

ARTICULOS ORIGINALES

BLASTOGENESIS Y PRUEBAS INTRACUTANEAS CON ANTIGENO PARCIALMENTE PURIFICADO DE *CANDIDA ALBICANS*

MAYE BERNAL RIVERA* y MIGUEL GUZMAN**

Utilizando un antígeno parcialmente purificado de *Candida albicans* cuya composición se estudió por electroforesis de poliacrilamida, se demostró que este antígeno estimula una respuesta de hipersensibilidad retardada en el curí, evidenciada tanto por el fenómeno de induración que aparece a las 24 horas y desaparece a las 72 como por estudios de histopatología. De 16 voluntarios estudiados 81.25%, fueron positivos y 18.75% negativos. Los estudios de transformación blástica de linfocitos de los candidina positivos estimulados con cantidades variables del antígeno parcialmente purificado y con base a la incorporación de timidina tritiada, fueron negativos lo cual plantea el hecho de que la prueba de hipersensibilidad retardada y la transformación blástica son fenómenos diferentes en la evaluación inmunológica.

INTRODUCCION

Las pruebas intradérmicas que producen una reacción de hipersensibilidad retardada han sido intensamente estudiadas desde su introducción por Koch (1). Hoy sabemos que ellas ponen de manifiesto una respuesta de inmunidad adquirida específica a la exposición de un antígeno determinado y que esta se evidencia por un fenómeno de infiltración celular linfocitaria que específicamente reconoce el antígeno localmente inoculado (2, 3). Aunque el fenómeno ha sido estudiado más en conexión con enfermedades infecciosas, es un hecho claramente establecido que no son elementos de diagnóstico, sino herramientas epidemiológicas cuando quiera que en una población se desee saber el porcentaje de población que se ha expuesto a un antígeno determinado (4).

Con los avances inmunológicos las pruebas intradérmicas han adquirido una mayor dimensión como instrumentos para evaluar la integridad del componente celular del sistema inmunitario (5).

Con el objeto de evaluar si la respuesta de hipersensibilidad retardada demostrada por la inoculación intradérmica de un antígeno corresponde a un fenómeno de transformación blástica "in situ" se decidió realizar el presente trabajo con el fin de comparar los 2 tipos de fenómenos utilizando un antígeno parcialmente purificado obtenido a partir de una cepa de *Candida albicans*.

MATERIALES Y METODOS

Cepa de *C. albicans*: Para la preparación de los antígenos se utilizó una cepa de *C. albicans* (CIN

*Bacterióloga Sección Control Biológico.

Actualmente Instructora Fundación Escuela Colombiana de Medicina, Santafé de Bogotá.

**Jefe Grupo de Inmunología Instituto Nacional de Salud. Profesor Asociado, Facultad de Medicina Universidad Nacional, Santafé de Bogotá, Colombia.

01-85) utilizada en el Grupo de Inmunología del Instituto Nacional de Salud para la preparación de candina.

MEDIOS DE CULTIVO: Para la caracterización de la cepa se utilizaron los medios convencionales en Micología. Para la producción de los cultivos con fines de obtención del antígeno se utilizó Sabouraud Dextrosa Agar (Difco) (6).

ANTIGENO: Para la producción del antígeno se utilizó un disruptor celular de ultrasonido (Bronson Systems-Ultrasonics, inc Model W 225).

ELECTROFORESIS: Los análisis electroforéticos en acrilamida se realizaron en un sistema vertical (Pharmacia Fine Chemicals GE 2/4 LS).

PRUEBAS EXPERIMENTALES: Para la evaluación de los antígenos se utilizaron curies machos del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

VOLUNTARIOS: Para la evaluación "in vivo" de los antígenos se realizaron pruebas intracutáneas en voluntarios en quienes igualmente se les estudió la transformación blástica "in vitro".

PRUEBAS DE BLASTOGENOSIS: La blastogénesis fue medida mediante la incorporación de timidina tritiada H₃ + (Amersham international plc, Buckinghamshire England HP 7 9 LL) y las mediciones fueron realizadas en un equipo de centelleo (LKB 1217 Rack beta).

La cepa de *C. albicans* fue cultivada en Sabouraud líquido e incubada a 37°C por 18 horas, luego de comprobar su crecimiento y pureza se estudió su comportamiento bioquímico; comprobado éste, la cepa fue cultivada en Agar Sabouraud en tubo inclinado para mantenerse para su utilización posterior.

