



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL POLISACARIDO
CAPSULAR DE Cryptococcus neoformans SEROTIPO**

CY D.

CALLA DE ORIGEN

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
MARIA DEL ROCIO GARRIDO GRANADOS
ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO**

DIRECTOR: M.V.Z. ENRIQUE SALAS TELLEZ

ASESOR: M. EN C. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.B. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Estudio de la estructura del polisacárido capsular de

Cryptococcus neoformans serotipo C y D".

que presenta la pasante Alma Lucila Núñez del Arco
con número de cuenta: 8857413-8 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
María del Rocío Garrido Granados

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de Abril de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Tonatiuh Cruz Sánchez

VOCAL M.V.Z. Enrique Sales Téllez

SECRETARIO M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera

PRIMER SUPLENTE M. en C. José Luis Arias Téllez

SEGUNDO SUPLENTE J.F.B. Carolina Segundo Zaragoza

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIDAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
PRESENTE.

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Estudio de la estructura del polisacárido capsular de
Cryptococcus neoformans serotino "A"

que presenta la pasante: Maria del Rocío Carrero
con número de cuenta: 3406578-8 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Alma Lucila Méndez del Arco

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de Abril de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Donatihu Cruz Sánchez

VOCAL M.V.Z. Enrique Salas Téllez

SECRETARIO M. en C. Stella Maris

PRIMER SUPLENTE M. en C. José Luis

SEGUNDO SUPLENTE M.F.B. Carolina

AGRADECIMIENTOS
Y
DEDICATORIAS

Dedico éste trabajo :

A la memoria de mi mamá, quien ha sido y será las más grande inspiración de mi vida.

A mis padres, con gratitud, cariño y respeto por todo lo que me han dado, y además, por el gran esfuerzo que hicieron para la realización de mi carrera.

A mis hermanos, Gerardo Mary y Gerardo Lovera por todo su apoyo, pero sobre todo por permanecer siempre unidos.

A mis sobrinos Fredy y Beto, porque con su inocencia logran hacer los momentos más agradables.

A mis tías Elisa y Gila, por la confianza, cariño y apoyo que me han otorgado.

A mis tíos Alicia y Heriberto, ya que con su valioso apoyo incondicional en todo momento, han colaborado para que un sueño se convierta en realidad.

A Jaime, por todo su cariño, apoyo, confianza y paciencia.

A todos, mil gracias.

- A L M A -

Dedico éste trabajo:

A mis padre Carmen y Genaro con todo mi amor y cariño, dandoles gracias por todo el apoyo que me han brindado. Y porque siempre he recibido de ellos cariño y comprensión.

Los quiero mucho.

A mis hermanos Genaro, Gerardo y Angeles por tolerarme en los momentos más difíciles y alentandome para seguir adelante.

Esperando compartan conmigo éste momento tan importante.

A mi tío Anastasio Garrido con todo micorazón y profundo respeto porque sé que dondequiera que se encuentre, él estaría orgulloso de mí.

A Ivonne e Isela por su amistad incondicional y por disfrutar juntas de momentos tan especiales para mí.

Y porque a pesar de tomar caminos diferentes nuestra amistad sigue siendo muy fuerte.

A todos, mil gracias

- R O C I O -

Agradecemos:

A la Unidad de Posgrado, por la ayuda brindada en el desarrollo de la parte experimental de éste trabajo.

Al M. en C. Enrique Angeles Anguiano, por su asesoramiento.

Al Profr. Marco Antonio Leiva Ramírez, por el asesoramiento en el uso del Difractómetro.

A la Q.F.B. Carolina Segundo Zaragoza, por su apoyo, asesoramiento y estímulo.

Al Ing. Ismael López, por el tiempo que desinteresadamente nos dedicó para concluir éste trabajo.

A la Srita. Maribel Porta O., por el sin fin de atenciones que siempre nos brindó.

Al Lic. Luis Talavera, por permitirnos ocupar un pequeño espacio de su área de trabajo.

A Alma Isela, Gisela, Lucia, Norma Herrera, Patricia Domínguez, Nery, Azucena y Rosa; por los momentos buenos y malos que compartimos juntas durante y después de nuestra estancia en la FES-Cuauhtlán.

A Antonio Medina Clorio, por su amistad, apoyo, y palabras de aliento que siempre tenía para nosotras.

A NUESTRO DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z. ENRIQUE SALAS TELLEZ.

*Con afecto, admiración y respeto
le manifestamos nuestro agradecimiento
por su buena disposición, responsabilidad
y eficiencia que demostró durante
la dirección de éste trabajo.*

Gracias

- ALMA Y ROCIO -

Gracias a Rocío Garrido Granados, por permitirme compartir contigo la culminación en la vida de un estudiante, su titulación.

***Gracias a Alma Lucila, porque a tu lado he aprendido lo que es la verdadera amistad, ya que a pesar de que hemos compartido momentos buenos y malos a lo largo de éste tiempo nuestra amistad no se ha visto afectada.
Gracias por ser como eres y principalmente por mí AMIGA.***

I N D I C E

	Páginas
RESUMEN	
1 INTRODUCCION	1
1.1 Morfología.	2
1.2 Patogénea de <i>C. neoformans</i>	6
1.3 Inmunología	8
1.4 Diagnóstico	11
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Generales	16
2.2 Objetivos Especificos	16
3 JUSTIFICACION	17
4 MATERIAL Y METODOS	19
4.1 Cepas	21
4.2 Medio de SDA-Cloranfenicol-Gentamicina	21
4.3 Tinción con Tinta China	22
4.4 Medio de Niger	22
4.5 Medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol	23
4.6 Prueba de la Inhibición de la Ureasa por EDTA	25
4.6 Cinética de crecimiento de <i>C. neoformans</i>	27
4.7 Crecimiento de la cápsula de <i>C. neoformans</i> serotipos C y D.	28
4.8 Obtención del polisacárido capsular	29
4.9 Análisis de rayos X del polisacárido capsular	30
5 RESULTADOS	35
5.1 Cinética de crecimiento de <i>C. neoformans</i>	36
5.2 Crecimiento de la cápsula de <i>C. neoformans</i> serotipos C y D	38
5.3 Obtención del polisacárido capsular de <i>C. neoformans</i> serotipos C y D	38
5.4 Análisis de rayos X del polisacárido capsular de <i>C. neoformans</i> serotipos C y D	38
6 DISCUSION	43
7 CONCLUSIONES	46
8 BIBLIOGRAFIA	48

RESUMEN

Con el método de Glutamina-Glicina-Asparagina se logró aumentar el tamaño de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*, y con esto la posibilidad de obtener mayor cantidad de polisacárido capsular.

Se desarrolló un método de precipitación rápido, eficiente y de bajo costo para la obtención del polisacárido capsular, empleando etanol purificado-destilado y acetato de etilo (39:1). Del método propuesto se obtuvo 0.71 g de precipitado de un volumen total de 130 ml, en el caso del serotipo D, para el serotipo C se obtuvieron 0.75 g a partir del mismo volumen. Estos volúmenes fueron obtenidos después de la centrifugación y el dializado; lo cual indica que el rendimiento es adecuado.

Se comprobó por medio de una reacción inmunológica con el paquete diagnóstico Crypto-Látex-Test que el precipitado obtenido mostró una excelente reacción de aglutinación equiparada al control positivo, lo que indica que es reconocido como el antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans*.

El polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* fué analizado mediante el método de rayos X, observándose diferencias entre los serotipos C y D; lo que puede auxiliar en la identificación de estos serotipos.

1 INTRODUCCION

1.1 MORFOLOGIA.

1.2 PATOGENIA DE *C. neoformans*.

1.3 INMUNOLOGIA.

1.4 DIAGNOSTICO.

La criptococosis conocida también como "Blastomicosis Europea" (Enfermedad de Busse-Buschke o meningitis torular) es una enfermedad que afecta tanto al hombre como a los animales, puede ser subaguda a aguda o crónica, con manifestaciones pulmonar, meningítica o sistémica, que se inicia por la inhalación de basidiosporas o levaduras de *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) (1).

1.1 Morfología.

C. neoformans es una levadura que presenta la misma morfología tanto en estado parasitario como vegetativo, es decir no es dimórfico.

Al microscopio se observa como un hongo levaduriforme, capsulado que llega a medir de 15 a 20 micrómetros (μm) de diámetro con gemas (algunas levaduras) de la mitad de su tamaño, el resto lo forma la cápsula que en ocasiones llega a medir hasta 3 veces el tamaño de la levadura, en la Figura 1 se aprecia dicha morfología. La formación de una cápsula grande es una característica de *C. neoformans* cuando se desarrolla en los tejidos y bajo condiciones adecuadas de cultivo; debe señalarse que diversas especies del género *Cryptococcus* (apatógenas) también producen cápsula. En los medios de cultivo y en resiembras posteriores, la cápsula tiende a reducirse o incluso a desaparecer(4),(8).

