



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS  
DE POSGRADO

EFECTO DE DIFERENTES AMINOACIDOS SOBRE EL  
DIMORFISMO DE Candida albicans

TESIS

PROFESIONAL

que para obtener el título de  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a :

LOURDES IVETH MACIAS RODRIGUEZ

S. LUIS POTOSÍ, S.L.P.

1992



T

QR245

M3

c.1



1080076440



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS  
DE POSGRADO**

**EFEECTO DE DIFERENTES AMINOACIDOS SOBRE EL  
DIMORFISMO DE Candida albicans**

**TESIS PROFESIONAL**

que para obtener el título de

**QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

p r e s e n t a :

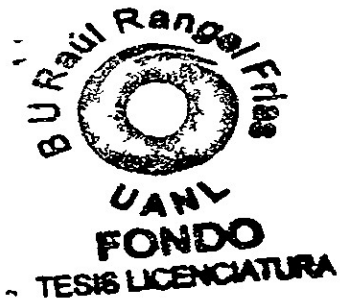
**LOURDES IVETH MACIAS RODRIGUEZ**

**SAN LUIS POTOSI, S.L.P.**

1992



X  
Q 2245  
M3



## DEDICATORIAS

A Dios Nuestro Señor

Por permitirme lograr todos mis anhelos y sobre todo por proporcionarme la familia que tengo.

A Mi Padrino

A Quien le hubiera dado mi vida con tal de que estuviera conmigo estos momentos.

A mi Asesor

Quien tiene y tendrá todo mi respeto y admiración.

A Maru

Quien a pesar de todo, supo ser una verdadera amiga.

A Victor

Quien apareció en un momento muy importante de mi vida y de mi carrera.

A ti Mamá

Solo quiero decirte, que al fin se acabaron nuestros desvelos y malpasadas, porque quiero que sepas que este logro no es sólo mío, ya que tú has sido mi principal apoyo y gracias a ti me encuentro yo aquí.



A mi Papá

Porque te quiero mucho y ojalá hubieras podido compartir conmigo esta etapa de mi vida.

A mis Hermanos

Por estar siempre conmigo y porque aparte de mis padres son lo más valioso que poseo en la vida.

A mi Abuelita Tina

Que con sus oraciones, su apoyo y sus buenos consejos, siempre me impulsó a seguir adelante.

A mi Abuelita Meche

Quien siempre ha deseado lo mejor para mi.

A mis tíos Candy y Arturo

Quienes han sido como unos segundos padres para mi  
pues siempre han visto por mi y por mi familia y  
les doy gracias por acompañarme en este día tan  
especial

A mis primas Ady y Nezly

Quienes han compartido conmigo todas las etapas de  
mi vida.

A Carito

Quien siempre ha sido muy linda conmigo.

## INDICE GENERAL

Indice de Tablas.....	I
Indice de fotos.....	II
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Generalidades.....	5
Fisiología de la asimilación de Amonio.....	6
Antecedentes.....	7
Objetivo General.....	9
Material y Equipo.....	10
Metodología.....	12
Preparación de Medios de Cultivo.....	13
Resultados.....	15
Discusión.....	30
Conclusiones.....	31
Bibliografía.....	32

## INDICE DE TABLAS

TABLA No.1.- Aminoácidos utilizados.....	11
TABLA No.2.- Porcentaje de producción..... de tubo germinal en presencia de Zinc.	17
TABLA No.3.- Porcentaje de producción..... de tubo germinal en ausencia de Zinc.	18
TABLA No.4.- Comparación de producción..... de tubo germinal (en Medio de Vogel en presencia y ausencia de Zinc.)	19
TABLA No.5.- Porcentaje real de producción..... de tubo germinal obtenido en presencia de Zinc.	20
TABLA No.6.- Porcentaje real de producción..... de tubo germinal obtenido en ausencia de Zinc.	21

## INDICE DE FOTOS

FOTO No.1.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	22
en presencia de Glutamina (Ausencia de Zinc).	
FOTO No.2.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	23
en presencia de Glutamina (Presencia de Zinc).	
FOTO No.3.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	24
en presencia de Acido aspártico (Ausencia de Zinc).	
FOTO No.4.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	25
en presencia de Acido Glutámico (Ausencia de Zinc).	
FOTO No.5.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	26
en presencia de Valina (Ausencia de Zinc).	
FOTO No.6.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	27
en presencia de Valina (Presencia de Zinc).	
FOTO No.7.- Levaduras de <u>Candida albicans</u> .....	28
crecidas en Caldo YPG.	
FOTO No.8.- Control Negativo.....	29
(Sin aminoácido y ausencia de Zinc).	

## ABREVIATURAS

Alanina	Ala
Valina	Val
Leucina	Leu
Isoleucina	Ile
Fenilalanina	Phe
Triptófano	Trp
Glutamina	Gln
Lisina	Lys
Arginina	Arg
Metionina	Met
Glicina	Gly
Serina	Ser
Treonina	Thr
Cisteína	Cys
Tirosina	Tyr
Asparagina	Asn
Acido aspártico	Asp
Acido glutámico	Glu
Histidina	His

## RESUMEN

Candida albicans es un hongo dimórfico que posee formas de reproducción asexual (blastosporas), y tiene la capacidad de crecer como levadura ó como micelio verdadero gracias a diferentes estímulos ambientales que inducen o inhiben la transición morfológica levadura-micelio. Esta transición ha sido objeto de bastantes estudios, aunque, parece ser que ambas formas son importantes en su patogenicidad. Así mismo, los tubos germinales son el inicio de la transición levadura-micelio, por lo que se han descrito una gran variedad de factores para la inducción del tubo germinal, entre los que se encuentran: el pH, la temperatura de incubación, el suero humano y algunos nutrientes del medio de cultivo, como son: biotina y aminoácidos no sulfurados (como fuente de Nitrógeno); así como la glucosa, la N-acetilglucosamina y el ácido butírico en medio de cultivo con sales. También se ha reportado que la adición de Zinc en pequeñas cantidades inhibe la formación de tubo germinal, mediante un bloqueo en diferentes etapas del ciclo celular.

Por lo anterior, en este trabajo se analizó el efecto de diferentes aminoácidos como única fuente de Nitrógeno sobre la inducción de tubo germinal a partir de levaduras de C. albicans en fase semilogarítmica. Se analizaron 19 aminoácidos, de los cuales la Glutamina, Treonina y Tirosina fueron los que estimularon en mayor proporción la formación del tubo germinal (60%, 31.21% y 9.69%, valor real de miceliación, respectivamente, en presencia de Zinc). Además, 10 de los 19 aminoácidos probados no indujeron en forma completa la miceliación sin importar la influencia del Zinc; tales aminoácidos fueron: Acido aspártico, Acido glutámico, Lisina, Glicina, Histidina, Alanina, Metionina, Fenilalanina y Asparagina, mientras que los aminoácidos restantes tuvieron efectos moderados y variables en la inducción del tubo germinal. Así mismo, la presencia de Zinc en el medio de cultivo inhibe ligeramente la formación del tubo germinal, confirmando otros reportes de la literatura (Bedell y Soll, 1979; Szaniszlao y cols. 1985).

## INTRODUCCION

Los hongos, se desarrollan en dos morfologías básicas, como levadura o como mohos. "Levadura" se refiere al crecimiento unicelular de los hongos, mientras que el término "Moho" se refiere a la producción de colonias multicelulares filamentosas; sin embargo, algunas especies de hongos son dimórficas, capaces de crecer como levadura o micelio, en diferentes condiciones ambientales (cambios de temperatura, pH, algunas fuentes de Nitrógeno, y ciertas condiciones de stress) (Dennetierre, B., 1991; Kulkarni, R. K., 1980), o bien, existen otros que requieren la interrelación de varios factores; y de acuerdo con esto, los hongos son subdivididos dentro de tres grupos en base a la morfología que presentan *in vivo* (Szanislaio, 1985; Velasco Castrejón, 1980).

1er. GRUPO: Consiste en cuatro hongos que exhiben predominantemente el desarrollo levaduriforme *in vivo* y presentan la fase micelial bajo condiciones saprofíticas. Sin embargo, no todos los micólogos médicos, los consideran dimórficos. Estos hongos son:

- a) Blastomyces dermatitidis.
- b) Histoplasma capsulatum.
- c) Paracoccidioides brasiliensis.
- d) Sporothrix schenkii..

2o. GRUPO: Cada una de estas especies, puede inducir *in vitro* la transición levadura→micelio, y puede presentar ambas fases *in vivo*. Dentro de éste se encuentran:

- a) Candida albicans.
- b) Exophiala werneckii.
- c) Wangiella dermatitidis.

3er. GRUPO: Los pertenecientes a este grupo, desarrollan muy bien la fase micelial, pero no la fase levaduriforme *in vivo* ó *in vitro*. A este grupo pertenecen entre otras:

- a) Chrysosporium sp.
- b) Phialophora verrucosa.

Algunos hongos patógenos son dimórficos, (Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, el hongo oportunista Candida albicans y el contaminante ambiental Mucor rouxii). La capacidad para existir en dos formas diferentes es llamada dimorfismo, y este tipo de diferenciación es reversible y no es una parte esencial del ciclo de vida del organismo.



