans* does not belong either to the steroid nuclear receptor gene superfamily or to other steroid binding proteins previously reported in mammals [13, 18]. This suggests that CBP should be a new kind of regulatory proteins which mediates glucocorticoid action in fungi. Similar binding proteins that mediate steroid hormone action in fungi such as the estrogen-binding protein have also been previously reported [7]. The presence of nuclear steroid hormone receptors in fungi similar to those found in mammals has not yet been reported. Indeed, yeast have been widely used as a cellular system for expressing steroid hormone receptors [19, 20].

Although it has been reported that glucocorticoids may participate in yeast germination and fungal infection [6, 21] the physiological or pathogenic role of CBP has not yet been elucidated. However, the presence and expression of CBP gene in many pathogenic fungi demonstrated in the present molecular study suggests that its protein product should participate in biochemical processes mediated by glucocorticoids in these species.

The results presented in this study indicate that CBP is a highly conserved gene in fungal species. In spite of the unknown role of its protein, our data support the possibility that CBP in the species studied but *S. cerevisiae* could participate in pathogenic fungal physiology. The role of CBP in the latter species deserves further investigation.

### Acknowledgements

This work was supported by grant No. 207095 from DGAPA, UNAM, México. We thank M.L.A. Flora García-Formenti from CELE, UNAM for the revision of the English manuscript.

### References

1. Apisamthanarax Y, Self SJ, Ramer G, Montes LF. Oral contraceptives and candidiasis. *Cutis* 1974; 14: 77-82.
2. Hurley R. Inveterate vaginal trush. *Practitioner* 1975; 215: 753-756.
3. Odds FC. *Candida and Candidosis*. Leicester: Leicester University Press, 1979.
4. Powell BL, Drutz DJ, Huppert M, Sun SH. Relationship of progesterone- and estradiol-binding proteins in *Coccidioides immitis* to coccidioidal dissemination in pregnancy. *Infect Immun* 1983; 40: 478-485.
5. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implication for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984; 46: 346-353.
6. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA, Kinsman OS, Pitblado K, Coulson CJ. Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications for vaginal candidosis. *Mycoses* 1988; 31: 617-626.
7. Skowronski R, Feldman D. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Candida albicans*. *Endocrinology* 1989; 124: 1965-1972.
8. Schar G, Stover EP, Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Progesterone binding and inhibition of growth in *Trichophyton mentagrophytes*. *Infect Immun* 1986; 52: 763-767.
9. Hernández-Hernández F, De Bievre C, Camacho-Arroyo I, Cerbón M, Dupont B, López-Martínez R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* *in vitro* and characterization of progesterone receptors. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 235-239.
10. Loose DS, Schurman DJ, Feldman D. A corticosteroid binding protein and endogenous ligand in *C. albicans* indicating a possible steroid-receptor system. *Nature* 1981; 293: 477-479.
11. Loose DS, Feldman D. Characterization of a unique corticosterone-binding protein in *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1982; 257: 4925-4930.
12. Loose DS, Stevens DA, Schurman DJ, Feldman D. Distribution of a corticosteroid-binding protein in *Candida* and other fungal genera. *J Gen Microbiol* 1983; 129: 2379-2385.
13. Malloy PJ, Zhao Xi, Madani ND, Feldman D. Cloning and expression of the gene from *Candida albicans* that encodes a high-affinity corticosteroid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1902-1906.
14. Hoffman CH, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 1987; 57: 267-272.
15. Feinberg A, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 137: 6-13.
16. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extractions. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
18. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor super family. *Science* 1988; 240: 889-895.
19. Metzger D, White JH, Chambon P. The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature* 1988; 334: 31-36.
20. Schena M, Yamamoto KR. Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. *Science* 1988; 241: 965-967.
21. Frenkel JK. Role of corticosteroids as predisposing factors in fungal diseases. *Lab Invest* 1962; 11: 1192-1208.

*Address for correspondence:* Francisca Hernández-Hernández, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, C.P. 04510, Mexico, D. F.  
Phone: (525) 6 23 24 58; Fax: (525) 6 23 24 59;  
E-mail: franciscahh@liceaga.facmed.unam.mx

## **VI. RESULTADOS ENVIADOS A PUBLICAR**

# Molecular analysis of steroid binding protein genes in human pathogenic fungi

F. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ,<sup>1\*</sup> and M. A. CERBÓN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), <sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, México D.F., México.

Running title: Steroid binding proteins genes in fungi.

\*Corresponding author. Mailing address: Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México DF, México. Phone: (525) 56 23 24 58 and (525) 6 23 24 60; Fax: (525) 56 23 24 59. E-mail: franciscahh@liceaga.facmed.unam.mx

# Molecular analysis of steroid binding protein genes in human pathogenic fungi

F. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ,<sup>1\*</sup> and M. A. CERBÓN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), <sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, México D.F., México.

Running title: Steroid binding proteins genes in fungi.

\*Corresponding author. Mailing address: Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México DF, México. Phone: (525) 56 23 24 58 and (525) 6 23 24 60; Fax: (525) 56 23 24 59. E-mail: franciscahh@liceaga.facmed.unam.mx

## ABSTRACT

Several epidemiologic and clinical studies in our and other laboratories indicate that most of mycotic infectious diseases present differences between sexes, being men more affected than women. Many studies have shown that fungi respond to different sex steroid hormones and possess steroid hormone binding proteins. In this report, using RT-PCR and Southern blot analysis we showed that six different pathogenic fungal isolates possess steroid binding protein genes which present characteristics similar to those previously reported in mammals or other fungi. The role of these genes in the fungal physiology or pathogenicity is under investigation in our laboratory.

## INTRODUCTION

Over the last years, different clinical and epidemiological studies have shown that several infectious diseases have a generic predominance being men more affected than women. For many years this condition was principally attributed to occupational factors and exposition to the involved etiologic agent.

In the water fungus *Achlya* it has shown that antheridiol and oogoniol, two steroid hormones, are involved in the sexual reproduction process. After the antheridiol purification (1) and characterization of its receptors (2), several studies were performed to determine the role of the mammal's steroid hormones on the biological cycle of several fungi. In many of them it was shown that these hormones stimulate or inhibit the *in vitro* growth (3-5). In addition, many fungi as *Saccharomyces cerevisiae* (6), *Candida albicans* (7), *Phialophora verrucosa* (8), *Paracoccidioides brasiliensis* (9), *Coccidioides immitis* (10) and others possess mammal's steroid hormone binding proteins. Although in some cases the presence of these proteins had been related with infection pathogenesis (11, 12), in most of them the role of their presence in fungal cytosol is unknown.

Among all Steroid Binding Proteins (SBP), only two proteins have been characterized in pathogenic fungi, the Corticosteroid Binding Protein (CBP) and the Estrogen Binding Protein (EBP) of *C. albicans*. These proteins were cloned, sequenced and compared with the steroid hormone receptors reported in mammals, and no homology with those was found. (13). Likewise it was shown that EBP functions as an oxidoreductase and its activity is inhibited by estradiol (14).

From the 18 most frequent human mycosis, it can be observed that with exception of tinea nigra and lymphocutaneous sporotrichosis which are more frequent in women than men, 16 of them have predominance in men (15). The pulmonary coccidioidomycosis is often observed in men, but in pregnant women the dissemination risk is increased (16).

The different generic incidence of human mycosis and the presence of fungal steroid binding capacity conduced us to determine whether different pathogenic fungi possess steroid hormone receptor genes similar or equal to those reported in mammals or steroid binding proteins genes reported in *C. albicans*.

## STEROID HORMONE RECEPTOR GENES IN PATHOGENIC FUNGI

In the present study we searched genes similar to the progesterone nuclear receptor gene reported in rat uterus and for CBP and EBP genes previously reported in *C. albicans*. We used the Reverse Transcriptase followed by Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Southern blot analysis of genomic DNA. Using lithium chloride the RNA extraction was performed. For RT reaction we used 2 µg of RNA of each fungal isolates.

We used six fungal isolates: *C. albicans* (IP 884), *Madurella grisea* (IP 970), *P. verrucosa* (IP 273), *S. cerevisiae* (FM 147), *Sporothrix schenckii* (FM 307) and *Trichophyton mentagrophytes*



(FM 296). With exception of *S. cerevisiae*, all were clinical isolates. In *P. verrucosa* we previously detected a progesterone binding protein (8).

For nuclear progesterone receptors searching we used two oligonucleotides corresponding to a progesterone binding domain fragment from rat uterus receptor. These oligonucleotides amplify a 504 bp fragment and its sequence is as follows:

Sense:        5'        CCT CTG GAT GAG CCT GAT GGT G     3'

Antisense:    5'        CAC CAT CCC TGC CAG GAT CTT G     3'

Ten  $\mu$ l of the RT reaction product were subjected to PCR. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the PCR reaction was programmed for 25 cycles. The cycling profile was: 94°C, 1 min; 60°C 1 min; and 72°C for 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C for 7 min. Twenty five  $\mu$ l of the RT-PCR reaction of each sample were electrophoresed on 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide. As positive control we used 2  $\mu$ g of rat uterus RNA. In this gel a 504 bp fragment was not visible on lanes corresponding to fungi; thus, this gel was transferred to a nylon membrane for Southern blot analysis by using the rat uterus 504 bp fragment as probe. In this case, we detected a hybridization fragment in all tested strains at level of the positive control. This hybridization fragment was stronger in *T. mentagrophytes* than in the other strains (data no shown). These results suggest that in some pathogenic fungi there are genes with significant homology to progesterone nuclear receptor reported in rat uterus.

For the CBP gene detection, a Southern blot analysis of 10  $\mu$ g of DNA digested with *BamH I* and *EcoR I* was performed. In this study we considered the *CBP* gene sequence reported in *C. albicans* (13). In this yeast we previously amplified a 125 bp fragment by using two 18 mers which sequence is:

Sense:        5'        CAT CCT GAT CAA GCT TGG     3'

Antisense    5'        GAA CCC ATA TAT CCG TGG     3'

This product was used as probe for the Southern blot analysis, which showed that all fungal isolations possessed sequences hybridizing with the *CBP* gene fragment (**Figure 1**). For the RT-PCR reaction we programmed 30 cycles, which consisted in 94°C, 30 s; 55°C, 30 s; and 72°C, 30 s. The initial denaturation and final extension temperatures were similar to the progesterone receptor study mentioned above. In Figure 2 the 125 bp fragment obtained by RT-PCR in four fungal isolations is shown. In *M. grisea* and *S. schenckii* this fragment was also amplified (data no shown). The *T. mentagrophytes* fragment was obtained in enough quantity to purify and determine its sequence. This study showed a 98% homology as compared with the respective fragment in *C. albicans* (17). Thus, we determined that *CBP* gene is widely conserved in others pathogenic fungal species.