El género *Cryptococcus* es caracterizado por tener una estructura en forma de globo o elongación de células, éstas células se reproducen por gemación. La pseudohifa está ausente o rudimentaria. Kwon-Chung demostró la producción de basidiosporas y conexiones de pinza o "clamp" en la hifa fertilizada para el estado perfecto de la levadura. A *C. neoformans* se le han encontrado dos estados perfectos o telemórficos que corresponden a basidiosporas y se les denomina *Filobasidiella neoformans*. En

su estado asexual las blastosporas son producidas a partir de la célula madre o a través de un poro estrecho. Las blastosporas miden de 4 a 20 μm , la cápsula mide de 1 a 2 μm en cultivo, pero puede variar hasta por arriba de 4 μm (23).

En el medio Agar Dextrosa Saboraud (SDA) los cultivos son generalmente mucoides, producen pigmentos carotenoides anaranjados, rojos o amarillos, pero las colonias jóvenes son usualmente no pigmentadas y tienen un color crema (15). El crecimiento diferencial de *C. neoformans* en el medio de Niger se ha usado como una prueba para su identificación, ya que es la única levadura de su género que cuando se siembra en medio de semilla Niger (*Guizotia abyssinica*) genera pigmentos de color café-marrón, debido a que transforma el ácido cafeínico que contiene la semilla en un compuesto polimérico de estructura química similar a la melanina (28), (32).

Existen otras especies no patógenas dentro del género *Cryptococcus* las cuales son: *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, *C. terreus* y *C. uniguttulatus*; la única patógena para el hombre es *C. neoformans*. En sus dos variedades: *neoformans* y *gattii* atribuyéndose a la cápsula su patogenicidad (3), (23), (32). Características como presencia de cápsula, forma de célula, aspecto de la colonia, producción de ureasa, asimilación de nitratos, fermentación y asimilación de carbohidratos, sirven para diferenciar el género *Cryptococcus* de otras levaduras patógenas (8).

C. neoformans presenta dos variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii*.

Estas dos especies presentan variabilidad antigénica y cuatro serotipos (A, B, C y D); perteneciendo los serotipos A y D a *C. neoformans* var. *neoformans*, en tanto que B y C a *C. neoformans* var. *gattii*, encontrándose diferencias importantes entre estos. Para los cuatro serotipos existe variación geográfica en su distribución, teniéndose que

mientras el serotipo A está extendido en todo el mundo, el serotipo D es raro en Estados Unidos, pero común en Europa. Los serotipos B y C parecen restringidos a ciertas zonas tropicales y subtropicales, aunque pueden localizarse en zonas geográficas más amplias como en Europa y el sur de Australia (15).

En 1950 Emmons encontró una relación ecológica entre *C. neoformans* var. *neoformans* y las heces de paloma; ésta relación se debe a que la levadura es capaz de utilizar la creatinina como fuente de nitrógeno a diferencia de otros miembros del género *Cryptococcus*. Las palomas no funcionan como reservorio sino como acarreadores mecánicos del hongo y no padecen la enfermedad porque su temperatura corporal es elevada (17), (28). *C. neoformans* var. *gattii* se ha encontrado en asociación específica ecológica con *Eucalyptus camalendulensis* y *Eucalyptus tereticornis* (16).

Bulmer y cols. descubrieron algunos factores que ayudan a sobrevivir a *C. neoformans* en el medio ambiente, las condiciones son: alcalinidad, suelo suave, obscuridad y humedad moderada, la adición de excremento de paloma al suelo provee la alcalinidad y los nutrientes, especialmente creatinina favorable para la multiplicación y prolongación de la sobrevivencia de la levadura, además es capaz de resistir calor y clima seco. Bajo estas condiciones las levaduras disminuyen su tamaño progresivamente y la cápsula apenas es evidente, en ocasiones su diámetro puede ser menor de 2 μm (7).

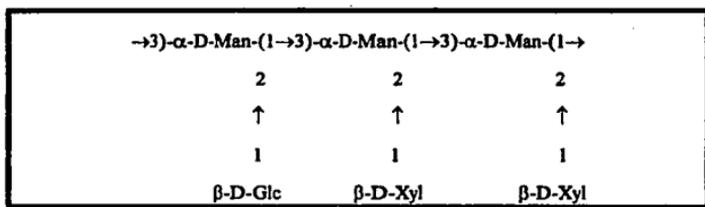
La envoltura celular de *C. neoformans* esta compuesta por lo siguiente:

Una pared celular rígida, constituida principalmente de glucanas, un polisacárido capsular reponsible directo de la diferenciación en serotipos, el cual esta formado por: glucuronoxilomanana (GXM) compuesta de manosa (Man), xilosa (Xil), ácido glucurónico (Glc) y O-acetilto y un mínimo de dos antígenos menores (carbohidratos), galactoxilomanana (GalXM) y manoproteínas (MP). GXM es un polisacárido viscoso

el cual constituye aproximadamente el 88% de la masa capsular, esta compuesto de enlaces -1,3- α -D-manana sustituidos por enlaces sencillos -1,2-D-xilosil y -1,2-D-ácido glucurónico. La proporción de los componentes en el serotipo A son xilosa:manosa:ácido glucurónico (2:5:1) (17).

La Figura 2 muestra un esquema de un octasacárido del serotipo A, que es la unidad repetitiva de GXM, polisacárido que compone la cápsula de *C. neoformans*.

FIGURA 2. OCTASACARIDO DEL SEROTIPO A.



Man: Manosa
 Glc: Acido glucurónico
 Xyl: Xilosa

(26)

GalXM y MP se encuentran en una cantidad de 12% en la masa capsular, GalXM ha sido caracterizado y esta constituido por glucosa:manosa:xilosa:ácido glucurónico en la siguiente proporción 1.9:1.8:1.0:0.2 y 2% de O-acetilos (11), (12). Cada uno de estos determinantes confiere propiedades fisicoquímicas distintivas para la superficie capsular. Existe una variación natural entre los serotipos de *Cryptococcus* en la cantidad de sustituyentes O-acetilo y xilosilo. La O-acetilación varía de 10 a 10.3% en

el serotipo D y 3% en el serotipo C; sin embargo, la sustitución de xilosilo varía en una proporción xilosa:manosa de 1:3 en el serotipo D y de 4:3 en el serotipo C (12).

El polisacárido capsular confiere varias propiedades fisicoquímicas a la superficie celular de la levadura, incluyendo una superficie cargada negativamente e hidrofílica. Kozeł en 1983, determinó si una superficie hidrofílica sería necesaria o suficiente para fagocitar a *C. neoformans*, los resultados obtenidos muestran que la característica antifagocítica de la cápsula permanece sin cambio, aún cuando se varíe la superficie hidrofílica de la célula. Los mismos investigadores al año siguiente estudiaron el efecto del pH en la producción de cápsula *in vitro* y su porcentaje de fagocitosis, encontrando que a un pH ligeramente ácido (pH de 5.0) independientemente del medio utilizado para crecer la levadura (sacarosa, dextrosa, fructuosa, manosa, etc.) la producción de cápsula disminuía, incluso hasta desaparecer y el porcentaje de fagocitosis se incrementaba notablemente (22).

1.2 Patogenia de *C. neoformans*.

La ingestión o implantación cutánea de *C. neoformans* puede conducir al desarrollo de la enfermedad sistémica diseminada, sin embargo, la mayoría de las infecciones se inician vía tracto respiratorio, por lo anterior, una de las áreas investigadas más a fondo acerca del mecanismo de patogenicidad ha sido el tamaño de la partícula infecciosa.

Para que el microorganismo penetre al organismo por los pulmones, es necesario que la partícula infecciosa sea compatible con la disposición pulmonar, células menores de 10 μm son lo suficientemente pequeñas para diseminarse por corrientes de aire y depositarse en los alveólos pulmonares, donde rápidamente sintetizan material capsular, de manera que la temperatura, la hidratación y la concentración de bióxido de carbono en los tejidos del pulmón favorecen la producción y tamaño de la cápsula

(11), (12). Así, el aerosol debe de estar compuesto por partículas menores de 10 μm de diámetro para lograr su llegada hasta el tejido pulmonar; partículas menores de 5 μm pueden llegar al tracto respiratorio bajo (21).

Las personas están frecuentemente expuestas a *C. neoformans* por la inhalación de células desecadas localizadas en el medio ambiente. La exposición natural raramente resulta en síntomas clínicos asociados con criptococosis, debido a que los mecanismos innatos de resistencia celular están presentes en el pulmón y son efectivos para controlar al invasor (12).

Existen diversos mecanismos bioquímicos de patogénesis los cuales han sido examinados, tal es el caso de la producción de ureasa por *C. neoformans* cuyo papel no ha sido aclarado dentro de la patogenicidad de la levadura, sin embargo, se sugiere que la ureasa induce la liberación de amoníaco, el cual puede inhibir la función del complemento del huésped y por lo tanto reducir sus defensas, facilitando el crecimiento del hongo. Otra característica de la levadura es que no puede emplear las proteínas séricas del humano; el microorganismo libera proteasas que activan la degradación del fibrinógeno humano *in vitro*, esto da lugar a que si la actividad de las proteasas ocurre *in vivo* puede explicar la carencia de fibrosis e hialinización alrededor de las lesiones criptococales (31).