Una característica importante de la morfogénesis en algunos hongos dimórficos, es que la inducción de una fase conduce a la forma encontrada en el tejido infectado (transición de fase saprofítica a fase parasitaria), y esta capacidad para colonizar el tejido del huesped puede estar íntimamente relacionada con la transición morfológica del hongo, (Maresca y Kobayashi, 1989).

Así mismo, la capacidad de Candida albicans para existir como levadura o como micelio *in vivo*, ha sido objeto de diversos estudios, pues muchos autores asocian una u otra forma con la patogenicidad del hongo (Ghannoum y Abu-Elteen, 1991). La mayoría de reportes indican una relación causal entre la formación del micelio y la infección, pues se ha encontrado que la hifa penetra en el tejido infectado más fácilmente que la levadura, las cuales son más difíciles de ingerir y de formar acúmulos en dicho tejido (Odds, 1988), y también se observan más frecuentemente formas filamentosas o miceliales del hongo en raspados y biopsias de las lesiones. Sin embargo, también hay evidencias que sugieren que la levadura es más virulenta que la forma micelial, pues mutantes que no germinan *in vivo* no producen la infección en animales de experimentación (Ghannoum y Abu-Elteen, 1991). Así mismo Shepherd (1985), usando mutantes morfológicas de Candida albicans reportó que tanto la levadura como el micelio son capaces de invadir tejidos provocando una infección sistémica que produce la muerte de los ratones. Por lo que parece ser, que ambas formas son importantes en la patogenicidad de este hongo.

Los tubos germinales son el inicio de la transición levadura→micelio (Chiew, Y.Y., 1980); por lo que se han descrito una gran variedad de factores para la inducción del tubo germinal, entre los que se encuentran el pH (Soll, 1975), temperatura de incubación (Maresca y Kobayashi, 1989), el suero humano (Rippon, 1990), y algunos nutrientes en medios de cultivo, entre los que se encuentran : fuentes de Nitrógeno, principalmente Biotina y Aminoácidos no sulfurados, así como la Glucosa (Odds, 1988), la N-acetilglucosamina (Braun y Calderone 1978) y el ácido butírico en medio con sales (Szaniszlao y cols., 1985).

Por otro lado, se ha reportado que la adición de Zinc en pequeñas cantidades inhibe la transición levadura-micelio de Candida albicans, pues las células aparentemente son bloqueadas en diferentes etapas del ciclo de gemación, dando como resultado un aumento en la concentración final de levaduras y un bloqueo del ciclo celular.

Se ha sugerido, que el Zinc actúa como un quelante, ó que en Candida albicans, hay dos vías metabólicas de producción de micelio una dependiente de Zinc y otra independiente del mismo metal, aunque esta hipótesis no es muy aceptada y se requieren muchos estudios para comprobarla o rechazarla (Bedell y Soll, 1985). Debido al gran número de funciones claves realizadas por el Zinc en los mecanismos de defensa en algunas enfermedades infecciosas, es difícil asegurar el efecto directo de éste sobre el crecimiento y la conversión dimórfica de Candida albicans (Beisel, 1977).

Por lo anterior, existe la posibilidad de inducir el dimorfismo a través del uso de diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno, ya que Candida albicans requiere de medios mínimos a base de sales para dar la fase micelial; es decir, pertenece al grupo de nutrientes dependientes (Bonifaz 1990; Eddy, A.A., 1980).

## GENERALIDADES

La candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *Candida albicans*. Estos microorganismos son miembros de la flora normal de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal; haciendo que se considere una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre, su nivel de profundidad ó sistematización no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor predisponente con el que se asocie (personas diabéticas, pacientes inmunodeprimidos, alcoholismo y embarazo, etc.) (Bonifaz 1990; Neely, A.N., 1988).

Las especies de *Candida* producen levaduras elipsoidales ó esféricas, con brotes de 3 a 6 micrómetros (um) de tamaño. Normalmente, se forman múltiples brotes y pseudohifas en un medio deficiente en sustratos rápidamente metabolizables (Por ejemplo, Agar Harina de maíz), (Bonifaz, 1990).

Es importante mencionar que dichas especies crecen en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: Agar Sabouraud, Gelosa sangre, Infusión de cerebro, corazón y Extracto de levadura, pero no pueden diferenciarse sobre la base del aspecto de sus colonias. En 24-48 horas, producen colonias sobreelevadas de coloración cremosa y opacas de aproximadamente 1-2 mm. de diámetro.

Por otro lado, la *Candida albicans* es un hongo dimórfico que posee formas de reproducción asexual (blastosporas), y tiene la particularidad de crecer como levadura ó como micelio verdadero gracias a estímulos ambientales que desencadenan ó bloquean la conversión *in vitro* de levaduras a hifas (Evans, E.G., 1975; Nolthing, S., 1982; Pugh, D., 1979).

Un inductor muy estudiado es el suero normal. Luego de 90 minutos en suero a 37°C, la *Candida albicans* comienza a formar hifas. Esta reacción se manifiesta por la aparición de un tubo germinal, un apéndice elongado que crece hacia afuera, y tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la célula levaduriforme (Rippon, 1990; Shepherd, M.G., 1979).

Sin embargo, como la pared celular del hongo es una barrera de protección, y es responsable de la morfología, se ha estudiado desde diferentes enfoques la participación y/o modificaciones que sufre ésta durante la transición morfológica (Cabib, Bowers, Sburlati, 1988; Cellini, Calderone 1977; Elorza, Murgi, Sentandreu, 1985; Gander, 1974; Orlean, 1982; Ruiz-Herrera, 1991).

## FISIOLOGIA DE LA ASIMILACION DE AMONIO EN MICROORGANISMOS

La asimilación de amonio, es un proceso mediante el cual el amonio proviene del medio de cultivo o del catabolismo de compuestos nitrogenados, es incorporado a esqueletos de carbono. Como resultado de la asimilación del amonio se sintetizan ácido glutámico y glutamina, los cuales además del amonio, pueden ser utilizados como fuentes de nitrógeno y constituyen los principales donadores de nitrógeno en muchas reacciones biosintéticas.

Los estudios iniciales sobre la asimilación del amonio que se realizaron en Klebsiella aerogenes, definieron dos vías de asimilación de este compuesto. En la primera vía la Glutamato deshidrogenasa (GDH) asimila principalmente al amonio cuando éste se encuentra en altas concentraciones en el medio de cultivo y la Glutamino sintetasa (GS) participa en la síntesis de Glutamina. Después de estos estudios, la hipótesis sobre estas vías se ha generalizado a otras enterobacterias como Escherichia coli y Salmonella typhimurium (Leija, 1985). En Saccharomyces cerevisiae y Candida albicans (Holmes, 1989) se ha reportado la vía GS-GOGAT (Glutámico oxalacético glutamin amino transferasa) a concentraciones limitadas de Amonio. En Penicillium chrysogenum se ha descrito actividad de GS, la cual participa eficientemente en la asimilación de altas y bajas concentraciones de Amonio. Así mismo, en Neurospora crassa se han descrito dos vías para asimilar el Amonio: la vía catalizada por la GDH-NADP y la GS de alta capacidad que opera en altas concentraciones de Amonio y una subunidad de la GS (alfa) de baja capacidad, pero de alta afinidad que funciona en bajas concentraciones de Amonio (Hernández, 1985).

Así, el Acido glutámico y la Glutamina, son los productos primarios de la asimilación de Amonio, ocupando una posición central en el metabolismo celular, pues son los donadores del grupo Amino para la síntesis de los demás compuestos nitrogenados que la célula requiere para la síntesis de macromoléculas (Eddy, 1980).

## ANTECEDENTES

El término Dimorfismo ha sido empleado por muchos años en Micología Médica, para describir la dualidad fenotípica de forma, que presentan los diferentes hongos en la fase saprofítica y parasitaria (Ainsworth, 1955; Howard, 1962; Mariat, 1964). Frecuentemente este término es usado de tal manera que implique que la infección es acompañada por una transición del hongo patógeno desde su forma saprofítica hacia una morfología parasitaria. Sin embargo, el empleo de este término es variado; ya que aparte de ser utilizado en Micología General para describir interconversiones controladas por factores ambientales de una levadura a una forma micelial; es usado también constantemente para describir cualquier transformación del estado vegetativo por un hongo. En general, un hongo podrá ser dimórfico, pero no siempre patógeno.

Se considera dimórfico a aquel hongo que sufre por lo menos dos distintas fases transitorias, ya sea *in vivo* ó *in vitro*. El hecho de utilizar indefinidamente este término, nos permite considerar que la transición levadura-micelio está asociada a diversos organismos que han sido ampliamente estudiados, y se han tomado como modelo desde hongos oportunistas como Mucor rouxii (Ruiz Herrera, 1985) y Candida albicans (Odds, 1979; Soll, 1985) hasta dimórficos patógenos como Histoplasma capsulatum (Maresca y Koba Yashi, 1989), Paracoccidioides brasiliensis (San Blas, 1989), Coccidioides immitis (Cole and Sun, 1985), Exophiala werneckii (Harris, 1985). Desafortunadamente, las distinciones entre la fase de crecimiento de la célula y la fase de transición son frecuentemente ignoradas; sin embargo, las mayores diferencias en el metabolismo se han asociado con un crecimiento logarítmico y una fase estacionaria celular (Szanislaw, 1985).

