
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



DETERMINACION DE FRACCIONES ANTIGENICAS DE EXTRAC-
TOS DE LEVADURAS DE PITYROSPORUM ORBICULARE
Y PITYROSPORUM OVALE

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

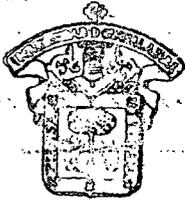
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

ANA ISABEL VAZQUEZ VELAZQUEZ

GUADALAJARA, JALISCO.

1990



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

M. B. / 2000
B. 170



ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA,
EN LA DIVISION DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL I.M.S.S., BAJO-
LA DIRECCION DEL Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA, M. En C.
ANGELICA LEAL DELGADILLO y M. En C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA.

MI MAS PROFUNDO Y SINCERO AGRADECIMIENTO PARA LA M. en C.
ANGELICA LEAL DELGADILLO, POR SU TENACIDAD, AYUDA Y ENSE-
ÑANZA BRINDADA EN ESTE TRABAJO, SIN LA CUAL NO SE HUBIERA
CONCLUIDO.

MI AGRADECIMIENTO SINCERO:

A MI DIRECTOR DE TESIS,
Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA,
POR SU APOYO Y ENSEÑANZA EN
ESTE TRABAJO.

AL M. EN C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA,
POR SU AYUDA INCONDICIONAL EN LA
ELABORACION DE ESTE TRABAJO.

AL DR. AMADO GONZALEZ MENDOZA,
JEFE DE LA DIVISION DE PATOLOGIA
EXPERIMENTAL DE LA U.I.B.O.,
POR LA OPORTUNIDAD BRINDADA PARA
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A QUIEN ME PERMITE EXISTIR Y
DISFRUTAR AL OBSERVAR LA BELLEZA
DE UNA FLOR, LA INMENSIDAD DEL
MAR, LA PERFECTA ARMONIA EN CADA
ORGANO DE MI CUERPO, NO PUEDO
DEJAR DE DARTE MI GRATITUD VERDADERA.
DIOS.

MI AGRADECIMIENTO ETERNO A QUIENES
ME BRINDARON LA DICHA DE NACER Y
QUE DIA A DIA ES UNA DE MIS RAZONES
PARA EXISTIR, MIS PADRES
AMELIA Y J. MANUEL

A MIS HERMANOS, QUE HAN
ESTADO CONMIGO EN TODO,
GRACIAS POR SU APOYO
Y AMOR.

A MIS MAESTROS Y COMPALEROS,
GRACIAS POR SUS ENSEÑANZAS
Y APOYO.

A MIS AMIGOS, QUE ME HAN
DADO SU COMPANIA, AMISTAD
Y CONSEJO.

A TODO EL PERSONAL DE LA DIVISION
DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL Y GENETICA,
QUE DE UNA U OTRA FORMA COLABORARON
PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO,
ESPECIALMENTE AL DEL LABORATORIO DE
BACTERIOLOGIA.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE
MICOLOGIA DEL INSTITUTO DERMATOLO-
GICO, POR LAS FACILIDADES PARA LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA,
QUE ME PERMITE SER MIEMBRO DE
ESTA CASA DE ENSEÑANZA.

DETERMINACION DE FRACCIONES ANTIGENICAS DE EXTRACTOS DE -
LEVADURAS DE PITYROSPORUM ORBICULARE Y PITYROSPORUM OVALE.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES.	2 - 6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	7
HIPOTESIS.	8
OBJETIVOS.	9
MATERIAL Y METODOS.	10 - 17
RESULTADOS.	18 - 26
DISCUSION.	27 - 29
CONCLUSION.	30
BIBLIOGRAFIA.	31 - 36

INTRODUCCION

Dentro del género Pityrosporum se encuentran dos levaduras lipofílicas Pityrosporum orbiculare, que es el agente etiológico de la pitiriasis versicolor y Pityrosporum ovale, - el cual se relaciona con la dermatitis seborréica. Algunos investigadores consideran que se trata sólo de una levadura saprofitica (1-4), en diferente estadio del ciclo celular, y que debido a ciertos factores predisponentes, - cambia su morfología y por lo tanto se hace patógena (5-9), pero también existen estudios que las consideran como dos especies de levaduras diferentes (10-12).

Dado que estos antecedentes originan controversia, en este trabajo se optó por analizar mediante cromatografía, electroforesis y doble difusión, el contenido antigénico de ambas levaduras.

ANTECEDENTES

Dentro del género Pityrosporum se encuentran dos levaduras lipofílicas, es decir, que requieren de ácidos grasos para su crecimiento: Pityrosporum orbiculare (P. orbiculare) y Pityrosporum ovale (P. ovale), los cuales forman parte de la flora cutánea normal humana (2,6,10,13).

Pityrosporum orbiculare fué descrita por Robin en 1853 y la nombró Microsporum furfur, por la textura furfurácea de la epidermis. Pero el nombre de Microsporum ya había sido utilizado diez años antes por Gruby para designar al Microsporum audouini, que es el agente etiológico de la tiña más común en Francia (10,14). Por esta razón, en 1889 Baillyon lo denominó Malassezia furfur (10,14,15). En 1904, Sabouraud introdujo el término Pityrosporum para ubicar a la espora de Malassezia (10). Gordon en 1951 logró cultivar a Malassezia furfur de células epiteliales en descamación del estrato córneo de la epidermis de pacientes con pitiriasis versicolor y también de personas aparentemente sanas, al cual llamó P. orbiculare (11,16,17).

