

BIOLOGIA DEL PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Imelda Campo-Aasen*, Carolina Castillo**, Félix J. Tapia**

Laboratorio de Histoquímica*, Biología Molecular**, Instituto Nacional de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Se hace el estudio de la biología del Paracoccidioides brasiliensis utilizando dos técnicas modernas: la citoquímica y la ultraestructura. Para el estudio y separación de la fase levaduriforme del hongo se utiliza la técnica de la sonicación de suspensiones de cultivos durante 20 segundos. -

De esta manera se investigan diferentes reacciones enzimáticas las cuales reconocen e identifican a los organelos del hongo a nivel ultraestructural. Se reconoce así su pared celular; la membrana plasmática; el retículo-endoplasmático y el sistema de Golgi -antes no identificado- la vacuola central; las mitocondrias y los lisosomas.

Se concluye que la biología del Paracoccidioides brasiliensis es muy compleja poseyendo un sistema de túbulos, vesículas y sacos aplanados interconectados que forman compartimientos cerrados estructuralmente continuos, muy activos enzimáticamente y cuyas funciones no se alejan o son muy similares a las de la biología celular características de las células vivas y eucarióticas.

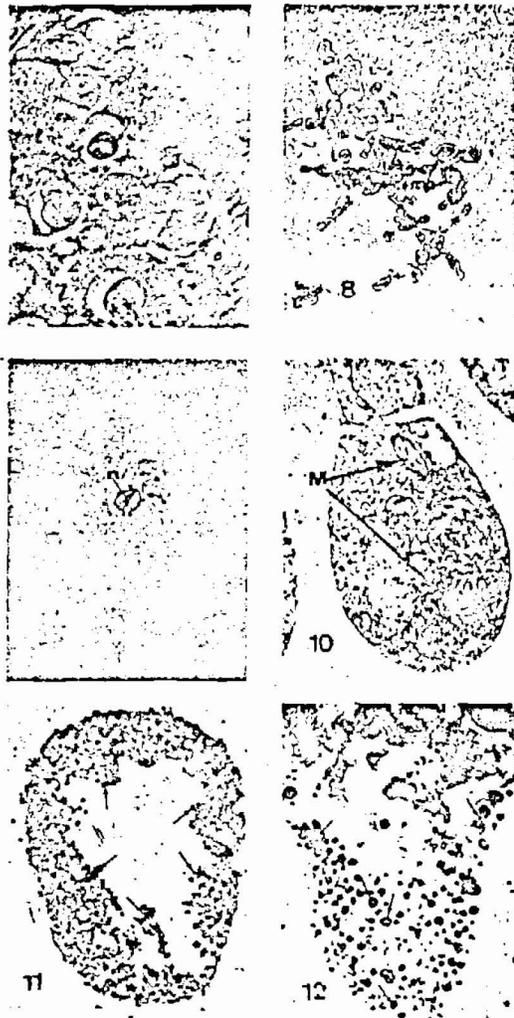
Para el estudio de la biología del *Paracoccidioides brasiliensis*, hemos utilizado dos disciplinas modernas las cuales se han aplicado a la investigación de la biología celular. Estas son la Citoquímica, la cual combinada a la Ultraestructura, nos permiten reconocer organelos, interpretar su morfología y fisiología y llegar a conclusiones con respecto a su actividad metabólica.

Las enzimas son las entidades moleculares empleadas por la célula para producir diversos tipos de transformaciones energéticas necesarias para mantener las actividades vitales. Así se ha llegado a la conclusión, de que las mitocondrias son el centro de la oxidación-reducción y que los lisosomas son el centro defensivo hidrolítico celular y que así los diferentes organelos existentes en la célula están abocados a una función determinada. Otro enfoque importante de la citoquímica proviene de la posibilidad de estudiar reacciones enzimáticas a nivel subcelular, determinándose su localización y su funcionamiento y darles la interpretación adecuada.

El *P. brasiliensis* es un hongo que tiene factor simple de dimorfismo a la temperatura, haciéndose micelial a la temperatura ambiente y levaduriforme a 37° C. Se sabe que la fase levaduriforme es la forma parasitaria y por lo tanto es ésta a la cual nos vamos a referir y hemos estudiado mejor.

Para el estudio del *Paracoccidioides brasiliensis* en su fase levaduriforme hemos utilizado hongos obtenidos de suspensiones sonicadas (ref. 8) originarios de pacientes con paracoccidioidomicosis, cepa N° 6688 del Laboratorio de Micología del INSNADERM.