Por otro lado, la capacidad de C. albicans para desarrollar las dos formas *in vivo*, ha llevado a tres líneas principales de investigación involucradas en el estudio del dimorfismo:

a) El estudio del metabolismo intermediario. Este ha permitido comprender el papel que juegan el oxígeno, el CO<sub>2</sub> (Dióxido de Carbono) y la fuente de carbono en el dimorfismo. Es posible que el CO<sub>2</sub> y las hexosas actúen elevando los niveles de AMP<sub>c</sub> (Adenosín monofosfato-cíclico) (Niimi y cols. 1980) y reprimiendo la síntesis ó la actividad de los productos no identificados hasta la fecha.

b) El enfoque de Biología Molecular. Estos estudios han permitido determinar los cambios que ocurren en la síntesis de macromoléculas durante la transición dimórfica (Aumento en la velocidad de replicación del DNA, y su metilación; así como, un aumento en la velocidad de síntesis de las Poliaminas, las cuales son aminoácidos que no constituyen el esqueleto de las Proteínas, (Ruiz-Herrera, Comunicación personal))

c) En cuanto al estudio de los mecanismos involucrados en la síntesis de la pared celular, se puede mencionar la síntesis de Quitina, Mananas y Glucanas con objeto de obtener antígenos para uso diagnóstico.

Entre otros estudios, existen pocos reportes con respecto al papel de la fuente de nitrógeno sobre el dimorfismo en Candida albicans, pues solo se ha reportado que la transición es inducida en medios sintéticos que contienen Biotina, y aminoácidos no sulfurados, así como la N-acetilglucosamina (Szanislaw y cols. 1985; Sullivan y Shepherd, 1982; Chiew y cols., 1980); mientras que para otros hongos está más estudiado, por ejemplo: T. mentagrophytes, en el cual se ha descrito germinación de microconidias inducida por L-leucina (Hashimoto y cols. 1972), en Mucor rouxii la Leucina, Metionina y Arginina inducen un 100% de formación de tubo germinal, mientras que la Fenilalanina, Isoleucina y Treonina dan índices muy bajos de germinación, (Leija y cols.; 1986; Orłowski, M., 1991.) y en Sporothrix schenckii, la Asparagina induce eficientemente la transición (Arenas López y cols., 1992); así como en Histoplasma capsulatum donde la Cisteína es esencial para la transición morfológica (Kobayashi y cols., 1985).

## OBJETIVO GENERAL

Estudio del efecto de diferentes aminoácidos sobre la formación del tubo germinal en Candida albicans.

## MATERIAL Y EQUIPO

### -MATERIAL BIOLÓGICO:

El material biológico utilizado, fué la fase levaduriforme de Candida albicans obtenida del cepario del laboratorio del Area Biológica del Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.S.L.P.

### -VARIOS:

Micropipetas de 200 y 1000 microlitros (ul)  
Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.  
Vasos de precipitado de 600 y 1000 ml.  
Pipetas de 0.1 y 1 ml.  
Probetas de 100 y 1000 ml.  
Hematocitómetro.

### -EQUIPO:

-Baño de agitación continua  
Yamato  
Constant temperature.  
Shaking bath.  
Model BT-25.

-Microscopio  
Nikon  
Optiphot-2  
Type 104  
(40x)

-Potenciómetro  
pHmeter 120  
Corning.

*NOTA:* Con el fin de evitar al máximo problemas de interferencia con cualquier otro tipo de metales, se emplea en la elaboración de los medios y en el lavado del material agua tridesionizada.



## REACTIVOS

-Solución de HCl 0.1N

-Solución de NaOH 0.1N

-Se emplearon los siguientes aminoácidos (SIGMA), tomando su peso (gr.) en base al Peso Molecular y a la cantidad de medio a utilizar:

TABLA No. 1

	AMINOACIDO	P.M. ( g/mol)	CANTIDAD(gr.)
Ala	Alanina	89	0.0445
Val	Valina	117	0.0585
Leu	Leucina	131	0.0655
Ileu	Isoleucina	131	0.0655
Phe	Fenilalanina	165	0.0825
Trp	Triptófano	204	0.102
Gln	Glutamina	146	0.073
Lys	Lisina	146	0.073
Arg	Arginina	174	0.087
Met	Metionina	149	0.0745
Gly	Glicina	75	0.0375
Ser	Serina	105	0.0525
Thr	Treonina	119	0.0595
Cys	Cisteína	121	0.0605
Tyr	Tirosina	181	0.0905
Asn	Asparagina	132	0.066
Asp	Ac. Aspártico	133	0.0665
Glu	Ac. Glutámico	147	0.0735
His	Histidina	155	0.0775

## METODOLOGIA

### TECNICA:

1.- Las levaduras se incubaron en 200 ml. de caldo YPG (Extracto de levadura adicionado de Peptona y Glucosa, en caldo nutritivo) a 37°C, con agitación constante, durante 18 horas para lograr un crecimiento en fase semi-logarítmica (fase del ciclo celular en que las enzimas se encuentran en mayor actividad).

2.- Se tomó una alícuota de 1 ml., la cual se diluyó con solución salina al 0.85% y se contará en un hematocitómetro.

3.- Se inocularon en 50 ml. de Medio Vogel (Con cada aminoácido a probar) 300 000 levaduras/ml. y se incubaron a 37°C con agitación constante durante 3-4 horas, en comparación con un control de pH (").

4.- Se observaron y contaron las formas miceliales del organismo inicialmente levaduriforme en un hematocitómetro, para tomar concentraciones conocidas de las levaduras del hongo.

(") *NOTA*: El matraz control, es el medio de Vogel (Medio Mínimo de sales) un pH óptimo de producción (6.7) de tubo germinal (Bruato, 1991), en el cual se obtiene un crecimiento de 27.5% en promedio y para obtener el % real de miceliación, es necesario restar del valor control (sin ningún aminoácido) el obtenido en los medios con los diferentes aminoácidos analizados.

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

**-MEDIO YPG:** (Extracto de levadura, Peptona y Glucosa)

-Extracto de levadura = 0.3gr.

-Peptona de caseína = 1gr.

-Glucosa = 2gr.

c. b. p. 100 ml.

**-MEDIO VOGEL:**

-Citrato de sodio = 0.3 g.

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 0.83 g.

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 0.033 g.

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  = 0.016 g.

-Biotina = 0.83 ug. (microgramos)

- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  = 0.33 g.

-Reactivo de trazas = 0.1ml

c. b. p. 1000 ml.

*NOTA:* El Nitrato de amonio no fué agregado al medio, para evitar cualquier alteración con los resultados que se pudieran presentar debido a la presencia del ión amonio.

Se agregó 0.1 ml. de Reactivo de Trazas/lt de medio de Vogel, (que fué preparado por separado) el cual consiste en:

-Acido Cítrico = 5 g.

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 5 g.

-Sulfato de amonio y hierro = 1 g.

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  = 0.25 g.

- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  = 0.05 g.

- $\text{H}_3\text{BO}_3$  anhidro = 0.05 g.

- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  = 0.05 g.

c. b. p. 100 ml.

*NOTA:* El sulfato de amonio y hierro, y el  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Oxido de Molibdeno Amoniaco) no fueron agregados al reactivo debido a las razones expuestas anteriormente.

Es importante hacer notar que para ver la influencia del Zinc sobre la inducción del dimorfismo a partir de los diferentes aminoácidos empleados, se prepararon dos reactivos de trazas, uno conteniendo Zn y otro sin Zn (Ver preparación de medios).

*NOTA:* Después de agregar el Reactivo de Trazas al Medio de Vogel, se le ajusta el pH a 6.7 +/- 0.02 con HCl 0.1N y/o NaOH 0.1N, ya que existen reportes que afirman que el pH es un factor que puede inducir ó reprimir el dimorfismo.

#### **SOLUCION SALINA ESTERIL AL 0.85%**

Se disuelven 0.85 g. de NaCl, en agua destilada. Esterilizar a 1 atm. de presión durante 15 minutos. Guardar en el refrigerador a (4-10°C).

## RESULTADOS

A partir de levaduras de Candida albicans obtenidas en fase semi-logarítmica se inocularon en 50 ml. de Medio de Vogel 300 000 levaduras/ml. con una concentración de 10 mM (milimolar) del aminoácido a probar (TABLA No.1) para determinar el % de inducción de tubo germinal de cada aminoácido. Se probaron 19 aminoácidos, donde los resultados obtenidos fueron restados del valor obtenido en el control, para obtener el valor real de miceliación, dando lo siguiente:

Se pudo observar que 10 de los 19 aminoácidos no indujeron en forma completa la miceliación, sin importar la influencia del Zinc sobre el dimorfismo (TABLA 5 Y 6); tales aminoácidos fueron: Ac. aspártico, Ac. glutámico, Lisina, Glicina, Histidina, Alanina, Metionina, Fenilalanina, Lisina, Asparagina.