En sujetos normales, P. orbiculare se aísla del antebrazo lateral y región retroauricular, mediante un raspado de células epiteliales en descamación, al microscopio se observan levaduras redondas de 3 a 6 micras de diámetro (2,12).

Por condiciones aún desconocidas, este hongo produce racimos de levaduras y fragmentos cortos de hifas (dimorfismo), que es la forma patógena de pitiriasis versicolor (tiña - versicolor), que es una micosis superficial frecuente en clima templados y tropicales. Principalmente se presenta entre la pubertad y la edad media, debido al incremento de la excreción de grasa, la que facilita la reproducción de P. orbiculare (Malassezia furfur). Clínicamente se manifiesta como manchas furfuráceas irregulares, que pueden estar aisladas o agrupadas, hipopigmentadas o hiperpigmentadas, de ahí su nombre de versicolor generalmente son asintomáticas, se encuentran en el estrato córneo de la epidermis, principalmente en el tórax, antebrazo o espalda (1,13 14,15).

Los factores predisponentes que se han observado en estos pacientes son: Sudoración excesiva, falta de higiene, obesidad, desnutrición, embarazo, uso excesivo de antibióticos y/o esteroides y en leucemias (6,14,18).

Otra levadura lipofílica es P. ovale, a la cual se le ha relacionado con la dermatitis seborréica (2,4,19). Es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, en la cual se observan escamas secas o grasosas amarillentas, que pueden producir placas costrosas, eritematosas, de forma y tamaño irregular. Generalmente se originan en cuero cabelludo, -

pueden infectar párpados, surco nasolabial, labios, orejas, área externa, axila, ingle y pliegues interglúteos (2,9,20). Algunos investigadores consideran a P. orbiculare y P. ovale como una sola especie y debido a su estadio diferente de su ciclo celular y algunos factores predisponentes, la levadura cambia de saprófito (P. ovale), a una fase patógena (P. orbiculare) (4,7,9). Además, cuando se cultivan células epiteliales de pacientes con pitiriasis versicolor y dermatitis seborréica en medios de cultivo adicionados con ácidos grasos de 12 a 24 carbonos, y se incuban a 37°C, producen colonias cremosas similares macroscópicamente (2,10,12).

Los estudios de investigación que apoyan la idea de que P. orbiculare y P. ovale es una misma especie de levaduras son los siguientes: Faergemann y Torsten, mediante infecciones experimentales en conejos y humanos bajo oclusión con P. orbiculare y P. ovale obtuvieron lesiones similares a las establecidas clínicamente en pitiriasis versicolor (7).

Nazzaro-Porro y colaboradores, obtuvieron in vitro hifas idénticas en ambas levaduras, (P. orbiculare y P. ovale) en un medio enriquecido con una mezcla de colesterol y ésteres de colesterol (21).

Faergemann también logró obtener in vitro hifas idénticas en ambas levaduras incubándolas en estrato córneo de células epiteliales con un medio ambiente de CO₂ elevado (8).

Sin embargo, también existen estudios para pensar que son dos especies de levaduras diferentes como son los realizados mediante microscopía óptica y electrónica, en los cuales se observó que P. orbiculare es una levadura esférica que mide de 3 a 6 micras de diámetro y se reproduce por gemación sobre una base estrecha y en ocasiones se pueden observar de 2 a 4 levaduras en forma de collarete y tiene fragmentos cortos de hifas cuando está infectando, en cambio P. ovale es una levadura oval o cilíndrica, mide de 2 a 3 x 4 a 5 micras, se reproduce por gemación sobre una base ancha (2) y cuando se aísla de la piel, no presenta filamentos. Además, se ha observado que P. orbiculare solamente tiene 3 mitocondrias, en tanto que P. ovale posee 23 mitocondrias por célula (2,10).

Dorn y Roehner produjeron hifas in vitro de P. orbiculare, pero no de P. ovale adicionando al medio de cultivo glicina (22).

Mediante estudios inmunológicos realizados por Tanaka e Imamura, por medio de la técnica de Ouchterlony y de inmunofluorescencia, observaron que P. orbiculare, P. ovale -

comparten fracciones antigénicas idénticas (11).

No obstante los antecedentes descritos que apoyan uno y otro postulado, continúa la controversia de si se trata de una o dos especies diferentes de levaduras P. orbiculare y P. ovale. Por lo tanto, se considera de importancia el análisis de los extractos de ambas levaduras, por fraccionamiento en cromatografía de filtración, electroforesis e inmunodifusión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Pityrosporum orbiculare es el agente etiológico de la piti
riasis versicolor y Pityrosporum ovale, está relacionado -
con la dermatitis seborreica, pero no se ha determinado -
con precisión si realmente son dos especies de levaduras -
diferentes o se trata de una sola en diferente estadio de-
su ciclo celular.

HIPOTESIS

Las fracciones de los extractos levaduriformes de Pityrosporum orbiculare y Pityrosporum ovale tienen diferente comportamiento inmunológico y electroforético.

OBJETIVOS DE LA TESIS.

1. Obtener extractos de levaduras de Pityrosporum orbiculare y de Pityrosporum ovale.
2. Determinar su antigenicidad.
3. Fraccionar los extractos levaduriformes.
4. Analizar el comportamiento electroforético de los extractos levaduriformes y de sus fracciones.

MATERIAL Y METODOS.

Se obtuvieron levaduras de tres grupos de 10 individuos cada uno. El grupo 1 (PV) lo integraron pacientes con pitiriasis versicolor, cuyo agente causal es P. orbiculare. El Grupo 2 (DS) incluyó a pacientes con dermatitis seborreica, que se asocia con P. ovale. El grupo 3 (SS) fué de personal de laboratorio clínicamente sano, a ellos se les aisló un hongo similar a P. orbiculare. El 50% de cada grupo fueron mujeres y el 50% hombres, con edades promedio de 20 ± 3 años y pertenecían a diversos estratos sociales.

