

## PURIFICACION DE ANTIGENOS SOMATICOS DEL PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS ESTUDIO PRELIMINAR (\*)

Luis C. BURGOS (1), Luz E. CANO y Angela RESTREPO

### S U M A R I O

Se describen los procedimientos de purificación empleados para la separación de las fracciones antigénicas a partir de un material somático obtenido por rotura de células levaduras completas de *P. brasiliensis*. Dichas fracciones mostraron ser proteínas con pesos moleculares de 66 y 85 Kd; la primera de ellas reaccionó con sueros específicos produciendo una banda de precipitado idéntica a una de las 3 desarrolladas por el antígeno total.

Los resultados señalan la posibilidad de obtener antígenos purificados, químicamente identificados y cuyo uso pudiera, en el futuro, representar ventajas para el diagnóstico serológico de la paracoccidioidomicosis, permitiendo separar, repetidamente, solo aquel componente reconocidamente activo.

### I N T R O D U C C I O N

El empleo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis ha recibido gran impulso en los últimos años, en gran parte debido a la posibilidad de producir antígenos reactivos<sup>3,7,9,10,11,14,15,16,17</sup>. Sin embargo, la gran mayoría de tales antígenos son mezclas complejas que no están caracterizadas plenamente y que presentan comunidad antigénica con otros de los agentes causales de las micosis sistémicas, lo cual lleva a reacciones cruzadas<sup>1,14,16,18</sup>. Igualmente, un buen número de los antígenos empleados son predominantemente de composición polisacárida<sup>3,9</sup>. El presente estudio explora la posibilidad de obtener antígenos reactivos de naturaleza protéica, susceptibles de purificación y caracterización bioquímica, de manera de obtener fracciones mejor caracterizadas y posiblemente, más específicas.

### MATERIALES Y METODOS

#### *P. brasiliensis* y Condiciones de Cultivo

Se utilizó la cepa B339 la cual había demostrado previamente una adecuada antigenicidad<sup>9</sup>. Inicialmente se hicieron 3 pases seriados de la fase levadura a tubos con el medio sintético modificado de McVeigh y Morton (SMM-M) (12), a 36°C y por 5 días hasta obtener un crecimiento suave y abundante; éste sirvió para inocular un Erlenmeyer con 150 ml de SMM-M líquido, el cual se incubaba a la misma temperatura del medio sólido pero con agitación constante a 130 rpm y por 3 días consecutivos. Este era el cultivo madre. Una vez comprobada la ausencia de contaminación por microscopía y con el objeto de obtener una buena cantidad de células, se tomaban alícuotas de 10 ml cada una de las cuales servía para inocular 5 recipientes tipo Erlenmeyer cada uno con 250 ml del SMM-M líquido. Los cultivos anteriores se incubaban en iguales condi-

(\*) Trabajo realizado bajo los auspicios del Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales, Ciencias. Proyecto No. 97145-3-07-82

(1) Dirección actual: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad del Valle, Cali, Colombia  
Laboratorio de Micología, Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Hospital Pablo Uribe, Medellín, Colombia

ciones al cultivo madre pero por un período más prolongado, 10 días. Al cabo de este tiempo, se comprobaba microscópicamente el aspecto de las células y la ausencia de contaminación; en aquellos cultivos con crecimiento óptimo se determinaba la viabilidad de las células levaduriformes por técnicas de fluorescencia<sup>13</sup>. Si la viabilidad era mayor del 85%, se procedía a la preparación del antígeno.

### Preparación del Antígeno Somático

Los cultivos que reunían las anteriores condiciones se mezclaban centrifugándose (600 x g) a 4°C por 30 minutos. Las células levaduras empacadas eran luego lavadas repetidamente (5 veces), con solución tampón de fosfatos pH 7.2. Al término de esta operación, las células eran suspendidas 1:5 en solución tampón fresca, adicionándose, en este momento, un reactivo para impedir la degradación de las proteínas, el fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 10 mM<sup>2</sup>. La rotura de las células se efectuó por medio de ultrasonido (Branson Sonifier, Modelo 185, Danbury, Con. USA). Para evitar el calentamiento que pudiera alterar las proteínas citoplásmicas, se utilizó una micropunta y vasos enfriadores (rosette cooling cells). La rotura del 90% de las células tomaba 30 minutos y se determinaba por observación microscópica. Se tuvo especial precaución en mantener siempre el vaso en baño de hielo. Una vez terminado el proceso de rotura, la suspensión era centrifugada (600 x g., 30 minutos, 4°C) para separar las paredes celulares del material somático soluble. Este último se separaba, se preservaba nuevamente con el PMSF (igual molaridad), liofilizándose en pequeñas porciones (5-10 ml) y conservándose en el congelador (menos 20°C) hasta el momento de su uso.