Sin embargo, se puede afirmar que la Glutamina tuvo un papel muy importante en la transición levadura-micelio (60 % real de inducción de tubo germinal), ya que a pesar de tomar en cuenta el valor control, el índice de miceliación fué bastante elevado en comparación a los anteriores, el segundo aminoácido que presentó mayor inducción fue la Treonina (31.21% real), (TABLA 5 Y 6). Pero hay que tomar en cuenta que existe un porcentaje entre el 3 y 10% inducidos por otros aminoácidos, el cual no es muy relevante (TABLA 5) y en este caso el pH del medio no influyó de manera gradual en el dimorfismo, además, se observa que el valor obtenido para la Treonina fué del 31.21% (Tabla 5) en presencia de Zinc.

En cambio, cuando no hay Zinc en el medio de cultivo (TABLA 6), se obtuvo mayor porcentaje en los casos que presentaron miceliación en comparación a la Tabla 5; por lo que es importante hacer notar que la ausencia de Zinc puede ser un factor que beneficie la inducción.

Ahora, comparando los valores obtenidos en las Tablas 2 y 3, sin tomar en cuenta el valor control, los resultados fueron los siguientes:

-El Acido Aspártico, el Acido Glutámico y la-Lisina, no favorecieron al dimorfismo, debido tal vez al caracter ácido en caso de Asp. y la Glu.; y al tamaño de la cadena de la Lys., o bien podría ser que no tuviera ningún papel específico en la transición.

Es importante hacer notar que al igual que las tablas 5 y 6, la Glutamina tiene un papel importantísimo en la miceliación, ya que en este caso el valor fué del 100% (TABLA 3) y del 88% respectivamente (TABLA 2), por lo que aquí se manifiesta una ligera inhibición del Zinc en la inducción; pero no hay que descartar a la Treonina, que en ambos casos da un porcentaje mayor del 50%, al igual que la Valina (TABLA 4).

TABLA No. 2

Porcentaje de producción de tubo germinal en presencia de Zinc

AMINOACIDO	
Asp	0%
Glu	0%
Lys	0%
Gly	9.206%
His	13.97%
Ala	16.9%
Met	18.11%
Phe	22.005%
Asn	23.35%
Lys	24.62%
Ileu	28.144%
Ser	30.5%
Arg	30.67%
Trp	32.42%
Leu	35.305%
Val	36.94%
Tyr	37.195%
Thr	58.71%
Gln	88.0%

TABLA No.3

Porcentaje de producción de tubo germinal en ausencia de Zinc.

AMINOACIDO	
Asp	0%
Lys	0%
Glu	0%
His	15.025%
Asn	16.9%
Ala	22.51%
Gly	23.816%
Cys	24.62%
Phe	24.835%
Met	26.40%
Ser	30.5%
Arg	31.67%
Trp	33.075%
Ileu	36.15%
Tyr	44.01%
Val	50.022%
Leu	53.70%
Thr	70.0%
Gln	100%



TABLA No. 4

Comparación de producción de tubo germinal (en medio de Vogel) en presencia y ausencia de Zinc.

AMINOACIDO	CON ZINC (%)	SIN ZINC (%)
Asp	0	0
Lys	0	0
Glu	0	0
Gly	9.2	23.8
His	13.9	15.0
Ala	16.9	22.5
Met	18.1	26.4
Phe	22.0	24.8
Asn	23.3	16.9
Cys	24.6	20.4
Ile	28.1	36.1
Ser	30.5	30.5
Arg	30.6	31.6
Trp	32.4	33.0
Leu	35.5	53.7
Val	36.9	50.0
Tyr	37.1	44.0
Thr	58.7	70.5
Gln	88.0	100.0

TABLA No. 5

Porcentaje real de producción de tubo germinal obtenido en presencia de Zinc

AMINOACIDO	
Asp	0%
Glu	0%
Lys	0%
Gly	0%
His	0%
Ala	0%
Met	0%
Phe	0%
Asn	0%
Lys	0%
Ileu	0.644%
Ser	3.0%
Arg	3.17%
Trp	4.92%
Leu	7.805%
Val	9.44%
Tyr	9.695%
Thr	31.21%
Gln	60.5%

% OBTENIDO - % DE pH = CANTIDAD REAL DE MICELIACION  
(27.5%)

TABLA No. 6

Porcentaje real de producción de tubo germinal obtenido en ausencia de Zinc.

AMINOACIDO	
Asp	0%
Lys	0%
Glu	0%
His	0%
Asn	0%
Ala	0%
Gly	0%
Cys	0%
Phe	0%
Met	0%
Ser	3.0%
Arg	4.17%
Trp	5.575%
Ileu	8.65%
Tyr	16.51%
Val	22.522%
Leu	26.2%
Thr	42.5%
Gln	72.5%

% OBTENIDO - % pH = CANTIDAD REAL DE MICELIACION  
(27.5%)

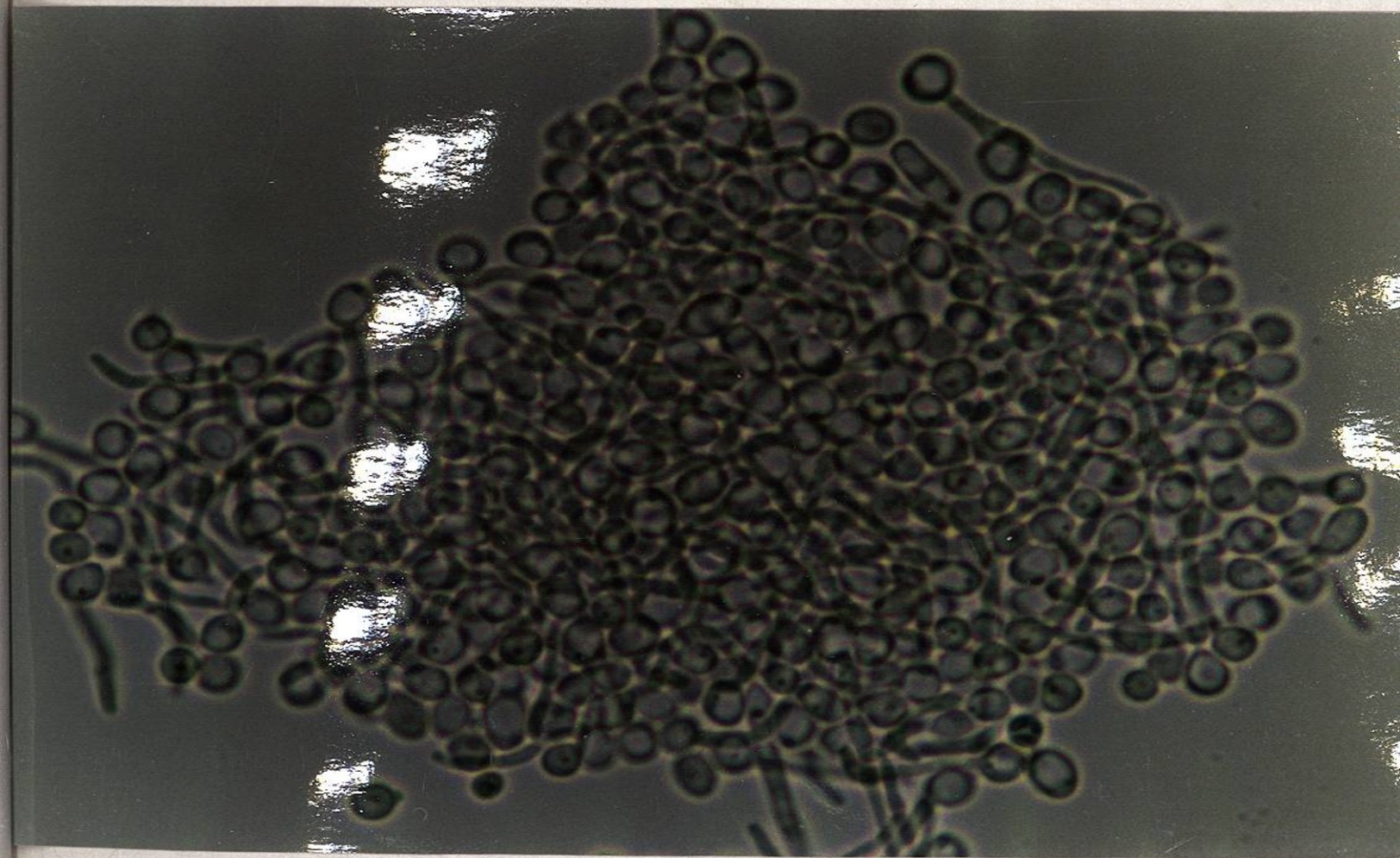
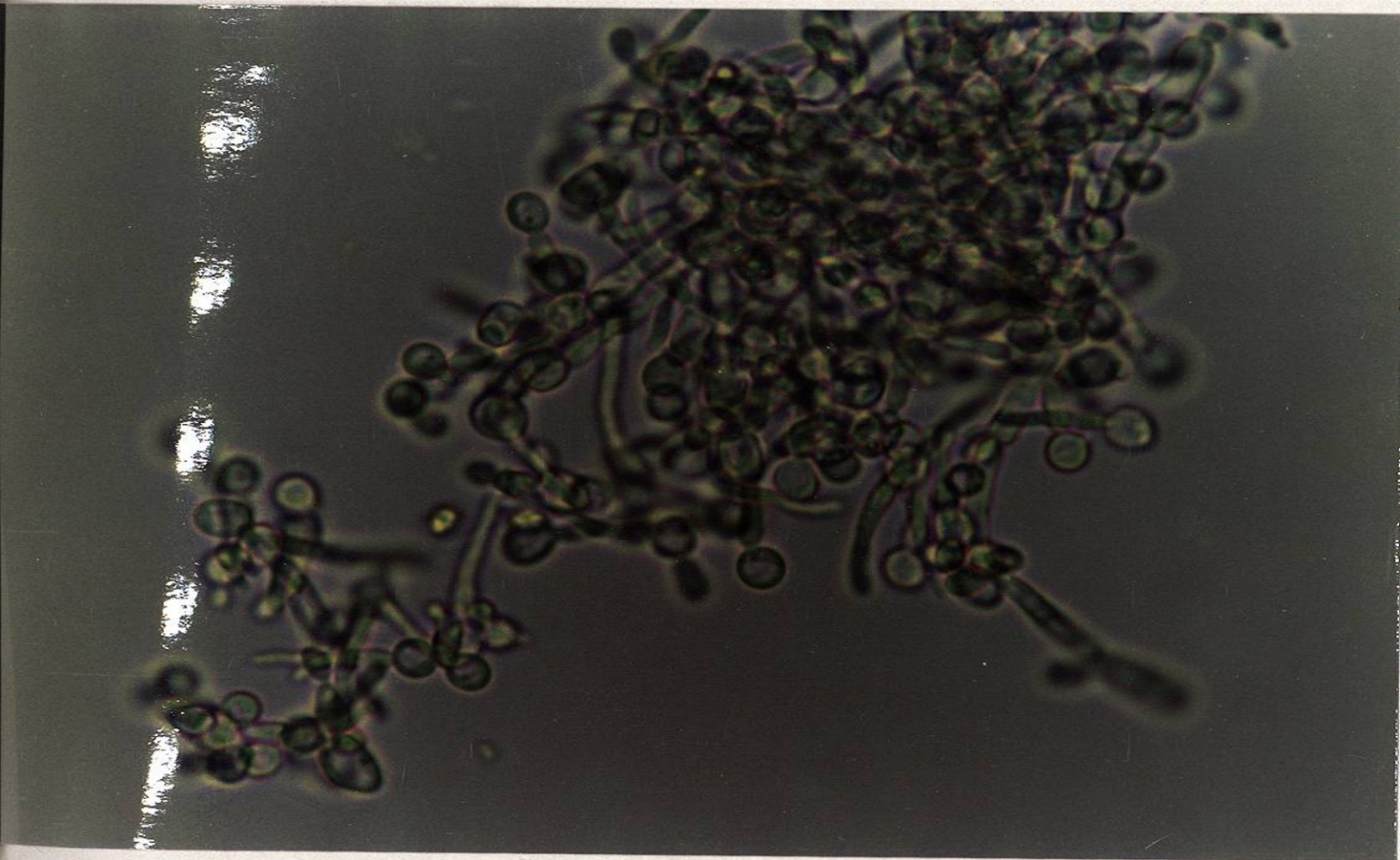