Finally, two 21-mers were designed to study the *EBP* gene previously reported in *C. albicans* (19). These oligonucleotides amplify a 418 bp fragment and their sequences are as follows:

Sense:        5'        TGC TCG TTC TCA ATA TCC AGG        3'  
Antisense:    5'        CAT GGT GCT CAT GGT TAC TTG        3'

By RT-PCR (PCR 30 cycles: 95°C, 1 min; 54°C, 1 min; 72°C, 1 min) we observed the searched fragment in *S. cerevisiae* and *S. schenckii*. By the Southern blot analysis we confirmed this result in addition to hybridization fragments of lower intensity in the other studied fungi (Fig. 3).

There are enough evidences to consider that fungi possess molecules, which may play a role similar to that of steroid hormone receptors. The physical and biochemical study is under investigation due that these genes are poorly expressed in fungal species.

Results presented here suggest that in fungi exist steroid hormone receptors-related genes with probably significant identity to those described in other eukaryotic organisms. This hypothesis is supported by the presence of an intense hybridization fragment in the progesterone nuclear receptor gene study principally in *T. mentagrophytes*. In addition, by RT-PCR we demonstrated a

125 bp fragment corresponding to *CBP* gene in all studied fungi. This *CBP* gene was also evidenced by Southern blot. Likewise an intense hybridization fragment in *S. cerevisiae* and *S. schenckii* for *EBP* gene was shown by Southern blot analysis.

In the water mold *Achlya* the antheridiol receptor has been considered as part of a steroid non-binding and binding proteins complex; both seem to be related with the 85-kDa heat shock proteins (18). In *S. cerevisiae* it has been shown to produce 17  $\beta$ -estradiol that is liberated into culture medium; this indicates that yeast possesses a steroidogenic machinery similar to superior eukaryotes (19). In conclusion, the results suggest that a progesterone receptor-like gene and corticosteroid and estrogen binding protein genes are conserved among fungal species. It remains further work to determine whether these steroid hormone binding proteins genes have functional activity similar to those described in human or other mammals and to establish the role of the corresponding proteins in the relationship fungus-human host.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant No. 207095 from DGAPA, UNAM, México.

## REFERENCES

1. **McMorris, T. C., and A. W. Barksdale.** 1967. Isolation of a sex hormone from the water mould *Achlya bisexualis*. *Nature* **215**:320-321.
2. **Riehl, R. M., and D. O. Toft.** 1984. Analysis of the steroid receptor of *Achlya ambisexualis*. *J. Biol. Chem.* **259**:15324-15330.
3. **Chattaway, F. W., J. D. Townsley, and A. J. E. Barlow.** 1959. Effect of steroids and related compounds on the growth of dermatophytes. *Nature* **184**: 1731-1732.
4. **Drutz, D. J., M. Huppert, S. H. Sun, and W. L. McGuire.** 1981. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* **32**: 897-907.
5. **Méndez-Tovar, L. J., C. De Bièvre, and R. López-Martínez.** 1991. Effets des hormones sexuelles humaines sur le développement in vitro des agents d'eumycétomes. *J. Mycol. Méd.* **118**: 141-143.
6. **Burshell, A., P. A. Stathis, Y. Do, S. C. Miller, and D. Feldman.** 1984. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**: 3450-3456.
7. **Loose, D. S., and D. Feldman.** 1982. Characterization of a unique corticosterone-binding protein in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **257**: 4925-4930.
8. **Hernández-Hernández, F., C. De Bièvre, I. Camacho-Arroyo, M. A. Cerbón, B. Dupont, and R. López-Martínez.** 1995. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**:235-239.
9. **Loose, D. S., E. P. Stover, A. Restrepo, D. A. Stevens, and D. Feldman.** 1983b. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7659-7663.
10. **Powell, B. L., and D. J. Drutz.** 1984. Identification of a high-affinity binder for estradiol and a low-affinity binder for testosterone in *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* **45**: 784-786.

11. Restrepo, A., M. E. Salazar, L. E. Cano, E. P. Stover, D. Feldman, and D. A. Stevens. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **46**: 346-353.
12. Ng, T. T. C., G. D. Robson, and D. W. Denning. 1994. Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp.: implications for pathogenesis. *Microbiology* **140**:2475-2479.
13. Malloy P. J., X. Zhao, N. D. Madani, and D. Feldman. 1993. Cloning and expression of the gene from *Candida albicans* that encodes a high-affinity corticosteroid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1902-1906.
14. Madani, N. D., P. J. Malloy, P. Rodríguez-Pombo, and A. V. Krishnan. 1994. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:922-926.
15. Hernández Hernández, F. 1999. Estudio molecular de proteínas que unen hormonas esteroides en algunos hongos patógenos para el hombre. Tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM.
16. Smale, L. E., and K. G. Waechter. 1970. Disseminated coccidioidomycosis in pregnancy. *Am. J. Obst. Gynecol.* **107**:356-361.
17. Hernández-Hernández, F., R. López-Martínez, I. Camacho-Arroyo, C. A. Mendoza-Rodríguez, and M. A. Cerbón. 1999. Detection and expression of corticosteroid binding protein gene in human pathogenic fungi. *Mycopathologia* **143**:127-130.
18. Brunt, S. A., R. Riehl, and J. C. Silver. 1990. Steroid hormone regulation of the *Achlya ambisexualis* 85-kilodalton heat shock protein, a component of the steroid receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* **10**:273-281.

19. Feldman, D., L. G. Tökés, P. A. Stathis, S. C. Miller, W. Kurz, and D. Harvey. 1984. Identification of 17  $\beta$ -estradiol as the estrogenic substance in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 4722-4726.

## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Southern blot analysis of pathogenic fungal species. Genomic DNA from *C. albicans* (Ca), *M. grisea* (Mg), *P. verrucosa* (Pv), *S. cerevisiae* (Sc), *S. schenckii* (Ss) and *T. mentagrophytes* (Tm) was digested with 2 U/ $\mu$ g of EcoR I and BamH I endonucleases, electrophoresed on 1% agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The blot was probed with the <sup>32</sup>P-labelled cDNA fragment of the *C. albicans* *CBP* gene.

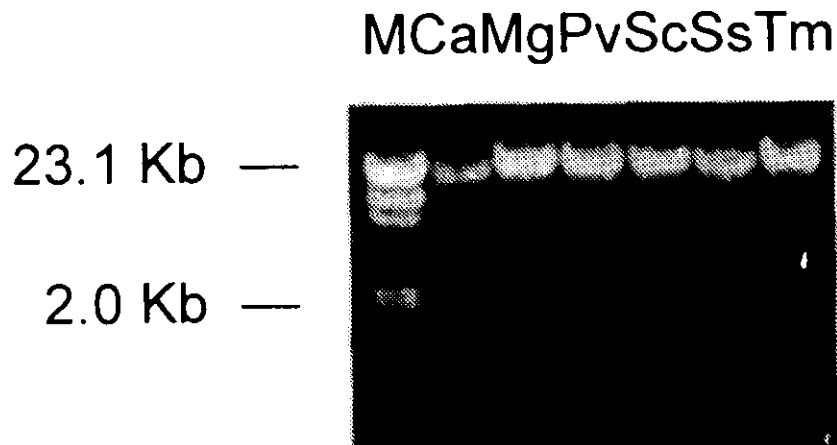
FIG. 2. Expression of *CBP* in fungal genomic DNA from different species. RT-PCR was performed using total RNA from *C. albicans* (Ca), *P. verrucosa* (Pv), *S. cerevisiae* (Sc) and *T. mentagrophytes* (Tm). PCR products were electrophoresed on a 12% acrylamide gel and stained with ethidium bromide. Molecular weight marker (10 bp) is indicated in the first lane (M).

FIG. 3. Southern blot analysis of *EBP* gene in fungi. RT-PCR products from six different fungal species were hybridized with a 419 bp fragment of the *C. albicans* *EBP* gene. Ca: *C. albicans*; Mg: *M. grisea*; Pv: *P. verrucosa*; Sc: *S. cerevisiae*; Ss: *S. schenckii*; Tm: *T. mentagrophytes*.

## VII. RESULTADOS NO PUBLICADOS

### 1. Acidos nucleicos: material de partida

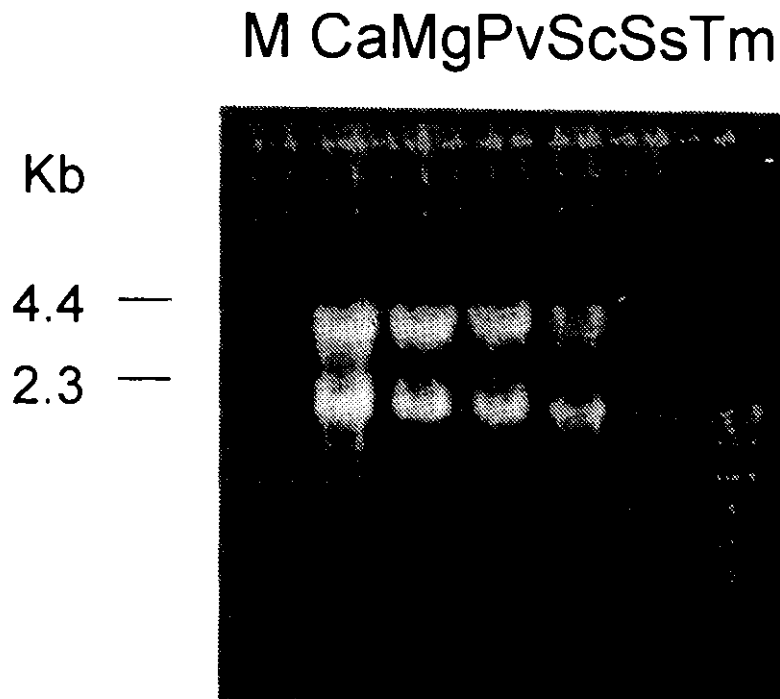
Partiendo del principio de que la calidad del ADN es esencial para lograr resultados confiables y reproducibles, fue necesario estandarizar la técnica de extracción y purificación de ADN de las diferentes especies incluidas en este estudio. Se aplicaron diferentes protocolos con resultados no satisfactorios. Finalmente la técnica de Blin y Stanfford (1976) fue considerada óptima para nuestros objetivos. El ADN mostrado en la **Figura 1** fue utilizado para el análisis de Southern blot durante el estudio del gen que codifica para CBP y EBP.



**Figura 1.** Gel de agarosa al 0.8% en el que se depositaron aproximadamente 5  $\mu$ g de ADN correspondientes a cada uno de los hongos estudiados. **M:** 1  $\mu$ g de  $\lambda$  DNA/*Hind III* Fragments; **Ca:** *C. albicans*; **Mg:** *M. grisea*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Ss:** *S. schenckii*; **Tm:** *T. mentagrophytes*.