### Determinación de la Actividad Serológica

La actividad serológica del antígeno total fue verificada por las técnicas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), frente a tres sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis comprobada, de acuerdo a lo anteriormente descrito<sup>8,9,10</sup>. Solo si el antígeno total se revelaba activo y producía bandas de precipitado,

se verificaban los estudios tendientes a la obtención de fracciones.

### Determinación del Contenido Protéico

Se determinó la concentración de proteínas en el antígeno total por el método de LOWRY<sup>6</sup>, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Ensayos preliminares revelaron que solo los antígenos que contenían por lo menos 1.0 mg/ml de proteínas, eran serológicamente activos.

### Fraccionamiento del Antígeno Total

Con el objeto de trabajar directamente con las fracciones que tuvieran actividad serológica definida, el antígeno total se enfrentó inicialmente a un suero reactivo conocido (procedente de un enfermo con paracoccidioidomicosis), en la prueba de IDGA. Como era necesario obtener una cantidad apreciable de precipitado, la reacción se verificó en placas de vidrio de 20 x 30 cms., utilizando un sistema de surcos paralelos y continuos en lugar de pozos individuales. Cada surco recibía 0.5 ml de uno de los 2 reactivos; el sistema se dejó incubar por 48 horas, manteniendo la placa en cámara húmeda a 22°C. Al cabo de este tiempo, formadas ya las bandas de precipitado, la placa era lavada en solución salina al 0.85%, a 4°C por 48 horas, renovando la solución de lavado cada 8-10 horas. Posteriormente, el gel de agar era macerado suavemente en mortero y resuspendido al doble de su volumen en solución tampón de fosfatos pH 7.2, adicionada de 0.2 mM de glicina de manera de romper la unión antígeno-anticuerpo pero sin alterar la reactividad del primero<sup>4</sup>. En esta solución se dejaba por 12 horas a 4°C; pasando luego el macerado por papel de filtro de poro amplio para retener el gel y conseguir en solución las fracciones antigénicas y los anticuerpos, los que se separaban, posteriormente, por filtración en columna.

### Filtración por Columna con Gel

Se utilizó una columna de 40 cms de longitud y 2 cms de diámetro, la cual se empacó con Sephadex G-100 (Farmacia Fine Chemicals) y se calibró previamente con el tampón de corrida. Se aplicó un volumen de 2 ml de la solución obtenida como se indicó anterior-

mente, instalándose el flujo a una velocidad de 0.5 ml/minuto. Se recogieron fracciones de 10.0 ml y se escogieron para estudio posterior aquellas que, al ser examinadas espectrofotométricamente a 280 nm mostraban tener mayor absorción.

### Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

El procedimiento empleado fue el descrito por LAEMLI<sup>5</sup>, el cual utiliza electroforesis discontinua en un gel de poliacrilamida con sulfato dodecil sódico (SDS-PAGE) y utilizando un gradiente de concentración de 5-15%; como tampón de corrida se usó una solución de trisbórico 0.1 M, siendo la intensidad de la corriente de 0.015 mA/cm<sup>2</sup> de gel. Después de la corrida, la cual duraba 4 horas, el gel fue fijado con ácido tricloroacético al 12% por un período de 12 horas. La tinción se efectuó con plata<sup>8</sup> y azul brillante de Coomassie (Eastman Kodak, New York). El SDS-PAGE se efectuó paralelamente para el antígeno total, las varias fracciones obtenidas por filtración en columna y dos tipos de controles, consistentes uno de ellos en soluciones patrones de proteínas con peso molecular conocido. (Marcadores de peso molecular para PAGE-SDS, Sigma Chemical Co.) y el otro, en suero humano total.

### RESULTADOS

La Fig. 1 ilustra el perfil de los componentes separados por filtración en columna. Se observa la presencia de varios picos correspondientes a fracciones proteicas de peso molecular diferente. El conjunto de picos mayores corresponde a las inmunoglobulinas del suero humano mientras que los dos restantes (pesos moleculares de 85 y 66 Kd), representan antígenos del *P. brasiliensis*.

El método de PAGE-SDS (Fig. 2) mostró gran número de bandas con el antígeno total, dos de las cuales ocupaban posiciones idénticas a las producidas por las fracciones previamente purificadas por columna. El suero humano, por su parte, presentó también bandas múltiples, una de las cuales mostraba posición similar a la ocupada por la restante fracción purificada.