Los pacientes fueron diagnosticados en el servicio de Consulta Externa del Instituto Dermatológico de Guadalajara, Jalisco y no presentaron alguna patología agregada, ni estaban bajo tratamiento.

OBTENCION DE LEVADURAS.

De las lesiones de los pacientes y de un brazo de los individuos sanos, se obtuvieron células epiteliales por medio de un raspado con dos portaobjetos estériles. Con una parte de la muestra se realizó el diagnóstico micológico, según el método de Ajello (23), para lo cual se depositó sobre un portaobjetos una porción de la muestra y se agregaron 20 mcl de KOH al 10%. Se colocó un cubreobjetos y se

calentó por 5 seg. en la flama del mechero. Se observaron los microorganismos al microscopio de luz, con el objetivo 40x.

Además, se realizó la tinción de ácido peryódico de Schiff (24). Que consistió básicamente en fijar otra parte de la muestra con albúmina de Meyer en un portaobjetos y se lavó con agua de la llave. Se colocó en ácido peryódico al 1% durante 5 min y se lavó. Se pasó al reactivo de Schiff - - (fucsina básica al 0.5%) por 20 min y se lavó. Se contrastó con hematoxilina al 0.5% y se lavó. Se pasó por tres baños de alcohol (50,70 y 100%) y uno de xilol. Se cubrieron con resina sintética y con cubreobjetos para observarse en microscopía de luz, con el objetivo 100x.

En ambos procedimientos P. orbiculare se observó en forma de racimos de levaduras esféricas y fragmentos cortos de hifas, en tanto que P. ovale como levaduras ovoides o en forma de botella.

CULTIVO DE LEVADURAS.

Una vez observados y caracterizados los hongos P. orbiculare y P. ovale, se procedió a sembrarlos en tubos para cultivo que contenían 12 ml de agar micobiotic (Difco). Sobre el agar se depositaron 0.5 ml de aceite de oliva esté-

ril, ya aplicadas las muestras. Los tubos se incubaron con una inclinación de 30° durante 8 días a 37°C.

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

Las levaduras de cada individuo fueron resembradas en 20 cajas de Petri en agar mycobiótico y aceite de oliva, se incubaron por 72 hrs a 37°C. Al cabo de este tiempo, las levaduras de las 200 cajas correspondientes a los 10 integrantes de cada grupo, se juntaron en un pool. Así se obtuvieron 50 ml de levaduras concentradas y se procedió a la extracción antigénica. Para ello se tomó como referencia el método de Sohnle y Collins-Lech (25), que consistió en lavar las levaduras tres veces con 100 ml de solución salina estéril al 0.85%. A continuación se extrajo con acetona el exceso de aceite.

En condiciones de esterilidad, el paquete de levaduras se trituró en un mortero de porcelana con fragmentos de vidrio. El triturado se resuspendió en 100 ml de buffer salina fosfatos, 0.1 M pH 7.4 estéril (BSF) y se puso en agitación constante durante 24 hrs a 4°C. Se centrifugó a 600 g durante 30 min. El sobrenadante fué centrifugado a 3000 g durante 50 min. Con el sobrenadante se repitió la centrifugación a 3000 g. El sobrenadante se dializó a 4°C contra BSF durante 24 hrs. Esta operación se repitió

en tres ocasiones. El dializado se concentró por filtración en amicón, con presión de nitrógeno, hasta un volumen de 5 ml. Al concentrado se le hicieron pruebas de esterilidad por filtración en millipore de 0.22 micras y por cultivos microbiológicos en caldo-cerebro-corazón (Bioxón), - agar-dextrosa-Sabouraud (Bioxón) y agar mycobiotic (Difco). Los cultivos se hicieron por duplicado y se incubaron a 28 y 37°C respectivamente por 10 días. Se determinaron además los contenidos de proteínas por el método de Lowry - - (26) y carbohidratos por el método de Morris (27). Los extractos se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

PRUEBAS DE INMUNOGENOCIDAD.

Se inmunizaron intramuscularmente tres conejos Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso, con 0.5 ml de BSF que contenía 1 mg de proteínas y 0.9 mg de carbohidratos. Los antígenos se mezclaron con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund's - - (Sigma). A cada conejo se le aplicó un extracto en 4 dosis, una cada semana.

A la quinta semana de iniciada la inmunización, se obtuvo suero de cada conejo y se probó la presencia de anticuerpos. Para ello se utilizó la prueba de doble difusión de Ouchterlony (28,29), que consistió en preparar tres cajas-

de Petri de 60 mm de diámetro, con 5 ml de agarosa al 1% y 0.2% de azida de sodio. Se dejaron gelificar y se hicieron 7 perforaciones con sacabocados. Una central 6 periféricas. En el centro se depositaron 20 mcl del antisuero de conejo correspondiente y en la periferia 20 mcl de cada extracto. Las cajas se incubaron en cámara húmeda por 24 hrs a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se observaron las bandas de precipitación respectivas.

CROMATOGRAFIA

Las fracciones de los tres extractos antigénicos se realizaron en columna para cromatografía de filtración de 25 X 400 mm. Como soporte se utilizó sephadex G - 100 (Pharmacia Chemical UB Uppsala Sweden) y se eluyó con BSF. Las muestras de cada extracto consistentes de 3 mg de proteínas y 2.7 mg de carbohidratos disueltos en 2 ml de BSF, se colocaron en la parte superior de la columna y de inmediato se eluyó con BSF. Las fracciones se colectaron en volúmenes de 2 ml por tubo, con un flujo de 3 gotas por min, en un colector automático (L K B Ultorac 7000). Los eluentes fueron leídos a 280 nm en un espectrofotómetro (PMQ 3-Carl Zeiss) (30,31). A cada una de las fracciones que dieron lectura, se les realizó la prueba de inmunodifusión, con los anticuerpos de conejo.

