



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y
AMBIENTALES DEL GÉNERO *Cryptococcus* Y SU IDENTIFICACIÓN
MOLECULAR**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ALBA REBECA DE LA ROSA GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. MARÍA ELSA ESCUDERO GARCÍA
VOCAL: QFB. MISAEL GONZÁLEZ IBARRA
SECRETARIA: DRA. HAYDEE KERIMA TORRES GUERRERO
1er. SUPLENTE: QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
2° SUPLENTE: QFB. NORMA TREJO MEDINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICOLOGÍA BÁSICA, UNIDAD DE MEDICINA
EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. HAYDEE KERIMA TORRES GUERRERO

SUSTENTANTE (S):

ALBA REBECA DE LA ROSA GONZÁLEZ

ABREVIATURAS

| | | | |
|-------------------------|---|-------------|---|
| °C | Grados Celsius | min | minuto |
| µg | microgramo | mg | miligramo |
| µL | microlitro | MM | Medio mínimo |
| µm | micrómetro | mL | mililitro |
| ADS | Agar dextrosa de Sabouraud | MLST | Análisis de secuencias multi- <i>locus</i> |
| AFLP | Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica | MOPS | Acido 3-(N-norflino) propanosulfónico |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> | NCBI | Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i>) |
| BCG | Canavanina glicina azul de bromotimol | ng | nanogramo |
| cbp | Cuanto baste para | nm | nanómetro |
| Da | Dalton | pb | Pares de base |
| DNA | Acido Desoxirribonucleico | PCR | Reacción en Cadena de Polimerasa |
| dNTP's | Desoxirribonucleótidos tri-fosfato | pH | Potencial de iones hidrogeno |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético | RFLP | Polimorfismos de longitud de fragmentos de Restricción. |
| FQ | Facultad de Química | RNA | Ácido ribonucleico |
| g | gramo | RUH | Caldo Rápido de Urea |
| GXM | Glucoroxilomanana | SIDA | Síndrome Inmunodeficiencia Adquirida |
| GaXM | Galactoxilomanana | SL | Sabouraud Líquido |
| HEPES | ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico | SNC | Sistema Nervioso Central |
| h | hora | Tg | Tiempo de generación |
| HCl | Ácido clorhídrico | U | Unidad |
| KCl | Cloruro de potasio | UV | Ultravioleta |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo | var. | variedad |
| MIC | Concentración mínima inhibitoria | VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio | YPD | Agar extracto de levadura, dextrosa y peptona |
| mM | Milimolar | | |
| mm | Milimetro | | |

INDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| GÉNERO <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> | 1 |
| HÁBITAT Y EPIDEMIOLOGÍA..... | 2 |
| PATOGENESIS | 5 |
| CRIPTOCOCOSIS PULMONAR | 7 |
| CRIPTOCOCOSIS EN SISTEMA NERVIOSOS CENTRAL..... | 8 |
| FACTORES DE VIRULENCIA IDENTIFICADOS EN <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> | 9 |
| A. TERMOTOLERANCIA | 9 |
| B. CÁPSULA | 10 |
| C. MELANINA..... | 12 |
| D. UREASA..... | 14 |
| RESISTENCIA ANTIFÚNGICA | 15 |
| CICLO DE VIDA Y REPRODUCCIÓN..... | 16 |
| DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES..... | 19 |
| AGAR CANAVANINA GLICINA AZUL DE BROMOTIMOL..... | 19 |
| SEROTIPIFICACIÓN (REACCIONES DE AGLUTINACIÓN DE ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS DE SU CÁPSULA).. | 20 |
| MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE <i>C. NEOFORMANS</i> | 21 |
| GENOTIPIFICACIÓN | 24 |
| METODOLOGÍA | 29 |
| INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA | 29 |
| INDUCCIÓN DE CÁPSULA..... | 29 |
| INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELANINA | 30 |
| DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UREASA | 30 |
| IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LA ESPECIE <i>C. GATTII</i> | 30 |
| CARACTERIZACIÓN MOLECULAR..... | 31 |
| EXTRACCIÓN DE DNA | 31 |
| RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS..... | 32 |
| RESULTADOS | 33 |
| INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA | 33 |
| INDUCCIÓN DE CÁPSULA | 36 |
| DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UREASA | 39 |
| IDENTIFICACIÓN EN MEDIO L-CANAVANINA GLICINA AZUL DE BROMOTIMOL | 41 |
| IDENTIFICACIÓN MOLECULAR..... | 45 |
| DISCUSIÓN | 50 |
| CONCLUSIONES | 57 |
| REFERENCIAS | 58 |
| ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS | 66 |
| ANEXO 3. INDUCCIÓN DE CÁPSULA | 78 |
| ANEXO 4. MELANINA | 86 |

