

DIMORFISMO Y VIRULENCIA DE HONGOS PATOGENOS PARA HUMANOS: ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS(*)

Gioconda San-Blas

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Microbiología y Biología Celular, Apartado 21827, Caracas 1020A, VENEZUELA

ABSTRACT

Some biochemical mechanisms (sulphydryl groups, hormonal receptors, proteinases) involved in the processes of virulence and dimorphism in fungi pathogenic for humans are reviewed.

KEY WORDS: Pathogenic fungi, dimorphism, pathogenicity.

RESUMEN

Se revisan diversos mecanismos bioquímicos (grupos sulfidrilos, receptores hormonales, proteinasas) involucrados en el control de la virulencia y el dimorfismo de hongos patógenos para humanos.

PALABRAS CLAVES: Hongos patógenos, dimorfismo, patogenicidad

1. INTRODUCCION

Muchos hongos zoopatógenicos crecen en más de una morfología, con una fase saprofítica usualmente consistente en hifas, y una fase parasitaria, frecuentemente expresada como levadura. Esta dualidad fenotípica se ha llamado dimorfismo [14]. El dimorfismo es un modelo útil para examinar las bases de la morfogénesis y la diferenciación celular en eucariotes y su explicación podría ser útil para entender los mecanismos de control de un grupo importante de micosis que

(*)Este trabajo es un resumen del material presentado como Conferencia Inaugural del Primer Congreso Nacional de Micología, realizado en Tenerife, en julio de 1992.

afligen al hombre y a los animales. La temperatura, o factores nutricionales, o ambos, son generalmente los agentes que accionan los mecanismos conducentes al cambio en la morfología fúngica.

Si bien los estudios bioquímicos de regulación de la patogenicidad y del dimorfismo todavía no se conocen en profundidad, la literatura actual sobre el tema indica que hay algunos ejemplos ilustrativos sobre estos fenómenos.

2. GRUPOS SULFIDRILOS

2.1. Histoplasma capsulatum

H. capsulatum es un hongo patógeno dimórfico causante de la histoplasmosis. En su estadio saprofítico, el hongo está bajo la forma filamentosa o micelial (M) pero en el huésped existe como levadura (L) gemante. En el laboratorio, la fase M puede convertirse a la L cambiando la temperatura de incubación de 25°C a 37°C. Sin embargo, para que este cambio se manifieste, es indispensable que el medio de cultivo contenga grupos sulfidrilos. Garrison y col. [6] demostraron que la cisteína y la cistina eran transportadas en forma activa en la levadura por una permeasa dependiente de ATP y que ellas estimulaban la respiración fúngica al incorporarse al ciclo de Krebs como ácido pirúvico. También demostraron que los efectos en la respiración eran una buena medida de la incorporación de estos compuestos. Maresca y col. [11] retomaron estos estudios y comprobaron que las levaduras incubadas a 37°C tenían un nivel más alto de respiración que los micelios incubados a 25°C (6,6 y 2,8 nmol O₂ por

min por mg peso seco, respectivamente). Al llevar la levadura a 25°C. la respiración caía a niveles característicos del micelio y viceversa. La adición de cisteína o cistina al medio estimuló la respiración de la levadura pero no la de micelio. El estudio de la respiración en la transformación M→L reveló la existencia de tres estadios [10] durante las primeras 24 a 48 horas del aumento de temperatura se produce una disminución progresiva en la rata de respiración y en la concentración intracelular de cisteína; como segundo estadio ocurre una suspensión total de la respiración a la vez que el nivel de cisteína cae a su más bajo valor. Para pasar al estadio tercero, después de 4 a 6 días, se requiere de la adición exógena de cisteína que provoca la activación de la respiración mitocondrial y conduce a la culminación de la transición morfológica. En ese momento, la rata de respiración se restaura y se aumentan los niveles de cisteína a los valores iniciales.