ELECTROFORESIS

Para determinar el comportamiento electroforético y los pesos moleculares (P.M.) de los componentes de los extractos y de sus fracciones, se hizo electroforesis en gel de poliacrilamida a la que se le agregó detergente aniónico - dodecyl sulfato de sodio (DSS) (32,33,34). La cámara para electroforesis que se utilizó fué similar a la descrita - por Ornstein y Davis (35). Los tubos de acrilamida-DSS - con gradientes de concentración 7,10 y 13% se prepararon - en tubos de vidrio de 12 cm de largo por 0.5 cm de diáme- - tro. La suspensión que se colocó primero fué la del 13%, - después la del 10% y finalmente la del 7%. La concentra- - ción del 13% se preparó mezclando 8.7 ml de suspensión - - stock de poliacrilamida, la cual contenía (9 gr de acrilamida y 0.45 gr de bisacrilamida en 30 ml de buffer trizma- - base 1.5 M pH 8.8); 5 ml de buffer trizma base, 0.2 ml de DSS (Sigma) al 10%; 0.03 ml de N,N,N'N'- tetrametil-etilen diamina (TEMED-Sigma); 0.03 ml de persulfato de amonio - - (Sigma) al 10% y 6 ml de agua destilada. Para las suspen- - siones al 10 y 7% se tomaron 6.7 y 4.7 ml de la suspensión stock de acrilamida y 8 y 10 ml de agua respectivamente. - Después de colocar la suspensión al 7%, se llenaron los - tubos con agua destilada y se dejaron gelificar a tempera- - tura ambiente. Los tubos con los geles se colocaron en la cámara de electroforesis (HAAKE BUCHLER). En los recipientes

tes superior e inferior se colocó buffer de corrimiento - pH 8.3, el cual se preparó mezclando 3 gr de trizma base, - 14.4 gr de glicina (Sigma G-7126), 1 gr de DSS y se aforó - a 1000 ml de agua destilada. Los extractos antigénicos - conteniendo 0.4 mg de proteínas y 0.36 mg de carbohidratos en 0.2 ml de BSF, se mezclaron con 0.2 ml de buffer de - - muestra, que se preparó de la siguiente manera: 1 ml de bu - ffer trizma pH 6.8, 0.8 ml de glicerina; 1.6 ml de DSS al - 10%; 0.4 ml de 2-mercaptoetanol (Sigma); 0.2 ml de rojo de fenol al 0.05% (Sigma) y 4 ml de agua destilada.

Como marcadores de P.M. se utilizaron las siguientes pro - teínas: Lisozima con P.M. de 14 000, Anhidrasa carbónica - de P.M. 29 000, Albúmina de huevo de P.M. 45 000 y Albúmi - na bovina de 66 000 daltons. Se emplearon 0.02 ml de una - solución que contenía 0.04 mg/ml de cada proteína y se mez - claron con 0.02 ml del mismo buffer de las muestras. Pos - teriormente se colocaron en la parte superior de los geles 0.2 ml de los extractos y 0.02 ml de los marcadores de pe - sos moleculares, tratados con buffer de muestra.

El corrimiento de la electroforesis se realizó a temperatu - ra ambiente durante 5 hrs con un voltaje de 100 volts y - 200 mA. Finalmente, los geles se removieron de los tubos - de vidrio para realizar el revelado de las bandas por tin - ción de amidoblack(Merck) al 0.5% durante 5 min. A conti -

nuación se pasaron a una solución decolorante que contenía 10 partes de ácido acético glacial, 25 partes de etanol ab soluto y 65 partes de agua destilada. Esta solución se - cambió diariamente durante 8 días.

RESULTADOS

Determinación de proteínas y carbohidratos. En la tabla 1 se observa que la concentración de proteínas y carbohidratos del extracto de levaduras de pacientes con pitiriasis-versicolor (PV) fué mayor que en pacientes con dermatitis-seborréica (DS) y sujetos sanos (SS).

Doble difusión de Ouchterlony. En la figura 1 se muestran las bandas de precipitación formadas al reaccionar los extractos antigénicos con los correspondientes antisueros. En A se observa que el extracto de PV en presencia de su antisuero presentó 4 bandas de precipitación. Dos de ellas las comparten por identidad con los extractos de DS y SS. Además el anti-PV dió una banda adicional de precipitación con DS y SS que no son idénticas entre sí, ni con PV.

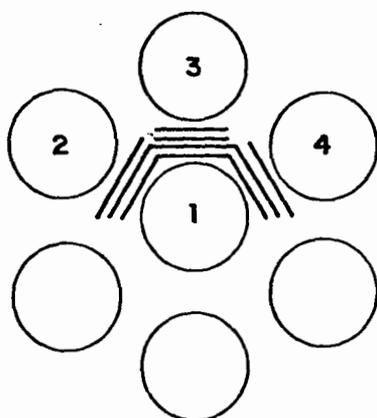
En B el extracto de DS en presencia de su antisuero presentó 4 bandas de precipitación. Una de ellas dió identidad con los extractos de PV y SS. El anti-DS dió una banda de precipitación adicional con PV que no fué idéntica a DS.

En C el extracto de SS reaccionó con su antisuero y presentó 3 bandas de precipitación. Una de ellas fué idéntica a PV y DS, otra dió identidad con PV.