La producción de antígeno se hizo cultivando *C. albicans* sobre Sabouraud dextrosa agar en cajas de Petri, luego de la incubación y comprobación de un buen crecimiento, la masa celular fue recolectada usando asa de Drigalski y solución salina tampón pH 7.2. La masa celular fue colectada asépticamente en frascos estériles en cámara de flujo laminar, luego de la colección total la pureza de los cultivos fue estudiada

por examen directo y coloración de Gram y cultivo para comprobar cualquier contaminación. La masa celular fue lavada con solución salina estéril por cuatro veces, mediante centrifugación a 5000 g por 20 minutos cada vez, utilizando para ello una centrífuga refrigerada de alta velocidad (Beckman Modelo J2-21). La masa final fue suspendida en solución salina tamponada estéril dando una concentración aproximada equivalente al tubo No. 10 de la escala de Mac Farland. Esta masa celular fue sometida a un proceso de disrupción celular por ultrasonido utilizando para ello el sonicador y un sistema de ciclos de 3x3; para evitar el calentamiento se tuvo el particular cuidado de realizar el procedimiento refrigerando la muestra con hielo, el porcentaje de disrupción se estimó a intervalos de 30 minutos por medio de extendido y coloración de Gram, considerándose completo, cuando menos de 5 células por campo se podían reconocer íntegras.

Una vez que el proceso de disrupción celular se consideró completo el material fue sometido a centrifugación refrigerada en una centrífuga de alta velocidad y luego de 20 minutos se colectó el sobrenadante y se sometió a delipidación mezclando volúmenes iguales de sobrenadante y éter en un embudo de separación, colectándose la fase acuosa; este procedimiento se repitió por tres veces consecutivas, una vez concluido se sometió a diálisis contra solución salina buffer pH 7.2 por 48 horas al término de los cuales se determinó la concentración de proteínas por la microtécnica de Lowry (7). Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un sistema vertical, luego de 5 horas de corrido a 300 voltios y 70 m amperios, el gel fue coloreado con Azul de Coomassie para revelar las bandas de separación y compararlas con los estándares para determinar el peso molecular de las distintas fracciones. Posteriormente se colorearon con un procedimiento de plata y se procedió a tomar fotografías para análisis posteriores. El material conteniendo proteína fue esterilizado por filtración con filtros millipore de 045 y 022 micras y guardado en frascos estériles a 4°C. Para las pruebas cutáneas en curí se utilizaron concentraciones de 200 mcg/0.1 ml, 50 mcg/0.1 ml y 10 mcg/0.1 ml, las cuales se inocularon en el dorso razurado de curies machos de 3-5 meses de edad, 0.1 ml de cada una de estas diluciones se inoculó con jeringa de 1 ml y aguja de 27, cada curí recibió además una inoculación de 0.1 ml solución salina estéril como control, las lecturas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas, leyéndose tanto

la presencia de eritema como la induración; de las reacciones positivas se tomó biopsia la cual fue remitida al laboratorio de patología para análisis.

Las pruebas intradérmicas en voluntarios se realizaron con la dilución óptima encontrada; para ello, se inoculó 01 ml de dicha dilución en la parte superior externa de la cara anterior del antebrazo, como control se inoculó 01 ml de solución salina estéril; las lecturas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas considerándose tanto el eritema como la pápula (8). Para las pruebas de blastogenesis se seleccionaron los voluntarios candidina positivos, a cada uno de ellos se les extrajo con una jeringa estéril 20 ml de sangre anticoagulada con heparina y se separaron los linfocitos sobre un gradiente de ficoll-hypaque. En algunos experimentos se utilizaron linfocitos puros retirando las células fagocitarias con hierro-carbámido e imán (9); en otras no se retiraron dichas células; una vez retiradas las células linfocitarias se procedió a lavarlas con medio de Click's (10) por 3 veces a 1.500 g por 10 minutos y luego de determinar su viabilidad con azul de Trypan se procedió a contarlas en cámara de recuento y ajustar su número a una concentración final de $2 \times 10^5/\text{mm}^3$ con medio de Click's (9).

Las células fueron cultivadas en 3 microplatos de 96 pozos (Costar 3596 Cambridge MA 02139 USA) por ensayo, a cuyos pozos por, triplicado, se les había adicionado 100 ul de medio Click's, fitohemaglutinina y diferentes concentraciones de antígeno (25, 50, 100 y 200 mcg/001 ml) respectivamente.

Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂ y 95% de humedad durante 4, 6 y 8 días; 24 horas antes de cumplirse el período de incubación se adicionó 25 ul de timidina tritiada (Amersham 5 Ci/mmol) que corresponde a 05 mCi por pozo. Al finalizar el período de incubación, los linfocitos fueron cosechados de los pozos de las microplacas y transferidos a filtros de fibra de vidrio y lavados con agua destilada en un equipo semiautomático (Harvester Skatrom As-401 Lier Norway). Los discos de fibra de vidrio fueron secados a 150°C por 30 minutos y colocados en frascos (Wheaton) a los cuales posteriormente se les adicionó 5 ml de coctel de centelleo y se leyó la radioactividad en el contador beta a temperatura ambiente con intervalos de 60 segundos (11).

Para la realización de los cálculos se tuvo en cuenta el promedio de las cuentas por minuto emitidas en cada uno de los pozos, determinación que fue hecha por triplicado.

RESULTADOS

La producción del Antígeno no confronta mayores dificultades obteniéndose una cantidad apreciable, en términos de la cuantificación de Lowry esto fue determinado en mg/ml, el análisis electroforético en el gel de poliacrilamida muestra que la composición de éste antígeno es bastante compleja demostrándose más de 20 bandas de peso molecular que va desde 300000 a 10000 daltons observándose que la banda más aparente semicuantitativamente es la de menor peso molecular (Fig. 1). La demostración experimental de que estos antígenos estimulan la respuesta de hipersensibilidad retardada fue hecha al observar los resultados de la inoculación en el curi en los cuales fue muy aparente que con una inoculación de 200 mcg/01ml se producía una reacción de HR a las 24 horas que desaparecía gradualmente a las 72 horas, los estudios histopatológicos son demostrativos de un claro proceso de HR con acúmulo linfocitario y polimorfocitos dispersos, hallazgo consistente en todos los estudios realizados.

El número inoculado de voluntarios fue de 16 encontrándose respuesta positiva en 13 (81.25%) de ellos y 3 (18.75%) negativos. Dentro de los positivos fue muy notoria la exagerada reacción positiva de una paciente embarazada. (Fig.2).

En los estudios de blastogenesis se obtuvo en todos ellos una buena recuperación celular, pero fue consistente en todos ellos que "in vitro" el antígeno no estimula una transformación blástica de la población celular en estudio, hecho repetidamente comprobado en los experimentos realizados (Cuadro 1).

DISCUSION

Puesto que la candidina, un antígeno parcialmente purificado derivado de la *C. albicans*, se ha utilizado y recomendado en la evaluación inmunológica ya que casi la totalidad de las poblaciones del mundo se han expuesto a dicho antígeno, parece justificado por tal razón insistir y profundizar en la naturaleza de este fenómeno. La producción del antígeno tal como se realizó en el presente estudio no confronta mayores