Las fracciones antigénicas fueron concentradas por liofilización y reconstituídas al 1:10

de su volumen original para su empleo en la prueba de IDGA. Una de ellas, la correspondiente a 66 Kd, produjo una banda de precipitado nítida frente a sueros controles, procedentes de 3 diferentes pacientes con paracoccidioidomicosis. Esta banda fue idéntica a una de las 3 producidas por el antígeno citoplásmico total.

### DISCUSIÓN

El presente trabajo se acerca a la definición de los antígenos del *P. brasiliensis* en varias formas. Inicialmente, se trata de reemplazar los antígenos metabólicos, empleados frecuentemente en la práctica<sup>7,9,16</sup> por productos derivados de la célula levadura misma. Este cambio pudiera resultar en una mayor reproducibilidad de los antígenos, puesto que se emplean componentes del hongo mismo y no sus metabolitos.

En segundo lugar, se concentra la atención en las fracciones proteicas cuando, en la práctica, los antígenos de naturaleza polisacárida han sido más utilizados<sup>3,9</sup>. Es probable que la fragilidad de las fracciones proteicas haya inclinado la balanza a favor de los polisacáridos, los cuales son bastante más estables. Sin embargo, el uso de sustancias como el PMSF que inhiben la degradación enzimática de las proteínas, hace posible la preservación de los antígenos correspondientes<sup>2</sup>. Al respecto vale la pena anotar que a menos que la mezcla citoplásmica sea rápidamente preservada con el PMSF, el antígeno va a perder su actividad aún si se lo liofiliza y se lo guarda en el congelador.

El tercer punto que se estudia en el trabajo, es el fraccionamiento de un antígeno complejo de manera de conseguir elementos purificados y definidos. Aunque preliminares, los resultados revelan la posibilidad de estandarizar fracciones químicamente reconocibles y serológicamente activas, a partir de mezclas antigénicas complejas. El *P. brasiliensis* posee un verdadero mosaico antigénico<sup>1,16,18</sup>. Además, muchos de los antígenos expresados por el hongo son similares a los producidos por otros agentes micóticos, lo que lleva a reacciones cruzadas de importancia<sup>14</sup>.

Una de las dificultades que suelen presentarse en la práctica serológica, es la gran va-