En la Fig. 1 observamos un esquema general del *P. brasiliensis* en fase levaduriforme en el cual vemos su pared celular, la membrana plasmática la cual produce invagina-



- Fig. 1 *P. brasiliensis*. Esquema general de la fase levaduriforme observada al microscopio electrónico.
- Fig. 2 *P. brasiliensis*. 5.000X. Se observa la pared celular (PC), la membrana plasmática (MP) y la vacuola del hongo (VC).
- Fig. 3 *P. brasiliensis*. Se observa la pared celular de la forma levaduriforme del hongo positiva a la A.T.P. y señalada por flechas. 175X.
- Fig. 4 *P. brasiliensis*. Alpha-glucan fosforilasa. Usando el sustrato glucosa-1-fosfato. Se observa exacerbación de la actividad en la pared celular de la fase levaduriforme del hongo. 5.000 X.
- Fig. 5 *P. brasiliensis*. Reacción antígeno-anticuerpo E/2-anti E/2 en la vacuola central (vc) 5.000 X.
- Fig. 6 *P. brasiliensis*. Reacción antígeno-anticuerpo E/2-anti E/2 en la membrana plasmática (mp) 5.000 X.

ciones o plasmalomasomas; las mitocondrias, lisosomas, vesículas, la vacuola central y su núcleo o nucleóide constituido por moléculas de A.D.N. y el cual tiene toda la información del hongo.

Carbonell fue el primero que estudió en nuestro medio la morfología del *P. brasiliensis*, relacionó su plasmalomasoma a los mesosomas de las bacterias (Ref. 5) y aplicó la citoquímica al estudio de este hongo al buscar los polisacáridos de su fase levaduriforme en cultivos (Ref. 6)

Veamos en la realidad del microscopio electrónico al *Paracoccidioides brasiliensis* y a un aumento de 6.000 X. Para la fijación se puede utilizar el permanganato de potasio el cual destruye el citoplasma y otras estructuras, pero conserva las membranas internas y la fijación formalina-aldehídica la cual preserva ribosomas y otras estructuras; para este estudio se usó la última fijación

Cuando les presento observaciones sólo al microscopio de luz, esto significa que la reacción enzimática al precipitar no deja producto electrodensito y por lo tanto no hay metodología apropiada por el momento.

Observando al hongo desde su parte externa hacia adentro y siguiendo el esquema anterior, vemos que el *P. brasiliensis* es un hongo redondeado u oval (Fig. 2), el cual crece por esporas e hifas y que se reproduce por gemación múltiple (Ref. 7). Posee una pared celular (pc) constituida por una mezcla de componentes fibrilares y amorfos o sea lípidos, quitina, celulosa, proteínas, mananos y alpha y beta-glucanos. La pared celular de la fase levaduriforme del hongo puede ponerse en evidencia por diferentes enzimas tales como la A.T.P. asa (Fig. 3 flecha); y podemos también evidenciar la exacerbación de su actividad empleando la enzima alfa-glucan fosforilasa y su sustrato glucosa-fosfato (Fig. 4).

La membrana plasmática que da origen a los lomasomas -sede de la división del hongo- se puede poner en evidencia sobre todo por su actividad inmunológica. El antígeno E/2 específico del *P. brasiliensis* al ponerse en contacto con el suero anti-E/2 marcado con peroxidasa se manifiesta en la membrana plasmática.

La presencia del antígeno E/2 se ha podido establecer buscando al antisuero monovalente anti-E/2 en conejos y conjugado a la peroxidasa (Ref. 9). Luego este antisuero al ponerse en contacto con células levaduriformes, observamos la reacción antígeno-anticuerpo en la vacuola central (Fig. 5), en vesículas (Golgi) y luego se establece en la membrana plasmática (mp) (Fig. 6) y sale al exterior (Ref. 3).

La membrana plasmática (mp) del *P. brasiliensis* también puede visualizarse con la peroxidada endógena (Fig. 7) y con la A.T.P. asa (Fig. 8). En el protoplasma del hongo podemos observar a la vacuola central la cual es el centro del metabolismo del hongo y el cual difiere poco del de otros organismos. Allí se genera A.T.P. para proveer energía para reacciones de síntesis, para proveer intermediarios en la glicólisis, en la síntesis de quitina, en el metabolismo de carbohidratos.