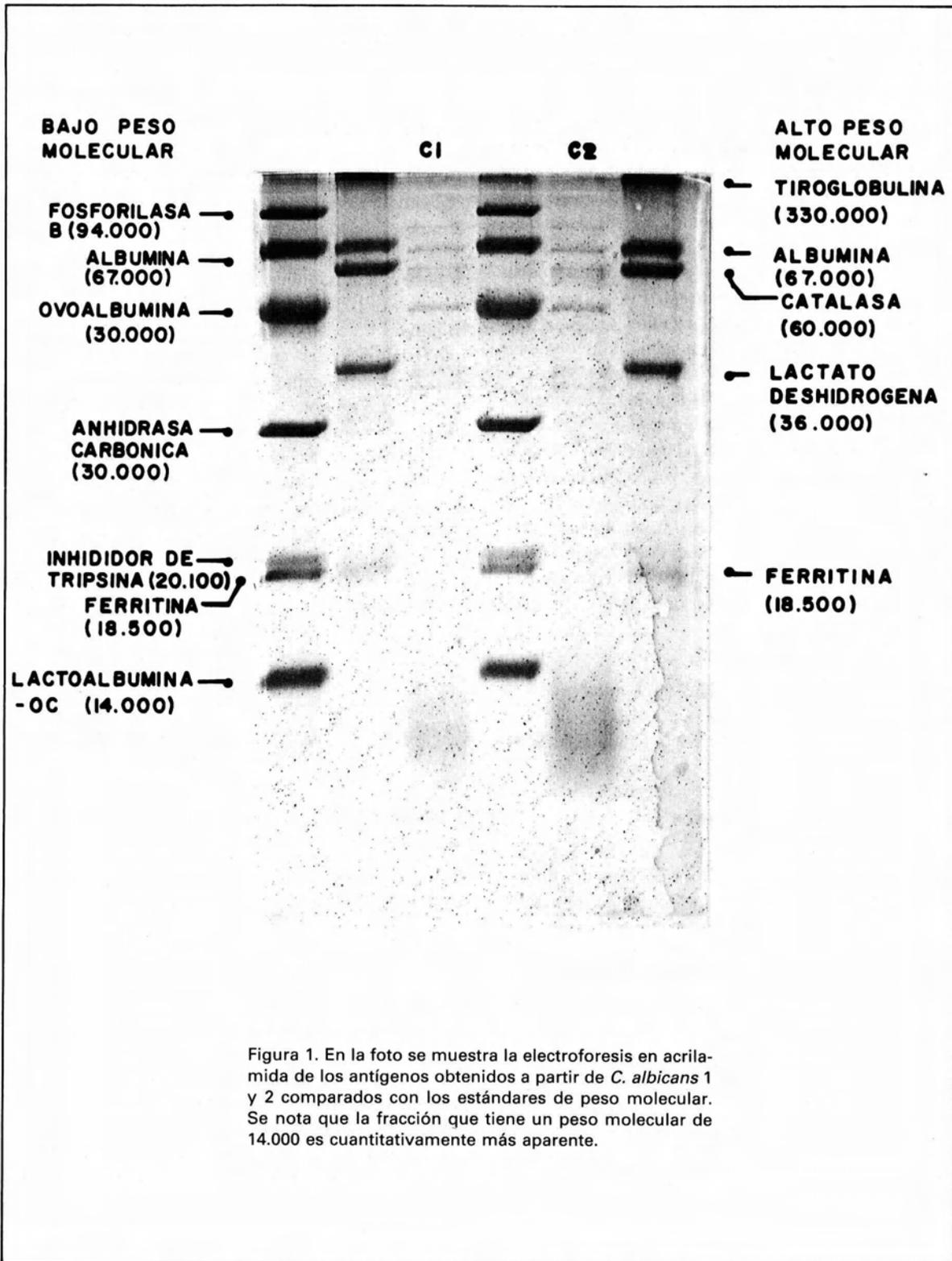


Figura 1. En la foto se muestra la electroforesis en acrilamida de los antígenos obtenidos a partir de *C. albicans* 1 y 2 comparados con los estándares de peso molecular. Se nota que la fracción que tiene un peso molecular de 14.000 es cuantitativamente más aparente.



Figura 2. Intradermorreacción positiva.

problemas pero el proceso de disrupción celular con ultrasonido es en definitiva inconveniente ya que es muy lento, necesiándose hasta 98 horas para obtener la disrupción del 95% de la masa celular. El análisis electroforético demuestra que el antígeno es en extremo complejo y que sería conveniente la purificación de las distintas bandas obtenidas para estudiarlas individualmente y determinar cuál o cuáles de ellas estimulan la reacción de HR y de esta manera utilizarla como antígeno.

Es claro que los experimentos "in vivo" realizados demuestran que el antígeno producido despierta la reacción de HR y que esta claramente demuestra la integridad de la respuesta celular mediada por linfocitos T, cómo ocurre este fenómeno? Para tratar de explicarlo se realizaron varios experimentos, en primer término se realizaron experimentos en los cuales se evitó remover las células fagocitarias postulando que ellas posiblemente eran necesarias para la presentación de los antígenos a las células linfocitarias; igualmente se realizaron experimentos con dosis muy bajas de antígeno para demostrar si la concentración usada presentaba toxicidad sobre las células; también se realizaron experimentos para demostrar que el antígeno no inactiva o neutraliza componentes del medio de cultivo para lo cual el medio fue mezclado con concentraciones de antígeno agregado a las células y estas estimuladas con fitohemaglutinina encontrándose que la respuesta blástica era igual a la obtenida en ausencia del antígeno.

3HT LECT	PHA	AG 1	AG 2	AG 3	AG 1 PHA	AG 2 PHA	AG 3 PHA
3/4	22858	554	86	55	24019	18482	63
5/6	4487	405	3141	247	6276	5570	11765
7/8	3187	390	1133	254	5351	2044	3195

CUADRO I RESULTADO PROMEDIO DE LOS ESTUDIOS DE TRANSFORMACION BLASTICA.