La integridad del ARN total es un requisito básico para evidenciar la expresión de los ARN mensajeros. En esta parte experimental también fue necesario aplicar diferentes protocolos. La técnica que se consideró óptima fue aquella en que se utilizó cloruro de litio 8 M (Sambrook *et al.* 1989) para precipitar el ARN total. Este producto se muestra en la **Figura 2** en donde resaltan los ribosomales de 18S y 26S. Este material fue utilizado en los ensayos de RT-PCR para el estudio de CBP y EBP. En el caso de Ss y Tm los ensayos fueron hechos con un ARN que mostraba mejor calidad que la observada en esta figura.

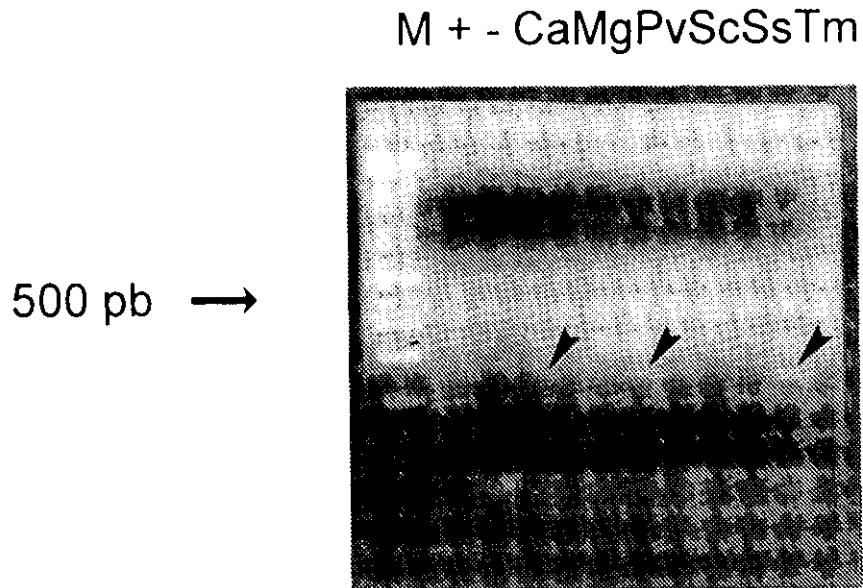


**Figura 2.** Gel desnaturalizante de agarosa al 1.1%, conteniendo aproximadamente 20 µg de ARN total obtenido de las diferentes especies fúngicas. **M:** marcador de peso molecular; **Ca:** *C. albicans*; **Mg:** *M. grisea*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Ss:** *S. schenckii*; **Tm:** *T. mentagrophytes*.

## 2. Estudio del gen que codifica para receptores nucleares a progesterona (RP): RT-PCR y Southern blot de los productos de PCR.

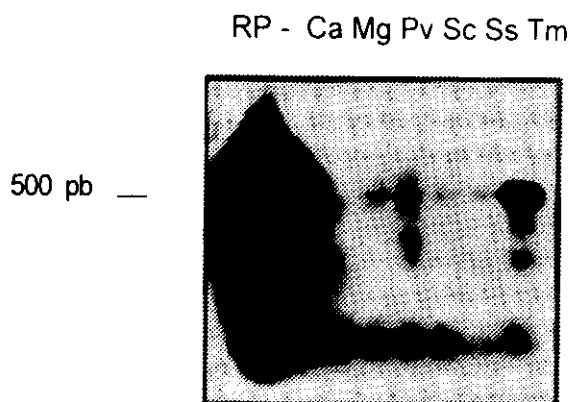
La **Figura 3** muestra los productos del RT-PCR realizado con los oligonucleótidos correspondientes al dominio de unión al esteroide del gen que codifica para el receptor nuclear a progesterona de útero de rata. En esta figura se observa que ninguna de las muestras presenta un producto de amplificación al nivel de 504 pb, como se observa en el caso control. Sin embargo, se aprecian algunas bandas de amplificación de mediana intensidad aproximadamente a la altura de 250 pb en *C. albicans*, *P. verrucosa* y con mayor intensidad en *T. mentagrophytes* (indicadas por una flecha). Se realizaron algunos ensayos con oligonucleótidos degenerados sintetizados a partir de los oligonucleótidos iniciales y tampoco evidenció algún fragmento de amplificación al nivel esperado (504 pb) ni en ningún otro, a pesar de haber modificado algunas de las condiciones de PCR, como la cantidad de ARN para el RT, la concentración de MgCl y la cantidad y marca de *Taq* polimerasa.

Los productos mostrados en la **Figura 3**, fueron transferidos a una membrana de nylon e hibridados con la sonda obtenida para el gen del RP. El resultado de este experimento se presenta en la **Figura 4 A**, en la cual se observa una señal muy evidente al nivel de 500 pb en todos los hongos estudiados y con mayor intensidad en el carril correspondiente a *T. mentagrophytes*. El resultado en este último hongo fue encontrado por lo menos en dos experimentos más, como se muestra en la **Figura 4 B**, expuesta menor tiempo a la placa radiográfica. Los fragmentos que se encontraban a la altura de 250 pb mostraron una hibridación mucho más débil. El resultado de la hibridación con los productos obtenidos con los oligonucleótidos degenerados no presentó fragmentos de hibridación a ningún nivel y con ningún hongo.

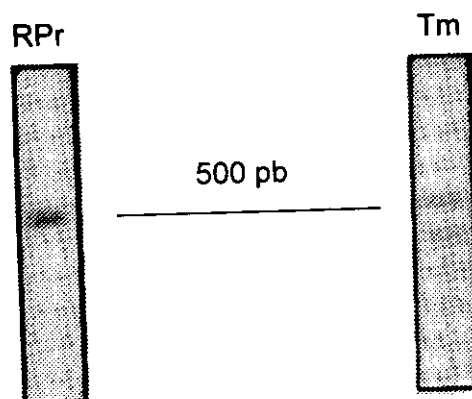


**Figura 3.** Gel de agarosa al 2% conteniendo 25  $\mu$ l de los productos de RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 504 pb del gen del receptor a progesterona de útero de rata. **M:** Marcador de 100 pb; **(+):** Control positivo (utilizando ARN de útero de rata); **(-):** Control negativo (sin ARN); **Ca:** *C. albicans*; **Mg:** *M. grisea*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Ss:** *S. schenckii*; **Tm:** *T. mentagrophytes*.

(A)



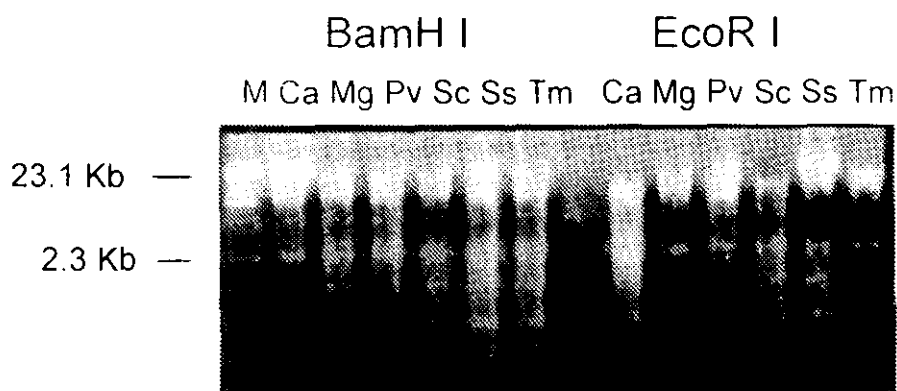
(B)



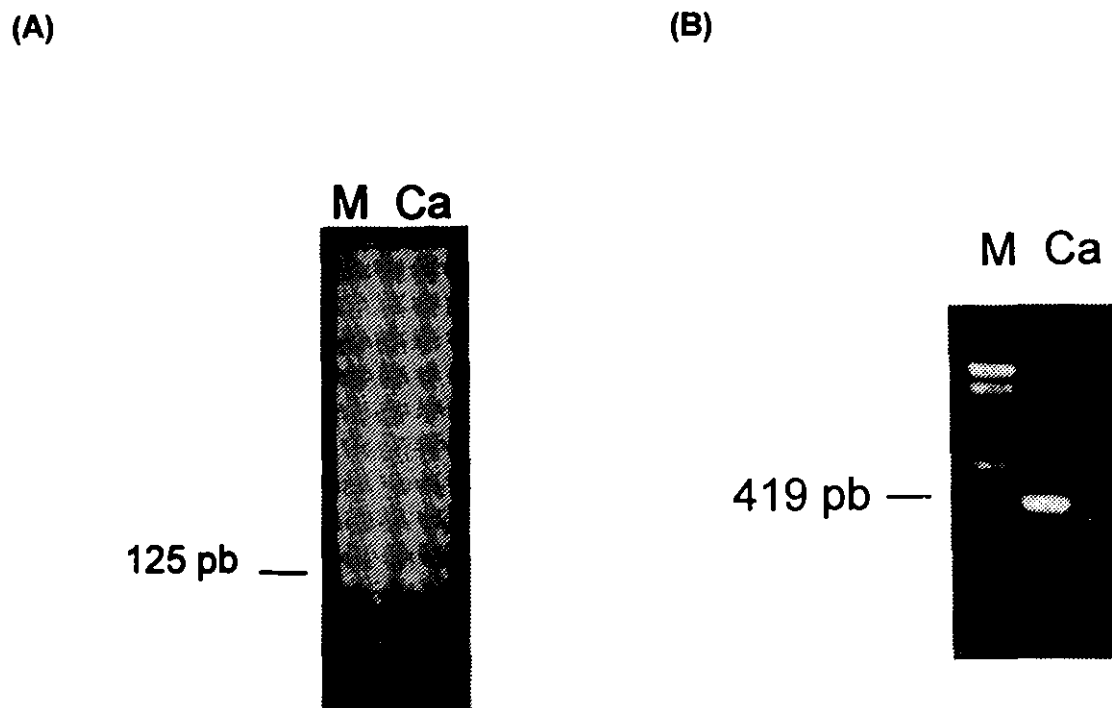
**Figura 4. (A).** Southern blot de los productos de PCR mostrados en la Figura 3, los cuales fueron hibridados con el fragmento de 504 pb del gen del receptor a progesterona de útero de rata. **RP:** Control positivo; **(-):** Control negativo; **Ca:** *C. albicans*; **Mg:** *M. grisea*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Ss:** *S. schenckii*; **Tm:** *T. mentagrophytes*. El tiempo de exposición fue de dos semanas. **(B)** Otro ensayo realizado en las mismas condiciones que **(A)**, pero con tres días de exposición.

### 3. Estudio del gen que codifica para la proteína que une corticosteroides (CBP): ADN digerido con *BamH I* y *EcoR I*.