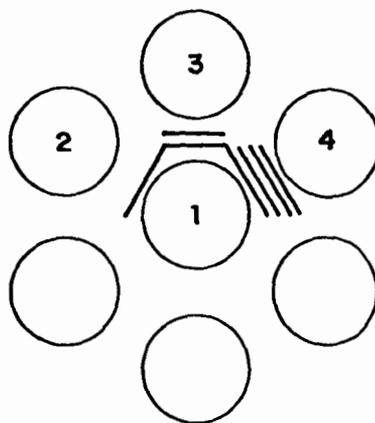
TABLA No. 1

Determinaciones de proteínas y carbohidratos en los extractos de levaduras de P. orbiculare y P. ovale.

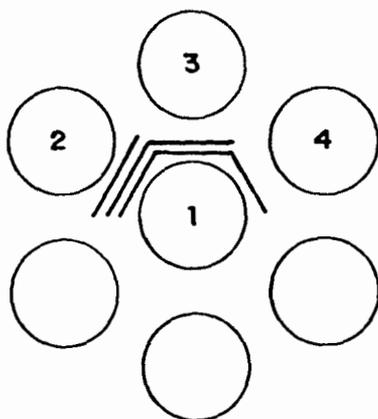
Extractos	Proteínas mg/ml	Carbohidratos mg/ml
PV	2.0	1.8
DS	1.5	0.5
SS	1.3	0.9



A) anti-PV



B) anti-DS



C) anti-SS

Fig. 1. Inmúnodifusión entre los extractos de SS⁽²⁾, PV⁽³⁾ y DS⁽⁴⁾ contra sus respectivos antisueros obtenidos de conejos. En el pozo 1 de A, B y C se colocó anti-PV, anti-DS y anti-SS respectivamente.

Cromatografía. En la figura 2 se muestra el producto del fraccionamiento cromatográfico (Sephadex G-100) de los extractos de levaduras de PV, DS y SS. Se observó una fracción de cada uno de ellos. La concentración de proteínas y carbohidratos de mayor a menor fue DS, SS y PV, según se observa en la tabla 2.

Electroforesis. En la figura 3 se presenta la distribución electroforética de las bandas de precipitación de los componentes de los extractos PV, DS, SS y de sus fracciones cromatográficas, así como sus pesos moleculares (PM) aproximados en relación con las proteínas de PM conocidos que se utilizaron como marcadores de referencia.

El extracto de PV presentó 10 bandas de precipitación a las que les corresponden los PM 66(2), 66, 47, 44, 43, 31, 30, 28 y 27 Kd. Su fracción cromatográfica mostró 4 bandas con PM de 30, 28, 27 y 26 Kd.

El extracto de DS presentó 4 bandas con los siguientes PM 64, 63, 42 y 16 Kd. Su fracción cromatográfica tuvo 2 bandas con PM de 42 y 16 Kd.

Por su parte, el extracto de SS dió 7 bandas de precipitación con PM de 66, 65, 48, 44, 43, 41 y 17 Kd. Su fracción cromatográfica mostró 7 bandas con PM 42, 41, 32, 31, 29, 28 y 16 Kd.

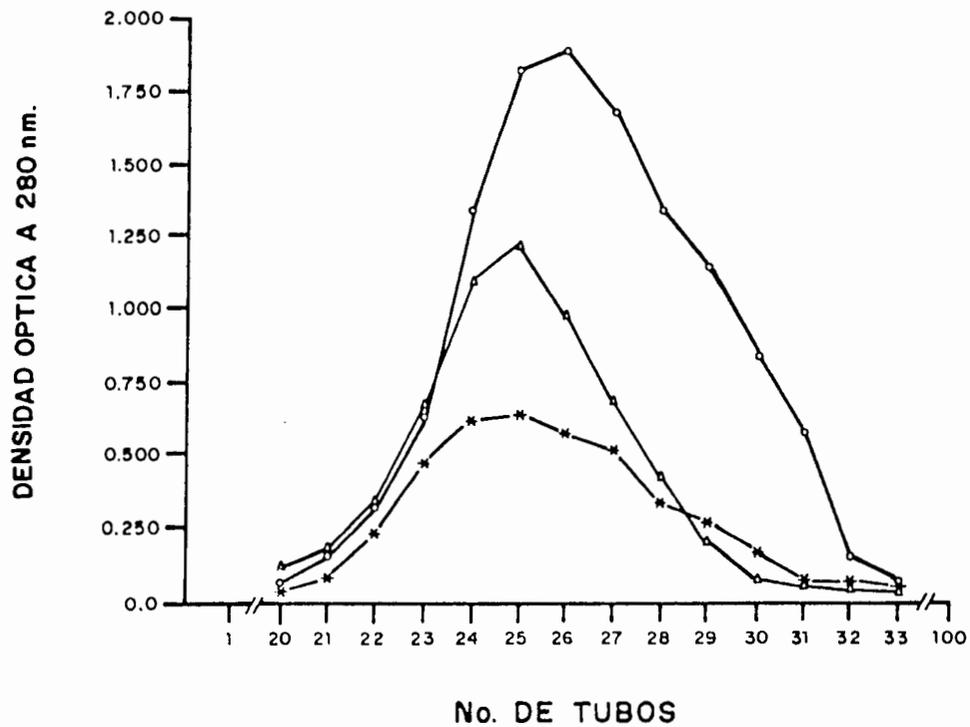


Figura 2.- Fraccionamiento por Cromatografía en Sephadex 6-100 de los extractos de levaduras.