Debido a que los cambios de morfología están relacionados con la virulencia, cualquier bloqueo genético o fisiológico en la transformación M→L tiene especial interés como posible arma terapéutica. A tal efecto, Medoff y col. [12] estudiaron el efecto del ácido p-cloromercurifenilsulfónico (PCMS), un agente bloqueador de grupos -SH, en la transformación M→L con el fin de verificar la hipótesis de que el estado redox de algunos grupos -SH podía controlar el dimorfismo. Cuando los micelios fueron expuestos a PCMS 100 µM por 24 horas, crecieron normalmente a 25°C aunque al ser transferidos a 37°C no fueron capaces de transformar, efecto que resultó irreversible aún

después de múltiples pasajes en medio sin PCMS. Aunque se desconoce la razón de este efecto, se ha sugerido que el PCMS podría curar la célula de algún plásmido o inhibir alguna translocación cromosómica, quizás similar al efecto observado en los tipos sexuales en levaduras [7]. Este micelio bloqueado en su transformación a levadura es suficiente para provocar una respuesta inmune protectora en animales y por lo tanto tiene un interés terapéutico potencial. De hecho, Medoff y col.[12] demostraron que a pesar de no existir diferencias en la virulencia de levaduras normales o tratadas con PCMS en ratones CD-1, los micelios de H. capsulatum tratados con PCMS no fueron capaces de transformar a levaduras en esos mismos ratones. Más aún, al aumentar la concentración de micelios tratados con PCMS se aumentó en forma significativa la sobrevivencia de ratones luego de la infección con cepas virulentas de levaduras, siendo esta supervivencia proporcional a la dosis de inóculo inmunizador. Este enfoque experimental está resultando de interés en la posible preparación de vacunas experimentales contra la histoplasmosis.

2.2. Paracoccidioides brasiliensis

En el modelo de dimorfismo de P. brasiliensis presentado por Kanetsuna y col. [8] y complementado por San-Blas y San-Blas [14], se enfatiza el papel de los grupos sulfhidrilos de las proteínas de pared celular en el dimorfismo de este hongo. Al igual que en H. capsulatum, P. brasiliensis presenta dimorfismo térmico, produciéndose una fase M a 23°C y una L a 37°C, efecto que es reversible y dependiente únicamente de la temperatura [8]. Resultados experimentales [8]

indican que la fase L tiene una actividad de 5 a 8 veces mayor de la enzima proteína disulfuro reductasa (PDR) que la fase M, actividad que provoca el rompimiento de los grupos disulfuros en las proteínas de la pared celular y que genera proteínas de cadena más corta en la levadura que en el micelio, propiciando de esta manera el establecimiento de una forma redondeada en la fase L con mayor actividad de PDR y de proteínas largas en el micelio, en armonía con la configuración de las hifas. Esta hipótesis permite suponer que cualquier efecto que perturbe la actividad de PDR en P. brasiliensis conducirá a modificaciones en el proceso de transformación M→L.

Con este enfoque experimental se han comenzado estudios para precisar el efecto de derivados de ajo (Allium sativum) sobre P. brasiliensis. Se ha reportado que los extractos acuosos de ajo tiene un efecto antifúngico sobre Candida albicans habiéndose propuesto varios sitios de acción, particularmente como inactivadores de tioles esenciales [2,3,5]. El ajoene es un derivado químico de la alicina del ajo y ha sido introducido hace algunos años como inhibidor de la agregación plaquetaria [1]. Su acción como posible agente antifúngico fue reportado por primera vez en Aspergillus niger y C. albicans por Yoshida y col. [9] quienes sugirieron que el ajoene bloqueaba algún paso de síntesis de la pared celular. Trabajos ulteriores [19] indicaron que el crecimiento de P. brasiliensis era inhibido por el ajoene, siendo la fase L más sensible que la M a la acción de este agente. Si bien el mecanismo de acción no fue elucidado, los datos provenientes de microscopía electrónica

sugirieron que la interferencia primaria estaba a nivel de la membrana citoplasmática, con un efecto secundario eventual sobre la pared celular. Más aún, el efecto inhibitorio del ajoene sobre la fase L (no así sobre la fase M) es revertido con la adición de compuestos protectores de grupos sulfhidrilos tales como cisteína o mercaptoetanol. Además, el proceso de transformación M→ L (pero no el reverso) es bloqueado en presencia de ajoene [16]. Como quiera que la estructura química del ajoene contiene un puente disulfuro, es probable que compuestos protectores de los grupos sulfhidrilos sean capaces de revertir la acción del ajoene precisamente a través de esos puentes disulfuros, quizás porque el ajoene estaría funcionando como un competidor de las proteínas contentivas de disulfuros, haciendo que la enzima PDR actúe en el ajoene y no hacia su blanco natural. De esta manera, las proteínas no pueden acortarse a las cadenas más pequeñas características de la fase L, con lo que se fuerza al hongo a mantenerse bajo la fase M.