La confiabilidad de un estudio de Southern blot depende del grado y calidad de digestión del ADN con las enzimas de restricción seleccionadas. En la **Figura 5** se muestra el ADN (10 µg) digerido con las enzimas *BamH I* y *EcoR I* (20 U). Como puede observarse, la digestión no fue total pero bastante aceptable. Este gel posteriormente fue transferido e hibridado con los fragmentos de 125 y 419 pb utilizados como sonda y que son mostrados en la Figura 6 A y B respectivamente.



**Figura 5.** Gel de agarosa al 1.2%, conteniendo 10 µg de ADN genómico de las seis especies fúngicas en estudio, digeridos con las enzimas *BamH I* y *EcoR I*. **M:** 1 µg de  $\lambda$ Hind III; **Ca:** *C. albicans*; **Mg:** *M. grisea*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Ss:** *S. schenckii*; **Tm:** *T. mentagrophytes*.

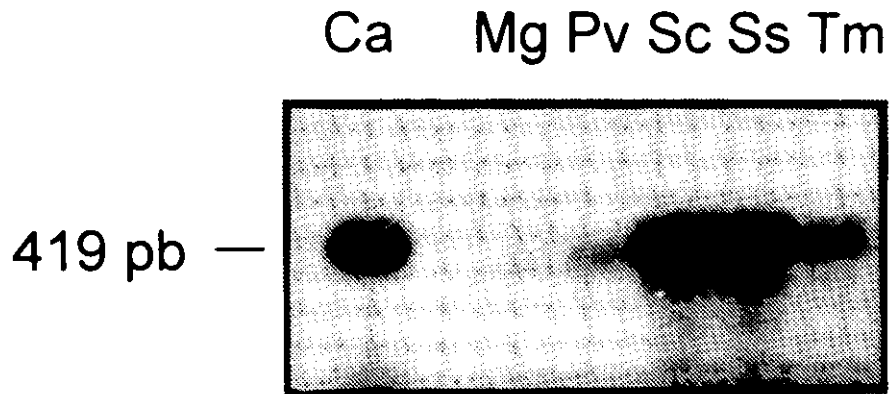


**Figura 6.** Fragmentos utilizados como sonda en los ensayos de Southern blot. Fueron obtenidos realizando cinco reacciones de RT-PCR, cortados del gel, purificados y corridos en un gel de agarosa al 2%. **(A)** Fragmento de 125 pb correspondiente al extremo 3' del gen que codifica para CBP de *C. albicans*. **M:** marcador de peso molecular de 25 pb; **Ca:** *C. albicans*. **(B)** Fragmento de 419 pb correspondiente al extremo 5' del gen que codifica para EBP de *C. albicans*. **M:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **Ca:** *C. albicans*.

#### 4. Estudio del gen que codifica para la proteína que une estrógenos (EBP): Southern blot de los productos de RT-PCR y del ADN digerido con *EcoR I*

Se realizaron ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos seleccionados para amplificar un fragmento de 419 pb del gen que codifica para la proteína que une estrógenos de *C. albicans*. Estos ensayos se hicieron tanto con *C. albicans* como las cinco especies fúngicas restantes. Los productos obtenidos fueron depositados en un gel de agarosa al 2%. Además de *C. albicans*, que representó el control positivo, se observaron fragmentos de amplificación débilmente visibles a la altura esperada solamente en *S. cerevisiae* y *S. schenckii*. Para determinar si los fragmentos de *S. cerevisiae* y *S. schenckii* correspondían en algún grado con el fragmento de *C. albicans*, se procedió a transferir el gel e hibridarlo con la sonda previamente obtenida por RT-PCR de *C. albicans*. El resultado de la hibridación se muestra en la **Figura 7**. En todos los hongos se observó una tenue banda de hibridación sólo a la altura del fragmento de 419 pb de *C. albicans*. En el caso de *S. cerevisiae* y *S. schenckii* la intensidad de la hibridación fue mayor.

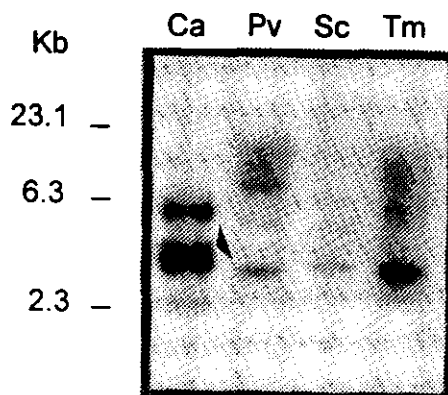
Finalmente, para corroborar la presencia del fragmento del gen de EBP en *S. cerevisiae* y *S. schenckii*, se procedió a realizar un Southern blot tratando el ADN de cuatro de los hongos con las enzimas *BamH I* y *EcoR I* y fueron hibridados con la sonda para EBP obtenida de *C. albicans*. El ADN se observó mejor digerido con *EcoR I* y el Southern blot mostró diferentes bandas de hibridación en cada uno de los hongos como se muestra en la **Figura 8 A**. En un experimento adicional, se utilizó la membrana que había sido hibridada con CBP (previamente lavada y conservada húmeda), para hibridar con el fragmento de EBP. El resultado de esta hibridación, después de 5 días de exposición, se muestra en la **Figura 8 B**. Las bandas de hibridación de los cuatro hongos mostrados en la Figura A coinciden con los hongos correspondientes de la Figura B. Además, es notoria la similitud de las bandas de hibridación entre CBP (ver Resultados Publicados) y EBP. Se observa que solamente hay una banda de hibridación diferente en *C. albicans*, la cual se encuentra señalada con una flecha.



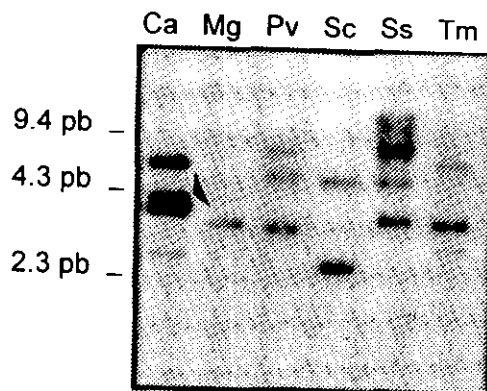
**Figura 7.** Southern blot de los productos de PCR para localizar la expresión del gen de EBP hibridado con el fragmento de 419 pb del gen correspondiente a *C. albicans*. **Ca:** *C. albicans*; **Mg:** *M. grisea*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Ss:** *S. schenckii*; **Tm:** *T. mentagrophytes*.



(A)



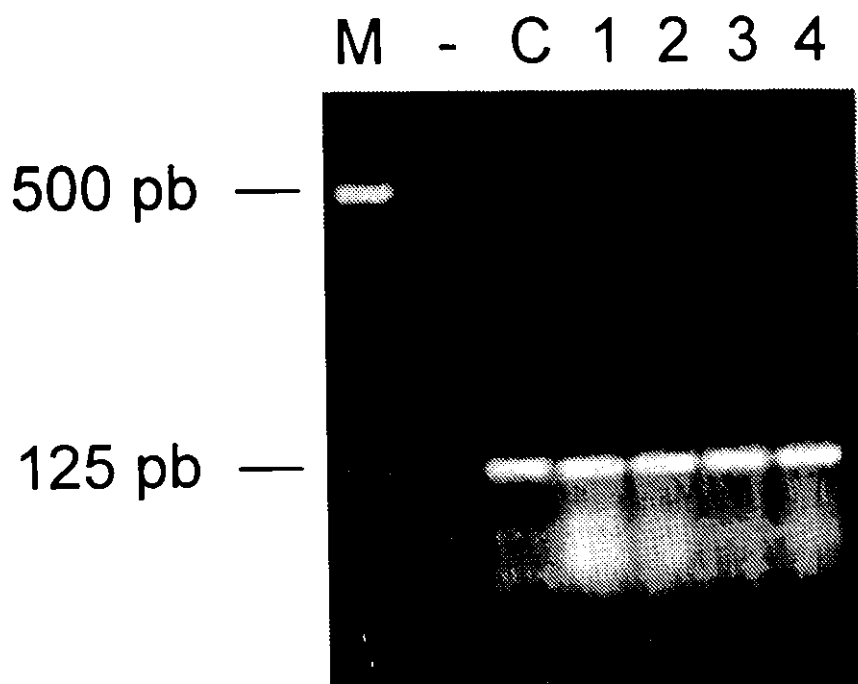
(B)



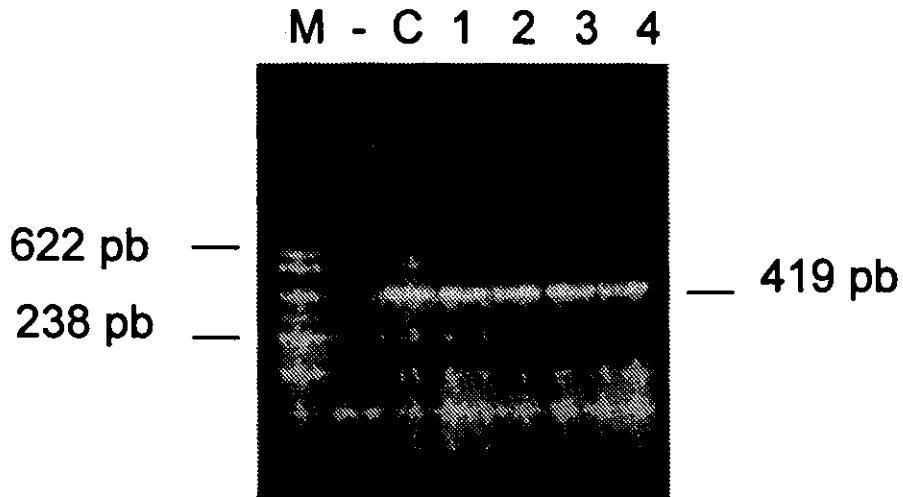
**Figura 8. (A)** Southern blot del ADN genómico de cuatro aislamientos fúngicos digerido con *EcoR I*, hibridado con la sonda de 419 pb del gen de EBP. **Ca:** *C. albicans*; **Pv:** *P. verrucosa*; **Sc:** *S. cerevisiae*; **Tm:** *T. mentagrophytes*. **(B)** Southern blot del ADN genómico digerido con *EcoR I*, cuya membrana fue anteriormente utilizada con la sonda de 125 pb del gen de CBP. La flecha indica la banda diferencial con el Southern de CBP.

### 5. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol en la expresión de gen que codifica para CBP y EBP

A partir de levaduras tratadas con dos concentraciones de 17  $\beta$ -estradiol y por dos tiempos diferentes, se extrajo el ARN total para realizar RT-PCR usando por separado los oligonucleótidos correspondientes a CBP y EBP. En las Figuras 9 y 10 se muestran los productos de PCR correspondientes, depositados en un gel de agarosa al 2%. Como puede apreciarse, aparentemente esta hormona no modifica la expresión de ninguno de los genes en ningún tiempo ni concentración, como se esperaba.