FOTO No. 1 : Levaduras de C. albicans en presencia de Glutamina (Medio de Vogel en ausencia de Zinc).



**FOTO No.2** : Levaduras de C.albicans en presencia de Glutamina (Medio de Vogel en presencia de Zinc)

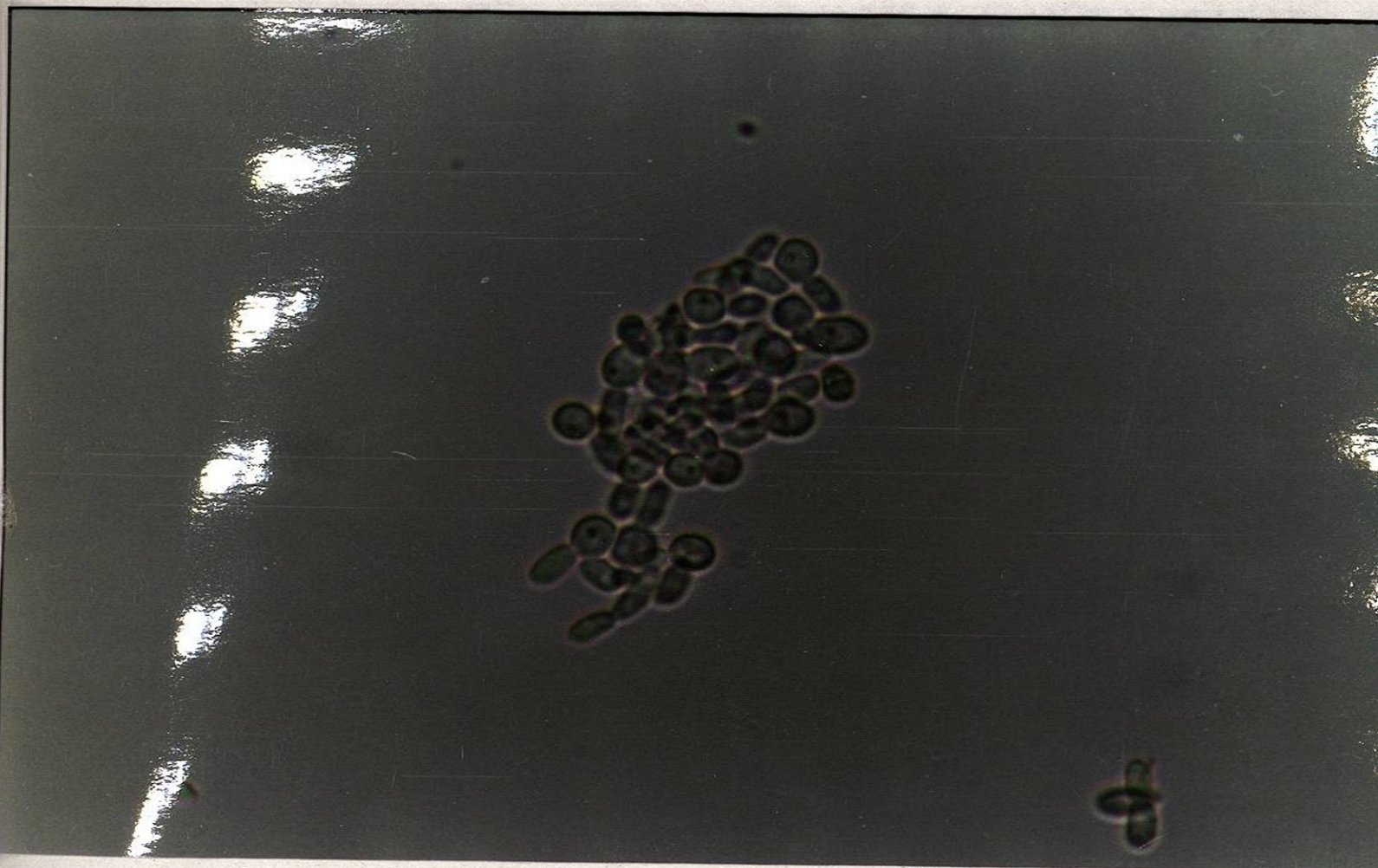


FOTO No.3 : Levaduras de C.albicans en presencia de Ac. aspártico  
(Medio de Vogel en ausencia de Zinc)