3. RECEPTORES HORMONALES

Los receptores de hormonas esteroideas han tenido interés para los estudiosos de la paracoccidiodomicosis debido a que si bien el contacto con P. brasiliensis es igualmente frecuente en hombres y mujeres, la enfermedad es de 13 a 87 veces más frecuente en hombres [13] lo cual sugiere algún efecto hormonal en la diseminación de la infección. Estudios realizados al efecto [13] indican que el citosol de P. brasiliensis es capaz de enlazar 17 β-estradiol en forma

específica, efecto que no se observó con testosterona, 17 α -estradiol o corticosterona, y sólo parcialmente (25%) con estrona, estriol y progesterona. La anulación del efecto con la adición de tripsina y N-etilmaleimida sugirió la naturaleza proteica del receptor y la necesidad de grupos disulfuros como elementos activos del proceso de recepción [9]. Más aún, el estradiol fue capaz de inhibir la transformación M \rightarrow L en P. brasiliensis, paso indispensable en el proceso de infección. De allí que los autores sugieran que los estrógenos endógenos del huésped actúen a través de la proteína receptora del hongo, inhibiendo la transformación M \rightarrow L, lo cual explicaría la resistencia de las mujeres a la paracoccidiodomicosis [13].

El efecto del estradiol en la morfogénesis de P. brasiliensis pudo ser observado en la expresión de proteínas [4]. El análisis electroforético de proteínas citosólicas por SDS-PAGE reveló la existencia de 12 bandas asociadas al micelio (entre los rangos de 30 a 140 kDa) y 18 bandas asociadas a la fase levaduriforme (entre 22 y 127 kDa). En células que transformaban del micelio a levadura se observó una progresión hacia el perfil de proteínas de levaduras a la vez que se produjeron 5 bandas nuevas (23 a 50 kDa), bandas que eran transitorias durante el proceso de transformación. El tratamiento de micelios con estradiol alteró los perfiles observados en condiciones normales: 4 de 12 bandas asociadas al micelio se mantuvieron mientras que la aparición de las 5 bandas de transición y 9 de las 18 bandas asociadas a la levadura fueron bloqueadas o demoradas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que en analogía a la acción de receptores

hormonales en mamíferos, la respuesta funcional de P. brasiliensis a estradiol está relacionada con la regulación de la expresión de proteínas, mediada a través de un complejo proteína receptora ligando que repercute directamente en la expresión de la virulencia del hongo.

4. PROTEINASAS

4.1. Coccidioides immitis

El ciclo parasitario de C. immitis, es iniciado por la transformación de la artroconidia infecciosa presente en el aire en una esférula multinucleada que se aloja en el tracto respiratorio y alcanza los alvéolos. El contenido de las esférulas es convertido eventualmente en una multitud de pequeñas endosporas uninucleadas que al diseminarse provocan la enfermedad [20]. Esta transformación es de primordial importancia en la patogenia de la enfermedad, razón por la cual se han comenzado estudio que permitan elucidar los mecanismos bioquímicos que la regulan. Yuan y Cole [20,21] estudiaron macromoléculas solubles en agua provenientes de paredes celulares de conidias (SCWF), demostrando que entre ellas existía una proteinasa capaz de digerir elastina y colágeno, importantes proteínas estructurales de los pulmones, así como también sIgA, inmunoglobulina que provee anticuerpos a las superficies de mucosas. La electroforesis en SDS-PAGE indicó que esta proteinasa correspondía a una molécula de peso molecular 36.000 kDa, tenía un pH óptimo de 8,0 y una temperatura óptima de 35° a 40°C. Los substratos preferidos fueron