En humanos, se han reconocido dos principales grupos afectados por *C. neoformans*:

A) Pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

La criptococosis ha surgido como la principal enfermedad oportunista en pacientes diagnosticados con SIDA. Esta es la cuarta infección más común que amenaza la vida de pacientes con SIDA después de *Pneumocystis carinii*, citomegalovirus, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*. Un 10% de los pacientes diagnosticados con SIDA sufren de criptococosis. Si la progresión de la enfermedad

no es controlada, entonces la diseminación a otros tejidos resulta ser un factor amenazante para la vida. La levadura tiene predilección por el Sistema Nervioso Central donde causa meningoencefalitis. Los pacientes con SIDA tienen una severa habilidad restringida para desarrollar inmunidad mediada por células. Este factor adicional en pacientes con SIDA marca una vulnerable particularidad para desarrollar criptococosis, porque la inmunidad mediada por células es un mecanismo primario para liberar a los pulmones de la levadura (12), (15).

B) Individuos aparentemente normales, donde es probable que existan defectos en las defensas del huésped que predisponen a la infección (29).

Aunque la criptococosis no ocurre en personas sanas, de otro modo por lo menos el 50% de pacientes con esta enfermedad tienen una condición de predisposición, como por ejemplo: enfermedad de Hodgkins, sarcoidosis, lupus, diabetes o pacientes inmunológicamente comprometidos por terapia con esteroides (15).

Ambos grupos pueden presentar diferentes manifestaciones clínicas de la criptococosis, las cuales no están enumeradas en orden de importancia:

- 1.- Pulmonar (criptococosis pulmonar benigna o crónica).
- 2.- Sistema Nervioso Central (criptococosis cerebral, la cual puede presentarse en forma meningítica, meningoencefálica o criptococoma).
- 3.- Dérmica o cutánea (criptococosis cutánea).
- 4.- Osea (criptococosis ósea).
- 5.- Visceral.

La mayoría de las criptococosis que se diagnostican son meningíneas (4), (18).

La Figura 3 nos muestra las diferentes manifestaciones clínicas de la criptococosis.

1.3 Inmunología.

El polisacárido capsular que rodea al *C. neoformans* inhibe la fagocitosis de la levadura por los macrófagos. La MP modula la reacción de hipersensibilidad

retardada, mientras que GalXM despierta un pequeña respuesta inmune. El papel de GalXM como un factor de virulencia no ha sido estudiado. Reconociéndose a GXM como el principal factor de patogenicidad (12).

Bulmer G.S. y Nhuan en 1967 estudiando la fagocitosis de *C. neoformans* por los leucocitos humanos, observaron que las cepas mutantes con poca cápsula eran fagocitadas de 70 a 80% por los leucocitos, pero una cepa con cápsula de mayor tamaño sólo era fagocitada en menos del 20%. En 1974, Neilson J.B. and cols. demostraron que el suero no se requería para fagocitar y englobar a las levaduras que eran muertas. Cuando se extrajo mieloperoxidasa de los leucocitos periféricos humanos se encontró que fué letal para *C. neoformans*. Así, parece que la mieloperoxidasa es un factor anticriptocócico importante (6).

Realizando investigaciones acerca de la vía de entrada de *C. neoformans* se ha descubierto lo siguiente.:

- Los macrófagos pulmonares engloban a las células no capsuladas de *C. neoformans*.
- El proceso de fagocitosis fué inhibido por material capsular criptocócico.
- Los macrófagos alveolares engloban a *C. neoformans*, pero no lo matan.
- Los macrófagos alveolares no contienen mieloperoxidasa.

Estos descubrimientos nos llevan a dudar acerca de la efectividad de los macrófagos alveolares como una primera barrera celular de defensa, es más importante una segunda barrera que dispone de ellos por la vía capa mucociliar en el tracto respiratorio, o un secuestro en el pulmón así se induce a un estado de extasis. Si lo último es verdad es posible que las células de *C. neoformans* puedan recibir en estas lesiones de la pared por períodos prolongados. Se infiere que *C. neoformans* puede encontrarse en estado latente en muchos individuos sanos aparentemente. Más adelante, durante una fluctuación inmunológica, éstas células pueden convertirse en un estado activo, su multiplicación y diseminación eventualmente resultan en un estado de

enfermedad (7). *C. neoformans* prolifera rápidamente sino existe una adecuada defensa celular, en especial células mononucleares (linfocitos, histiocitos, etc.); si el proceso infeccioso no se detiene, los microorganismos se diseminan fácilmente por vía linfática y hematogena con gran predilección hacia el Sistema Nervioso Central (SNC), en donde el líquido cefalorraquídeo es además deficiente en un factor fungicida denominado factor anticriptocócico, y sin embargo existe la presencia de sustancias que estimulan el crecimiento como la asparagina y creatinina. La entrada de la levadura a SNC es vía transporte activo, realizado por "bombas" proteicas en la membrana celular, atravesando así la barrera hematoencefálica. En SNC las lesiones se desarrollan en las meninges y afectan los nervios craneales, tallo cerebral y cerebelo (4).

Al menos dos mecanismos pueden ser propuestos para explicar la inhibición de la fagocitosis por el polisacárido criptocócico:

- 1.- El material capsular puede, por su propia presencia física alrededor de la levadura, prevenir una interacción efectiva entre *Cryptococcus* y la célula fagocítica, o bien el material capsular puede agotar componentes séricos necesarios para la fagocitosis.
- 2.- El polisacárido criptocócico ha demostrado inactivar a la properdina, y consume los últimos componentes del complemento, cuando se encuentra dicho polisacárido en altas concentraciones (13).

Otros investigadores estudiaron la fagocitosis de *Cryptococcus* cultivados a pH bajo para eliminar la formación de cápsula. Encontraron que el polisacárido criptocócico no inhibe la fagocitosis de las células con poca cápsula. Los autores sugieren que las células con poca cápsula son más susceptibles al ataque, o bien, el tratamiento usado altera los receptores responsables de la unión del polisacárido antifagocítico (4).

1.4 Diagnóstico:

Para establecer el diagnóstico de ésta micosis primero se lleva a cabo un examen microscópico directo; no se debe fijar por calor las células de *C. neoformans* ya que se colapsan y aparecen teñidas erráticamente, por lo cual son irreconocibles, se prefiere el uso de tinta china (de color azul de preferencia) para poner en manifiesto la cápsula y diferenciarla (30).

Staib en 1962, observó que de las especies del género *Cryptococcus* sólo *C. neoformans* es capaz de asimilar purinacreatina y demostró que cuando ésta levadura se siembra en medio de semilla Niger (*Guizotia abyssinica*) genera pigmentos café-marrón, debido a que transforma el ácido cafeínico que contiene la semilla en un compuesto polimérico de estructura química similar a la melanina, adquiriendo la colonia un color café. Para llevar a cabo el aislamiento del hongo el material biológico se siembra por dilución en el medio selectivo de Niger, incubándose 48 horas a 37 C. Al desarrollarse las colonias se observan convexas, lisas, de bordes regulares de color café oscuro, con apariencia vidriosa y húmedas debido a la gran cantidad de material capsular presente (28), (32).

Existen métodos para la diferenciación de las variedades de *C. neoformans*, en base a diferencias bioquímicas existentes entre ellas.

- 1) El primer medio utilizado fué el CDB que contenía Creatinina-Dextrosa-Azul de Bromotimol como indicador de pH. El color inicial de éste medio es dorado. Las cepas de los serotipos B y C cambian su color alrededor de la colonia a azul oscuro en 24 horas como resultado de la acumulación de Amonio (26).
- 2) Un segundo medio, en base a la resistencia a bajas concentraciones de Ciclohexamida y asimilación de Glicina como única fuente de Carbono, éste medio contenía Ciclohexamida-Glicina-Rojo de Fenol como indicador de pH. Recientemente

Kwon-Chung, Polachek y Bennet implementaron otro medio, esta vez conteniendo L-Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (medio CGB). Se han elaborado medios restrictivos y específicos que permiten el aislamiento primario de *C. neoformans* de ambientes ampliamente contaminados tales como suelo, aire, nido de aves, los cuales pueden ser utilizados en el laboratorio para el aislamiento primario a partir de muestras clínicas no estériles, tal es el caso del medio de Níger (26).

3) Otro método utilizado para la identificación de variedades de *Cryptococcus* es el de Inhibición de la ureasa por EDTA, en el cual *C. neoformans* var. *gattii* da positiva esta prueba y esto sirve para diferenciar de la variedad *neoformans*, la cual es negativa a ésta prueba.