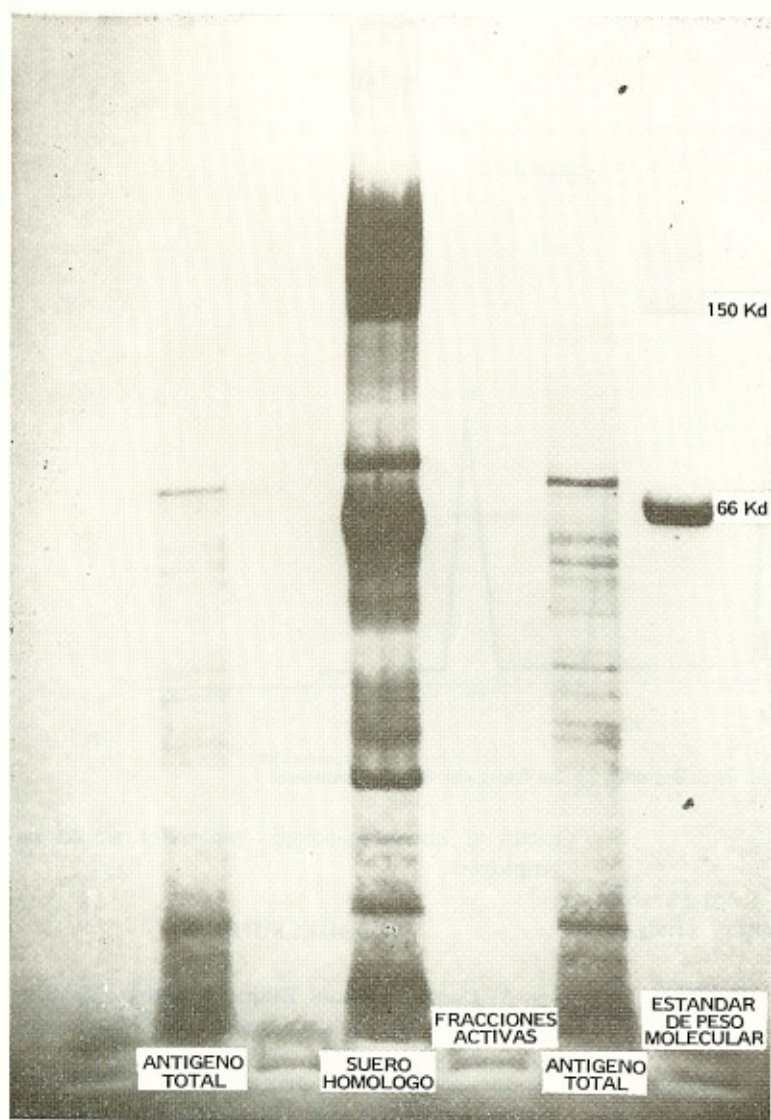


Fig. 1 — Gel de poliacrilamida coloreado con plata. Se observa en la fracción purificada una banda de precipitado de peso molecular aproximado de 66 kd

riación en la actividad de los lotes de antígenos producidos por un mismo investigador. Aún siguiendo cuidadosamente los varios pasos del proceso de obtención del antígeno, (empleo de la misma cepa, del mismo medio de cultivo y de iguales condiciones de incubación), la variación entre lote y lote es considerable<sup>2,14</sup>. Solamente la separación de antígenos definidos químicamente caracterizados obviaría este problema.

Hemos intentado preparar y caracterizar al menos uno de los múltiples componentes anti-

génicos del *P. brasiliensis*, el que pudiera resultar útil en la búsqueda de productos estandarizados y reproducibles. En efecto, la fracción de 66 Kd se muestra como promisoría.

Al presente, se adelantan estudios tendientes a la obtención de cantidades adecuadas de tal fracción que permitan determinar su sensibilidad y especificidad como antígeno independiente. Al mismo tiempo, se trabaja en la identificación bioquímica de esta fracción proteica.

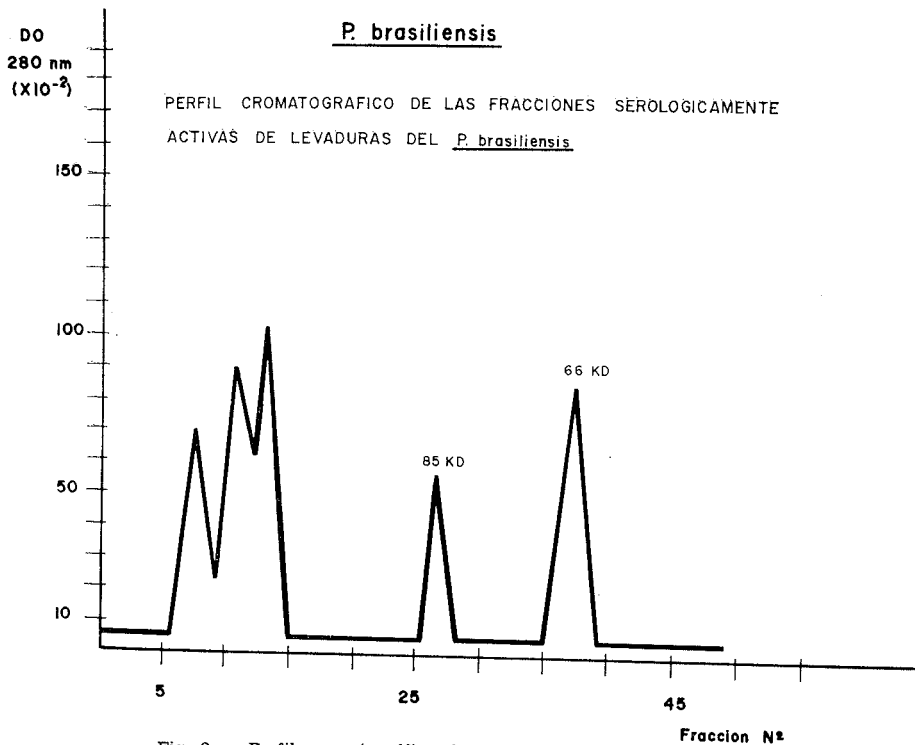


Fig. 2 — Perfil cromatográfico de las fracciones del *P. brasiliensis*

### SUMMARY

#### Purification of somatic antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. Preliminary study

We describe the procedures followed to purify antigenic fractions from *P. brasiliensis* sonicated whole yeast cells. By means of the agar gel immunodiffusion test, antigen-antibody complexes were allowed to produce precipitin lines; these were further separated, eluted and two antibody-free antigenic fractions were further purified by column chromatography and polyacrilamide gel electrophoreses. These fractions proved to be proteins with molecular weights of 66 and 85 kd; the former reacted with specific antisera and produced a precipitin line identical to one of the three formed by the total antigen.