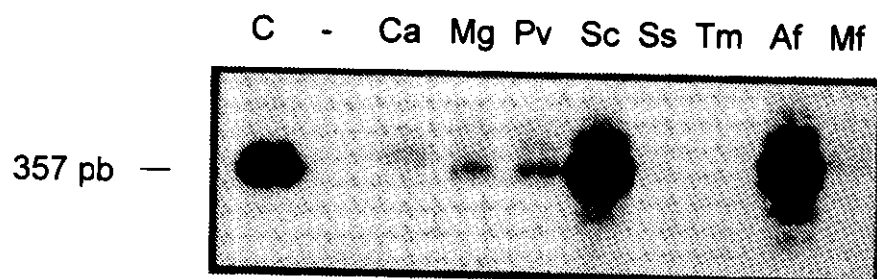
**Figura 9.** Efecto del 17  $\beta$ -estradiol en la expresión de gen de CBP de *C. albicans*. Productos de RT-PCR. **M:** marcador de ADN pBR322/*Msp I*; (-): control sin ARN; **C:** control sin hormona, 8 h de incubación; **1 y 2:** 0.1 y 1 mM de hormona respectivamente, 8 h de incubación; **3 y 4:** 0.1 y 1 mM de hormona, 2 h de incubación. Con excepción del marcador, todos los carriles contienen 5  $\mu$ l de producto de PCR.



**Figura 10.** Efecto del 17  $\beta$ -estradiol en la expresión de gen de EBP de *C. albicans*. Productos de RT-PCR. **M**: marcador de ADN pBR322/*Msp I*; (-): control sin ARN; **C**: control sin hormona, 8 h de incubación; **1** y **2**: 0.1 y 1 mM de hormona respectivamente, 8 h de incubación; **3** y **4**: 0.1 y 1 mM de hormona, 2 h de incubación. Con excepción del marcador, todos los carriles contienen 5  $\mu$ l de producto de PCR.

## 6. Detección de un gen que codifica para 5- $\alpha$ reductasa tipo 2.

En esta parte fueron utilizados un par de oligonucleótidos correspondientes al gen de 5- $\alpha$  reductasa tipo 2 de linfocitos humanos para realizar un PCR con 1 $\mu$ g de ADN genómico de cada una de las seis especies en estudio. Para estos ensayos se agregaron dos especies más por disponer del material nucleico y por la importancia que tienen estos hongos en la patología humana: la levadura lipofílica que forma parte de la biota normal *Malassezia furfur* y el hongo filamentoso oportunista *Aspergillus fumigatus*. Los productos fueron depositados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En éste se observó una banda de amplificación en los carriles correspondientes a *S. cerevisiae* y *A. fumigatus*. Para determinar si la expresión del gen de referencia y los aislamientos fúngicos comparten alguna similitud, se llevó a cabo la transferencia y posteriormente la hibridación con la sonda proveniente de linfocitos humanos. En la **Figura 11** se observa que, al parecer, el gen de la 5- $\alpha$  reductasa tipo 2 expresado en el control y el gen expresado en *S. cerevisiae* y *A. fumigatus* están estructuralmente relacionados. En el resto de aislamientos fúngicos se observa un fragmento de hibridación de mucha menor intensidad, lo cual posiblemente corresponda a un menor número de copias del gen en estos hongos o bien a genes estructuralmente poco relacionados.



**Figura 11.** Southern blot de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos de 5 alfa reductasa tipo 2 e hibridados con el fragmento de 357 pb de linfocitos humanos (control positivo). Muestras: **(C)**:Control positivo; **(-)**: Control negativo; **Ca**: *C. albicans*; **Mg**: *M. grisea*; **Pv**: *P. verrucosa*; **Sc**: *S. cerevisiae*; **Ss**: *S. schenckii*; **Tm**: *T. mentagrophytes*; **Mf**: *M. furfur*, **Af**: *A. fumigatus*.

## VIII. DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo fue detectar y caracterizar genes para receptores o proteínas que se unen a hormonas esteroides en seis aislamientos fúngicos, cinco de ellos causantes de una alta incidencia de micosis humanas. La levadura *C. albicans* es causa mundial de una alta morbi-mortalidad en los pacientes con algún factor de oportunismo como el SIDA, diabetes, neoplasias y otros (Perfect, 1991); *M. grisea* es uno de los diversos agentes de eumicetoma, segunda micosis subcutánea en México (Buot *et al.*, 1987); *P. verrucosa*, tercera causa mundial de cromoblastomicosis (Brigoo y Destombes, 1976); *S. schenckii*, agente etiológico de la esporotricosis, la micosis subcutánea más frecuente en México (González-Ochoa, 1965); *T. mentagrophytes*, segunda causa de dermatofitosis en México (Manzano-Gayosso *et al.*, 1993). Aunque existen algunos reportes de infecciones humanas causadas por *S. cerevisiae* (Rippon, 1988), esta levadura fue incluida en el estudio por la amplia disponibilidad de información bioquímica y genética (su genoma ha sido totalmente secuenciado) y por la facilidad de manejo como modelo experimental. Con excepción de *S. schenckii*, todas las especies aquí incluidas han sido utilizadas en algún estudio publicado relacionado con hormonas esteroides.

En relación con el gen que codifica para receptores nucleares a progesterona, utilizamos un par de oligonucleótidos específicos para receptor a progesterona de útero de rata, además de un par de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de los anteriores. Los estudios de Southern blot de productos de RT-PCR pusieron en evidencia una banda de hibridación en todos los hongos estudiados observándose con mayor intensidad en *T. mentagrophytes*. Esto sugiere que en los hongos estudiados existe un gen para una proteína probablemente similar al receptor a progesterona de útero de rata o bien un gen relacionado estructuralmente y que se expresa más en este dermatofito. Por otro lado, posiblemente este gen se encuentra en un número muy reducido de copias (tal vez una sola) lo cual ha dificultado su amplificación en cantidad suficiente para lograr su clonación, secuenciación y comparación con el gen para receptor a progesterona de útero de rata o de otros eucariotes.

En los aislamientos estudiados fue detectado, por RT-PCR y por Southern blot, el gen que codifica para la proteína que une corticosteroides (CBP), incluida la levadura *C. albicans* en la cual originalmente fue identificado. Para ello utilizamos un par de oligonucleótidos diseñados y sintetizados a partir de la secuencia del gen de CBP reportada por Malloy *et al.* (1993), y que amplifican un fragmento de 125 pb. La técnica de RT-PCR nos permitió obtener una cantidad de producto adecuada en *C. albicans* y *T. mentagrophytes* para poder llevar a cabo su secuenciación y confirmar que se trataba del gen de CBP en la levadura y compararlo con el gen del hongo filamentoso. Una homología de 98% del fragmento amplificado de CBP en *T. mentagrophytes* nos permitió establecer que se trataba del mismo gen. La presencia de diferente número y distribución de bandas de hibridación en el análisis por Southern blot de ADN digerido con *BamH I* y *EcoR I* indican probablemente: 1) que estos hongos tienen un arreglo estructural genómico diferente entre ellos; 2) que estos aislamientos podrían tener más de una copia del gen de la proteína que une corticosteroides; o 3) que estos organismos probablemente tienen genes estructuralmente relacionados con el de CBP y que codifican para proteínas diferentes desde el punto de vista funcional. La comparación de la secuencia de aminoácidos del fragmento de 125 pb de CBP de *C. albicans* con el banco genómico de *S. cerevisiae* da como resultado una identidad de 35% y es reportado como un "possible corticosteroid-binding protein gene".

Por RT-PCR fue posible amplificar un fragmento de 419 pb como parte del gen de EBP originalmente descrito por Madani *et al.* (1994) en *C. albicans*. Cuantitativamente la expresión del gen fue diferente en cada uno de los aislamientos fúngicos y en el gel de agarosa fue más notable en *S. cerevisiae* y *S. schenckii*. En el análisis por Southern blot de estos productos de PCR, observamos que la intensidad de los fragmentos de hibridación de *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *S. schenckii* son similares, por lo que suponemos que podría tratarse del mismo gen. En el Southern blot del ADN digerido con *BamH I* y *EcoR I* se pone de manifiesto una vez más la estructura genómica diferente entre cuatro de los hongos estudiados, además de diferentes bandas de hibridación. Es necesario reiterar que mucho tiempo después de haber hibridado y lavado perfectamente la membrana del Southern blot para CBP, ésta fue hibridada con el fragmento de 419 pb del gen de EBP. Fue sorprendente encontrar un

patrón de hibridación muy similar entre CBP y EBP. La diferencia consistió en una banda de hibridación adicional en *C. albicans* (Figura 8 B). Es probable que esta similitud se deba a que estos genes comparten algunas secuencias, como lo indicaron los estudios de Malloy *et al.* (1993) y Madani *et al.* (1994) al estudiar la función enzimática de las proteínas para las cuales codifican.

Durante el estudio del efecto del 17  $\beta$ -estradiol en la expresión de los genes que codifican para CBP y EBP, los resultados mostraron un efecto aparentemente nulo sobre los mismos. Se sabe que el estradiol inhibe la actividad de la enzima para la cual codifica EBP, pero este efecto no fue detectado a nivel del gen. Es posible que el efecto de esta hormona se manifieste solamente en la expresión funcional de la proteína como fue demostrado para EBP (Madani *et al.*, 1994).

Finalmente, por PCR y Southern blot, en *S. cerevisiae* y *A. fumigatus* fue detectado un gen que se expresa de manera similar al gen de la 5- $\alpha$  reductasa tipo 2 de linfocitos humanos usado como control. Este hallazgo es muy importante ya que muchos estudios han puesto de manifiesto que los hongos poseen una compleja maquinaria enzimática esteroideogénica (Brzezowska *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1995; Jayanthi *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1993) y hasta donde sabemos no ha sido reportado un gen similar en hongos. Queda por comprobar la existencia de esta enzima y su función en estas u otras especies fúngicas.

Los estudios moleculares previos en *C. albicans* han demostrado que no hay similitud entre el gen de CBP (Malloy *et al.*, 1993) y los genes que codifican para los receptores a hormonas esteroides de mamíferos, contrario a lo que se suponía previamente. Ya que las proteínas de unión a FAD/NAD a menudo son oxidorreductasas, los autores consideraron que CBP podría ser una de ellas, y que los esteroides que se unen a CBP representan substratos o efectores alostéricos para tal enzima. Los datos disponibles sugieren que CBP es una flavoproteína (proteína de unión a dinucleótidos) y no un receptor para hormonas esteroides.