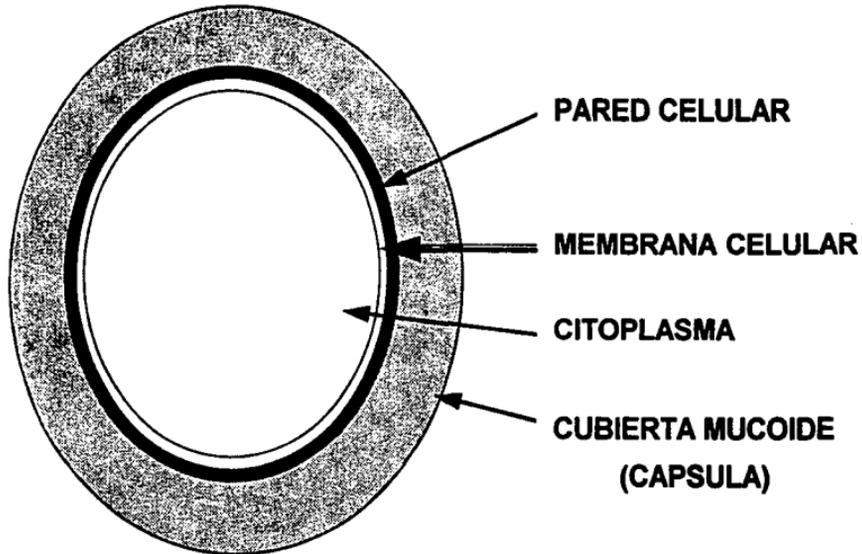
4) La prueba de D-Prolina la cual se basa en la habilidad que tiene *C. neoformans* var. *gattii* de utilizar a D-Prolina como única fuente de nitrógeno (15).

Para completar la identificación en el laboratorio de *C. neoformans* se deben realizar las pruebas de asimilación de nitratos y azúcares, fermentación de azúcares, así como la incapacidad del microorganismo para producir micelio

5) Con el fin de reconocer plenamente la patogenicidad de *C. neoformans* se puede llevar acabo la prueba de patogenicidad en ratón, debido a que es la única especie del género patógena para los animales y el hombre. Esta prueba se ha usado para el diagnóstico y consiste en inocular el sedimento de la centrifugación de líquido cefalorraquídeo (LCR) a ratones por vía intracerebral, pero se ha visto que en ocasiones el número de células viables en las muestras no produce tan rápidamente una enfermedad progresiva en ratón por lo que se prefiere realizar el aislamiento de la levadura para posteriormente realizar su patogenicidad mediante ésta prueba y en estos casos es de poco valor el uso de animales para el diagnóstico. Se sabe que el ratón blanco sucumbe a la inoculación intravenosa de *C. neoformans* en un tiempo aproximado de 2 semanas. Siguiendo el método de inoculación descrito anteriormente, se pueden encontrar lesiones tanto en bazo, hígado, pulmones y cerebro (28).

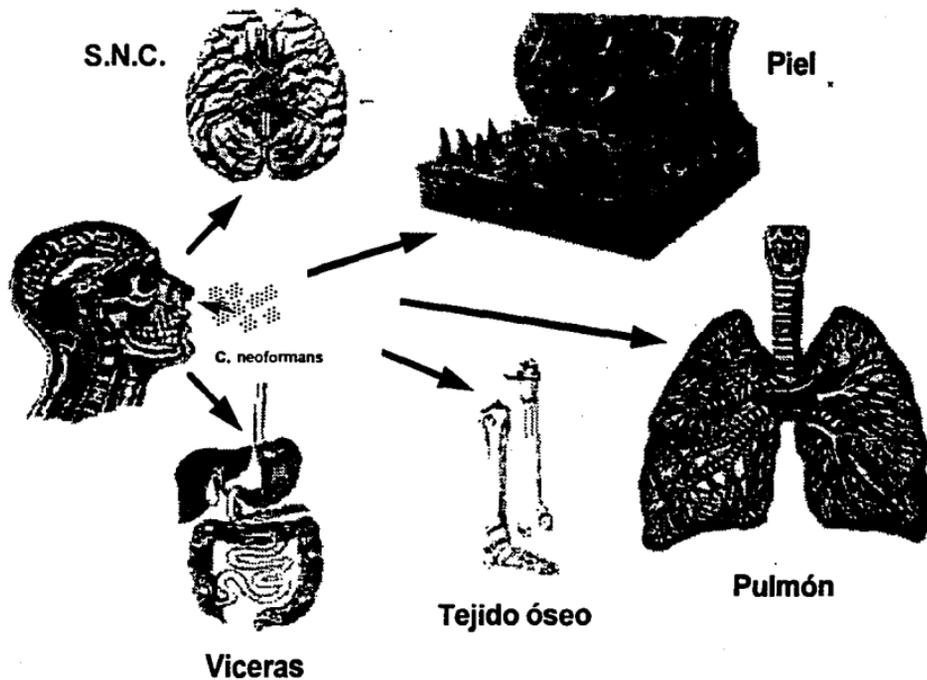
FIGURA 1

**CORTE ESQUEMATICO DE LA ESTRUCTURA
DE UNA LEVADURA**



Referencia (1)

FIGURA 3. CRIPTOCOCOSIS EN HUMANOS.



Referencia (4)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.1 OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Desarrollar un proceso tecnológico sencillo y de bajo costo para la obtención del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*, el cual permitirá conocer si existen o no diferencias en la composición molecular del polisacárido entre los serotipos C y D.
- 2.- Analizar mediante el método de rayos X la estructura del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* serotipos C y D.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1.- Identificación de las variedades de *Cryptococcus neoformans* mediante los siguientes métodos: Canavanina-Glicina-Azul de bromotímol (CGA) e inhibición de la ureasa por EDTA.
- 2.- Desarrollo en el medio de Glutamina-Glicina-Asparagina (GGA) para aumentar el crecimiento de la cápsula.
- 3.- Estandarización del método de precipitación de la cápsula.
- 4.- Estandarización del método de rayos X.

3 JUSTIFICACION.

Es importante conocer la estructura del polisacárido capsular de cada serotipo, ya que nos permitirá establecer diferencias importantes, las cuales ayudarán a diseñar metodologías específicas y sensibles para la identificación de cada uno de ellos.

Lo anterior permitirá conocer en un futuro cuales son los serotipos de *C. neoformans* que afectan en la República Mexicana.

4 MATERIAL Y METODOS.

4.1 CEPAS.

4.2 MEDIO DE SDA-CLORANFENICOL-GENTAMICINA.

4.3 TINCION CON TINTA CHINA.

4.4 MEDIO DE NIGER.

4.5 MEDIO DE CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL.

4.6 PRUEBA DE INHIBICION DE LA UREASA POR EDTA.

**PRUEBAS DE IDENTIFICACION PARA LOS SEROTIPOS C Y D
DE *C. neoformans*.**

Cepas de *C. neoformans* serotipos C y D



Sembrar en medio de SDA-Cloranfenicol-Gentamicina y en medio de Niger



Prueba de tinción negativa (Tinta china)



Crecimiento en medio de Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol



Prueba de inhibición de la ureasa por EDTA



Cinética de crecimiento



Crecimiento de la cápsula



Obtención del polisacárido capsular

PRUEBAS DE IDENTIFICACION PARA *C. neoformans* var. *gatti* y var. *neoformans*.

4.1 Cepas:

Se utilizaron cepas de *C. neoformans* var. *gatti* y var. *neoformans* donadas por el laboratorio de Micología Médica de la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

A partir de las células crecidas en el medio de SDA-Cloranfenicol-Gentamicina, se realizó el aislamiento de la levadura en medio de Níger; posteriormente se identificaron las variedades *gattii* y *neoformans* de *Cryptococcus* con pruebas de tinción con tinta china, inhibición de la ureasa por EDTA, crecimiento en el medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol.

4.2 Medio de SDA-Cloranfenicol-Gentamicina.

Preparación del medio:

Agar SDA	65 gr.
Cloranfenicol	250 mg.
Gentamicina (40mg / ml)	0.65 ml.
Agua destilada	1000 ml.

Se mezclan todos los ingredientes excepto la gentamicina en 100 ml. de agua, se hierve el agua restante y se adicionan los ingredientes restantes llevando a hervor para disolver completamente, se esteriliza en autoclave a 121 C por 10 min.

Se vacía a cajas de Petri estériles y dejar 24 hrs. a 37 C para prueba de esterilidad.

Interpretación:

La apariencia macroscópica de *Cryptococcus neoformans* (ambas variedades) se observa como colonias color crema, lisas y mucoides.

4.3 Tinción con tinta china.

El examen microscópico directo se debe realizar sin fijar la muestra con calor, ya que la levadura se colapsa y se tiñe erróneamente. Se recomienda el uso de tinta china color azul para una mejor apreciación de la cápsula.

En un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado se coloca una gota de tinta china color azul, con una asa bacteriológica previamente esterilizada a fuego directo, se toma una pequeña muestra de la colonia aislada que se desea observar; inmediatamente después se coloca un cubreobjetos sobre la muestra y se observa al microscopio. Inicialmente se enfoca con el objetivo de 10X y para una mejor apreciación se utiliza el objetivo de 40X.

Interpretación:

Al microscopio, las células de *C. neoformans* se observan de forma esférica y con cápsula alrededor, algunas pueden presentar gemación, o bien estar en forma agrupada; se revela la presencia de la cápsula, por un halo refringente.

