

Interacción de Levaduras de *Sporothrix schenckii* con epitelios

Dra. Myrna Sabanero López ¹, Dr. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi ²,
Dra. Gloria Barbosa Sabanero ³, Dr. Everardo López Romero ¹,
M. en C. Gerardo Sandoval Bernal ^{*1}

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, esporotricosis, adhesión fúngica epitelio y citoesqueleto
Key Words: *Sporothrix schenckii*, sporotrichosis, fungal adhesion, epithelium, cytoskeleton

RESUMEN

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico que causa la infección subaguda y crónica llamada esporotricosis, caracterizada por lesiones nodulares cutáneas y subcutáneas con implicación linfática. Las interacciones del patógeno con el epitelio son esenciales para las infecciones cutáneas. En este trabajo, se estudió la interacción entre levaduras y epitelios. Los resultados muestran que las levaduras de *S. schenckii* se adhieren a los epitelios causando daño celular y alteración en los microtúbulos dependiente del tiempo.

ABSTRACT

Sporothrix schenckii is dimorphic fungus that usually causes a subacute and chronic infection called sporotrichosis, characterized by nodular

lesions of cutaneous and subcutaneous tissues with lymphatic involvement. The interactions of pathogen with epithelium are essential for cutaneous infections. In this work we studied the interaction between *S. schenckii* yeast with epithelium. The results shown that yeast of *S. schenckii* adhere to epithelial cells causing cell damage and alteration in the microtubules in a time dependent manner.

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una micosis adquirida por la inoculación traumática de micelio o inhalación de conidias del hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Esta micosis presenta varias formas clínicas, siendo la más frecuente la cutánea, mientras que la sistémica, se presenta en individuos inmunocomprometidos. (Tachibana *et al.*, 2001). La adhesión del patógeno es un prerequisite para la colonización y diseminación a los tejidos hospederos. Al respecto, el proceso de adhesión ha sido extensamente estudiado en hongos patógenos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* (Mendes-Giannini *et al.*, 2000), sin embargo, poco se conoce de los mecanismos de adhesión de *S. schenckii* a los tejidos. En este trabajo se examinó la interacción de *S. schenckii* con células epiteliales. Los resultados muestran que: (1) el porcentaje de adhesión de levaduras a los epitelios, es dependiente del tiempo y del inóculo, (2) el patógeno induce alteración en la integridad de la monocapa epitelial (3) a nivel subcelular, afecta las fibrillas de tubulina

Recibido 23 de Junio de 2006, Aceptado 26 de Septiembre de 2006

¹ Universidad de Guanajuato, Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Ciencias Químicas, fax: (473) 7322007 Ext. 8151. Correo electrónico: myrna@quijote.ugto.mx

² Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN. Tel: 01 (52)-555061-3800 Ext: 5626. Fax: 525-7477107. Correo electrónico: vtsutsu@cinvestav.mx

³ Universidad de Guanajuato, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Tel: (477) 714-3813, fax: (477) 716 8354.

* Becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, para Estudios de Doctorado en Ciencias (Biología). Instituto de Investigación en Biología Experimental.

y (4) durante la interacción el hongo presenta diferenciación levadura – micelio, la cual puede estar en relación con la patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Sporothrix schenckii, MP102 fue utilizado en este estudio, siendo amablemente donado por la Dra. Haydee Torres Guerrero del Departamento de Parasitología y Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNAM).

Condiciones de cultivo de levaduras de *S. schenckii*

El estadio levaduriforme se obtuvo al inocular 1×10^6 conidias/ml a 50ml de medio YPG: Extracto de levadura 0.3% (Difco, EUA), Peptona 1% (Hycl, México), Glucosa 2% (Bioxón, México) a pH 7.2 contenidos en matraces erlenmeyer de 250ml, se incubaron a 37°C, y 170rpm de agitación por 6 días (Rodríguez – Del Valle *et al.*, 1983).

Cultivo de células epiteliales

Las células epiteliales L929 (ATCC-CCL1) son cultivadas (1×10^5 células /ml) en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, EUA) y 0.1% de un cocktail de antibióticos y antimicóticos (Microlab, México), los cultivos se incubaron durante 48-72h a 37°C, 5% de CO₂ y humedad constante (Dalle *et al.*, 2003).