colágeno, elastina, hemoglobina, IgG, sIgA y caseína. Como inhibidores actuaban disopropilfosfofluoridato, TPCK, α -1 antitripsina, PMSF y quimostatina, todo lo cual la caracteriza como una serina proteinasa del tipo quimotripsina. La enzima se encontraba más concentrada en la pared del aparato de segmentación de las esférulas momentos antes de comenzar el proceso de diferenciación de endosporas [22]. Así mismo, la presencia de un inhibidor de la proteinasa fue detectada del citosol y de la pared celular del hongo [21]. Con todos estos datos, los autores sugieren que la proteinasa podría ser una enzima alostérica bajo el control del modulador inhibitorio que dejaría de ejercer su efecto en el momento en que la esférula debe pasar a la fase final indispensable del proceso invasivo como es la producción de las endosporas.

4.2. Paracoccidioides brasiliensis

En el modelo de dimorfismo de P. brasiliensis presentado por Kanetsuna y col. [8] y luego complementado por San-Blas y San-Blas [14], el principal elemento de consideración en el control de la regulación de la transformación radica en la presencia de α -1,3-glucán en la fase L del hongo y su sustitución por β -1,3-glucán en la fase M. Estudios in vitro sobre la síntesis de β -glucán en P. brasiliensis [15] indican que la UDP-glucosa actúa como nucleótido preferencial con la participación de la enzima glucán sintetasa que se encuentra particulada en las membranas y que es más activa a 23°C que a 37°C. Curiosamente, tanto la enzima proveniente de levadura como de micelio provocan la síntesis de β -glucán y en ningún caso de

α -glucán. Considerando que la levadura sólo contiene trazas de β -glucán, se ha postulado la hipótesis de que proteinasas presentes en el citoplasma podrían regular el control de la síntesis del polisacárido a fin de que éste se produzca mayormente durante el crecimiento micelial y se restrinja durante la formación de levaduras [18]. Resultados inéditos (San-Blas y colaboradores) sugieren que este es en realidad el caso. Se ha encontrado que existe una proteinasa neutra intracelular, con características de serina proteinasa que permanece activa durante el crecimiento de micelio y en la transformación L \rightarrow M. Al contrario, la actividad decrece durante el crecimiento levaduriforme y en la transformación M \rightarrow L. Estos datos apoyan la hipótesis planteada por San-Blas y col. [18] en cuanto a la participación de proteinasa en el control de la síntesis de β -glucán y por ende, en la regulación del dimorfismo de P. brasiliensis, siendo este proceso indispensable para el establecimiento de la infección.

5. CONCLUSIONES

Los ejemplos arriba señalados permiten establecer la existencia de controles bioquímicos de la patogenicidad y el dimorfismo en ciertos hongos. Sin embargo, con ellos sólo estamos comenzando un estudio que tiene mucho que ofrecer en cuanto a las posibilidades de conocer reguladores biológicos para el tratamiento de algunas micosis que afligen a la humanidad. Al mismo tiempo, estos estudios revelan la existencia todavía no comprobada de otros eventos que van desde la activación de genes hasta el cambio morfológico, algunos de los

cuales serian los verdaderos causantes de las regulaciones bioquímicas aquí señaladas. Es de esperarse, por lo tanto, que las investigaciones continúen en estas líneas a fin de entender con propiedad estos fenómenos y aplicarlos en el control de las enfermedades micóticas.

AGRADECIMIENTOS: Al Comité Organizador del I Congreso Nacional de Micología por su invitación a dictar la Conferencia Inaugural de ese evento, y a la Academia Canaria de Ciencias por financiar los gastos de traslado a Tenerife.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] APITZ-CASTRO, R., LEDEZMA, E., ESCALANTE, J., JORQUERA, A., PIÑATE, F., MORENO-REA, J. CARRILLO, G., LEAL, O., and JAIN, M.K. (1988), Ajoene [(E,Z)-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene-9-oxide], reversibly prevents platelet activation in dogs under extracorporeal circulation. *Arzneim. Forsch. Drug. Res.* 38, 901-904.
- [2] BARONE, F.E., and TANSEY, M.R. (1977), Isolation, purification, identification, synthesis, and kinetic of activity of the anticandidal component of Allium sativum and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia* 69, 793-825.
- [3] BLOCK, E., AHMAD, S., CATAFALMO, J.L., JAIN, M.K., AND APITZ-CASTRO, R. (1986), Antithrombic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7045-7055.
- [4] CLEMMONS, K.V., FELDMAN, D., and STEVENS, D.A. (1989), Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of Paracoccidioides brasiliensis. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1607-1617.
- [5] GHANNOUM, M.A. (1988), Studies on the anticandidal mode of action of Allium sativum (garlic). *J. Gen. Microbiol.* 134, 2917-2924.