El protoplasma del hongo constituido por la matriz citoplasmática contiene el núcleo o nucleóide (n) el cual se pone de manifiesto por la presencia de A.D.N. (Fig. 9) al



- Fig. 7 *P. brasiliensis*. Peroxidasa endógena también visualiza a la membrana plasmática (mp). 225X.
- Fig. 8 *P. brasiliensis*. La. A.T. P. asa también puede visualizar a la membrana plasmática (mp) 175X.
- Fig. 9 *P. brasiliensis*. Hongos en cultivo a 37°C. Se observa presencia de A.D.N. o nucleóide(n) por el Faulgen 175X.
- Fig. 10 *P. brasiliensis*. Fase levaduriforme. Se observan mitocondrias (M) demostradas por la dehidrogenasa succínica 5.000X.
- Fig. 11 *P. brasiliensis*. Tiaminopirofosfatasa. Se demuestra la presencia del sistema del Golgi a los 6 días de crecimiento. El depósito enzimático en las vesículas del Golgi está señalado por flechas. 5.000X.
- Fig. 12 *P. brasiliensis*. Tiaminopirofosfatasa. Golgi demostrado a los 9 días de crecimiento. 5.000X.

microscopio de luz. El citoplasma del hongo contiene mitocondrias (m) que son sede de los procesos oxidativos y las cuales se manifiestan por la enzima dehidrogenasa succínica (Fig. 10)

La actividad del retículo-endoplasma (re) y del aparato de Golgi (G) ha sido posible visualizar utilizando a la enzima tiaminopirofosfatasa, la que ha venido usándose por investigadores en el esclarecimiento de problemas relacionados con el sistema de Golgi y hoy en día se considera como marcador de este sistema u organelo. Hasta el momento se creía que el *P. brasiliensis* no tenía sistema de Golgi o no había sido establecido como tal, ya que éste no se había visualizado con los elementos de estudio normales pero con la citoquímica hemos podido observar un activo sistema de Golgi que prácticamente es observable por toda la superficie del hongo, empezando por depósito fino a los 3 días de crecimiento para luego manifestarse grueso y abundante a los 6 y 9 días de crecimiento del hongo en las vésiculas de Golgi (Fig. 11 y 12) (flechas) (Ref. 7).

El metabolismo intrínseco del *P. brasiliensis* se manifiesta también por otras enzimas como las fosfatasas tanto ácida como alcalina. La fosfatasa ácida demuestra su actividad en las estructuras membranosas del hongo y en sus lisosomas. Vemos al microscopio de luz a la fosfatasa ácida de Barka y Anderson (Fig 13 flechas) y la fosfatasa ácida de Gomori también en las estructuras membranosas del hongo y en sus lisosomas (Fig 14) (Ref. 14) (Ref. 2).

Con la fosfatasa alcalina la actividad enzimática se manifiesta en la membrana plasmática (mp), en las vesículas del citoplasma (v) (Fig. 15) y en las esporas del hongo (Fig. 16 flechas).

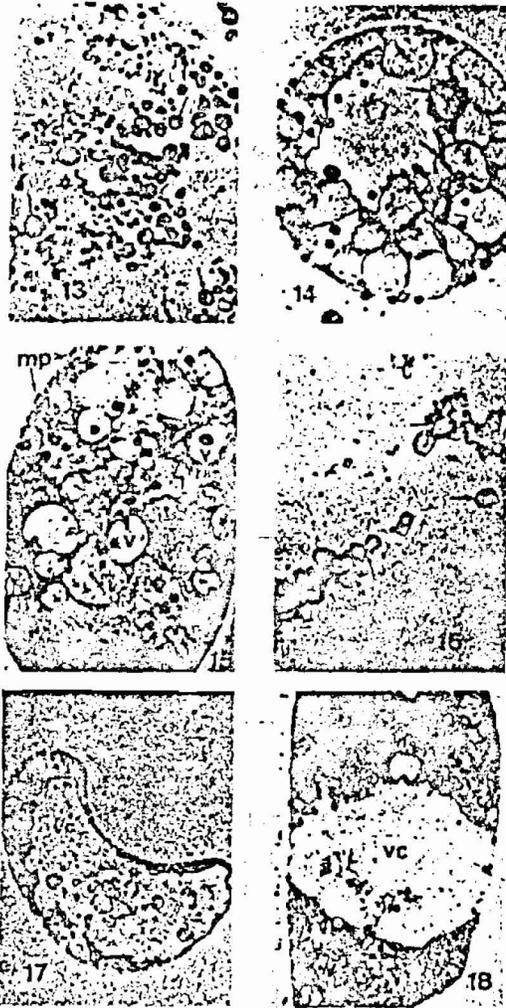
Las esterasas tan extendidas en la biología celular han sido estudiadas con el 5-bromo-4-chloro-indoxyl acetato que se manifiesta al microscopio electrónico todo en la vacuola central (vc) (Ref. 4) y en sus vesículas (v) (Fig. 17 y 18).