Ensayos de interacción Hongo - célula blanco

Los experimentos de adhesión se realizaron en cultivos confluentes. A la monocapa epitelial se le adicionó 10^3 y 10^6 /ml levaduras, la interacción se efectuó a 5h, 24h y 48h. Los controles son cultivos de epitelios sin levaduras. Después de la interacción, se examinó el porcentaje de adhesión de las levaduras y la integridad de las monocapas como se describe a continuación:

Porcentaje de adhesión de hongos a la célula blanco

Para ello, se fijaron las preparaciones con p-Formaldehído 4% y Glutaraldehído 0.05%, se lavaron con PBS y se tiñó de manera específica la pared de célula del hongo con blanco de calcoflúor al 0.01% (SIGMA Chemical Co, EUA). Las preparaciones se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon HFX-II) utilizando el filtro V (Exc= 380-425nm). El porcentaje de adhesión se calculó, contando por triplicado para cada tiempo de interacción en particular el número de levaduras adheridas a los epitelios por campo. Los porcentajes de adhesión se promediaron y se evaluaron las diferencias del promedio (\pm SD) entre las variables analizadas por la prueba de Tukey – Kramer (Systat Software Inc. 2003; Sigma Stat 3.0). $P < 0.05$ se consideró como significativo (Ibrahim *et al* 1995).

Inmunocitoquímica para microtúbulos

Después de la interacción entre las levaduras y los epitelios, las muestras se fijaron con p-formaldehído 4% en glutaraldehído 0.05% y se permeabilizaron con 0.5% Tritón X-100 por 3 min. Después fueron incubadas con los anticuerpos monoclonal anti α -tubulina y anti-ratón IgG conjugado a FITC (Meza *et al.*, 1982). Las preparaciones se observaron en el microscopio de epifluorescencia con filtro UV (Exc= 400-420nm).

RESULTADOS

Adhesión de *S. schenckii* a epitelios

Interesados en conocer la adhesión de las levaduras a epitelios con respecto al tiempo, analizamos la adhesión del patógeno bajo condiciones de alto y bajo inóculo (10^3 y 10^6 levaduras/ml), en la figura 1 se aprecia que en ambas condiciones de inóculo, a partir de las 3h de interacción, las levaduras se adhieren a los epitelios en un 19% y 32%, respectivamente. Después de 48h de interacción, la adhesión alcanzan 32% y 60%, respectivamente. Estos experimentos sugieren que la adhesión del patógeno al epitelio se comporta de manera tiempo e inóculo dependiente.

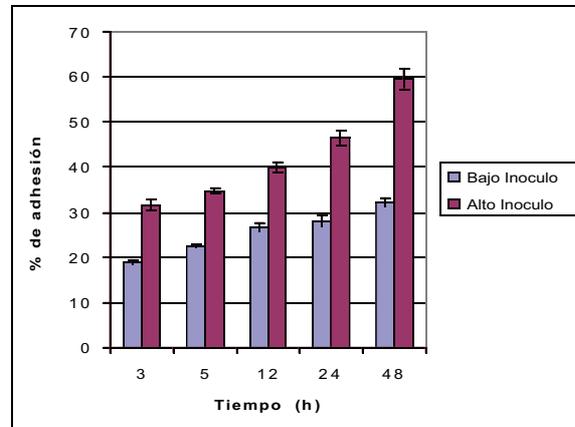


Figura 1. Cinética de adhesión de levaduras a epitelios. Condición de bajo inóculo (Azul, 10^3 levaduras/ml) y de alto inóculo (Tinto, 10^6 levaduras/ml). Experimento por triplicado. * $P < 0.05$ Prueba de Tukey-Kramer Sigma Stat.