INDICE DE IMAGENES Y TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. TAXONOMÍA DEL COMPLEJO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> | 1 |
| IMAGEN 1. A. CÁPSULA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> EN TINTA CHINA (100X). B. COLONIAS EN AGAR DEXTROSA DE SABOURAUD Y C. EN AGAR ALPISTE NEGRO. | 2 |
| IMAGEN 2. FRECUENCIA DE ESPECIES DEL COMPLEJO <i>C. NEOFORMANS</i> | 3 |
| IMAGEN 3. PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>CRYPTOCOCCUS SP.</i> | 5 |
| (TOMADA DE LIN X., ET AL., 2006.) | 5 |
| IMAGEN 4. PROCESO DE FAGOCITOSIS DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> | 6 |
| IMAGEN 5. LESIONES NODULARES DE CRIPTOCOCOSIS PULMONAR. | 8 |
| (TOMADA RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F. ET AL, 2012) | 8 |
| IMAGEN 6. ESTRUCTURAS DE LOS COMPONENTES DE LA CÁPSULA. (A) GLUCOROXILOMANANA; (B) GALACTOXILOMANANA | 11 |
| IMAGEN 7. ESTRUCTURA DE CATECOLAMINAS (A) UTILIZADAS PARA GENERAR MELANINA (B). | 12 |
| IMAGEN 8. COLONIA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> EN MEDIO MÍNIMO, ADICIONADO CON L-DOPA | 13 |
| IMAGEN 9. PRUEBA DE UREASA. AMARILLO (NEGATIVO), ROSA (POSITIVA). | 14 |
| IMAGEN 10. CICLO DE VIDA Y REPRODUCCIÓN SEXUAL DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> | 18 |
| (TOMADA DE LIN X., ET AL., 2006) | 18 |
| IMAGEN 11. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS DE LAS ESPORAS DE A. <i>C. NEOFORMANS</i> (<i>FILOBASIDIELLA NEOFORMANS</i>) Y B. <i>C. GATTII</i> (<i>FILOBASIDIELLA BACILLISPORA</i>) | 19 |
| (TOMADA DE KWON-CHUNG K., 2006) | 19 |
| IMAGEN 12. AGAR CANAVANINA GLICINA AZUL DE BROMOTIMOL. A. DESARROLLO DE <i>C. GATTII</i> Y B. INCAPACIDAD DE CRECER EN ESTE MEDIO DE <i>C. NEOFORMANS</i> DESPUÉS DE 48H A 30°C. | 20 |
| IMAGEN 13. ESTRUCTURAS DEL GXM DE LOS SEROTIPOS DEL COMPLEJO <i>CRYPTOCOCCUS</i> . GLCPA, ÁCIDO GLUCOPIRANOSILURONICO; MANP, MANOPIRONANA; XYLP, XILOPIRANOSIL | 21 |
| IMAGEN 14. ESQUEMA GENERAL DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA | 22 |
| IMAGEN 15. ESQUEMA GENERAL DE LA TÉCNICA DE POLIMOSFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN | 23 |
| IMAGEN 16. CLASIFICACIÓN DEL COMPLEJO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> | 25 |
| (TOMADA DE LIN X., ET AL., 2006) | 25 |
| IMAGEN 17. PATRONES DE BANDAS OBTENIDOS POR AFLP UTILIZANDO EL CEBADOR ESPECÍFICO PARA EL MICROSATÉLITE M13. (TOMADO DE TRILLES L., 2008) | 26 |
| IMAGEN 18. PATRONES DE BANDAS OBTENIDOS POR RFLP DEL GEN <i>URA5</i> UTILIZANDO LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN <i>SAU96I</i> . (TOMADO DE TRILLES L., 2008) | 27 |

| | |
|---|----|
| IMAGEN 20. TIEMPOS DE GENERACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y CEPAS ATCC EN MEDIO YPD..... | 34 |
| IMAGEN 21: TIEMPOS DE GENERACIÓN DE AISLAMIENTOS AMBIENTALES Y CEPAS ATCC EN MEDIO SL..... | 35 |
| IMAGEN 22: TIEMPOS DE GENERACIÓN DE AISLAMIENTOS AMBIENTALES Y CEPAS ATCC EN MEDIO YPD.. | 35 |
| IMAGEN 23. INDUCCIÓN DE CÁPSULA EN MEDIO SL Y SL DIL 1:10 | 36 |
| TABLA 2. INTERVALO DE PH DE LOS MEDIOS DE INCUBACIÓN PARA LA..... | 37 |
| INDUCCIÓN DE CÁPSULA. (PH INICIAL Y FINAL A 72H DE INCUBACIÓN)..... | 37 |
| IMAGEN 25. EXAMEN DIRECTO DE CÁPSULA EN MEDIOS DE INCUBACIÓN (72H..... | 38 |
| IMAGEN 26. MUESTRAS EN MM CON GLUCOSA 15 MM Y 222 MM CON L-DOPA 10 MM | 39 |
| TABLA 3. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS | 40 |
| IMAGEN 27. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE UREASA DE LOS AISLAMIENTOS | 40 |
| IMAGEN 28: ACTIVIDAD DE UREASA EN MEDIO RUH..... | 41 |
| IMAGEN 29. MEDIO L-CANAVANINA GLICINA AZUL DE BROMOTIMOL. AISLAMIENTOS CLÍNICOS (DERECHA), MUESTRA FQ IDENTIFICADA COMO <i>C. GATTII</i> (DERECHA). | 41 |
| TABLA 4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS A LOS AGENTES ANTIFÚNGICOS. | 43 |
| IMAGEN 30. FUNGITEST DE MUESTRAS CLÍNICAS:..... | 44 |
| IMAGEN 31. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>CAP59</i> | 45 |
| IMAGEN 32. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE <i>CAP59</i> CON DIGESTIÓN DE HpaII | 46 |
| IMAGEN 33. PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>GEF1</i> | 47 |
| IMAGEN 34. PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS ATCC | 48 |
| IMAGEN 35. PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES..... | 48 |
| IMAGEN 36. PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE MUESTRA | 49 |

Resumen

La criptococosis es una micosis subaguda, crónica, y sistémica, causada por dos especies de hongos levaduriformes y capsulados, *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Este hongo se caracteriza por afectar inicialmente pulmones para posteriormente diseminarse a piel y órganos internos presentado preferencia hacia el Sistema Nervioso Central (meningitis y meningoencefalitis).

El complejo *Cryptococcus neoformans* está formado por dos variedades: *Cryptococcus neoformans* variedad *grubii* y *C. neoformans* variedad *neoformans*. Esta levadura presenta diversos factores de virulencia los cuales le permiten infectar y establecerse dentro del organismo generando enfermedad. Dentro de estos factores se encuentran: termotolerancia (capacidad de crecer a 37°C), presencia de cápsula, producción de melanina y actividad de ureasa entre otras.

Las dos especies de *Cryptococcus*, presentan diferencias fisiológicas y de virulencia. La diferenciación y clasificación de estas especies aporta datos importantes para la asistencia clínica y para estudios epidemiológicos. El objetivo de este trabajo es realizar la tipificación de los aislamientos por métodos moleculares y analizar las características fenotípicas asociadas a factores de virulencia de 12 aislamientos clínicos provenientes de pacientes con VIH/SIDA del Hospital Juárez de México OPD. SSA. en el periodo 2008-2013 y 7 aislamientos ambientales que provienen de eucaliptos y excretas de palomas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una gran variabilidad en los factores de virulencia analizados de tal manera que no se puede establecer ninguna relación entre los aislamientos clínicos y ambientales. La identificación de los mismos indican que pertenecen al género *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, pareja sexual α , genotipo VNI.