4.4 Medio de Niger.

Fundamento: El crecimiento diferencial de *Cryptococcus neoformans* en el medio de Niger se ha usado como una prueba para su identificación, ya que es la única levadura

de su género capaz de asimilar la purina creatina que se encuentra en éstas semillas (Niger), produciendo un pigmento de color café oscuro.

Preparación del medio:

Semillas de <i>Guizotia abyssinica</i> (Niger)	50 gr.
Agar bacteriológico	15 gr.
Cloranfenicol	50 mg.
Agua destilada	1000 ml.

Se pulverizan las semillas de Niger en un mezclador eléctrico, posteriormente se ponen a hervir en baño maría por 25 minutos en 100 ml. de agua. Se filtra a la vez en gasa o papel, al filtrado se le adiciona 15 gr. de agar, llevando a un volumen de 1 lit. con agua destilada, se esteriliza con autoclave a 110 C por 25 min. y se enfría a 50 C para adicionar el cloranfenicol, el cual debe de estar disuelto en 10 ml. de alcohol absoluto. Se homogeniza y se sirve en cajas de petri estériles, dejando solidificar y sometiendo a prueba de esterilidad por 24 horas.

Interpretación:

El desarrollo de colonias convexas, lisas de bordes regulares de color café oscuro, con apariencia vidriosa y húmedas debido a la gran cantidad de material capsular presente.

4.5 Medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (GGA).

Fundamento: Este medio cuenta con Glicina como única fuente de Carbono y Nitrógeno y un análogo de la Arginina, la Canavanina como un inhibidor selectivo. Se adiciona azul de bromotimol al medio como indicador de pH.

Este medio permite la diferenciación de las variedades *neoformans* y *gattii*; ya que las cepas que corresponden a la var. *gattii* no son inhibidas por la Canavanina a diferencia de las cepas de la var. *neoformans* que si lo son.

Preparación del medio:

Solución A (Glicina y L-Canavanina)

Glicina	10 gr.
Fosfato ácido de potasio	1 gr.
Sulfato de magnesio	1 gr.
Solución vitaminada	1 gota.
Sulfato de L-Canavanina	30 mg.
Agua destilada	100 ml.

Solución de vitaminas: Esta solución puede ser reemplazada por 1 mg. de Tiamina-HCl. El pH final de la solución A se ajusta a 5,6 y la solución se filtra para esterilizarla.

Solución B (Solución del indicador): Solución acuosa de azul de bromotimol (0.4% peso-volumen):

Azul de bromotimol sódico	0,4 gr.
Agua destilada	100 ml.

Para 1 lt. de medio:

Agua destilada	880 ml.
Solución B	20 ml.
Agar bacteriológico	20 gr.

Se esteriliza en autoclave por 15 min. a 121 C. Cuando el agar se encuentra aproximadamente a 50 C se agregan 100 ml de la solución A y se mezclan, se sirven asépticamente en cajas de Petri.

Interpretación:

C. neoformans var. *neoformans* no presenta cambio en la coloración del medio, permaneciendo amarillo y no crece.

C. neoformans var. *gattii* presenta cambio en la coloración del medio, de amarillo a azul y crece.

4.5 PRUEBA DE INHIBICION DE LA UREASA POR EDTA.

Fundamento: Se emplea para diferenciar variedades; la variedad *gattii* muestra resultados positivos, observándose una coloración rojo magenta; mientras que la variedad *neoformans*, muestra resultados negativos permaneciendo con una coloración amarilla. Es importante que las lecturas se realicen antes de 4 horas, ya que pasado éste tiempo la variedad *neoformans* también vira el indicador, pasando de ser un resultado negativo a positivo.

Preparación de la prueba :

Urea	4.0 gr.
Extracto de levadura	0.02 gr.
Rojo de fenol	2.0 mg.
Fosfato ácido de potasio	0.273 gr.
Fosfato ácido de sodio	0.285 gr.
Agua destilada	100.0 ml.

Se disolvieron los ingredientes anteriores en los 100 ml. de agua destilada, esterilizando por filtración y ajustar a un pH de 6.8.

Antes del estudio las cepas son crecidas en medio de SDA por 48 horas a 30 C.

Tomar una asada de células obtenidas del cultivo de 48 hrs. y sembrar en tubos inclinados con medio YEPG y YEPG-EDTA 100 mM.

Preparación de los medios:

YEPG:

Extracto de levadura	3.0 gr.
Peptona	5.0 gr.
Glucosa	5.0 gr.
Agar bacteriológico	18.0 gr.
Agua destilada	1000.0 ml.

YEPG-EDTA:

Extracto de levadura	3.0 gr.
Peptona	5.0 gr.
Glucosa	5.0 gr.
EDTA	0.034 gr / lt.
Agar bacteriológico	18.0 gr.
Agua destilada	1000.0 ml.

Suspender en 2 ml. de solución salina fisiológica 0.9% células de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y var. *galli* ajustando a la concentración del estándar de

Mac Farland No. 2.

Agregar en un tubo 1 ml. del medio y adicionar 1 ml. de la suspensión anterior; colocar los tubos en baño maría a 37 C con agitación (40 oscilaciones por minuto).

Leer los tubos cada hora durante 4 horas leyendo inicialmente la suspensión antes de introducirla al baño, leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, solo en el caso de que la reacción sea dudosa.

Interpretación: Esta se lee cada hora durante 4 horas. La interpretación es la siguiente:

El color rojo magenta se considera una reacción positiva.

El color amarillo se considera una reacción negativa.

El color naranja se considera una reacción dudosa.

4.6 Cinética de crecimiento de *C. neoformans*.

El medio Glutamina-Glicina-Asparagina (GGA) se empleo para la realización de la cinética de crecimiento, el cual se prepara de la siguiente manera:

MEDIO GLUTAMINA-GLICINA-ASPARAGINA (GGA).**Preparación del medio:**

Glutamina	1.0 gr.
Glicina	1.0 gr.
Asparagina	1.0 gr.
Sulfato de magnesio	0.2 gr.

Cloruro de calcio	0.1 gr.
Fosfato ácido de sodio hidratado	1.0 gr.
Sulfato ferroso	0.1 gr.
Glucosa	10.0 gr.
Tiamina	0.001 gr.
Penicilina	800.000 U.I.

Se disuelve en 100 ml. de agua destilada y se esteriliza por filtración (poro de 0.22 μ). Mezclando lo anterior con 900 ml. de una solución conteniendo 6 gr. de Fosfato ácido de potasio previamente esterilizado a 121 C por 15 min. en autoclave, dejando a prueba de esterilidad durante 24 horas; y se agrega posteriormente la penicilina.

Metodología de la cinética de crecimiento:

Se preparó en un matraz Erlenmeyer de 1 lt. provisto de un sistema de fermentación conteniendo 500 ml. de medio GGA, el cual se dejó a prueba de esterilidad por 24 hrs. a 37 C. Posteriormente se le agregó al matraz células de *C. neoformans* suspendidas en 5 ml. de S.S.F. (Solución salina fisiológica) ajustando la suspensión con el estándar de Mac Farland No. 10, tomando del mismo 1 ml. de muestra (bajo condiciones de esterilidad) con el fin de medir la absorbancia inicial, incubando el matraz a 37 C con agitación y oxigenación continua, midiendo cada hora la absorbancia, terminando cuando estas permanecieron constantes, es decir cuando alcanza la fase estacionaria. Ver Figura 4.

Las lecturas de las absorbancias se realizaron en un Espectrofotómetro Beckman DU-64, a una longitud de onda de 550 nm.

4.7 Crecimiento de la cápsula de *C. neoformans* serotipos C y D.

Para cultivar las dos variedades de *C. neoformans* se utilizó el medio Glutamina-

Glicina-Asparagina (GGA), el cual provee a *C. neoformans* (ambas variedades) de un mayor tamaño de cápsula. (9).

Se preparó inicialmente un preinóculo en un matraz Erlenmeyer de 1 lt. el cual fué provisto de un sistema fermentador conteniendo 500 ml. del medio GGA, al cual se le agregó penicilina de 800,000 U. para evitar posible contaminación, se adicionó 5 ml. de S.S.F. donde fueron suspendidas las células de *C. neoformans* después de haber desarrollado un crecimiento en tubo con medio de SDA-Cloranfenicol, dicha suspensión se ajustó con el estándar de Mac Farland No. 10. Se dejó el preinóculo con agitación y oxigenación continua mediante el uso de una bomba de aire durante 48 hrs. a 37 C. Posteriormente el preinóculo se adicionó a un matraz erlenmeyer de 4 lt. provisto de un sistema fermentador similar al del preinóculo conteniendo 2,500 ml. del medio GGA, el cual contaba con las mismas condiciones de agitación y oxigenación que el preinóculo. Después de 96 hrs. de crecimiento el cultivo se inactivó con Formaldehído al 0.25% durante 24 hrs. Ver **Figura 5.**

Se removió la biomasa por medio de dos ciclos de centrifugación, el primero a 7,000 r.p.m. durante 40 min. en donde se descartó el sobrenadante. Inmediatamente después se resuspendió la pastilla con S.S.F. y se centrifugará nuevamente a 15000 r.p.m. por 30 min. para descartar la pastilla. Ver **Figura 6.**

4.8 Obtención del polisacárido capsular.

El sobrenadante, que contenía el polisacárido, fué dializado durante 4 horas con agua corriente y después 24 horas con agua destilada.