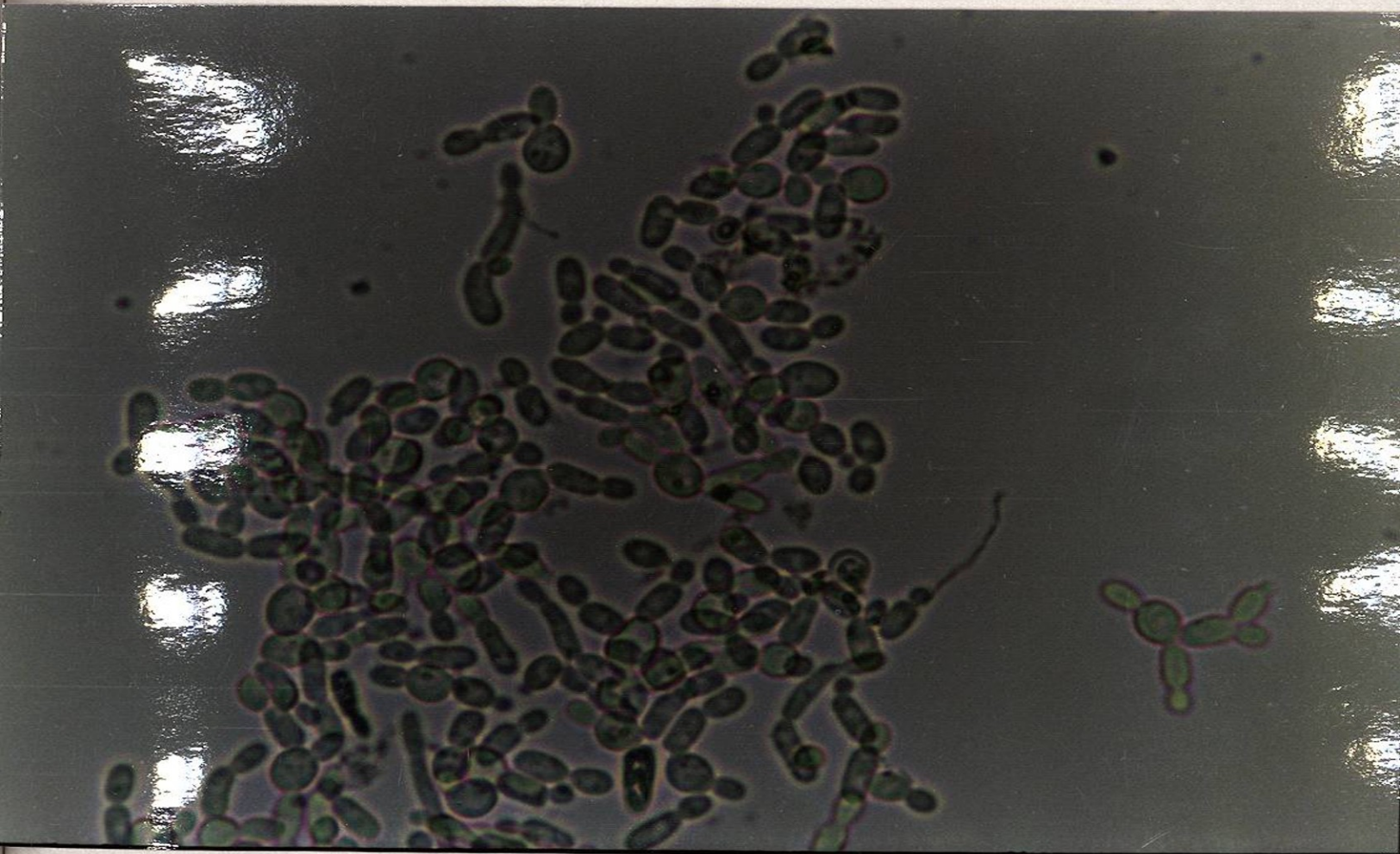


FOTO No.4 : Levaduras de C.albicans en presencia de Ac. glutámico  
(Medio de Vogel en ausencia de Zinc)

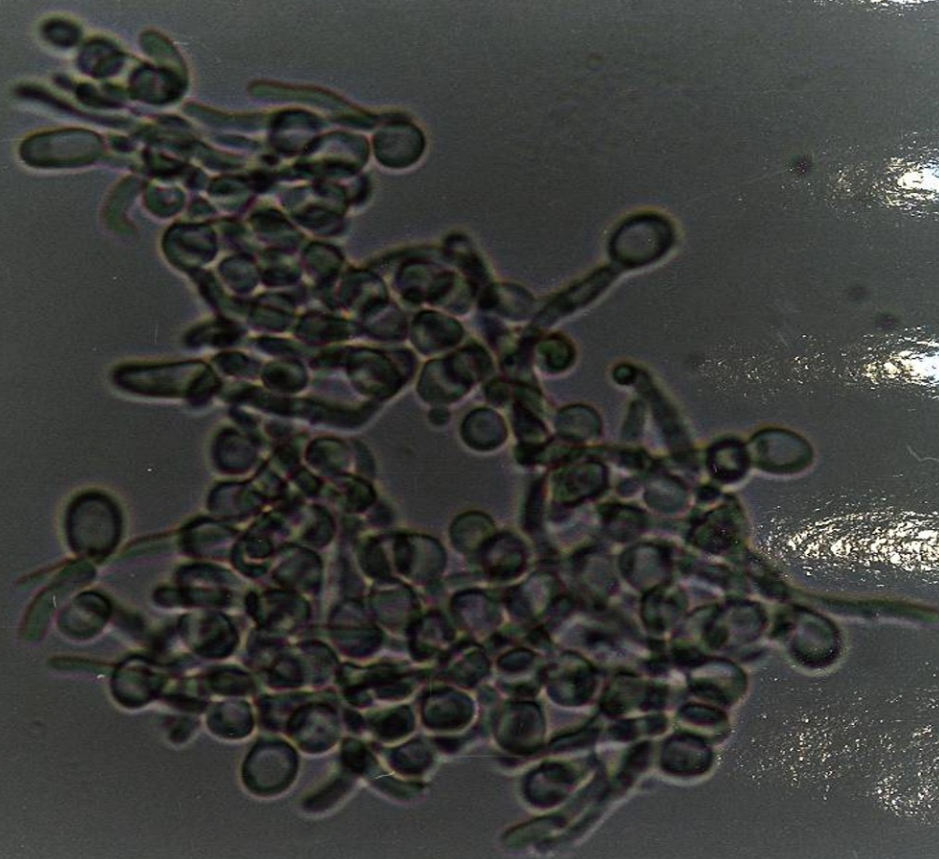


FOTO No.5 : Levaduras de C.albicans en presencia de Valina (Medio de Vogel en ausencia de Zinc)



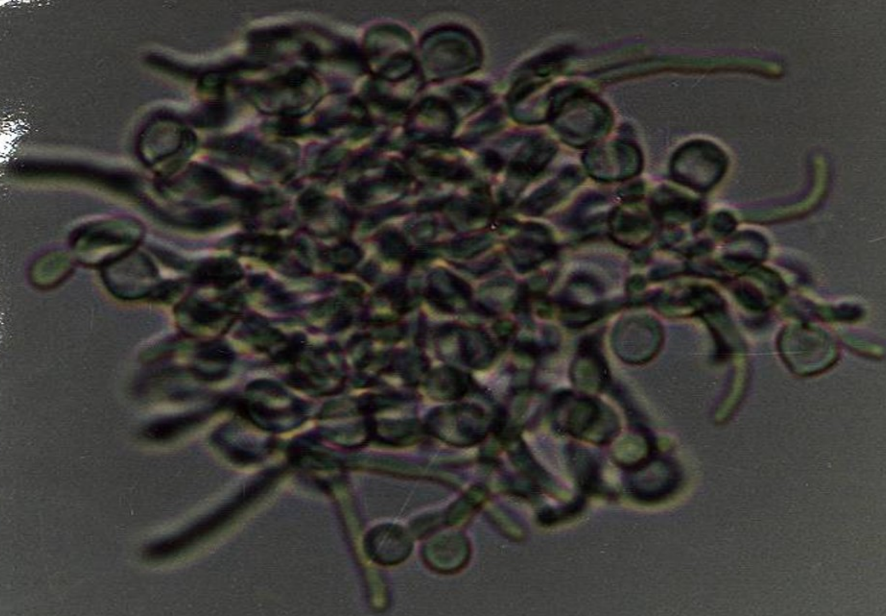


FOTO No.6 : Levaduras de C.albicans en presencia de Valina (Medio de Vogel en presencia de Zinc)