Un segmento de la EBP de *C. albicans* (llamada por sus autores EBP1) corresponde a una región altamente conservada en algunas flavoproteínas. EBP1 también tiene una pequeña región de similitud con la esteroide 21-hidroxilasa y ésta a su vez tiene un residuo de cisteína que corresponde con la cisteína 225 de EBP1. La



EBP de *C. albicans* es 64% similar a la Old Yellow Enzyme (OYE) de *S. cerevisiae*. Esta enzima se une a diferentes moléculas fenólicas, pero con menor afinidad que EBP1 por el estradiol. La OYE tiene actividad de oxidorreductasa y cuando EBP1 fue sobreexpresada en *S. cerevisiae* también manifestó esa actividad enzimática. Las probabilidades funcionales de la EBP planteadas por los investigadores fueron: (a) los esteroides sirven como substratos para las proteínas que unen esteroides (Steroid Binding Proteins, SBP) y estas los transforman en otros compuestos; (b) los esteroides actúan como moduladores de la expresión de proteínas cuyo papel aún se desconoce (Madani *et al.*, 1994).

La producción de 17  $\beta$ -estradiol por *S. cerevisiae* está bien documentada (Feldman *et al.*, 1982; Feldman *et al.*, 1984a y b). El estrógeno excretado por esta levadura induce la producción de receptores para progesterona en células de cáncer de mama humana (Feldman *et al.*, 1984a) además de que desplaza el  $^3\text{H}$ -estradiol de la EBP de esa levadura y de los receptores a estrógenos de mamíferos (Feldman *et al.*, 1984b). La purificación y los estudios enzimáticos recientes realizados por Buckman y Miller (1998), determinaron que EBP tiene actividad de NADPH-oxidorreductasa con diferentes funciones y se ha considerado como miembro de la familia de enzimas OYE.

Si CBP y EBP son enzimas, es posible también que estas formen parte de los complejos enzimáticos que contienen citocromo P-450. Estudios adicionales han revelado que el ketoconazol y otros imidazoles relacionados, desplazan la corticosterona del sitio de unión de CBP. Desde el punto de vista terapéutico estos compuestos deben su actividad antifúngica a la inhibición de enzimas metabólicas como el citocromo P450.

Se sabe que las esteroide-hidroxilasas fúngicas son sitio-selectivas del citocromo P-450. La participación del citocromo P-450 en los hongos fue descrita en el sistema progesterona 11- $\alpha$  hidroxilasa de *Rhizopus nigricans* (Breskvar, 1977). Este sistema transportador de electrones consiste de citocromo P-450, ferredoxina hierro-azufre y FAD-flavoproteína; esta composición es similar a los sistemas bacterianos y mitocondriales. Este sistema se ha encontrado en diferentes hongos filamentosos incluyendo *Aspergillus fumigatus*, en donde la hidroxilación de la progesterona en 11- $\alpha$  y 15- $\beta$  hidroxiprogestero es muy eficiente. La presencia de múltiples formas de

hidroxilasa ha sido revelada por su inhibición con ketoconazol, además de otros inhibidores como la ebullición y el tratamiento con monóxido de carbono como se esperaba en sistemas similares (Smith *et al.*, 1993). En *Neurospora crassa* el citocromo P-450 es inducible por progesterona y es inhibido por SKF-525 y por inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (Nega y Grunwaldt, 1977).

El descubrimiento de la producción de hormonas sexuales en los hongos, algunas estructural y/o funcionalmente similares a las de mamíferos, dio lugar al inicio de una intensa actividad científica. En particular, en el hongo acuático *Achlya* fue descrita la producción de anteridiol, y el estudio de los receptores reveló similitud funcional y estructural con los receptores a hormonas esteroides de mamíferos (Gooday y Adams, 1993; Riehl y Toft, 1984; Riehl *et al.*, 1984). Después, diversos investigadores se dedicaron a esclarecer el efecto y la posible función que tenían algunas hormonas esteroides de mamíferos en diferentes hongos de importancia médica. Se demostró que algunas hormonas esteroides de mamíferos modifican diversos aspectos biológicos de ciertos hongos patógenos para el humano (Brasch y Gottkehaskamp, 1992; Brasch y Flader, 1996; Chattaway *et al.*, 1959; Drutz *et al.*, 1981; Méndez-Tovar *et al.*, 1991). Estudios más profundos indicaron la presencia de proteínas fúngicas que se unen con alta afinidad y especificidad a estas hormonas (Burshell *et al.*, 1984; Hernández-Hernández *et al.*, 1995b; Feldman *et al.*, 1982, Loose y Feldman, 1982), sugiriendo la presencia de sistemas hormona-receptor que podrían participar en la fisiopatogenia de algunas micosis como la paracoccidioidomicosis (Restrepo y Gutiérrez, 1970; Restrepo *et al.*, 1984) y la coccidioidomicosis (Smale y Waechter, 1970; Powell *et al.*, 1983).

Con el actual trabajo, aplicando directamente técnicas moleculares y usando oligonucleótidos específicos para el estudio de genes para receptores a hormonas esteroides de mamíferos y para proteínas homólogas de *C. albicans*, se logró la detección de genes relacionados con las proteínas que unen hormonas esteroides en algunos hongos patógenos. Sin embargo, aun se necesitan estudios futuros que permitan conocer el papel que tienen estos genes en la virulencia de los hongos estudiados o en la patogenesis de las micosis correspondientes.

## IX. PERSPECTIVAS

Para el equipo interesado en la interacción entre hongos y hormonas, existen líneas de investigación a abordar en el futuro: (a) clonar y secuenciar los genes para EBP y 5- $\alpha$  reductasa, y determinar su homología con los genes correspondientes que han sido descritos en otros organismos; (b) determinar el efecto que tienen diferentes hormonas sexuales esteroideas en la expresión de los genes para 5- $\alpha$  reductasa; (c) buscar el efecto que tiene la delección o la interrupción de estos genes en la sobrevivencia y/o virulencia de las especies fúngicas correspondientes, y así definir su papel específico; (d) buscar el efecto que tienen diferentes compuestos azólicos antifúngicos en la expresión de estos genes relacionados con hormonas esteroideas; (e) determinar si los genes aquí identificados se expresan de manera similar en cepas obtenidas directamente de pacientes, lo cual sería posible para *C. albicans* en caso de una candidosis bucal y para *M. grisea* en caso de un micetoma durante el cual se forman microcolonias constituyendo granos.

## X. CONCLUSIONES

- Por Southern blot se observó que las especies fúngicas *C. albicans*, *M. grisea*, *P. verrucosa*, *S. cerevisiae*, *S. schenckii* y particularmente *T. mentagrophytes*, expresan un gen estructuralmente relacionado con el gen para el receptor nuclear a progesterona de útero de rata.
- Por RT-PCR, en *M. grisea*, *P. verrucosa*, *S. cerevisiae*, *S. schenckii* y *T. mentagrophytes*, se expresó el gen que codifica para la proteína que une corticosteroides (CBP) previamente reportado por Malloy *et al.* en *C. albicans*. En estos hongos patógenos este gen se encuentra altamente conservado, de acuerdo al estudio de Southern blot de ADN genómico.
- El fragmento de 125 pb del gen de CBP en *T. mentagrophytes* tiene una homología de 98% con el fragmento correspondiente de *C. albicans*, lo cual indica que podría tratarse del mismo gen.
- Por Southern blot de los productos de PCR se demostró que en *S. cerevisiae* y *S. schenckii* se encuentra un gen estructuralmente muy relacionado con el gen que codifica para la proteína que une estrógenos (EBP) de *C. albicans*.
- El 17  $\beta$ -estradiol aparentemente no modifica la expresión del gen que codifica para la proteína que une estrógenos ni para la proteína que une corticosteroides.
- Es probable que en los hongos exista una familia de multigenes que codifican para una correspondiente familia de proteínas que unen esteroides de origen endógeno o exógeno, pero estructuralmente serían muy diferentes a la familia de receptores para hormonas esteroides reportada en vertebrados.
- En *Aspergillus fumigatus* y *S. cerevisiae* se detectó por PCR y Southern blot un gen que podría corresponder al gen de la 5- $\alpha$  reductasa tipo 2 reportada en el humano.

## XI. REFERENCIAS

- Abioye AA, Edington GM**, 1972. Prevalence of amoebiasis at autopsy in Ibadan. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **66**:754-763.
- Ajello L**. 1983. Histoplasmosis - a dual entity histoplasmosis capsulati and histoplasmosis duboisii. Igiene Moderna **79**:3-30.
- Alkan M, Ofek I, Beachey EH**. 1977. Adherence of pharyngeal and skin strains of group A streptococci to human skin and oral epithelial cells. Infection and Immunity **18**:555-557.
- Aly T, Shinefield HI, Strauss WG, MacBach HI**. 1977. Bacterial adherence to nasal mucosal cells. Infection and Immunity **17**:546-549.
- Andersson S, Russell DW**. 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **87**:3640-3644.
- Andersson S, Berman DM, Penkins EP, Russell DW**. 1991. Deletion of steroid 5  $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. Nature **354**:159-161.
- Apisarnthanarax I, Self SJ, Ramer G, Montes LF**. 1974. Oral contraceptives and candidiasis. Cutis **14**:77-82.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A**. 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells *in vivo* inhibition in females. Infection and Immunity **66**:5587-5591.

**Arsenault GP, Biemann K, Barksdale AW, McMorris TC.** 1968. The structure of antheridiol, a sex hormone in *Achlya bisexualis*. Journal of the American Chemical Society **90**:5635-5636.

**Auld JC, Beardmore GL.** 1979. Sporotrichosis in Queensland: A review of 137 cases at the Royal Brisbane Hospital. Australian Journal of Dermatology **20**: 14-22.

**Barksdale AW.** 1969. Sexual hormones of *Achlya* and other fungi. Science **166**: 831-837.

**Batra S, Bengtsson LP, Oberg SJ.** 1979. Interrelationships between plasma and tissue concentrations of 17-beta-estradiol and progesterone during human pregnancy. Clinical Endocrinology **11**:603-610.

**Bennett JE, Bonner H, Jennings AE, López RI.** 1973. Chronic meningitis caused by *Cladosporium trichoides*. American Journal of Clinical Pathology **59**:398-407.

**Biagi FF, Beltrán HF.** 1969. The challenge of amoebiasis: Understanding pathogenic mechanisms. International Review of Tropical Medicine **3**:219-239.

**Bland PB, Rakof AE, Pincus IJ.** 1937. Experimental vaginal and cutaneous moniliasis. Clinical and laboratory study of certain monilias associated with vaginal and cutaneous thrush. Archives of Dermatology and Syphilology **36**:760-780.