○—○ DS
 — PV
 ▲—▲ SS

TABLA No. 2

Determinación de proteínas y carbohidratos en las fracciones de los extractos de levaduras de P. orbiculare y P. - Ovale obtenidos por cromatografía en sephadex G-100.

Fracciones	Prot. totales mg/ml	Carboh. totales mg/ml
PV	1.0	0.6
DS	2.1	1.7
SS	1.5	0.7

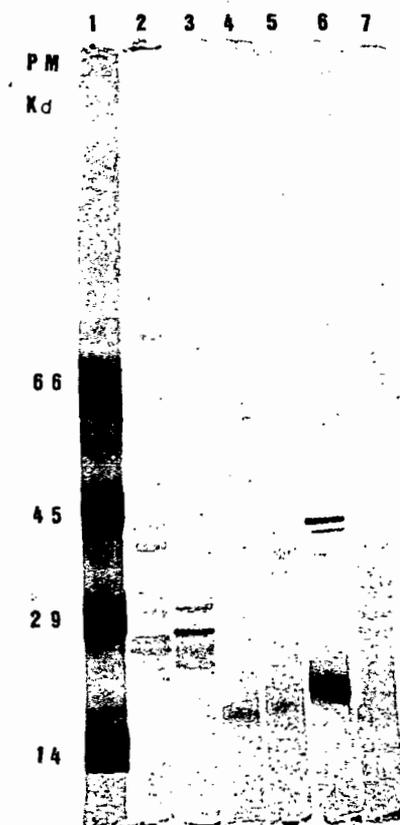


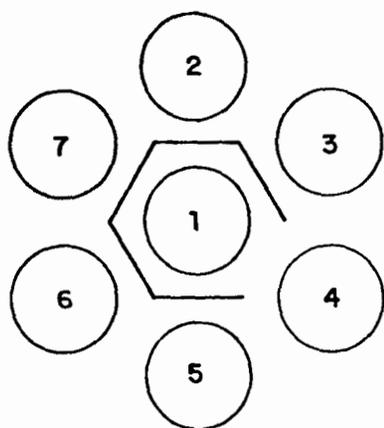
Figura 3. Electroforesis en disco de gel de poli-acrilamida. 1) Marcadores de PM (Albúmina bovina 66 Kd, Albúmina de huevo 45 Kd, Anhidrasa carbónica 29 Kd y Lizosima 14 Kd. 2) Extracto de PV 3) Fracción de PV 4) Extracto de DS 5) Fracción de DS 6) Extracto de SS y 7) Fracción de SS. Teñidos con negro amido al 0.5%.

Inmunodifusión de fracciones cromatográficas. En la figura 4 se muestran las bandas de doble difusión entre los sueros de conejos anti-PV, DS y SS, contra las fracciones cromatográficas de los extractos correspondientes.

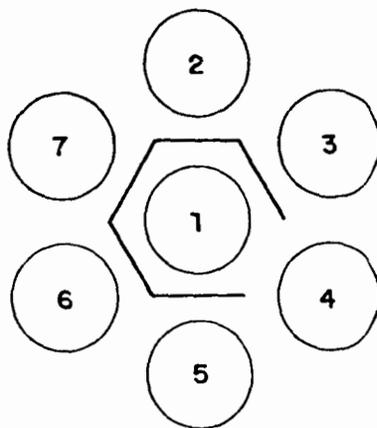
En A se observa que el suero de anti-PV dió una banda de precipitación con la fracción PV, que tuvo identidad con su extracto con el DS y con SS. Así mismo dió banda de precipitación idéntica con FSS. En cambio, no hubo reacción con la fracción FDS.

En B el suero anti-DS reaccionó con las fracciones de los extractos PV y SS, con una banda de identidad entre sí y con una banda de los extractos no fraccionados.

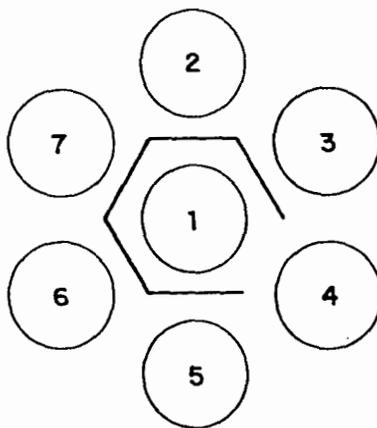
En C el suero de anti-SS dió una banda de precipitación con FSS y con FPV. Las cuales son idénticas entre sí y con una de las bandas de SS, PV y DS, sin embargo no se observó reacción con FDS.



A) anti-PV



B) anti-DS



C) anti-SS

Fig. 4. Doble difusión de Ouchterlony en las fracciones cromatográficas de PV, DS y SS contra sus respectivos -antisueros obtenidos en conejos. En el pozo 1 de A, B y C se colocó el anti-PV, anti-DS y anti-SS respectivamente. Extracto de PV⁽²⁾ fracción de PV⁽³⁾, fracción de DS⁽⁴⁾, extracto de DS⁽⁵⁾ fracción de SS⁽⁶⁾ y extracto de SS⁽⁷⁾.