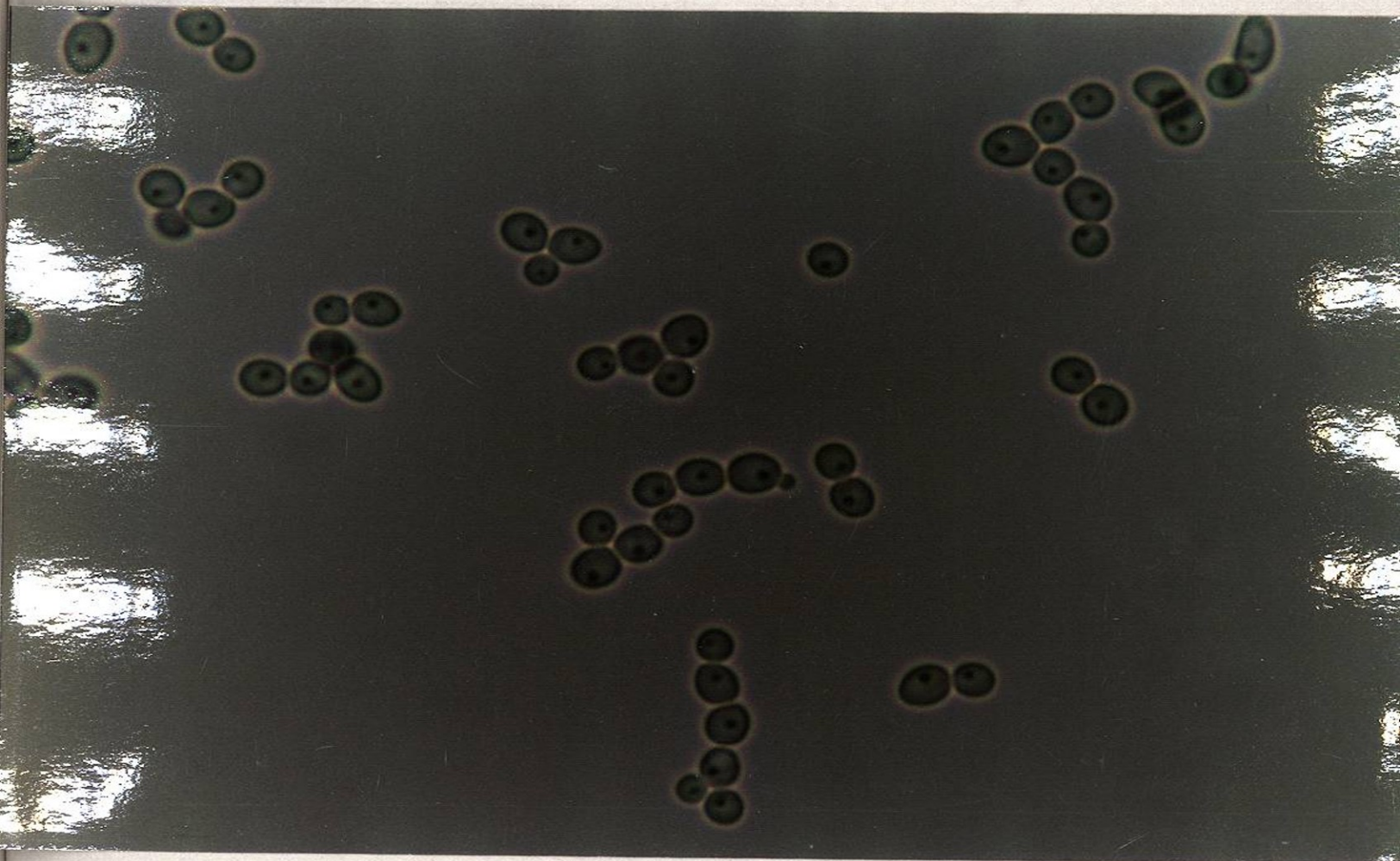


FOTO No. 5

Control Negativo

FOTO No.7 : Levaduras de C.albicans crecidas en Caldo YPG.

## DISCUSION

En este trabajo se encontró que en un medio control de Vogel sin aminoácidos se forma un micelio dependiente del zinc. Este resultado confirma otros reportes en la literatura, por ejemplo, Sullivan y Soper (1956) en *M. rouxii*, Armas López y colaboradores (1972) en *M. rouxii*, Sullivan y Soper (1956) en *L. gibbosa*, y Armas López y colaboradores (1972) en *L. penicilliformis* y Meroff y cols. (1971) en *L. penicilliformis*.

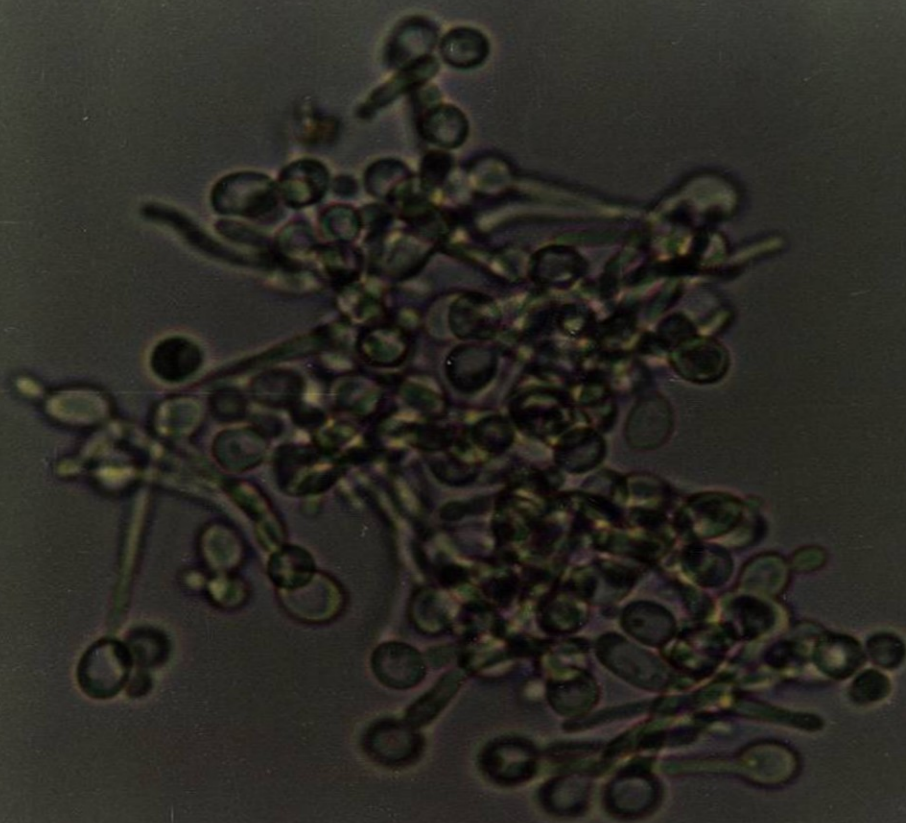


FOTO No.8 : Control Negativo (Medio de Vogel sin aminoácido y en ausencia de Zinc).

## DISCUSION

En este trabajo se encontró que en un medio mínimo de Vogel, se puede formar micelio dependiendo del aminoácido usado como fuente de Nitrógeno, lo que confirma otros reportes en la literatura, por ejemplo, Leija y cols. (1986) en M. rouxii, Arenas López y cols. (1992) en Sporothrix schenckii, Sullivan y Sepherd (1982), en C. albicans, Hashimoto y cols. (1972) en T. mentagrophytes y Medoff y cols. (1987) en Blastomyces dermatitidis y Paracoccidioides brasiliensis.

De los 19 aminoácidos analizados se indujo el promedio de miceliación del 15% (Histidina), hasta un 100% (Glutamina), los aminoácidos que indujeron más eficazmente el tubo germinal fueron la Glutamina (100%), Treonina (70%), Leucina (53.7%) y Valina (50%), (que representa el 72.5%, 42.5%, 26.2% y 22.5%, una vez restado el % de micelio formado con el control del pH). Estos datos difieren un poco con lo reportado por Leija y cols., 1986 en M. rouxii, donde encuentran un 100% de miceliación para Leucina, un 11% para Valina, un 73% para Glutamina y un 14% para Treonina y son similares a la germinación inducida de microconidias de T. mentagrophytes por Leucina (60%) reportado por Hashimoto y cols., en 1972, y difieren con lo reportado por Arenas López y cols., 1992 para S. schenckii donde el principal inductor de la transición conidio levadura fué la Asparagina, y con lo encontrado por Kobayashi y cols., en 1985 para H. capsulatum donde la Cisteína es esencial para la transición morfológica.

Con respecto a los demás aminoácidos probados, los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por Leija y cols., 1986 para M. rouxii.

Por otro lado, la menor inducción de tubo germinal en presencia de Zinc confirman lo reportado por Bedell y Soll en 1979 para Candida albicans inducida por el cambio de temperatura, además, debido al gran número de funciones del Zinc en los mecanismos de defensa del huésped (Beisel, 1977), es difícil saber los efectos directos del Zinc sobre el crecimiento y conversión fenotípica de las levaduras dimórficas *in vivo*, pues la reducción de la infección por C. albicans puede deberse a un efecto directo de una alta concentración de Zinc en el sitio de la infección ó a una estimulación de los mecanismos de defensa del huésped en pacientes con candidosis (Bedell y Soll, 1979; Beisel, 1977; Campo y Mc Donald, 1976).

## CONCLUSIONES

1.- De los 19 aminoácidos probados sin tomar en cuenta el control del pH, 16 indujeron la formación del tubo germinal, y tomando en cuenta el control del pH, solo 9 indujeron la formación del tubo germinal en mayor o menor grado.

2.- Los aminoácidos que fueron más efectivos en la inducción fueron: Glutamina, Treonina y Leucina respectivamente.

3.- Los aminoácidos que no tuvieron ningún efecto sobre la formación del tubo germinal fueron: Asparagina, Lisina y Ac. Glutámico.

4.- El Zinc en trazas inhibió ligeramente la inducción de tubo germinal en todos los aminoácidos probados.