**Blin N, Stanfford DW.** 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Research **3**: 2303.

**Brasch J, Gottkehaskamp D.** 1992. The effect of selected human steroid hormones upon the growth of dermatophytes with different adaptation to man. Mycopathologia **120**: 87-92.

**Brasch J, Flader S.** 1996. Human androgenic steroids affect growth of dermatophytes *in vitro*. *Mycoses* **39**:387-392.

**Breskvar K, Hudnik-Plevnik T.** 1977. A possible role of cytochrome P-450 in hydroxylation of progesterone by *Rhizopus nigricans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **74**:1192-1198.

**Breskvar K, Hudnik-Plevnik T.** 1981. Inducibility of cytochrome P-450 and of NADPH-cytochrome C reductase in progesterone treated filamentous fungi *Rhizopus nigricans* and *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Steroid Biochemistry* **14**:395-399.

**Breskvar K, Cresnar B, Hudnik-Plevnik T.** 1987. Resolution and reconstitution of cytochrome P-450 containing steroid hydroxylation system of *Rhizopus nigricans*. *Journal of Steroid Biochemistry* **26**:499-501.

**Bruchovsky N, Wilson JD.** 1968. The conversion of testosterone to 5  $\alpha$ -androstane-17  $\beta$ -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* **243**:2012-2021.

**Brunt SA, Riehl R, Silver JC.** 1990. Steroid hormone regulation of the *Achlya ambisexualis* 85-kilodalton heat shock protein, a component of the steroid receptor complex. *Molecular and Cellular Biology* **10**:273-281.

**Brygoo ER, Destombes P.** 1976. Epidémiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **74**: 219-243.

**Brzezowska E, Dmochowska-Gladysz J, Kolek T.** 1996. Biotransformation XXXIX. Metabolism of testosterone, androstenedione, progesterone and testosterone derivatives in *Absidia coerulea* culture. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **57**:357-362.

**Buckman J, Miller SM.** 1998. Binding and reactivity of *Candida albicans* estrogen binding protein with steroid and other substrates. *Biochemistry* **37**:14326-14336.

**Buot G, P Lavalle, F Mariat, P Suchil.** 1987. Etude épidémiologique des mycétomes au Mexique. À propos de 502 cas. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales* **80**: 329-39.

**Burshell A, Stathis PA, Do Y, Miller SC, Feldman D.** 1984. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 3450-3456.

**Capek A, Simek A.** 1971. Effect of steroids on dermatophytes. *Folia Microbiologica* **16**:299-302.

**Carlile MJ, Machlis L.** 1965. Response of male gametes of *Allomyces* to sexual hormone sirenin. *American Journal of Botany* **52**:478-483.

**Casas-Campillo C, Balandrano D, Galarza A.** 1961. Antimicrobial properties of 21, 21-dimethoxy progesterone and other progesterone analogues. *Journal of Bacteriology* **81**:366-375.

**Chattaway FW, Townsley JD, Barlow AJE.** 1959. Effect of steroids and related compounds on the growth of dermatophytes. *Nature* **184**: 1731-1732.

**Clemons KV, Schar G, Stover EP, Feldman D, Stevens DA.** 1988. Dermatophyte-hormone relationships: characterization of progesterone-binding specificity and growth inhibition in the genera *Trichophyton* and *Microsporum*. *Journal of Clinical Microbiology* **26**: 2110-2115.



**Clemons KV, Stover EP, Schär G, Stathis PA, Chan K, Tökés L, Stevens DA, Feldman D.** 1989. Steroid metabolism as a mechanism of escape from progesterone-mediated growth inhibition in *Trichophyton mentagrophytes*. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:11186-11192.

**Cresnar B, Breskvar K, Hudnik-Plevnik T.** 1985. Resolution and reconstitution of the NADPH-cytochrome C (P-450) reductase induced by progesterone in *Rhizopus nigricans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **133**:1057-1063.

**Devliotou-Panagiotidou D, Koussidou-Eremondi T, Badillet G.** 1995. Dermatophytosis in northern Greece during the decade 1981-1990. *Mycoses* **38**: 151-157.

**Drutz DJ, Huppert M, Sun SH, McGuire WL.** 1981. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity* **32**: 897-907.

**Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D.** 1981. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **53**:58-68.

**Feldman D, Do Y, Burshell A, Stathis PA, Loose DS.** 1982. An estrogen-binding protein and endogenous ligand in *Saccharomyces cerevisiae*: Possible hormone receptor system. *Science* **218**: 297-298.

**Feldman D, Stathis PA, Hirst MA, Stover EP, Do YS.** 1984a. *Saccharomyces cerevisiae* produces a yeast substance that exhibits estrogenic activity in mammalian systems. *Science* **224**: 1109-1111.

**Feldman D, Tökés LG, Stathis PA, Miller SC, Kurz W, Harvey D.** 1984b. Identification of 17  $\beta$ -estradiol as the estrogenic substance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **81**:4722-4726.

**Feldman D.** 1986. Ketoconazole and other imidazole derivatives as inhibitors of steroidogenesis. *Endocrine Reviews* **7**:409-420.

**Flawia MM, Torres HN.** 1973. Adenylate cyclase activity in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry* **248**:4517-4520.

**Frenkel JK.** 1962. Role of corticosteroids as predisposing factors in fungal diseases. *Laboratory Investigation* **11**:1192-1208.

**Furcolow ML, Chick EW, Busey JF, Menges RW.** 1970. Prevalence and incidence studies of human and canine blastomycosis. *American Review of Respiratory Disease* **102**:60-67.

**González-Ochoa A.** 1965. Contribuciones recientes al conocimiento de la esporotricosis. *Gaceta Médica de México* **95**:463-474.

**Gooday GW.** 1974. Fungal sex hormones. *Annual Review of Biochemistry* **43**: 35-49.

**Gooday GW, Adams DJ.** 1993. Sex hormones and fungi. *Advances in Microbial Physiology* **34**:69-145.

**Gore-Lancon RE, Armstrong DT.** 1988. Follicula steroidogenesis and its control. In *Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neil JD et al (Eds.) Vol I, pp 331-335. Raven Press Ed. New York.

**Gorski J, Toft DO, Shyamala G, Smith D, Notides A.** 1968. Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogens with the uterus. *Recent Progress in Hormone Research* **24**:45-80.

**Gray AM, Flatt PR.** 1998. Insulin-releasing and insulin-like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). *Journal of Endocrinology* **157**:259-266.

**Gujjar PR, Finucane M, Larsen B.** 1997. The effect of estradiol on *Candida albicans* growth. *Annals of Clinical Laboratory Sciences* **27**:151-156.

**Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P.** 1995a. *Nocardia brasiliensis*: *in vitro* and *in vivo* growth response to steroid sex hormones. *Mycopathologia* **132**: 79-85.

**Hernández-Hernández F, De Bièvre C, Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Dupont B, López-Martínez R.** 1995b. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* *in vitro* and characterization of progesterone receptors. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **33**:235-239.

**Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Camacho-Arroyo I, Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA.** 1999a. Detection and expression of corticosteroid binding protein gene in human pathogenic fungi. *Mycopathologia* **143**:127-130.

**Holland HL, Nguyen DH, Pearson NM.** 1995. Biotransformation of corticosteroids by *Penicillium decumbens* ATCC 10436. *Steroids* **60**:646-649.

**Hu S, Genain G, Azerad R.** 1995. Microbial transformation of steroids: Contribution to 14  $\alpha$ -hydroxylations. *Steroids* **60**:337-352.

**Janssens PMW.** 1987. Did vertebrate signal transduction mechanisms originate in eukaryotic microbes? *Trends in Biochemical Sciences* **12**:456-459.

**Janssens PMW.** 1988. The evolutionary origin of eukaryotic transmembrane signal transduction. *Comparative Biochemistry and Physiology* **90A**: 209-223.

**Jayanthi CR, Madyastha P, Madyastha M.** 1982. Microsomal 11  $\alpha$ -hydroxylation of progesterone in *Aspergillus ochraceus*: Part I: Characterization of the hydroxylase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **106**:1262-1268.

**Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW.** 1992. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5  $\alpha$ -reductase. *Journal of Clinical Investigation* **89**:293-300.

**Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf EW, Jungblut PW, DeSombre ER.** 1968. A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **59**:632-638.

**Kalo A, Segal E.** 1988. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosa: Effect of sex hormones on adherence of yeasts in vitro. *Canadian Journal of Microbiology* **34**:224-228.

**Karunaratne WAE.** Rhinosporidiosis in man. 1964. The Athlone Press, London.

**Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Mordecai D.** 1979. Zearalenones: Characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal  $\beta$ -resorcylic acid lactones. *Endocrinology* **105**: 33-40.

**Kernbaum S, Tazi L, Champagne D.** 1976. Sexe et susceptibilité aux maladies infectieuses. *Bulletin de l' Institut Pasteur* **74**: 359-382.

**Kimura LH, Pearsal NN.** 1978. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity* **21**:64-68.

**Kinsman OS, Collard AE.** 1986. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. *Infection and Immunity* **53**:498-504.

**King RD, Lee SC, Morris LA.** 1980. Adherence of *Candida albicans* and other species to mucosal epithelial cells. *Infection and Immunity* **27**:667-674.

**Klotz SA, Drutz DJ, Harrison JL, Huppert M.** 1983. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infection and Immunity* **42**:374-384.

**Kolek T, Swizdor A.** 1998. Biotransformation XLV. Transformations of 4-ene-3-oxo steroids in *Fusarium culmorum* culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **67**:63-69.

**Kwong-Chung KJ, Bennett JE.** Infections caused by *Malassezia* species. In *Medical Mycology*. 1992. Lea & Febiger, Philadelphia.

**Lacaz CS, Rose M.** 1969. Bibliografia sobre blastomicose salamericana (doença de Lutz) e blastomicose queloidiforme (doença de Lobo) (1909-1968). Instituto de Medicina Tropical, Sao Paulo.

**Landers JP, Spelsberg TC.** 1992. New concepts in steroid hormone action: Transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in Eukariotic Gene Expression* **2**:19-63.

**Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC.** 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **52**:575-580.

**Leibson L.** 1979. Endocrinology evolution and evolutionary endocrinology. *Perspectives in Biology and Medicine* **23**:25-43.

**Lenard J.** 1992. Mammalian hormones in microbial cells. *Trends in Biological Sciences* **17**:147-150.

**Lenasi H, Hudnik-Plevnik T.** 1996. Identification and partial characterization of cytosolic progesterone-binding sites in the filamentous fungus *Rhizopus nigricans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **330**:80-86.

**Le Roith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA.** 1980. Evolutionary origins of vertebrate hormones: Substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**: 6184-6188.

**Le Roith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA.** 1981. Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **256**:6533-6536.