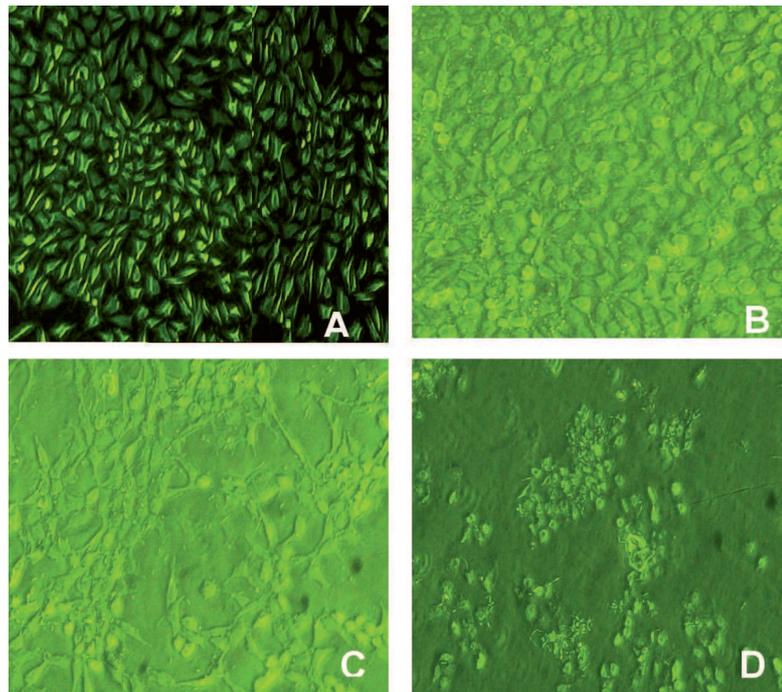


Figura 2. Levaduras de *S. schenckii* interaccionan con epitelios. Se muestra control sin levaduras (A), 5h (B), 24h (C) y 48h (D) de interacción con las levaduras.

Alteraciones del epitelio durante la interacción con levaduras S. schenckii.

La figura 2 muestra las alteraciones en los epitelios después de la interacción con las levaduras a las 5h (B), 24h (C) y 48h (D) de interacción. Es evidente el daño a la monocapa

epitelial por el hongo, comparado con el epitelio control (A) sin levaduras. Las alteraciones más severas se presentan a las 24 y 48h ya que se pierde la integridad de la monocapa. Particularmente a las 48h se observa efecto citopático y diferenciación del hongo de levadura a micelio (Figura 2D).

Daño del citoesqueleto de la célula epitelial por la interacción de levaduras

Durante la interacción de las levaduras con el epitelio se afecta las fibrillas de microtúbulos, (figura 3B, C y D) de manera tiempo dependiente.

Normalmente, el epitelio muestra un arreglo fibrilar uniforme intracitoplasmático que da la morfología celular (figura 3A), este arreglo se va alterando y en consecuencia, se pierde los contactos celulares y la morfología como se muestra en la figura 3 (B, C y D).