Algunos autores consideran que no es que el antígeno inoculado atraiga hacia él células e induzca una transformación blástica "in situ" sino que células ya específicamente instruidas en el reconocimiento del antígeno que van circulando eventualmente, pasa por allí reconocen el antígeno e inician el proceso de producción de interleukina-2 y expansión clonal de células CD8 (12, 13, 14 y 15); bien puede suceder que "in vivo" las células tomadas en el cultivo contengan apenas si un número muy escaso de células que reconozcan el antígeno y no sean suficientes para dar un fenómeno de transformación blástica. En conclusión bajo las estrictas condiciones experimentales del presente trabajo, se concluye que el fenómeno de HR "in vivo" no corre paralelo con el fenómeno de transformación blástica "in vitro", utilizando un antígeno parcialmente purificado de *C. albicans*.

SUMMARY

Using a partial purified antigen from *Candida albicans*, analysed by polyacrilamide gel electrophoresis, which probed to elicit a delayed type of hypersensitivity in guinea pigs noticed by induration 24 hours after the intradermal inoculation of 0.1 ml of the appropriate antigen dilution, phenomenon which disappears 72 hours later and which histopathological studies were in agreement with a delayed hypersensitivity type of reaction, candidine and blastogenesis studies were carried out; 13 out of 16 healthy volunteers tested showed a delayed hypersensitivity reaction, but the blastogenesis test of their lymphocytes cultures stimulated with the antigen and incubated with radioactive thymidine were consistently negative. These results seem to demonstrate that blastogenesis and delayed hypersensitivity are different phenomena to evaluate cell mediated immunity.

BIBLIOGRAFIA

1. Guzmán M, Iriondo M. Las pruebas cutáneas en la evaluación inmunológica. Serie de Notas e Informes Técnicos No. 15 1987. Instituto Nacional de Salud, Bogotá.
2. Bloom BR. In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions. Adv Immunol 1971; 13:101.
3. Dvorak HF, Mihm MC, Dvorak AM, et al. Morphology of delayed type hypersensitivity reaction in man. I-Quantitative description of the inflammatory response. Labor Invest 1974; 31:111.
4. Gange JM, Swanson-Beck J, Harper E, et al. The effect of exposure of hospital employees to patients with tuberculosis on dermal reactivity to four new tuberculins. Tubercle 1986; 67: 109.
5. Guzmán M, Villanueva A, Bernal M. Las pruebas intradérmicas de evaluación de competencia celular. Estudio comparativo entre antígenos clásicos y otros antígenos. Biomédica 1982; 2:177.
6. Ponton J, Quindos G, Regulez P, et al. Cellular and humoral immune response to *Candida albicans* in subcutaneous infected mice. Micopathol 1985; 92: 11.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265.
8. Bates SE, Suen JY, Tranun BL. Immunological skin test and interpretation. A plea for uniformity. Cancer 1979; 43:2306.
9. Braley LM. Mitogen-induced response, in Selected Methods in Cellular Immunology, edited by Mishell BB, Shiigi SM. WR. Freeman Co. San Francisco 1980; pag 156.
10. Preparation and testing of reagents. Appendix A, in Selected Methods in cellular Immunology. Edited by Mishell BB, Shiigi SM. WR Freeman Co. San Francisco 1980; pag 454.
11. Kuntz MM, Innes JB, Weksler ME. Lymphocyte transformation induced by cells. IV-Human T-lymphocyte proliferation induced by autologous or allogeneic non-T. Lymphocytes J Exp Med 1976; 143:1042.
12. Platt JL, Grant BW, Eddy, et al. Immune cell populations in cutaneous delayed type hypersensitivity J Exp Med 1983; 158:1227.
13. Issekutz TB, Stolz JM, Meide P. Lymphocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity. The role of INF-Gamma. J Immunol 1988; 140: 2989.
14. McCluskey RT, Benacerraf B, McCluskey JW. Studies on the specificity of the cellular infiltrate in delayed hypersensitivity reactions. J Immunol 1963; 90: 466.
15. Shannon DC, Johnson G, Rosen FS, et al. Cellular reactivity to *Candida albicans* antigen. N Engl J Med 1966; 275: 690.