**Levi JD.** 1956. Mating reaction in yeast. *Nature* **177**:753-754.

**Loose DS, Schurman DJ, Feldman D.** 1981. A corticosteroid binding protein and endogenous ligand in *C. albicans* indicating a possible steroid-receptor system. *Nature* **293**: 477-479.

**Loose DS, Feldman D.** 1982. Characterization of a unique corticosterone-binding protein in *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* **257**: 4925-4930.

**Loose DS, Stevens DA, Schurman DJ, Feldman D.** 1983a. Distribution of a corticosteroid-binding protein in *Candida* and other fungal genera. *Journal of General Microbiology* **129**: 2379-2385.

**Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D.** 1983b. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **80**, 7659-7663.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saúl A, Macotela Ruiz E.** 1992. Epidemiología del micetoma en México: Estudio de 2105 casos. *Gaceta Médica de México* **128**: 477-481.

**Loumaye E, Thorner J, Catt KJ.** 1982. Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: Evolutionary conservation of a reproductive hormone? *Science* **218**:1323-1325.

**Madani ND, Malloy PJ, Rodríguez-Pombo P, Krishnan AV.** 1994. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**:922-926.

**Malloy PJ, Zhao X, Madani ND, Feldman D.** 1993. Cloning and expression of the gene from *Candida albicans* that encodes a high-affinity corticosteroid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**:1902-1906.

**Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R.** 1994. Dermatophytoses in Mexico city. *Mycoses* **37**:49-52.

**Martinson FD, Clark BM.** 1967. Rhinophycomycosis entomophthorae in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **16**:40-47.

**Maruo T, Cohen H, Segal SJ, Koide SS.** 1979. Production of choriogonadotropin-like factor by microorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**:6622-6626.

**McMorris TC, Barksdale AW.** 1967. Isolation of a sex hormone from the water mould *Achlya bisexualis*. *Nature* **215**:320-321.

**McMorris TC, Le PH, Preus MW, Schow SR, Weihe GR.** 1989. Synthesis of dehydro-oogoniol, a female-activating hormone of *Achlya*: The progesterone route. *Steroids* **53**:345-361.

**McMorris TC.** 1978. Antheridiol and oogoniols. Steroid hormones which control sexual reproduction in *Achlya*. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B* **284**:459.

**Méndez-Tovar LJ, De Bièvre C, López-Martínez R.** 1991. Effets des hormones sexuelles humaines sur le développement *in vitro* des agents d'eumycétomes. *Journal de Mycologie Médicale* **118**: 141-143.

**Miller SC, Bottema CDK, Stathis PA, Tokés LG, Feldman D.** 1986. Unexpected presence of estrogens in culture medium supplements: Subsequent metabolism by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Endocrinology* **119**: 1362-1369.

**Mohr JA, Long H, McKown BA, Muchmore HG.** 1972. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to steroids. *Sabouraudia* **10**: 171-172.

**Mohr JA, Tatem BA, Long H, Muchmore HG, Felton FG.** 1973. Increased susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B in the presence of steroids. *Sabouraudia* **11**:140-142.

**Möller W, Amons R.** 1985. Phosphate-binding sequences in nucleotide-binding proteins. *FEBS Letters* **186**:1-7.

**Mostafa ME.** 1995. Progesterone transformation as a diagnostic feature in the classification of the *Aspergillus niger* group. *Letters of Applied Microbiology* **20**:243-246.

**Nega E, Grunwaldt G.** 1997. Evidence for and characterization of cytochrome P-450 in *Neurospora crassa*. *Journal of Basic Microbiology* **37**:139-145.



**Ng TTC, Robson GD, Denning DW.** 1994. Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp: Implications for pathogenesis. *Microbiology* **140**:2475-2479.

**Odds FC.** 1979. *Candida* and candidosis. Leicester University Press.

**Othman YHS, Adams DJ, Hitchcock CA, Oakey RE.** 1988. Oestradiol-binding protein in *Candida albicans*. *Biochemical Society Transactions* **16**: 789-790.

**Perfect JR, Pickard WW, Hunt DL, Palmer B, Schell WA.** 1991. The use of amphotericin B in nosocomial fungal infection. *Reviews of Infectious Diseases* **13**:474-479.

**Pertseva MN.** 1990. The evolutionary pathways of the systems realizing the hormonal signal. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* **76**:1126-1137.

**Powell BL, Drutz DJ.** 1983. Confirmation of corticosterone and progesterone binding activity in *Candida albicans*. *The Journal of Infectious Diseases* **147**:359.

**Powell BL, Drutz DJ, Huppert M, Sun SH.** 1983. Relationship of progesterone- and estradiol-binding proteins in *Coccidioides immitis* to coccidioidal dissemination in pregnancy. *Infection and Immunity* **40**: 478-485.

**Powell BL, Drutz DJ.** 1984. Identification of a high-affinity binder for estradiol and a low-affinity binder for testosterone in *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity* **45**: 784-786.

**Powell BL, Frey CL, Drutz DJ.** 1984. Identification of a 17  $\beta$ -estradiol binding protein in *Candida albicans* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Experimental Mycology* **8**:304.

**Restrepo MA, Gutierrez F.** 1970. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **19**:68-76.

**Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA.** 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity* **46**: 346-353.

**Riehl RM, Toft DO.** 1984. Analysis of the steroid receptor of *Achlya ambisexualis*. *The Journal of Biological Chemistry* **259**:15324-15330.

**Riehl RM, Toft DO, Meyer MD, Carlson GL, McMorris TC.** 1984. Detection of a pheromone-binding protein in the aquatic fungus *Achlya ambisexualis*. *Experimental Cell Research* **153**:544-549.

**Riehl RM, Sullivan WP, Vroman BT, Bauer VJ, Pearson GR, Toft DO.** 1985. Immunological evidence that the nonhormone binding component of avian steroid receptors exists in a wide range of tissues and species. *Biochemistry* **24**:6586-6591.

**Riehl RM, Toft DO.** 1986. *The receptors* (P. Conn ed.), vol 4. Academic Press, Orlando.

**Rippon JW.** *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.* 1988. 3<sup>a</sup> Ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia.

**Roberts SOB.** 1969. *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *British Journal of Dermatology* **81**:262-269.

**Roth J, Le Roith D, Shiloach J, Rosenzweig JL, Lesniak MA, Havrankova J.** 1982. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular chemical messengers. *New England Journal of Medicine* **306**: 523-527.

**Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA.** 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity* **56**: 711-713.

**Samanta TB, Ghosh DK.** 1987. Characterization of progesterone 11 $\alpha$ -hydroxylase of *Aspergillus ochraceus* TS: A cytochrome P-450 linked monooxygenase. *Journal of Steroid Biochemistry* **28**:327-332.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning. A Laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> ed. 1989. Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**Sano A, Nishimura K, Miyaji M.** 1999. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **40**:1-8.

**Schar G, Stover EP, Clemons KV, Feldman D, Stevens DA.** 1986. Progesterone binding and inhibition of growth in *Trichophyton mentagrophytes*. *Infection and Immunity* **52**: 763-767.

**Schneider JJ.** 1952. Conversion of desoxycorticosterone to four allopregnane metabolites by rat liver *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* **199**:235-244.

**Sentamilselvi G, Kamalam A, Ajithadas K, Janaki C, Thambiah AS.** 1998. Scenario of chronic dermatophytosis: An Indian study. *Mycopathologia* **140**: 129-135.

**Segal E, Soroka A, Schechte A.** 1984. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells *in vitro* and candidal vaginitis. *Sabouraudia* **22**:191-200.

**Skowronski R, Feldman D.** 1989. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Candida albicans*. *Endocrinology* **124**:1965-1972.

**Smale LE, Waechter KG.** 1970. Disseminated coccidioidomycosis in pregnancy. *American Journal of Obstetric Gynecology* **107**:356-361.

**Smith KE, Ahmed F, Antoniou T.** 1993. Microbial transformations of steroids. *Biochemical Society Transactions* **21**:1077-1080.

**Sobel JD, Muller G, McCormick JF.** 1985. Experimental chronic vaginal candidosis in rats. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **23**:199-206.

**Sobel JD.** Genital candidiasis. In: *Candidiasis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment*. 1993. GP Bodey Ed. 2<sup>a</sup>. Ed. 1993. Raven Press Ltd., New York.

**Solomon GB.** 1969. Host hormones and parasitic infection. *International Review in Tropical Medicine* **3**:101-158.

**Stevens D.** *Coccidioidomycosis. A text*. 1981. Plenum Press, New York.

**Stover EP, Loose DS, Stevens DA, Feldman D.** 1983. Ketoconazol binds to the intracellular corticosteroid-binding protein in *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **117**: 43-50.

**Stover EP, Schar G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D.** 1986. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity* **51**: 199-203.

**Sugarman B, Mummaw N.** 1988. The effect of hormones on *Trichomonas vaginalis*. *Journal of General Microbiology* **134**:1623-1628.

**Svandborg-Eden C, Hanson LA, Judal U, Lindberg U, Sohl-Akerland A.** 1976. Variable adherence to normal human urinary tract epithelial cells of *Escherichia coli* strain associated with various forms of urinary tract infections. *Lancet* **2**:490-492.

**Thigpen AE, Russell DW.** 1992. Four-amino acid segment in steroid 5  $\alpha$ -reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* **267**:8577-8583.

**Tio TH, Djojopronota M, Njo-Injo TE.** 1966. Subcutaneous phycomycosis caused by *Basidiobolus haptosporus* in East Java. *Archives of Dermatology* **93**:550-553.

**Tsuchiya E, Abe K, Fukui S.** 1978. Sequence of events in early stages of sexual differentiation caused by rhodotorucine A, a fungal sex hormone: Biological determination using matingless mutants derived from *Rhodosporidium toruloides* M 1057. *Journal of General and Applied Microbiology* **21**:291-294.

**Vartivarian SE.** 1992. Overview of fungal Infections. virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clinical Infectious Disease* **14** (Suppl 1): S30-6.

**Vita M, Smith K, Rozman D, Komel R.** 1994. Progesterone metabolism by the fungus *Cochliobolus lunatus*. *Journal of Steroid biochemistry and Molecular Biology* **49**:87-92.

**Wagner VP, Smale LE, Lischke JH.** 1975. Amebic abscess of the liver and spleen in pregnancy and the puerperium. *Obstetric Gynecology* **45**:562-565.

**White S, Larsen B.** 1997. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cellular and Molecular Life Sciences* **53**:744-749.

**Wierenga RK, Hol WGJ.** 1983. Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant. *Nature* **302**:842-844.

**Wilson JD, Griffin JE, Russell DW.** 1993. Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews* **14**:577-593.

**Zhao X, Malloy PJ, Ardies CM, Feldman D.** 1995. Oestrogen-binding protein in *Candida albicans*: Antibody development and cellular localization by electron immunocytochemistry. *Microbiology* **141**: 2685-2692.