INTRODUCCIÓN

El género *Cryptococcus* es el principal agente etiológico de la criptococosis, que es una micosis sistémica adquirida por la inhalación de esporas o levaduras de *C. neoformans* o *C. gattii*; éstos son hongos saprófitos, oportunistas, con potencial patogénico y capacidad de causar enfermedad. La mayoría de las infecciones clínicas se da por *C. neoformans* en hospederos inmunocomprometidos, mientras que *C. gattii* causa infección en hospederos inmunocompetentes. A continuación se hablará de las características de este hongo, así como también, de las diversas infecciones que genera.

Género *Cryptococcus sp*

Cryptococcus pertenece a la familia *Cryptococaceae*, con un total de 39 especies. Este género es el único de los hongos que presentan cápsula de polisacáridos. Las principales especies por su importancia clínica forman parte del complejo *C. neoformans*; que está formado por la especie *C. neoformans* (con de dos variedades: *var. neoformans* y *var. grubii*), y *C. gattii*, además de que se encuentran agrupados en 5 serotipo y 8 genotipos moleculares. A continuación se muestra su clasificación taxonómica de acuerdo a *The Mycota*, volúmenes VIIA y VIIB (McLaughlin, 2001).

| Taxonomía | |
|------------|--|
| Reino | <i>Eukaryota</i> |
| Subreino | <i>Dikarya</i> |
| Phylum | <i>Basidiomycota</i> |
| Subphyllum | <i>Agaricomycotina</i> |
| Clase | <i>Tremellomycetes</i> |
| Orden | <i>Tremellales</i> |
| Familia | <i>Tremellaceae</i> |
| Genero | <i>Filobasidiella</i> |
| Especies | Complejo <i>Cryptococcus</i> <i>C.</i> |
| Variedad | <i>neoformans</i> <i>neoformans</i> <i>grubii</i> <i>C. gattii</i> |

Tabla 1. Taxonomía del complejo *Cryptococcus neoformans*.

El complejo *C. neoformans* se observa al microscopio como blastoconidios de 4 a 6 μm que presentan una cápsula que recubre la célula gemante, la cual puede llegar a medir de 1 a 30 μm (Dismukes E. et al, 2003; McFadden D. 2006); la cápsula se evidencia fácilmente al hacer una tinción negativa con tinta china (Imagen 1). Esta cápsula está formada por dos polisacáridos (GXM: glucorono-xilo-manano y GaXM: galacto-xilo-manano) y diversas manoproteínas. Macroscópicamente, *Cryptococcus* desarrolla colonias mucoides, lisas, brillantes y de color crema. En algunos medios como el agar alpiste negro se puede observar la presencia de un pigmento melánico en las colonias.

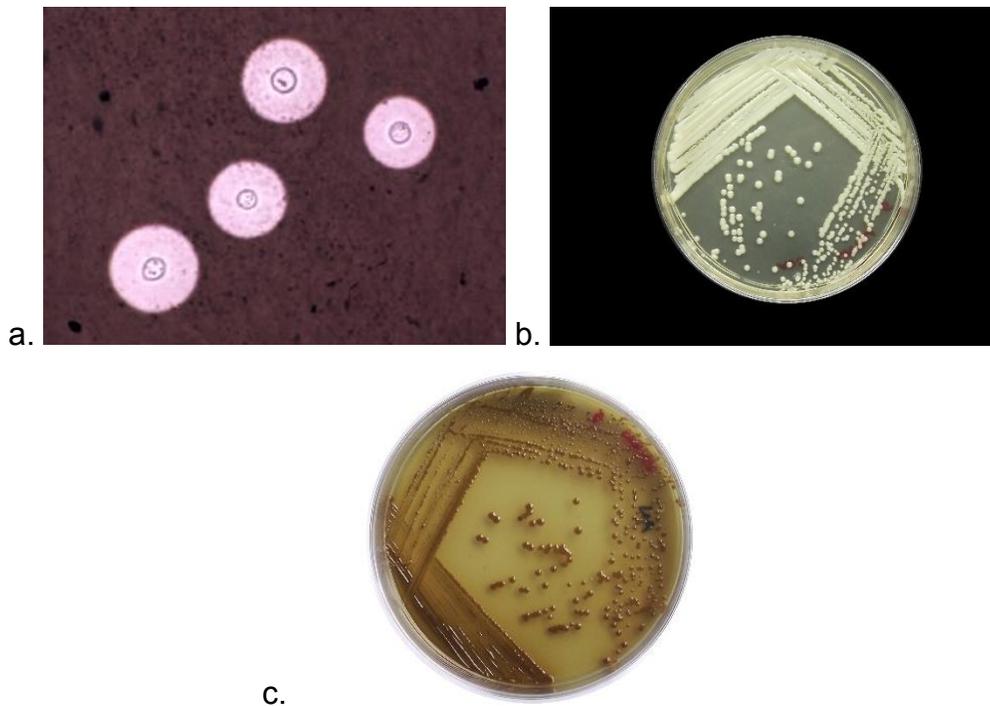


Imagen 1. a. Cápsula de *Cryptococcus neoformans* en tinta china (100x). b. Colonias en agar dextrosa de Sabouraud y c. en agar alpiste negro.

Hábitat y Epidemiología

C. neoformans se encuentra distribuida a nivel mundial, principalmente en climas subtropicales y templados. Se puede aislar fácilmente a partir de excretas de aves, suelos, *detritus* vegetales y como contaminante anemófilo. También sobre las hojas y cortezas de algunas especies de eucaliptos (principalmente de *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*). *C. neoformans* representa entre el 59.1%

al 80% del total de los aislamientos a nivel mundial.

Una frecuencia mayor de *C. gattii* se ha encontrado en climas tropicales, principalmente en Australia, Papua Nueva Guinea, Brasil y Colombia; han sido aislados de los mismos sustratos que *C. neoformans* y a partir de otros árboles como cassias (*Senna siamea*), almendros (*Prunus dulcis*), cañadonga (*Cassia grandis*), pino de canarias (*Pinus canariensis*) y de algunas variedades de árboles como la haya *Acer saccharum* y el maple o suchiate *Liquidambar styraciflua*. Una gran proporción de los aislados australianos provienen de excretas de koala (*Phascolarctos cinereus*).

Solo una proporción cercana al 20% de los aislados a nivel mundial (tanto ambientales como clínicos) ha sido genotipificado y los datos más recientes han sido publicados por *Cogliati* y cols. en 2013. En la Imagen 2 se resume brevemente la frecuencia de *C. neoformans* y *C. gattii* de acuerdo a los datos recabados por *Cogliati*.