El sobrenadante dializado se colocó en un embudo de separación de 500 ml. y se realizaron tres extracciones con etanol puro y acetato de etilo (39:1) agitando vigorosamente y purgando a criterio, dejando reposar el embudo y quitando el tapón hasta observar la aparición del precipitado, se dejó secar completamente en una caja de Petri.

Posteriormente se suspendió el polisacárido en un buffer salino de Glicina 0.1 M y pH de 7.4, para corroborar con el paquete de Cripto-Látex-Test (Wampole Labs.) la presencia del polisacárido capsular. Después de que se disolvió completamente el polisacárido se colocó una gota de la suspensión en una placa de vidrio y se agregó una gota de reactivo del paquete diagnóstico, mezclándose ambos. También, con el fin de comparar la reacción producida por el polisacárido y el reactivo, se ocupó un control positivo y un control negativo (ambos preparados de la misma forma que el polisacárido). Una vez obtenidas las preparaciones se observaron al microscopio con el objetivo de 40 X para determinar la presencia o ausencia de la aglutinación según sea el caso.

4.9 Análisis de rayos X del polisacárido capsular.

El análisis de la estructura de un sólido suele llevarse a cabo por pruebas como rayos X y las espectroscopías (infrarroja, ultravioleta y fotoelectrónica), permitiendo así a las técnicas de rayos X, determinar parámetros tan importantes como la cristalinidad, el estado de agregación y el tamaño de las partículas metálicas.

Se ha convenido en llamar rayos X a la radiación electromagnética cuya longitud de onda es mayor a 0.1 y menor a 1000 Amstrong ($1 \text{ Amstrong} = 10^{-8}$).

La técnica de difracción de rayos X, puede aplicarse tanto al análisis cualitativo como cuantitativo de la muestra. Los electrones de los átomos ordenados en los cristales, desvían los rayos X originando protones de difracción a partir de los cuales se calculan los parámetros deseados. Así, la información proviene de la "masa" en su conjunto y las determinaciones correspondientes son por lo tanto, valores promediados dentro de ésta "masa" que constituye al sólido.

A través de ésta técnica es posible identificar los compuestos químicos que constituyen

la muestra, además de evaluar la porción relativa de dichos compuestos y estimar el tamaño de sus cristales.

Metodología de la prueba de rayos X:

Una vez obtenido el polisacárido se realizaron los análisis de rayos X en el Instituto de Investigación en Materiales de U.N.A.M. para conocer la estructura del polisacárido capsular.

Una pequeña cantidad de cada uno de los precipitados obtenidos previamente pulverizados en un mortero de agata fueron colocados en un porta- muestras de Aluminio; bajo las siguientes condiciones de experimentación en un Difractómetro SIEMENS D5000:

Angulo $2\theta = 3.000$ a 60.000 .

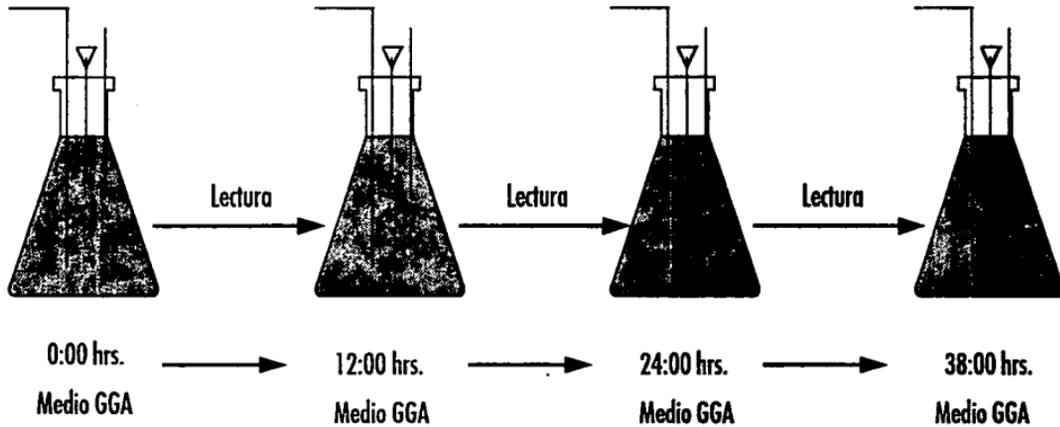
ss : 0.020 °/seg.

tm: 0.6.

ss: Ancho de paso de luz.

tm: Tiempo de paso de luz.

FIGURA 4. CINETICA DE CRECIMIENTO DEL PREINOCULO.

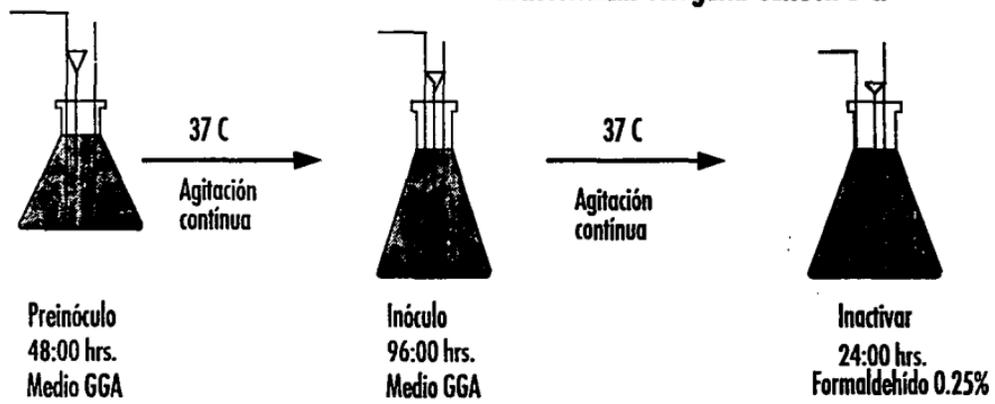


Medio GGA: Glutamina - Glicina - Asparagina.

Nota: Las lecturas de las absorbancias se realizaron cada hora.

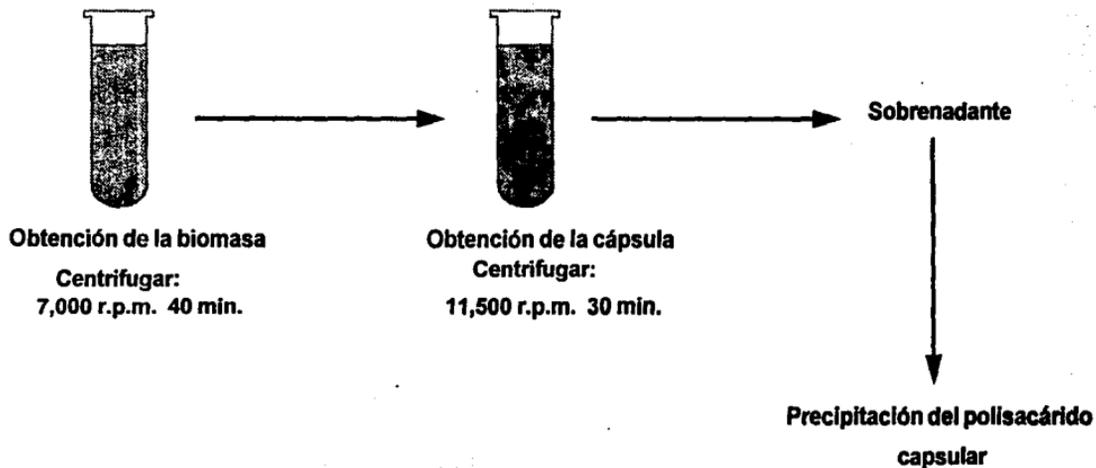
FIGURA 5. CRECIMIENTO DE LA CAPSULA DE *C. neoformans* var. *neoformans* SEROTIPO D.

Y
***C. neoformans* var. *gattii* SEROTIPO C.**



Medio GGA : Glutamina - Glicina - Asparagina

FIGURA 6. OBTENCION DEL POLISACARIDO.