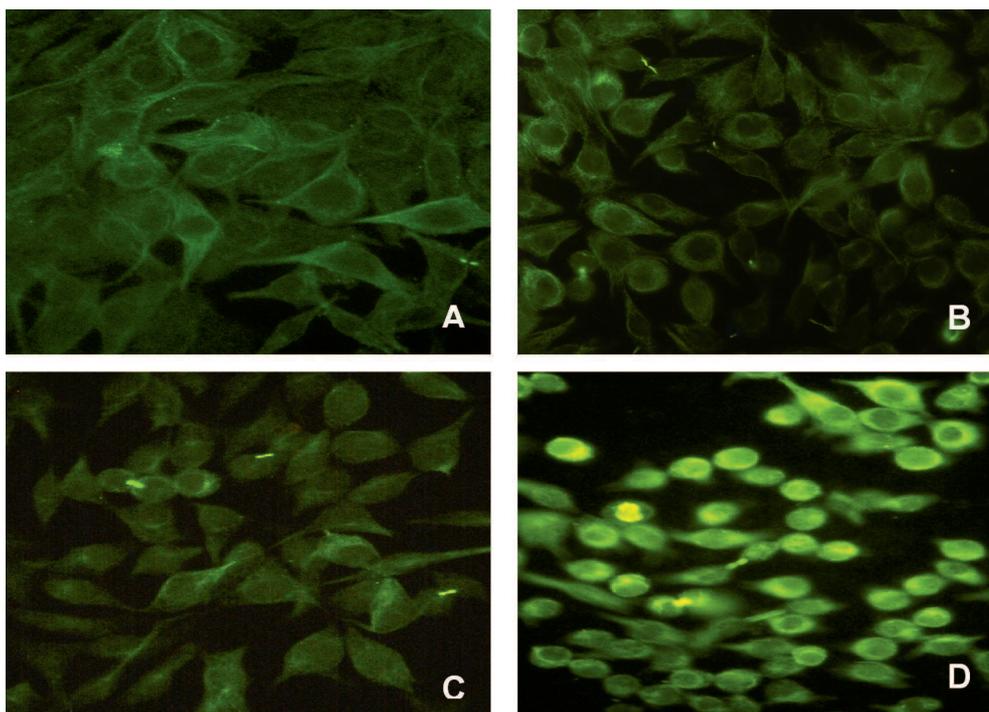


Figura 3. Distribución de microtúbulos en epitelios durante interacción con levaduras de *S. schenckii*. Epitelios: A) control sin levaduras, B) 5h; C) 12h y D) 24h de interacción con *S. schenckii*.

DISCUSIÓN

La adhesión del patógeno es un prerequisite importante para la colonización y posterior diseminación hacia los tejidos hospederos. Con el objeto de conocer más sobre la patobiología de la esporotricosis, en este trabajo se analizó la interacción de las levaduras de *S. schenckii* con epitelios. En este sentido, los resultados de las cinéticas de interacción muestran claramente que la adhesión es dependiente del tiempo de interacción y del inóculo del patógeno. Otro aspecto de nuestro estudio mostró que la interacción del patógeno afecta la integridad y polaridad del epitelio, consecuentemente, las uniones intercelulares se alteran y existen cambios morfológicos. En todo lo anterior

participa el citoesqueleto. Por ello, al analizar la red de microtúbulos se observó que durante la interacción existen cambios en el citoesqueleto. Resultados similares han sido reportados durante la interacción de tejidos con otros patógenos (Mendes - Giannini *et al.*, 2000). El daño sobre la monocapa epitelial por la interacción de las levaduras de *S. schenckii*, es posible que esté mediado por acción de proteasas tales como Serín y Aspartil proteasas, fosfatasa ácida, colagenasa y gelatinasas, las cuales poseen funciones clave en la patogenicidad del *S. schenckii* (Lima y Lopes Bezerra 1997). Particularmente, nuestros resultados muestran que al interaccionar las levaduras con los epitelios se afecta la red microtubular indicando daño sobre del epitelio, esto está en relación con la habilidad que posee

S. schenckii para invadir y dañar a los tejidos. El siguiente enfoque a este proyecto es elucidar las moléculas implicadas en la adhesión epitelio – parásito.

CONCLUSIONES

A partir de la interacción de las levaduras de *S. schenckii* a los epitelios se concluye que la

adhesión de las levaduras a las células blancas, promueve alteración morfológica, pérdida del arreglo de la red microtubular del epitelio, sugiriendo que la adhesión del patógeno al epitelio conlleva a una invasión y daño en los tejidos. El conocer los procesos que gobiernan la adhesión fúngica pueden servir como base para el desarrollo de nuevas drogas antifúngicas dirigidas en contra de receptores esenciales.

BIBLIOGRAFÍA

- DALLE, F, *et al.*, β -1-2 and α -1-2-Linked Oligomannosides Mediate Adherence of *Candida albicans* Blastospores to Human Enterocytes In Vitro. *Infect. Immun* 71, 7061-7068, 2003.
- IBRAHIM, AS, *et al.*, Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* In vitro: Role of the capsule. *Infect. Immun.* 63, 4368-4374, 1995.
- LIMA, OC. y LOPES BEZERRA, LM. Identification of Concanavalin A- binding antigen of the cell surface of *Sporothrix schenckii*. *J Med Vet Mycol* 35, 167-172, 1997.
- MENDES-GIANNINI, J.S., *et al.*, Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38, 113-123, 2000.
- MEZA, I, *et al.*, Occluding Junctions in MDCK Cells: Modulation of Transepithelial Permeability by the Cytoskeleton. *J Cell Biochem* 18,407-421, 1982.
- RODRÍGUEZ – DEL VALLE N, ROSARIO, M. y TORRES-BLASINI, G. Effects of pH, temperature, and aeration and carbon source on the development of the mycelia or yeast forms of *Sporothrix schenckii* form conidia. *Mycopathol* 82, 83-88, 1983.
- TACHIBANA, T., *et al.*, *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Med Mycol* 39, 295-298, 2001.