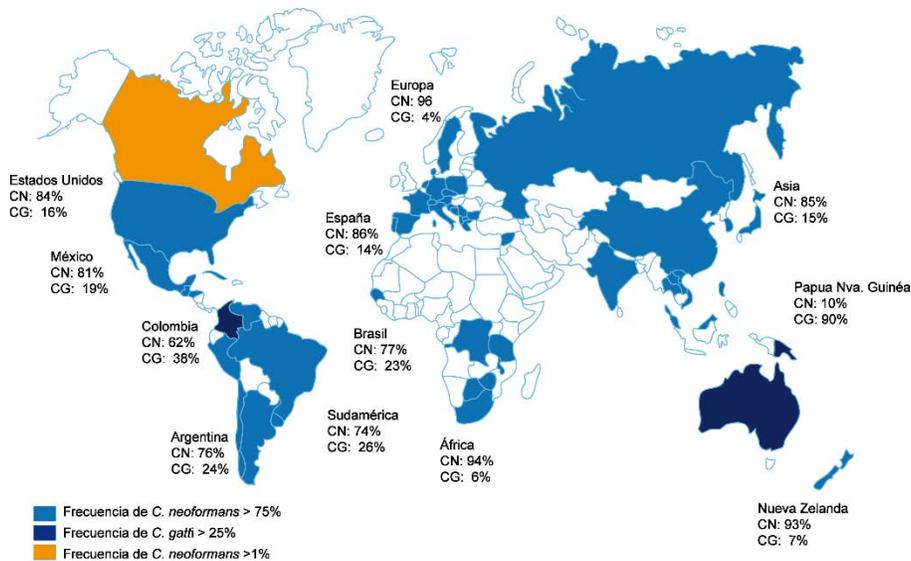


Imagen 2. Frecuencia de especies del complejo *C. neoformans*.

De la información presentada en este reporte, en América del Norte (México, Estados Unidos y Canadá) se obtuvieron alrededor de 8,000 aislamientos. De estos,

el 80% provienen de muestras clínicas y el 20% son ambientales a partir de excremento de aves.

En 2004, se reportó una epidemia de criptococosis en individuos inmunocompetentes en la Columbia Británica y la Isla de Vancouver, Canadá. Esto ha despertado el interés de varios equipos de investigación, ya que *C. gattii* solo se había reportado como endémico de Australia hasta finales de siglo pasado (Cogliati M., 2013). Numerosos estudios revelan que la mayor frecuencia de los aislamientos corresponden a *C. gattii*. Las infecciones son causadas principalmente por el genotipo VGII, pero también se han reportado cepas VGI e híbridas VNI/VGI (Bovers M., et al. 2008).

Por el contrario, los aislamientos ambientales y clínicos obtenidos en México y Estados Unidos, muestran un predominio de *C. neoformans* (81% al 84 %), en especial del genotipo VNI (43%), mientras que los genotipos VNII, VNIII y VNIV tienen una menor frecuencia. El aislamiento de *C. gattii* genotipo VGII se ha reportado en el noroeste de Estados Unidos, Norte de México y Sur de California. A la fecha se han obtenido 5 aislamientos de VGIV en México, tipo molecular ausente en Canadá y Estados Unidos (Castañón O. et al, 2009).

En 2014 López Martínez R. y cols. reportaron un aumento en la incidencia de Criptococosis, y en 2013 se realizó en México un estudio con 150 pacientes con cuadro clínico de meningoencefalitis probablemente criptococócica, de los que se obtuvieron aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii* en un porcentaje de 93% y 7%, respectivamente. Se observó que el serotipo predominante fue A, seguido de D, B, AD y C. Sin embargo en este último estudio no se realizó genotipificación.

El predominio de *C. neoformans var grubii*, está descrito en varios estudios provenientes de Brasil y Argentina. En 2010, a través de un estudio epidemiológico mundial que reunieron datos de 15,000 a 20,000 muestras (clínicas y ambientales) se estableció que su frecuencia es del 60% a 80% de muestras clínicas de pacientes

con criptococosis. Entre los países en los que se observa esta frecuencia sobresalen China, India, Tailandia, Francia, España, Italia, Brasil, Argentina, Estados Unidos y México. De este porcentaje, entre el 70% al 80 % pertenecen al complejo *Cryptococcus neoformans* y al genotipo VNI (Cogliati M., 2013).

En América Central y del Sur, a partir de 10,548 aislamientos (81% clínicos y 19% de muestras ambientales y fuentes veterinarias), reportan aislados de todos los genotipos excepto el VGIV. En Argentina, el tipo molecular VGI es el más prevalente, en Chile se encuentran los cuatro tipos moleculares de *C. neoformans*, pero no fue encontrado ningún aislamiento de *C. gattii* (Cogliati M., 2013).

Patogénesis

La infección por *Cryptococcus* comienza con la inhalación de blastoconidios o basidiosporas, que son transportadas hasta los alveolos y son confrontadas con los macrófagos alveolares, neutrófilos y células dendríticas, generando el primer contacto con el sistema inmunológico. La mayoría de las veces la infección cursa de manera subclínica o asintomática por lo que no se produce respuesta inflamatoria.

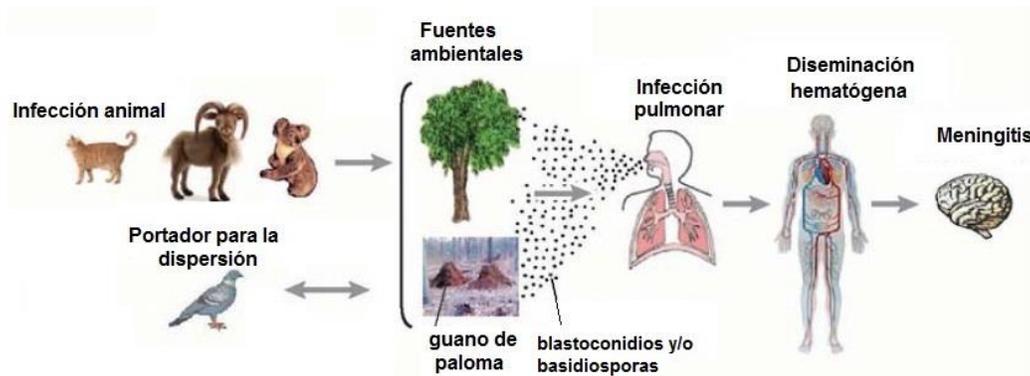


Imagen 3. Proceso de infección de *Cryptococcus* sp.
(Tomada de Lin X., et al., 2006.)