DISCUSION

El análisis de los extractos antigénicos de las levaduras provenientes de pacientes con PV, DS y SS, por el método de doble difusión realizados entre los extractos completos y los antisueros específicos obtenidos de conejos, - mostró que existen dos antígenos que comparten las tres - cepas de levaduras, puesto que se encontró identidad entre ellas cuando se probaron con el suero anti-PV. Pero además se observaron algunas bandas particulares en cada extracto, que no presentaron identidad. En cambio, cuando los extractos se probaron con anti-DS, sólo tuvieron una banda de identidad los tres extractos. Al probar con anti-SS, PV y SS dieron dos bandas de identidad entre sí, y sólo tuvieron identidad con una banda de DS. Estos datos sugieren que a nivel del extracto crudo existen proteínas que comparten las tres cepas, lo cual no es de extrañarse, si se tiene en cuenta que todas ellas forman parte del género Pityrosporum. Por otra parte, el que se encuentren proteínas específicas en cada uno de los extractos, señala que existen componentes que en un momento dado podrían influir en la manifestación de la identidad clínica con la que se relaciona cada levadura; por ejemplo P. orbiculare cuando es patógena es el agente causal de la Pitiriasis versicolor. Esta misma levadura como - saprófita se encuentra en SS. Por su parte P. ovale úni-

camente se ha observado como patógena asociada con DS.

Asimismo, por electroforesis se observó que los extractos tuvieron patrones de corrimiento diferente y sólo hubo coincidencia en algunas bandas, en relación con su peso molecular. Estos podrían tener relación con el resultado de la doble difusión en la que se encontraron similitudes y diferencias entre los extractos PV, DS y SS.

Al realizar el fraccionamiento cromatográfico de los extractos se obtuvo una fracción de cada uno. Estas fracciones tuvieron un patrón electroforético diferente y sólo coincidieron en alguna de las bandas. Al probar por doble difusión su actividad antigénica, con los tres antisueros se encontró que las fracciones PV y SS mostraron una banda de identidad entre sí y con una de los tres extractos. En cambio FDS no dió bandas de precipitación con su propio antisuero ni con los de PV y SS. Probablemente al realizar el fraccionamiento del extracto DS, los componentes antigénicos quedaron retenidos en la columna y debido a ello no aparecieron en el patrón electroforético correspondiente y por consiguiente, tampoco reaccionaron en la prueba de inmunodifusión.

Por lo anterior se puede señalar que P. orbiculare y P. ovale son dos levaduras de especies diferentes, puesto

que morfológicamente presentan diferencias (10-12), se relacionan con dos padecimientos cuyas manifestaciones clínicas son perfectamente diferenciables (1,2,4,13,14,15, - 19) y más aún, en este trabajo sólo se observó a P. orbiculare como suprófito en individuos normales.

Por otro lado, el contenido de proteínas y carbohidratos - entre los extractos PV y DS fueron diferentes, el corrimiento electroforético tanto de los extractos como de las fracciones cromatográficas no fueron iguales y mostraron - además diferencias por doble difusión. Todos estos datos están de acuerdo con los trabajos que señalan que se trata de dos levaduras diferentes (10-12). En cambio, la - evidencia que se tiene en este trabajo de que se trata de la misma levadura como también se ha informado en otros - estudios (2,7,8,21), es el hecho de que se encontraron - dos bandas de identidad entre los componentes antigénicos de PV y DS, ésto es comprensible debido a que corresponden al mismo género de levaduras, por lo que se considera poco relevante este hecho y es más importante tomar en - cuenta las diferencias que presentan ambas levaduras y su relación con el comportamiento patogénico.

CONCLUSION

Por los resultados de inmunodifusión y corrimiento electroforético de los extractos de Pityrosporium orbiculare y - P. ovale y de sus respectivas fracciones, se concluye que se trata de dos especies de levaduras diferentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Conant, M.F.; Smith, D.T.; Baker, R.D.; Callaway, J.L.:
Micología. Ed. Interamericana. México, D.F., pp. -
502-508, 1978.
2. Faergemann, J.; Lipophilic yeasts in skin disease.-
Sem Dermatol 4: 173-184, 1985.
3. Nazzaro-Porro, M.; Passi, S.; Caprilli, F.: Growth -
requirements and lipid metabolism of *Pityrosporum*
orbiculare. *J. Invest Dermatol* 66: 178-182, 1976.
4. Civila, E.S.; Vignale, R.A.; Conti-Diaz, I.A.: *Malasse*
zia ovalis: Mycologic and immuno-antigenic aspects
and probable pathogenic role. 5th international con-
ference on the Mycoses; Pan American health organi-
zation. Scientific publication 396: 54-62, 1980.
5. Faergemann, J.; Tjernlund, U.; Scheynius, A.; Bernan-
der, S.: Antigenic similarities and difference in -
genus *Pityrosporum*. *J. Invest Dermatol* 78: 28-31,
1982.
6. Faergemann, J.; Fredriksson, T.: *Tiña versicolor* with

- regard to seborrheic dermatitis. Arch Dermatol 115: 966-968, 1979.
7. Faergemann, J.; Fredriksson, T.: Experimental infections in rabbits and humans with *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale*. J. Invest Dermatol 77: 314-318, 1981.
 8. Faergemann, J.; Aly, R.; Maibach, H. I.: Growth and filament production of *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale* on human stratum corneum in vitro. Acta Dermatol-Venercol (Stockh) 63: 388-392, 1985.
 9. Randjandiche, M.: Présence de *Pityrosporum ovale* dans l'oreille de nouveau-nés. Sabouraudia 19: 145-145, 1981.
 10. Silva-Huntner, M.: *Malassezia furfur* as pathogen and in culture: A Review 5th international conference on the mycoses. Pan American health organization. Scientific publication 396: 29-37, 1980.
 11. Tanaka, M.; Imamura, S.: Immunological studies on *Pityrosporum* genus and *Malassezia furfur*. J. Invest Dermatol 73: 321-324, 1979.