5 RESULTADOS

5.1 CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CAPSULA DE *C. neoformans*.

5.2 CRECIMIENTO DE LA CAPSULA DE *C. neoformans* SEROTIPOS C Y D.

5.3 OBTENCION DEL POLISACARIDO CAPSULAR DE *C. neoformans* SEROTIPOS C Y D.

5.4 ANALISIS DE RAYOS X DEL PLISACARIDO CAPSULAR DE *C. neoformans* SEROTIPOS C Y D.

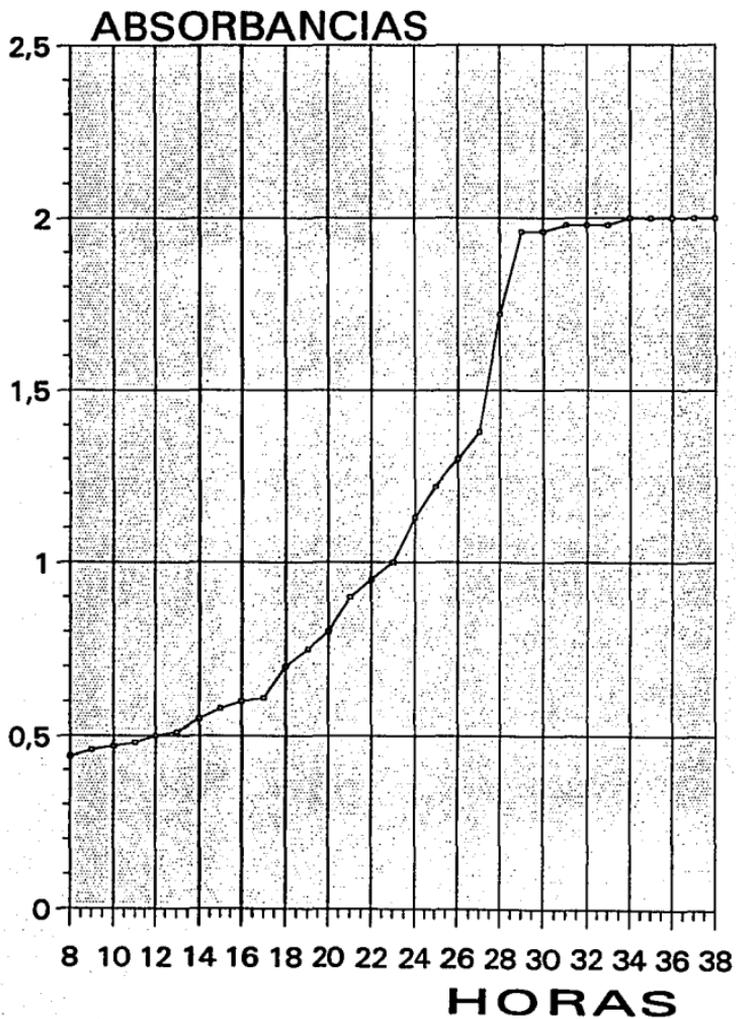
5.1 Cinética de crecimiento de *C. neoformans*.

El cuadro y la gráfica 1 muestran el comportamiento de *C. neoformans* durante la cinética de crecimiento, en donde se observa que a partir de las 30 horas la levadura alcanza su fase estacionaria.

CUADRO 1. RESULTADOS DE LAS ABSORBANCIAS DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL INOCULO DE *C. neoformans*.

TIEMPOS	ABSORBANCIAS
8:00	0.44
9:00	0.46
10:00	0.47
11:00	0.48
12:00	0.50
13:00	0.51
14:00	0.55
15:00	0.58
16:00	0.60
17:00	0.61
18:00	0.70
19:00	0.75
20:00	0.82
21:00	0.90
22:00	0.95
23:00	1.00
24:00	1.13
25:00	1.22
26:00	1.30
27:00	1.38
28:00	1.72
29:00	1.96
30:00	1.96
31:00	1.98
32:00	1.98
33:00	1.98
34:00	2.00
35:00	2.00
36:00	2.00
37:00	2.00
38:00	2.00

GRAFICA 1. CINETICA DE CRECIMIENTO DEL INOCULO



5.2 Crecimiento de la cápsula de *C. neoformans* serotipos C y D.

Al término de los seis días que duró la incubación (considerando preinóculo e inóculo) se observó un crecimiento notable de la cápsula, lo cual se confirmó al observar al microscopio una preparación con Tinta china, comparandola con otra a partir de medio SDA-Cloramfenicol-Gentamicina.

5.3 Obtención del polisacárido capsular de *C. neoformans* serotipos de C y D.

Se obtuvieron 0.71 gr. de precipitado de un volumen total de 130 ml, el cual se obtuvo después de la centrifugación, correspondiendo al serotipo D.

En el caso del serotipo C se obtuvieron 0.75 gr. de un volumen total de 130 ml., obtenido después de centrifugar.

Al ser enfrentada la suspensión del polisacárido contra el paquete de Crypto-Latex-Test la presencia de la aglutinación observada fué comparada con la reacción del control positivo , dando resultados similares. Ver Figura 7.

5.4 Análisis de rayos X del polisacárido capsular serotipos C y D.

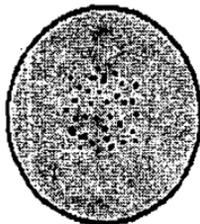
Las Figuras 8 y 9 muestran las intensidades relativas y ángulos 2θ de los perfiles de difracción por rayos X de los polisacáridos capsulares de *C. neoformans* de los serotipos C y D. Ver Cuadro 2.

CUADRO 2. RESULTADOS DE LAS DIFERENCIAS DE LOS DIFRACTOGRAMAS DEL ANGULO 2θ ASI COMO TAMBIEN DE LAS INTENSIDADES DE LOS SEROTIPOS C y D de *C. neoformans*.

INTENSIDADES (cps)	ANGULO 2θ
Serotipo C:10.96	22.00
11.18	23.20
25.04	30.50
43.79	31.50
17.23	44.50
5.78	57.50
Serotipo D:00.00	00.00
10.43	23.20
00.00	00.00
00.00	00.00
00.00	00.00
4.74	57.50

cps: Cuentas por segundo.

FIGURA 7. PRUEBA DE AGLUTINACION CON CRIPTO-LATEX-TEST PARA EL RECONOCIMIENTO DEL POLISACARIDO CAPSULAR



Control positivo



Control negativo

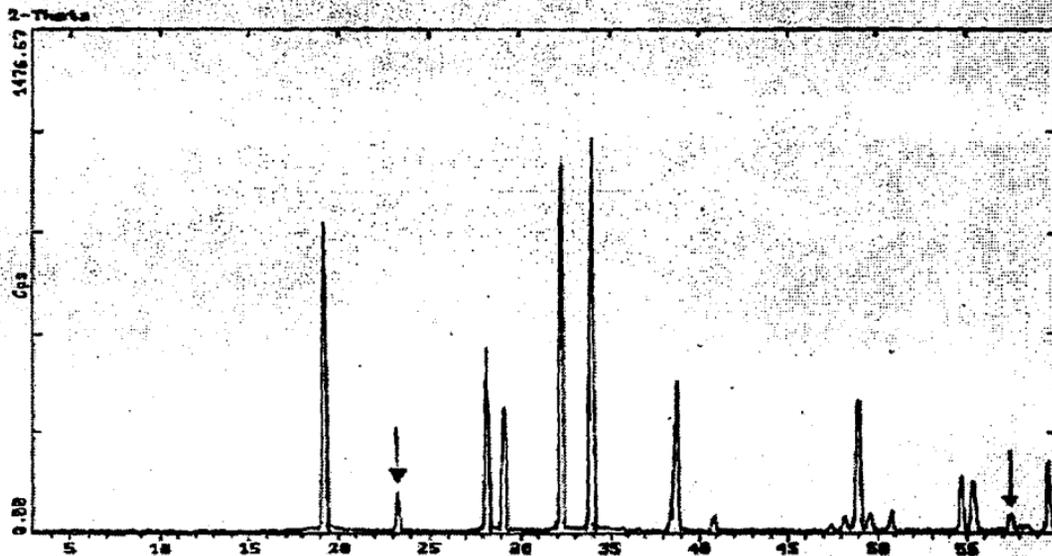


Problema

**Problema: Polisacárido capsular de *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo D.
Polisacárido capsular de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C.**

Control Positivo y Control negativo: Crypto-Latex-Test.

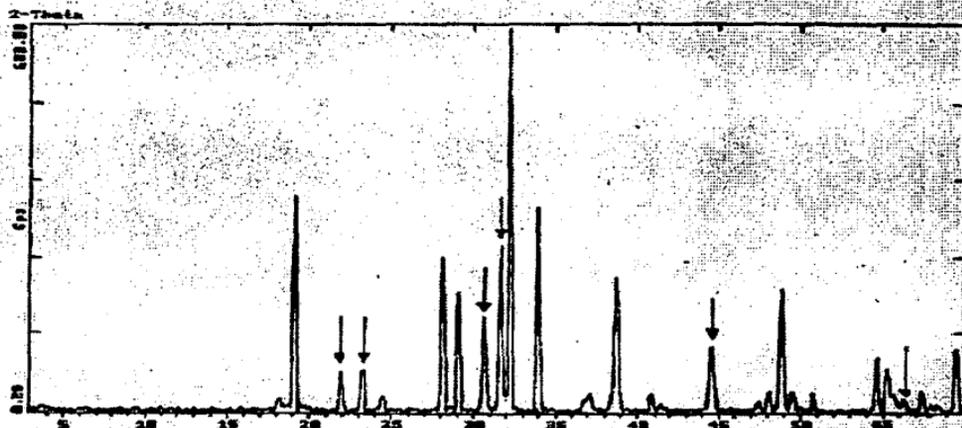
FIGURA 8. DIFRACTOGRAMA DE *C. neoformans* var. *neoformans* SEROTIPO D



→ Intensidades (cps) y ángulos 2 Theta que son diferentes con respecto al serotipo C de *C. neoformans* var. *gatti*.

cps: Cuentas por segundo.