5.- Se comprobó el efecto que tienen las diferentes fuentes de Nitrógeno en la inducción del tubo germinal reportado en otros sistemas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ainsworth, G. C., 1955. Pathogenicity of fungi in man and animals, in: Mechanisms of Microbial pathogenicity, J.W. Howie and A.J. O'Hea eds. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 242-262.
- 2.- Anderson, J., Soll D. R. 1986. Differences in actin localization during bud and hypha formation in the yeast C. albicans. J. of General Microbiology. Vol 132. pp. 2035-2047.
- 3.- Arenas López, G., et al, 1982. Influencia de la fuente de Nitrógeno en la transición conidio/levadura de S. schenckii. Memorias del primer Congreso Nacional de Micología. Guatemala, Guatemala.
- 4.- Bartnicki-García S. 1984. Chitosomes and the origin of chitin microfibrils. Department of plant Pathology, University of California. pp 475-481.
- 5.-Bedell, G. W. and Soll, D. R., 1979. Effects of low concentrations of Zinc on the growth and Dimorphism of C. albicans: evidence for Zinc-Resistant and Sensitive Pathways for Mycelium Formation. Infect and Immun. vol 26, No. 1. pp 348-354.
- 6.- Beisel, W. R. 1977. Zinc metabolism in infection. pp. 155-176. in: G. J. Brewer and A. S. Prasal (ed.), Zinc metabolism current aspects in health and disease. Alan R. Liss, INC, NY.
- 7.- Bonifaz, A., 1990. Micología Médica, ed. Mendez Cervantes. pp. 9-17, 227-301.
- 8.-Bruatto, M., et al. 1991. A new minimal synthetic medium for germ-tube production in C.albicans . Mycopathology, vol. 116, pp. 159-163.
- 9.-Cabib, E., Bowers, F. and Sburlati, D. 1988. Fungal cell walls synthesis: The construction of a biological structure . Microbiological Science, vol. 5, No.12, pp. 370-375.
- 10.- Campo, A. G. and Mc Donald, C. J. 1976. Treatment of acrodermatitis enterophatica with Zinc Sulphate. Arch.Dermatol. vol. 112, pp. 687-689.
- 11.-Cellini, B. P., Calderone. R. A. 1977. Chitin synthesis in C. albicans: comparison of yeast and hyphas forms. Department of Microbiology, Georgetown University, Schools of Medicine and Dentistry. pp. 1472-1477.
- 12.- Chiew, Y. Y. et al. 1980. Regulation of chitin synthesis during germ-tube formation, in C.albicans. Arch. Microbiol. vol. 125. pp. 97-104.

- 13.- Dennetierre, B. et al. 1991. Temperature, phospholipid variations and dimorphism in Fonsecae pedrosoi, Cladosporium carrioni, and S.schenckii. J. Mycol. Med. vol.I, pp. 302-305.
- 14.- Eddy, A. A. Some aspects of aminoacid transport in yeast 1980, Microorganisms and nitrogen sources . Edited by J. W. Rayne, Jonh Wiley and Sons Ltd. pp. 35-61.
- 15.- Elorza, V. et al. 1985. Dimorphism in C.albicans: Contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. J. of Gen. Microbiology. vol. 131. pp. 2209-2216.
- 16.- Evans, E. G. et al. 1975. Optimum conditions for initiation of filamentation in C.albicans. Can. J. Microbiol. vol. 21. pp 338-342.
- 17.- Evans, Z. A. 1980. Tissue responses to the blastospores and hypha of C. albicans in the mouse. J. Med. Microbiol. vol. 14. pp. 307-319.
- 18.- Gander, J. E. 1974. Fungal cell walls glycoproteins and peptido-polysaccharides. Department of Biochemistry, College of Biological Science, University of Minnesota. pp. 103-116.
- 19.- Ghannoum, M. A. and Abu-Elteen, K. H. 1990. Pathogenicity determinants of Candida. Mycoses. vol. 33. No.6. pp. 265-282.
- 20.- Greenfield, R. A. 1992. Host defense system interactions with Candida: A review article. J. of Med. and Veterinary Mycology. vol. 30. pp. 89-104.
- 21.- Gross, J. D. et al. 1983. Intracellular pH and the control of cell differentiation in Dictyostelium discoideum. Nature , vol. 303. pp. 244-245.
- 22.- Harris, J. L. 1985. Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for human. Plemun Press, New York and London. Chapter No. 8. pp. 197-204.
- 23.- Hashimoto, T. et al. 1972. Characterization of L-leucine-induced germination of T. mentagrophytes microconidia. J. Bact. vol. No. 2, pp. 967-976.
- 24.- Hazen, K. C. et al. 1990. Partial biochemical characterization of cell surface Hidrophobicity and hidrophilicity of C.albicans. Infection and Immunity. vol. 58. No. 11, pp. 3469-3476.
- 25.- Hernandez, G. 1984. La asimilación de amonio en Neurospora crassa. Caminos de la Biología fundamental. ed. UNAM. pp. 437-448.
- 26.- Howard, D. H. 1962. The morphogenesis of the parasitic form of the dimorphic fungi. Mycopathol. Mycol.. Appl. 18: 127-139.

- 27.- Kulkarni, R. K. et al. 1980. Variation in cell surface feature of C.albicans with respect to carbon sources. *Sabouraudia* vol. 18. pp. 255-260.
- 28.- Leija, A. et al. 1986. Effect of L-aminoacids on M. rouxii dimorphism. *J. of Bacteriology*. vol. 168. No. 2. pp. 843-850.
- 29.- Maresca, B. and Kobayashi, G. S. 1989. Dimorphism in H.capsulatum :a model for study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiological Reviews*. vol. 53. No. 2. pp. 186-209.
- 30.- Mariat, F. 1964. Saprophytic and parasitic morphology of pathogenic fungi, in: *Microbial behavior, in vivo and in vitro*. H. Smith ed. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 85-111.
- 31.- Mattia, E. et al. 1982. Induction of germ-tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in C.albicans: uptake of inducer and germanitive response. *J. of Bacteriology*. vol. 152. No. 2. pp. 555-562.
- 32.- Mc Gillviray, A. M. and Gaw Neil, A. R. 1987. The transhyphal electrical current of Neurospora crassa is carried principally by protons. *J. of Gen. Microbiol.* vol. 133. pp. 2875-2881.
- 33.- Medeff, G. et al. 1987. Mycelial to yeast-phase transition of the dimorphic fungi Blastomyces dermatitidis and P.brasiliensis. *J. Bacteriology*. vol. 169. No.9. pp. 4055-4060.
- 34.- Neely, A. N., et al. 1988. Characterization of Candida isolates from pediatric burns patients. *J. of Clinical Microbiology*. vol.26. No. 9. pp.1645-1649.
- 35.- Niimi, M. et al. 1980. Changes in cycle nucleotide levels and dimorphic transition in C.albicans. *J. Bacteriol.* 142: 1010-1014.
- 36.- Nolting, S. et al. 1982. Effect of insulin on germ tube and mycelial formation of C.albicans. *Mykosen*. vol. 25. No. 1. pp. 36-41.
- 37.- Odds, F. C. et al. 1983. Analysis of C.albicans phenotypes from differents geographical and anatomical sources . *J. of Clinical Microbiology*. vol. 18. No. 4. pp. 849-857.
- 38.- Odds, F. C. 1988. Candida and Candidosis: A review and bibliography. UK: Bailliere-Tindall.
- 39.- Orłowski, M. 1991. Mucor dimorphism. *Microbiological Reviews*. vol. 55. No. 2. pp 234-258.
- 40.- Pugh, D., Cawson, R. A. 1979. The induction of germ tubes in C.albicans by an intrinsic factor. *Microbios* .vol. 24. pp. 73-79.



- 41.- Rippon, J. W. 1988. Tratado de Micología Médica. ed. Interamericana. Tercera edición. pp. 574-615.
- 42.- Ruiz-Herrera, J. 1991. Biosynthesis of  $\beta$ -glucans in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*. vol. 60. pp. 73-81.
- 43.- Ruiz-Herrera, J. 1985. Dimorphism in Mucor species with emphasis on M.rouxii and M.bacilliformis in : Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for human. Paul J. Szaniszlao Editor. Plenum Press. NY and London. pp. 361-380.
- 44.- San-blas, G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationships. A Review. *Mycopathologia* .vol. 79. pp. 159-184.
- 45.- Schreurs Wilhelmus, J. A.; Harold Franklin M. 1988. Transcellular proton current in *Achlya bisexualis* hyphae: Relationship to, polarized growth. *Cell Biology*. vol 85. pp. 1534-1538.
- 46.- Shepherd M. G., et al 1979. Germ tube induction in C. albicans. *Can. J. Microbiol.* vol 26. pp. 21-26.
- 47.- Simonetti, N. and Strippoli, V. 1973. Pathogenicity of the Y form as compared to M form in experimentally induced C. albicans. infections. *Mycopathol. Mycol. Appl.* vol 51. pp. 19-28.
- 48.- Soll, D. 1985. C. albicans in: Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for human. Paul J. Szaniszlao Editor. Plenum Press, New York and London. pp. 167-190.
- 49.- Sullivan, P. A. and Shepherd, M. G. 1982. Gratuitous induction by N-acetylmannosamine of germ tube formation and enzymes for N-acetylglucosamine utilization in C. albicans. *J. of Bacteriology*. vol. 151. No. 3. pp. 1118- 1122.
- 50.- Szaniszlao, P. J., et al. 1985. Dimorphism: Morphological and Biochemical aspects. Plenum Press, New York and London. pp. 323, 348-360.
- 51.- Szaniszlao, P. J. and Harris, J. L. 1985. Fungal Dimorphism. With Emphasis on fungi pathogenic for Humans. Plenum Press, New York and London pp. 3-11, 167-190.

*Arista 270, C.P.78000  
San Luis Potosi, SLP,*