12. Faergemann, J.: *Tinea versicolor* and *Pityrosporum orbiculare* mycological investigation experimental infections and epidemiological surveys. *Acta Dermatol-Venereol* 86: 5-20, 1979.
13. Moore, G.S.; Jaciow, P.M.: *Mycology for the clinical laboratory*. Reston publishing. Reston Virginia pp. 107-109, 1979.
14. Salcedo, N.: Cultures and physiologic properties of the fungus producing *tinea versicolor*. 5th international conference on the mycoses. Pan American health organization. Scientific publication 396: 44-54, 1980.
15. Rippon, J.W.: *Medical mycology*. Ed. W.B. Saunders. Philadelphia pp. 84-87, 1974.
16. Faergemann, J.; Aly, R.; Maibach, H.I.: Quantitative variations in distribution of *Pityrosporum orbiculare* on clinically normal skin. *Acta Dermatol venereol (Stockh)* 63: 346-348, 1983.
17. Faergemann, J.: Experimental *tinea versicolor* in rabbits and humans with *Pityrosporum orbiculare*. *J. Invest Dermatol* 72: 326-329, 1979.

18. Gloor, M.; Kumpel, D.; Friederich, H.C.: Predisposing - factors on the surface of the skin in persons with - Pityriasis versicolor. Arch Dermatol 254: 281-286, - 1975.
19. Werry, P.E.; Va, C.: Pityrosporum ovale. Arch Derma- tol 98: 408-422, 1968.
20. Koneman, E.W.; Roberts, G.D.; Wright, S.E.: Practical laboratory mycology. Ed. W. Wilkiens. Baltimore, U.S.A. pp. 84-85, 1978.
21. Porro, M.N.; Passi, S.; Caprilli, F.; Mercantini, R.: - Induction of hyphae in cultures of Pityrosporum by - cholesterol and cholesterol esters. J. Invest Derma- tol 69: 531-534, 1977.
22. Dorn, M.; Roehnert, K.: Dimorphism of Pityrosporum - - orbiculare in a defined culture medium. Invest Derma- tol 69: 244-248, 1977.
23. Ajello, L.; Georg, L.K.; Kaplan, W.; Kaufman, L.: Labo- ratory manual of medical mycology. Ed Government - printing office. Washington. pp. A-I, 1963.
24. Vanbreuseghem, R.; Vroey, De. Ch.; Takashio, M.: Practi-

- cal guide to medical and veterinary mycology. 2th Ed. Masson publishing USA, Inc. pp. 255-256, 1978.
25. Sohnle, P.G.; Collins-Lech,C.: Cell mediated immunity to *Pityrosporum orbiculare* in tinea versicolor. J. - Clin Invest 62: 45-53, 1978.
26. Lowry,O.H.; Rosebrough,N.J.; Farr,A.L.; Randall,R.J.: protein measurement with the folin phenol reagent. J. Bio-Chem 193: 265-275, 1951.
27. Morris,D.L.: Quantitative determinations of carbohydrates with dreywoods anthone reagent. Science 107: 254, 1948.
28. Stites,D.P.; Fudenberg,H.H.; Stobo,J.D.; Wells,J.V.: Inmunología básica y clínica. Ed El Manual Moderno, 5ta edic pp. 316-321, 1985.
29. Kaufman,L.; Huppert,M.; Netto,C.F.; Pollak,L.; Restrepo,A.: Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnóstico de las micosis sistémicas. Parte 1. Pruebas de inmunodifusión en agar. Organización Panamericana de la Salud, Scientific Publication No. 205, pp. 3-9, 1970.

30. Fischer, L.: Introducción a la cromatografía en gel. Técnicas del laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica. Ed. El Manual Moderno pp. 1-205, 1975.
31. Ion exchange Chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, BOX 175,5 75104 Uppsala 1 Sweden.
32. Fehnström, H.; Moberg, U.: SDS and conventional polyacrylamide gel electrophoresis with LKB 2117 mutli-phor application note 306: 1-16, 1977.
33. Sigma Chemical company. SDS molecular weight markers technical builetin No MWS-877. January 1982.
34. Hedrick, L.J.; Smith, J.A.: Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Archives of Biochemistry and Biophysics 126: 155-164, 1968.
35. Harris, H.; Hopkinson, D.A.: Electrophoretic methods; Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics Amsterdam. New York-Oxford pp. 1-17, 1977.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 1493/89

SRITA. ANA ISABEL VASQUEZ VELASQUEZ
P R E S E N T E . -

Manifetamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
tema de Tesis "DETERMINACION DE FRACCIONES ANTIGENICAS DE EXTRACTOS DE --
PITYROSPURUM ORBICULARE Y PITYROSPORUM OVALE" para obtener la Licenciatu
ra en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado --
como Director de dicha Tesis el Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega.



ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Noviembre 23 de 1989
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS
FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

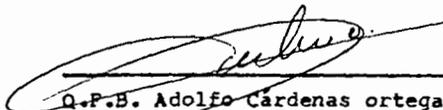
C. Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas
Dic. Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara.

P R E S E N T E:

Por medio de la presente informo a usted que la
C. Ana Isabel Vásquez Velásquez, pasante de la Licenciatura en _
Biología, ha concluido su trabajo de tesis titulado: DETERMINA -
CION DE FRACCIONES ANTIGENICAS DE EXTRACTOS DE LEVADURAS DE P. OR
BICULARE Y P. OVALE.

Asimismo le comunico que he revisado el trabajo-
del proyecto el cual cumple con los requisitos establecidos por
la Facultad y no encuentro inconveniente para que se imprima.

No teniendo otro asunto que tratar me despido de
usted atentamente.



Q.F.B. Adolfo Cárdenas ortega
Director de tesis

Guadalajara, Jal., Mayo 10 de 1990.