El sistema inmune reacciona contra los blastoconidios inhalados de dos maneras: contra los no capsulados se activa al complemento a través de la vía clásica, mientras que los capsulados activan al complemento por vía alterna (Ellerbroek P., et al., 2007). Posteriormente los blastoconidios son fagocitados por los receptores

de manosa y glucanos presentes en la pared celular de los macrófagos y se forma una vacuola intracelular (fagosoma), la cual posteriormente se fusiona con lisosomas para formar el fago-lisosoma, estructura celular que posee propiedades degradadoras a base de pH bajo, enzimas hidrolíticas para la digestión de partículas, péptidos microbicidas, y especies reactivas de oxígeno.

A partir de este suceso, pueden ocurrir cuatro posibles escenarios:

1. Los blastoconidios son degradados en el interior del fago-lisosoma.
2. Permanecer latentes en el interior del macrófago al inhibir la función del fago-lisosoma. Esto permitirá que los blastoconidios sean acarreados a diferentes órganos del cuerpo, proceso similar al “Caballo de Troya”, o bien pueden realizar la transferencia lateral, que consiste en la propagación de los blastoconidios de un macrófago a otro sin ser expuestos al medio extracelular.
3. Desarrollarse dentro del fagosoma y salir al medio extracelular causando la lisis de los macrófagos.
4. Salir del macrófago sin ser lisados.

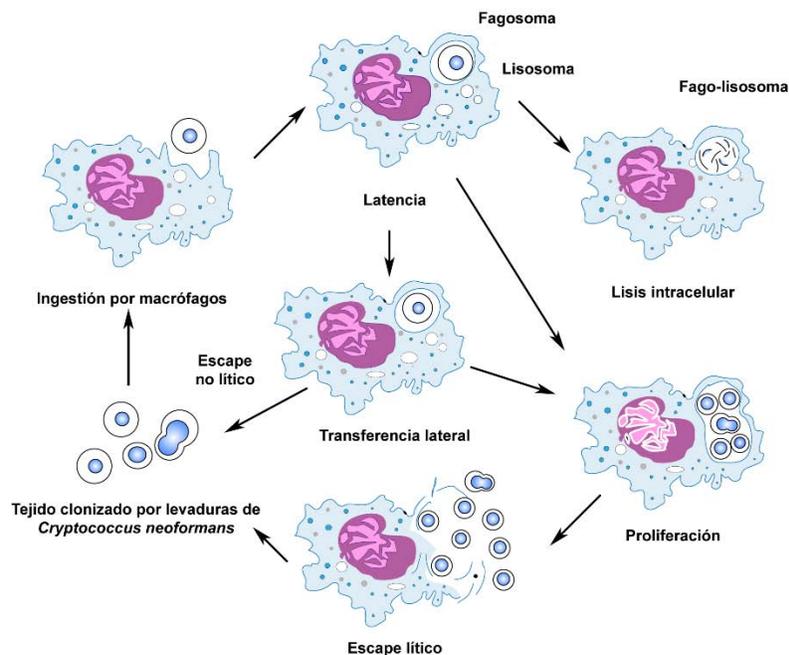


Imagen 4. Proceso de fagocitosis de *Cryptococcus neoformans*

Para que se desarrolle la infección es necesaria una deficiencia de linfocitos T CD4+ (menor a 100 células por μL de sangre periférica). Esto favorece la proliferación de los blastoconidios en los pulmones (que son el sitio inicial de infección); provocando problemas para respirar, tos y dolor pleurotorácico. Si los mecanismos de defensa en los alveolos son ineficientes, comienza la diseminación a otros sitios vía linfática y hematológica, con gran predilección por el Sistema Nervioso Central, en donde afecta las meninges, nervios craneales, tallo cerebral, llegando a cerebro, donde genera alta presión intracraneal y aumenta las manifestaciones clínicas, las cuales se describen a continuación.

Criptococosis pulmonar

La vía respiratoria es la entrada más importante para *Cryptococcus*. En un 95% de las infecciones se presenta de manera asintomática, de forma unilateral o bilateral confinada generalmente al lóbulo superior. La mayor parte de los hallazgos radiológicos incluyen nódulos simples o múltiples e infiltrados pulmonares, con menor frecuencia se encuentra efusiones pleurales, y cavitaciones en los pulmones (*Chayakulkeeree, 2008*). Cuando se presenta de manera “leve” tiene un cuadro clínico caracterizado por un cuadro gripal, tos, ligera fiebre y discreto dolor pleural. Mientras que la forma “grave” presenta pérdida de peso, astenia, adinamia, tos con esputo mucoide hemoptoico (con hilos de sangre), fiebre entre 38-40°C.

En un paciente normal, los hallazgos radiológicos más comunes son nódulos simples o múltiples. En el paciente inmunocomprometido estos hallazgos pueden ser confundidos con una neumonía por *Pneumocystis* o por tuberculosis, para confirmar el diagnóstico es necesario realizar una prueba de antígeno capsular GXM en suero o bien en líquido cefalorraquídeo.



Imagen 5. Lesiones nodulares de Criptococosis pulmonar.
(Tomada Rodríguez-Gómez, F. *et al*, 2012)

Criptococosis en Sistema Nerviosos Central

Es la manifestación clínica más común, presentándose en forma de meningitis y/o meningoencefalitis. La meningitis presenta diversos síntomas como cefalea intensa, rigidez y dolor de nuca, cuando se presenta de manera crónica, los signos de Kerning y Brundzinski son frecuentes. Posteriormente hay presencia de vómito en proyectil, náusea, vértigo, delirio, alucinaciones, pérdida temporal de la memoria, diplopía, nistagmo, disminución de la capacidad visual, confusión y alteraciones mentales, esto se debe a que hay una disfunción en el nervio craneal, resultado de la presión intracraneal aumentada, invasión de los nervios ópticos y lesiones en el parénquima cerebral.