- [6] GARRISON, R.G., DODD, H.T., and HAMILTON, J.V. (1970), The uptake of low molecular weight sulfur-containing compounds by Histoplasma capsulatum and related dimorphic fungi. Mycopathol. Mycol. Appl. 40, 171-180.
- [7] HICKS, J., STRATERN, S.L., and KLAR, J.S. (1979), Transposable mating type genes in Saccharomyces cerevisiae. Nature 282, 478-483.
- [8] KANETSUNA, F., CARBONELL, L.M., AZUMA, I., and YAMAMURA, Y. (1972), Biochemical studies on the thermal dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. J. Bacteriol. 110, 208-218.
- [9] LOOSE, D.S., STOVER, E.P., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. and FELDMAN, D. (1983), Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in Paracoccidioides brasiliensis. Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 7659-7663.
- [10] MARESCA, B., and KOBAYASHI, G.S. (1989), Dimorphism in Histoplasma capsulatum: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol. Rev. 53: 186-209.

- [11] MARESCA, B., MEDOFF, G., SCHLESSINGER, D., and KOBAYASHI, G.S. (1977), Regulation of dimorphism in the pathogenic fungus Histoplasma capsulatum. Nature 266, 447-448.
- [12] MEDOFF, G., SACCO, M., MARESCA, B., SCHLESSINGER, D., PAINTER, A., KOBAYASHI, G.S., and CARRATU, L. (1986), Irreversible block of the mycelial to yeast phase transition of Histoplasma capsulatum. Science 231, 476-479.
- [13] RESTREPO, A., SALAZAR, M.E., CANO, L.E., STOVER, E.P., FELDMAN, D., and STEVENS, D.A. (1984), Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect. Immun. 46, 346-353.
- [14] SAN-BLAS, F., and SAN-BLAS, G. (1985), Paracoccidioides brasiliensis. In Fungal dimorphism (P. Szaniszlo, Ed.), Plenum Press, pp. 93-120.
- [15] SAN-BLAS, G. (1979), Biosynthesis of glucans by subcellular fractions of Paracoccidioides brasiliensis. Exp. Mycol. 3, 249-258.
- [16] SAN-BLAS, G., MARIÑO, L., SAN-BLAS, F., and APITZ-CASTRO, R. (1993), Effect of ajoene on dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. J. Red. Vet. Mycol. 31, in press.

- [17] SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F., GIL, F., MARIÑO, L., and APITZ-CASTRO, R. (1989), Inhibition of growth of the dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis by ajoene. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 33, 1641-1644.
- [18] SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F., RODRIGUEZ, L.E., and CASTRO, C.J. (1987), Un modelo de dimorfismo en hongos patógenos: Paracoccidioides brasiliensis. *Acta Cient. Venez.* 38, 202-211.
- [19] YOSHIDA, S., KASUGA, S., HAYASHI, N., USHIROGUCHI, T., MATSUURA, H., and NAKAGAWA, S. (1987), Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 615-617.
- [20] YUAN, L. and COLE, G.T. (1987), Isolation and characterization of an extracellular proteinase of Coccidioides immitis. *Infect. Immun.* 55, 1970-1978.
- [21] YUAN, L., and COLE, G.T. (1989), Characterization of a proteinase inhibitor isolated from the fungal pathogen Coccidioides immitis. *Biochem. J.* 257, 729-736.
- [22] YUAN, L., COLE, G.T., and SUN, S.H. (1988), Possible role of a proteinase in endosporulation of Coccidioides immitis. *Infect. Immun.* 56: 1551-1559.