FIGURA 9. DIFRACTOGRAMA DE *C. neoformans* var. *gattii* SEROTIPO C.



—▶ Intensidades (cps) y ángulos 2θ que son diferentes con respecto al serotipo D de *C. neoformans* var. *neoformans*.

cps: Cuentas por segundo.

6 DISCUSSION

El método empleado por Cherniak, y col., 1982 emplea tres diálisis, se requiere concentrar a presión reducida, el polisacárido se precipita con la adición de etanol, pero se requiere el uso de tres compuestos orgánicos para poder secar el polisacárido; con todo esto la metodología resulta más complicada y tardada.

Si recurrimos a datos en cuanto a cantidad de polisacárido obtenido, resulta que por cada tres litros de dializado, Cherniak y col. 1982 obtienen 0.78 g y en éste estudio se obtuvieron 0.71 g y 0.75 g para el serotipo D y serotipo C, respectivamente ambos con la misma cantidad de volumen. Con estos valores se observa que el rendimiento es similar al obtenido con la metodología propuesta por Cherniak; sin embargo, la propuesta en éste trabajo es más sencilla y rápida de realizar. El método actualmente propuesto facilita el dejar de emplear 2 diálisis, concentrar a presión reducida y el empleo de dos solventes, además de ser más rápido debido a que éste proceso no toma más de 36 horas.

El paquete diagnóstico de Crypto-Látex-test, nos permitió confirmar el reconocimiento de éste antígeno por medio de una reacción inmunológica, confirmándose que el precipitado obtenido dió una excelente reacción de aglutinación equiparada al control positivo.

Referente al análisis de rayos X se observan diferencias entre los difractogramas de cada serotipo, ya que los ángulos 2θ no son los mismos, pues mientras en un serotipo están presentes, en el otro son ausentes, o bien sus intensidades son pequeñas.

Lo anterior indica que el polisacárido de cada serotipo, en éste caso C y D tiene una composición diferente, como se muestra claramente en el Cuadro 2 ya que el análisis cualitativo de rayos X nos indica que existen diferencias en el arreglo molecular en la estructura del polisacárido capsular de *C. neoformans*.

7 CONCLUSIONES

Podemos decir que el método de precipitación con etanol absoluto y acetato de etilo, resulta ser rápido, eficiente y de fácil realización, por lo que puede recomendarse para obtener el polisacárido capsular de *C. neoformans*.

Cabe señalar que se estudiaron ambas variedades para determinar si entre ellas existían diferencias importantes las cuales marcarán las diferencias entre los serotipos C y D, razón por la cual se realizó el análisis de rayos X, no sin antes mencionar que es la primera vez que se realiza éste análisis en el polisacárido capsular de *C. neoformans*, señalando que sólo es un estudio preliminar, ya que la información que estos estudios proporcionan solamente es cualitativa, por lo tanto, se recomienda el uso de otros estudios que ayuden a establecer una diferenciación más detallada tanto en el aspecto cualitativo como cuantitativo; pues así se conocerá exactamente la conformación molecular que presentan los serotipos de las variedades de *C. neoformans* estudiados en éste trabajo.

8 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ajello, L. G.; Kaplan, K.L. and Kaufman, L. (1980). *Laboratory Manual for Medical Micrology*. U.S. Dept. of Health Education and Welfare. Public Health Service Atlanta Georgia. 13-20.
- 2.- Arnold, N. N. (1981). *Yeast cell envelopes: biochemistry biophysics, and ultrastructure*. CRC Press Raton, U.S.A.
- 3.- Bloomfield, N.; Gordon, M.A. and Elmendorf, D.F. (1963). Detection of *Cryptococcus neoformans* antigen in body fluids by latex particle agglutination. *Proc. Soc. Biol. Med.* 114:64-67.
- 4.- Bonifaz, A. (1990). *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez Cervantes. México D.F.
- 5.- Bosch, G., P.; Domínguez, J.M., . *Técnicas experimentales en la caracterización de catalizadores*. Instituto Mexicano del Petróleo.
- 6.- Bulmer, S.G.; Bunting, A.L. and Neilson, B. J. (1979). *Cryptococcus neoformans* gastronomic delight of a soil amoeba. *Saboraudia*. 17: 225-232.
- 7.- Bulmer S. G. and Nuhan T.D. (1977). Infectious particle of *Cryptococcus neoformans*. In *recent advances in med. and vet. mycology*. Ed. Kazuo Iwata Univ. Park Press Tokio. pp. 161-167.
- 8.- Campbell C.M.B.A. and Stewarth J.B.S. (1980). *The Medical Micrology Handbook*, U.S.A. 265-267.
- 9.- Chaskes, S. and Tyndall, R.L. (1975). Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para and ortho-Diphenols effect of the nitrogen source. *J. Clin. Microbiol.* 1:509-514.
- 10.- Cherniak, R.; Reiss, E. and Turner, S.H. (1982). A galactoxylomanannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Carbohydrate research*. 103:239-250.
- 11.- Cherniak, R.; Reiss, E.; Slodki, E.M.; Plattner, D.R. and Bulmer O. (1980). Structure and antigenic activity of capsular polisaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Molecular Immunology*. 17:1025-1032.
- 12.- Cherniak, R., James, P.G. (1992). Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 60:1084-1088.
- 13.- Diamond, D.R.; May, E.J.; Kan, A.M.; Frank, M.M. and Bennett, E.J. (1974). The role of the classical and alternative complement pathways in the host defenses against *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 112(6): 2260-2270.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 14.- Dufait, R., Velho, R., De Vroey. Rapid Identification of the Varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-Proline Assimilation. *Mycosen.* 30 (1). 483
- 15.- Ellis, D. H. (1994). Clinical Mycology The Human Opportunistic Mycoses. 1 rd edition. Australia.
- 16.- Ellis, D.H. and Pfeiffer, T.J. (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology.* 28:1642-1644.
- 17.- Emmons, C.W. (1950). Sources of *Cryptococcus neoformans* associated with pigeon (*Columba livia*). *Amer. J. Hyg.* 62:227-232.
- 18.- Emmons, W. Ch. H.; Utz, J.R. (1970), *Medical Mycology* . 3a. edition. pp.186-206.
- 19.- Graybill, J.R., Hague M. and Drutz D.J. (1981). Passive immunization in murine cryptococcosis. *Saboraudia*, 19:157-160.
- 20.- Hall, N.K. and Blackstock, R. (1981). Production of specific antibody to *Cryptococcus neoformans* by hybridomas *in vitro*. *Saboraudia* 6:162-167.
- 21.- Hatch, T.F. (1961). Distribution and deposition of inhaled particles in respiratori tract. *Bacteriol Rev.* 25:237-240.
- 22.- Kozel, R.T. (1983). Dissociation of a hidrophobic surface from phagocytosis of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity.* 39 (3):1214-1219.
- 23.- Kwong-Chung, K.J., Polacheck I. and Bennet, E.J. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Criptococcus neoformans* var *neoformans* (serotipes A and D) and *Criptococcus neoformans* var *gattii* (serotipes C and B). *J. Clin. Microb.* 15 (3): 535-537.
- 24.- Kwong-Chung, K.J. and Bennet, J.E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties of *Criptococcus neoformans*. *Am. J. Epid.* 120 (1):123-130.
- 25.- McManus, J.E. and Bozdech, J.M. (1983). Role of the latex agglutination test for cryptococcal antigen in diagnosis disseminated infections with *Trichosporum beigelli*. *The Journal of infection diseases.* 151 (6):1167-1168.
- 26.- Millán, C. Ma., L. (1994). Desarrollo de la prueba de aglutinación en látex contra el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. Tesis de Licenciatura, FES-Cuautitlán, U.N.A.M

- 27.- Muchmore, G.H., Scott N.E., Felton, G.F. and Fromtling, A.R. (1980). *Cryptococcus neoformans* serotype groups encountered in Oklahoma. *Am. J. Epidem.* 112(1): 32-38.
- 28.- Rendón, R. MA. C. J. (1986). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de paloma y gallina. Tesis de Licenciatura, Q.F.B. (1986). F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M.
- 29.- Rippon, J. W. (1988). *Medical Mycology*. 3 rd. edition. W.B. Sanders Co., Philadelphia, USA.
- 30.- Segundo, C. (1991). *Manual teórico práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de Méx. U.N.A.M.
- 31.- Smith, J. M. B. (1989). *Opportunistic mycoses of man and other animals*. CAB International, U.K.
- 32.- Staib, F. and Seibold, M. (1988). Mycological diagnostic assessment of efficacy of amphotericin B more flucitosine to control *Cryptococcus neoformans* in AIDS patients. *Mycoses*. 31 (4):175-186.
- 33.- Stockman, L. and Roberts, D.G. (1982). Specificity of the latex test for cryptococcal antigen: a rapid, simple method for eliminating interference factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 16(5):965-967.
- 34.- Tacker, J. R., F. Farhi, and G.S. Bulmer. (1972). Intracellular fate of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 6:162-167.