En pacientes con SIDA, que presentan meningitis, el LCR puede ser de apariencia normal sin ninguna alteración importante, el aspecto puede ser claro con elevación ocasional de la concentración de proteínas (hiperproteorraquea), disminución en la concentración glucosa (hipoglucorraquea), aumento de la celularidad y de la densidad

La meningoencefalitis es una entidad menos común, pero de signo agudo y fulminante; se presenta en pacientes con severa inmunodepresión, el paciente cae en coma y fallece en un periodo de 2 a 3 días.

También puede manifestarse los criptocomas cerebrales y/o hidrocefálicas con o sin lesiones pulmonares, estos criptocomas son cúmulos de colonias de *Cryptococcus* en el parénquima cerebral, presentando invasión en los nervios craneales y por tanto aumentan la presión intracraneal. La sintomatología es cefalea, náusea, vómito, manifestaciones oftálmicas y finalmente el paciente cae en coma y muere.

Factores de virulencia identificados en *Cryptococcus neoformans*

Los hongos patógenos pueden dividirse en dos clases: primarios y oportunistas, los primarios causan enfermedad en pacientes inmunocompetentes y los oportunistas toman ventaja del hospedero inmunocomprometido para causar infección. Como se ha discutido anteriormente *C. gattii* es un ejemplo de patógeno primario y *C. neoformans* de oportunista.

Los hongos patógenos tienen características que les permiten crecer en condiciones adversas dentro del hospedero. Estos factores conocidos como factores de virulencia son componentes del patógeno que daña al hospedero y favorecen la colonización, diseminación y la capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles; permiten el establecimiento de la infección y contribuyen al desarrollo de la enfermedad.

Entre los factores de virulencia de *C. neoformans*, se encuentran los siguientes: termotolerancia (capacidad de crecer a 37°C), cápsula, melanina y ureasa.

a. Termotolerancia

Cryptococcus neoformans tiene la capacidad de desarrollarse entre 25° y 37°C, lo cual le permite permanecer en el ambiente subtropical y además colonizar diferentes tipos de mamíferos. Dado que este hongo se encuentra como saprófito-contaminante en frutos y semillas, también está en el excremento de aves (ya que estas se alimentan de frutos y semillas). La temperatura corporal de las aves es de aprox. 40° a 42°C, temperatura a la cual *C. neoformans* es incapaz de reproducirse

o causar infección; por tanto, las aves se comportan como reservorios de este hongo. Su importancia se debe a que de todas las especies de este género, *C. neoformans* y *C. gattii* son únicas en crecer a la temperatura corporal (37° C) y actuar como patógenas.

b. Cápsula

La cápsula es considerada como el factor de virulencia más importante, porque confiere resistencia ante la fagocitosis. Bajo condiciones normales de crecimiento *in vitro* (30°C, medio ADS) la cápsula tiene un grosor entre 1-2 μm , sin embargo *in vivo* suele ser hasta de 30 μm (McFadden D., 2006), debido a que las condiciones del cuerpo humano es un medio más hostil para su desarrollo.

El GXM constituye aproximadamente 90% de la masa capsular, tiene un peso aproximadamente de 1.7×10^6 Da, y está formado por residuos de manosa con enlaces α -1,3, además presenta cadenas laterales de xilosa y ácido glucorónico.

El GaXM constituye aproximadamente el 7% de la cápsula y tiene una estructura más elaborada que el GXM, pesa alrededor de 1×10^5 Da, con uniones α -1,6 ligadas a un polímero de galactosa con cadenas laterales de diferentes longitudes que consisten en residuos de galactosa (50%), manosa (29%) y xilosa (22%); estos varían dependiendo del serotipo (Bose I, et al 2003).

El tercer componente son las manoproteínas, que representan la menor fracción de la cápsula y se encuentran involucradas en la inducción de la inmunidad celular y producción de citocinas (Bose I, et al 2003)

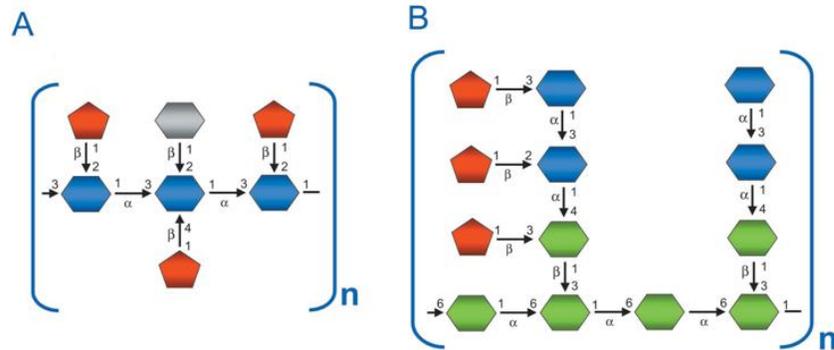


Imagen 6. Estructuras de los componentes de la cápsula. (A) Glucoroxilomanana; (B) Galactoxilomanana. (Tomada de *Bose I. et al.*, 2003)

El tamaño de la cápsula está regulado por diversas condiciones. Es inducida por una alta concentración de CO₂, concentraciones bajas de hierro, medios que contienen tiamina, glutamato de sodio, sales minerales, maltosa, sacarosa y una baja cantidad de glucosa (*Okabayashi.*, 2005); la síntesis de la cápsula es inhibida por la alta presión osmótica, alta glucosa y un medio rico, como ADS y aditivos como cloruro de sodio 1M. Una característica importante de la cápsula, es que cuenta con un potencial zeta muy alto (con carga eléctrica negativa).

La cápsula participa en la protección contra condiciones de estrés, tales como la deshidratación. Además, durante la infección, la cápsula inhibe diferentes procesos (*Zaragoza O., et al*, 2009) inmunológicos: la inhibición de leucocitos, la maduración de macrófagos, migración de neutrófilos, depleción del complemento y ruptura de la fracción Ab de los anticuerpos.