Results indicate that it would be feasible to obtain purified, chemically characterized antigens. These could, in the future, bring improvement in the serologic diagnosis of paracoccidioidomycosis as only those specific compo-

nents of known serologic reactivity would be employed.

### AGRADECIMIENTO

Al Doctor Manuel Elkin Patarroyo, del Departamento de Inmunología de la Universidad Nacional, de Bogotá, Colombia, no solo por habernos enseñado el manejo y las implicaciones del método PAGE-SDS sino por su interés en el presente estudio.

### REFERENCIAS

1. ANDRIEU, S.; BIGUET, J.; DUJARDIN, K. & VAUCELLE, T. — Etude antigenique des agents des mycoses profondes par l'analyse comparée des milieux de culture. *Mycopathologia* (Den Haag) 39: 97-108, 1969.
2. CALVANICO, N. J.; DUPONT, B.; HUANG, J.; PATTERSON, J. N.; FINK, T. N. & KUMP, N. P. — Antigens of *Aspergillus fumigatus*. I. Purification of a cytoplasmic antigen reactive with sera of patients with *Aspergillus*-related disease. *Clin. Exp. Immunol.* 45: 662-671, 1981.
3. FAVA NETTO, C.; SALCEDO, V.; MELLO, S. I. & BRASIL, D. G. — Antígeno polisacárido de *P. brasiliensis*.

- liensis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11: 177-181, 1969.
4. GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDARF, D. H. — *Methods in Immunology*. 3rd. Ed. W.A. Benjamin, 1977, 252-255.
  5. LAEMLI, U. K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685, 1970.
  6. LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FARR, A. L. & RONDREL, R. J. — Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
  7. NEGRONI, R.; COSTA, M. R. I.; BIANCHI, O. & GALIMBERTI, R. — Preparación y estudio de un antígeno celular de *P. brasiliensis*. *Sabouraudia* 14: 265-273, 1976.
  8. OAKLEY, D. R.; KRISCH, D. R. & MORRIS, N. R. — A simplified ultrasensitive silver stain for detecting protein in polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* 105: 261-263, 1980.
  9. RESTREPO, A. & SCHNEIDAU, J. D. — Nature of the skin reactive principle in culture filtrates prepared from *P. brasiliensis*. *J. Bact.* 91: 1741-1748, 1962.
  10. RESTREPO, A. & DROUHET, E. — Etude des anticorps précipitants dans la blastomycose Sud Américaine par l'analyse immunoelectrophorétique des antigens de *P. brasiliensis*. *Ann. Inst. Pasteur* 119: 338-346, 1970.
  11. RESTREPO, A.; RESTREPO, M.; RESTREPO, F.; ARISTIZABAL, L. H.; MONCADA, L. H. & VÉLEZ, H. — Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia* 16: 151-163, 1978.
  12. RESTREPO, A. & JIMÉNEZ, B. — Growth of *P. brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.* 12: 279-281, 1980.
  13. RESTREPO, A.; CANO, L. E.; DE BEDOUT, C.; BRUMMER, E. & STEVENS, D. A. — Comparison of various techniques for determining viability of *P. brasiliensis* yeast form cells. *J. Clin. Microbiol.* 16: 209-211, 1982.
  14. RESTREPO, A. — Las pruebas serológicas en la Paracoccidioidomycosis. Aceptado para publicación en: *Adelantos en Microbiología y Enfermedades Infecciosas*. Marzo, 1984.
  15. YARZÁBAL, I. A. — Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis Sud Americana revelados por inmunoelectroforesis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13: 320-327, 1971.
  16. YARZÁBAL, I. A.; BIGUET, J.; VAUCELE, T.; ANDRIEU, S.; TORRES, J. M. & da LUZ, S. — Análisis inmunológico de extractos solubles de *P. brasiliensis*. *Sabouraudia* 11: 80-88, 1973.
  17. YARZÁBAL, I. A.; ALBORNOZ, M. B.; CABRAL, N. A. & SANTIAGO, A. R. — Specific double diffusion microtechnique for the diagnosis of Aspergillosis and Paracoccidioidomycosis using monospecific antisera. *Sabouraudia* 16: 55-62, 1978.
  18. YARZÁBAL, I. A.; TORRES, J. A. & JOSEF, M. — Antigenic mosaic of *P. brasiliensis*. *Proc. 1st. Pan. Symp. Paracoccidioidomycosis*. PAHO, Scient. Publ. No. 254, Washington, D.C., 239-244.

Recebido para publicação em 18/5/1984.