En conclusión, la biología del *P. brasiliensis* es muy compleja. Su citoplasma es atravesado por un sistema de túbulos, vesículas y sacos aplanados, revestidos por membranas, existiendo un sistema vacuolar citoplasmático interconectado que forma compartimientos cerrados estructuralmente continuos, muy activos enzimáticamente y cuyas funciones no se alejan o son muy similares a las de la biología celular característica de las células eucarióticas.

SUMMARY

The biology of *Paracoccidioides brasiliensis* was studied using two modern techniques: *cytochemistry* and *ultrastructure*. To study and separate the yeast form phase of the fungus we used a technique which involves sonicating suspension cultures during 20 seconds.

We studies various enzymatic reactions which recognize and identify organelles in the fungus at an ultrastructural level. With this technique we can recognize the cell-wall, plasma membrane, endoplasmic reticulum and the Golgi system - not identified previously - the central vacuole, mitochondrias and lisozomes.



- g. 13 *P. brasiliensis*. Fosfatasa ácida de Barka y Anderson. Actividad en el citoplasma del hongo (flechas) 175X.
- g. 14 *P. brasiliensis*. Fosfatasa ácida de Gomori, en las estructuras membranosas del hongo y en sus lisosomas. 5.000X.
- g. 15 y 16 *P. brasiliensis*. Fosfatasa alcalina, la actividad enzimática se observa en la membrana plasmática (mp) en las vesículas (v) 5.000X y en blastosporas (Fig. 16) 175X.
- g. 17 *P. brasiliensis*. Con el sustrato 5-bromo-4-chloro indoxyl se observa actividad esterásica en la vacuola central (vc) y en vesículas (v). 5.000X.
- g. 18 *P. brasiliensis*. Con el mismo sustrato la actividad esterásica demostrada a nivel de vacuola central (VC) y de vesículas (v) 5.000X.

We conclude that the biology of *Paracoccidioides brasiliensis* is very complex with an interconnected system of tubules, vesicles and flattened sacs which forms closed compartments structurally continuous very active enzymatically and whose functions are not far or are very similar to those of characteristic cell biology of live and eukaryotic cells.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se hizo posible gracias a la colaboración técnica de Zulcma Cova y los fondos necesarios para su realización provienen del Proyecto SI-1162 del CONICIT

BIBLIOGRAFIA

1. CAMPO-AASEN, I.; CABRAL, N. and YARZABAL, L. Subcellular localization of antigen E/2 of *Paracoccidioides brasiliensis* an immunoenzymatic electron microscopy study. *Sabouraudia* 18, 167-171, 1980.
2. CAMPO-AASEN, I. and YARZABAL, L. Acid phosphatase observed in the intramembranous system of the yeast-like phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 74, 87-88, 1981.
3. CAMPO-AASEN, I.; PLANAS GIRON, G. and GOHMAN YAHR, M. A Cytochemical study of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cellular and Molecular Biology* 28 (5), 465-472, 1982.
4. CAMPO-AASEN, I.; CASTILLO, C. and GOHMAN YAHR, M. An electron microscope method using indoxyl derivatives for the study of esterases. *Cellular and Molecular Biology*. (En prensa).
5. CARBONEL, LM. y POLLAK, L. Ultraestructura del *Paracoccidioides brasiliensis* en cultivos de la fase levaduriforme. *Mycopathologia* 19, 184-204, 1963.
6. CARBONELL, L. M.; CASTEJON, H. and POLLAK, L. Cytochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. I. Cytochemistry of cytoplasmic polysaccharides in yeast form cultures with light microscope. *Ann. Hystochem.* 11, 375-384, 1966.
7. DEACON, J. W. Introduction to modern mycolgy. I. Fungi Blackwell Scientific Publications. Vol. 7, 1980.
8. GOHMAN YAHR, M.; PINE, L.; ALBORNOZ, M. B. de.; YARZABAL, L.; GOMEZ, M. H.; SAN MARTIN, B.; OCANTO, A.; MOLINA, T. and CONVIT, J. Studies on plating efficiency and estimation of viability on suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia* 71, 73-83, 1980.
9. YARZABAL, L. A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F. J and ANDRIEU, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia* 15, 79-85, 1977.