La síntesis de la cápsula esta codificada por diversos genes, los principales son: *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* y *CAP10*, el primero presenta secuencias homólogas con la α -1,3-manosiltransferasa de *Cryptococcus* y es el principal en la secreción de la cápsula, además de que está presente en todos los serotipos. El segundo, también está relacionado con la formación de la cápsula, *CAP60* y *CAP10*, codifican para la xilosiltransferasa (*Zaragoza et al*, 2009). Se han realizado análisis con PCR de los genes *CAP*, los cuales son expresados en función de la concentración de la glucosa.

c. Melanina

Las melaninas son pigmentos hidrofóbicos de alto peso molecular. Se forman por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos y/o indólicos. Son insolubles en solventes acuosos y en solvente orgánicos. Esta melanina requiere de sustratos exógenos y el tipo de pigmento sintetizado varía en función de la estructura química del sustrato adicionado al medio. Los pigmentos sintetizados a partir de o-difenoles con grupos hidroxilo en las posiciones 2,3 o 3,4 son oscuros y predominantemente asociados a la pared. Mientras que los pigmentos producidos a partir de p-fenoles con grupos hidroxilos en 1,4 o 2 y 5 son solubles y difusos en el medio (*Casadevall A., 2000*). Algunos de los sustratos más comunes (compuestos fenólicos que contienen grupos hidroxilo o amino) para la síntesis de melanina en *C. noeformans* son: el aminoácido tirosina, L-dopamina, norepinefrina y ácido caféico.

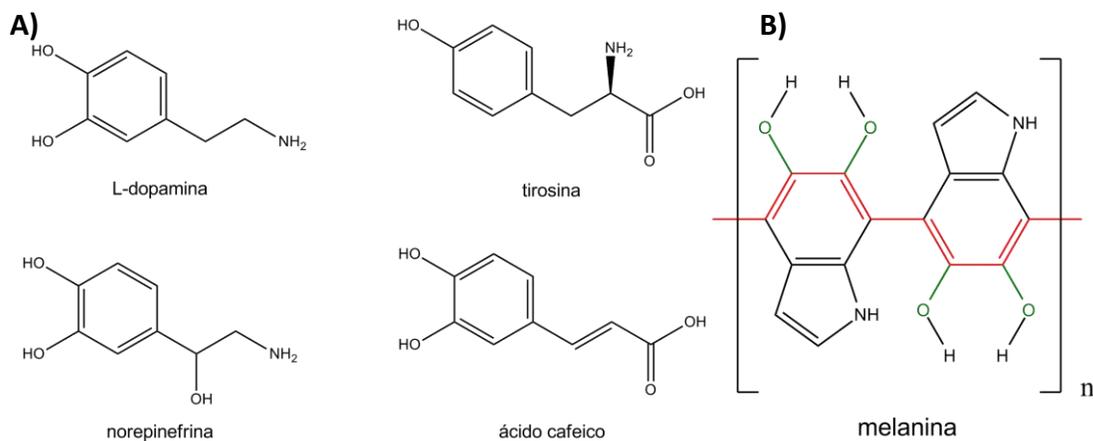


Imagen 7. Estructura de catecolaminas (A) utilizadas para generar melanina (B).

La síntesis de la melanina es llevada a cabo por la enzima fenoloxidasa o lacasa. Esta enzima está unida a la membrana donde se acumulan los sustratos específicos, posteriormente en citoplasma se comienza a sintetizar la melanina que subsecuentemente es depositada en la pared de la célula (*Ngamskulrungraj P., 2009*). Su actividad está estrictamente ligada a la concentración de glucosa, iones de Fe^{3+} y Cu^{2+} , diversos aminoácidos como glutamina y asparagina (*Vidotto V, et al 2002*). Sin embargo la glutamina reprime la actividad de la lacasa en todas las cepas, a excepción del serotipo B, mientras que el sulfato de amonio reprime a todos los aislados excepto al serotipo A (*Williamson Peter, 1997*).



Imagen 8. Colonia de *Cryptococcus neoformans* en medio mínimo, adicionado con L-DOPA

La síntesis de melanina se ha asociado como factor de virulencia ya que, al poseer la capacidad de convertir las catecolaminas (abundantes en SNC) a melanina, quizá esto facilite el proceso infeccioso en el SNC y explica parte del tropismo que este hongo tiene. (Casadevall A., 2000). La melanina tiene la capacidad de proteger a *Cryptococcus* contra las especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno, péptidos microbianos y defensinas producidas por las células del sistema inmunológico (Ngamskulrungrroj P., 2009). Las células pigmentadas son menos susceptibles a la muerte por radicales libres, sugiriendo que la melanina protege contra los agentes oxidantes. También presentan una menor susceptibilidad a los agentes antifúngicos como la anfotericina B, lo cual puede contribuir a la persistencia de la infección en humanos (Wang Y., 1995).

La lacasa es codificada por dos genes *LAC1* y *LAC2*, produciendo dos isoformas de esta proteína. En modelos de neuroinfección en ratones, la isoforma Lac1 es la predominante y responsable de la virulencia de *C. neoformans*, ya que la infección no se presenta con cepas *LAC1*⁻. La isoforma Lac2 no participa directamente en la virulencia ya que sus niveles de expresión son relativamente bajos y la falta de este gen no altera la patogenicidad. Su función posiblemente no esté relacionada con la virulencia, quizás con la regulación pero esto aún se desconoce.

En estudios *in vitro*, se ha determinado que la actividad de esta enzima disminuye a 37°C respecto a las condiciones experimentales a 30°C (Hogan L H, 1996). Esto estaría en contraposición con las funciones que se le han adjudicado al pigmento como factor de virulencia.

d. Ureasa

La ureasa es una metalo-enzima de alto peso molecular que contiene níquel, y ha sido localizada en numerosos organismos (bacterias, plantas y hongos). La ureasa tiene la función catalítica de hidrolizar la urea, los productos enzimáticos de la reacción son amoniaco y el carbamato, debido a la hidrólisis espontánea del carbamato los productos finales de la reacción son el amonio y el H₂CO₃. Esta reacción causa el incremento de pH en el medio (Krajewska, *et al*).

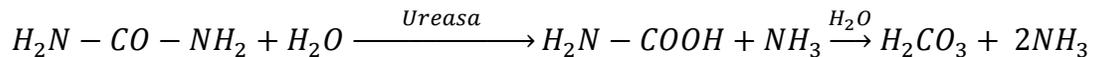


Imagen 9. Prueba de ureasa. Amarillo (negativo), rosa (positiva).

Esta enzima se ve inhibida por diferentes componentes, estos incluyen ésteres de ácidos fosfóricos, tioles, ácido bórico, metales pesados, compuestos de bismuto, quinonas y una menor cantidad de H₂O₂. Es un papel primario, ya que usa la urea como fuente de nitrógeno en los nichos ecológicos.

Se ha estudiado que cepas ureasa positivas están involucradas en la evasión del sistema inmune promoviendo la respuesta Th2, en lugar de la vía Th1; que la toxicidad del amoniaco liberado promueve la diseminación y además de que esto provoca una acidificación en células fagocíticas, disminuyendo la muerte de las levaduras fagocitadas y en la presentación de sus antígenos.

En *C. neoformans* el gen *URE1* codifica la enzima ureasa. Además, se ha descubierto que el genoma de esta levadura contiene el gen *NIC1*, el cual codifica para el transportador de níquel, ion que es requerido para la función de la ureasa en otros organismos.

Algunos modelos usados para ver la actividad de la ureasa en la virulencia fueron ratones infectados vía intravenosa y por inhalación; en ambos modelos, las cepas infectadas con *ure1* (gen inactivo) vivieron un mayor tiempo que las cepas infectadas de *URE1* (gen activo), indicando que éstas son más virulentas, disminuyendo el tiempo de vida, que los animales infectados con *ure1*.

Resistencia antifúngica

El término resistencia es usada para describir el crecimiento *in vitro* del microorganismo frente a un agente antimicrobiano, aun teniendo concentraciones elevadas y que es comparado con aislados de la misma especie. Este término se ve influido por la variedad de factores que la envuelven, como son: enfermedades conjuntas del paciente o por factores del microorganismo. Entre los factores incluidos son la respuesta del hospedero, virulencia de la cepa, farmacocinética de los fármacos, sitio de infección, perfiles de toxicidad y la concentración mínima inhibitoria (MIC). Por ejemplo, el ketoconazol con su penetración limitada en el Sistema Nervioso Central es ineficaz en el tratamiento de la meningitis criptococócica. La farmacocinética tiene un efecto importante en la resistencia, por ejemplo, el itraconazol es inefectivo en el tratamiento de meningitis por la baja absorción oral y en el LCR, en comparación con el fluconazol el cual se presenta en altas concentraciones (*Hanson K., 2009*)

Se han realizado estudios de susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* frente a tres azoles usados antes y después de la terapia antirretroviral, sin embargo, estos estudios demuestran que hay una disminución en la resistencia a fluconazol. También se ha presentado una resistencia cruzada al fluconazol con itraconazol (*A.I. Aller, 2007*)

Por otro lado se ha reportado el surgimiento de resistencia a anfotericina B (AMB), 5- fluorocitosina, fluconazol e itraconazol (Arechavala A., et al 2009). El mecanismo de acción de los agentes antifúngicos usados contra el tratamiento de la criptococosis pueden ser divididos en tres categorías: 1) disrupción de la membrana plasmática (azoles y polienos); 2) inhibición de la síntesis del DNA y RNA (fluoropirimidas) y 3) inhibidores de la 1,3 β -D glucana sintasa (Hanson K., 2009).

- El fluconazol, itraconazol, voriconazol son derivados triazólicos, su mecanismo de acción es interrumpir la síntesis de ergosterol, inhibiendo la 14- α -esterol-desmetilasa, generando una membrana defectuosa que pierde la permeabilidad, en particular en el intercambio iónico. Se consideran como fungistáticos y en altas concentraciones, se comportan como fungicida.
- La anfotericina B es un antifúngico derivados de los azólicos y sigue siendo un fármaco de elección en diversas micosis sistémicas graves que ponen en riesgo la vida del paciente, debido a su amplio espectro y bajas tasas de resistencia a hongos levaduriformes.
- La 5 fluorocitosina es un antimicótico que inhibe la síntesis de DNA y de RNA ya que la 5-fluorocitosina ingresa dentro de la célula fúngica y se transforma en 5-fluorouridina-trifosfato que se incorpora al RNA, lo que provoca una alteración y bloqueo de la síntesis de proteínas.

Ciclo de vida y reproducción

C. neoformans se reproduce de manera asexual para propagarse sobre el sustrato de crecimiento mediante blastogénesis holoblástica. Por esto, algunos autores se refieren a las levaduras de este hongo como blastoconidio (del gr. *blastós*, germen, brote o yema; *kónis*, polvillo; *-ídion* suf. diminutivo; *Ulloa M. 1991*). La reproducción asexual también se conoce como reproducción imperfecta, anamórfica o mitótica.

Estos hongos presentan además un ciclo de reproducción sexual, en el que se forman basidiosporas mediante tres procesos plasmogamia (unión de blastoconidios), cariogamia (fusión de núcleos) y meiosis (reducción gamética) unión de citoplasma, núcleos, recombinación y meiosis. Este tipo de reproducción

permite la variabilidad genética de las poblaciones y les permite adaptarse a las condiciones del medio.

Para llevar a cabo la reproducción sexual, es necesario que dos células de diferente tipo sexual interactúen estrechamente. Para el complejo *C. neoformans* se tienen solo dos tipos sexuales: a y α . El tipo sexual está determinado por un *locus* denominado MAT, en el que se encuentran poco más de 20 genes que regulan el ciclo sexual, liberación de feromonas y sus receptores están ligados a la prevalencia en el ambiente, virulencia y otros de función aún desconocida.

La reproducción sexual se favorece en medios con nutrientes limitados (principalmente bajas concentraciones de nitrógeno) y otros estímulos ambientales.

El ciclo sexual comienza con la fusión de dos blastoconidios de tipo sexual opuesto. Tras la fusión se forman filamentos o hifas dicariontes (este filamento contiene dos núcleos haploides, un núcleo a y uno α), que crecen en el sustrato y cuyos núcleos migran a un extremo de la hifa. Posteriormente, los núcleos se fusionan y forman una célula llamada basidio, en la que se lleva a cabo la meiosis y se producen cuatro núcleos haploides. La generación de esporas o esporogénesis ocurre en un extremo del basidio formando cuatro cadenas de esporas (dos para cada tipo sexual). Estas basidiosporas (nombradas así por producirse en un basidio) se separan y son aerotransportadas hasta un sustrato adecuado, donde germinan y cambian a su fase levaduriforme, reiniciando el ciclo de reproducción. A este proceso también se le llama reproducción perfecta, teleomórfica o meiótica (Imagen10).

Se ha descubierto recientemente que un proceso similar a la reproducción sexual se lleva a cabo entre células del mismo tipo sexual, sin embargo no hay recombinación de material genético y las esporas que se producen son genéticamente iguales a sus progenitoras. A este proceso se le denomina fructificación monocariótica.

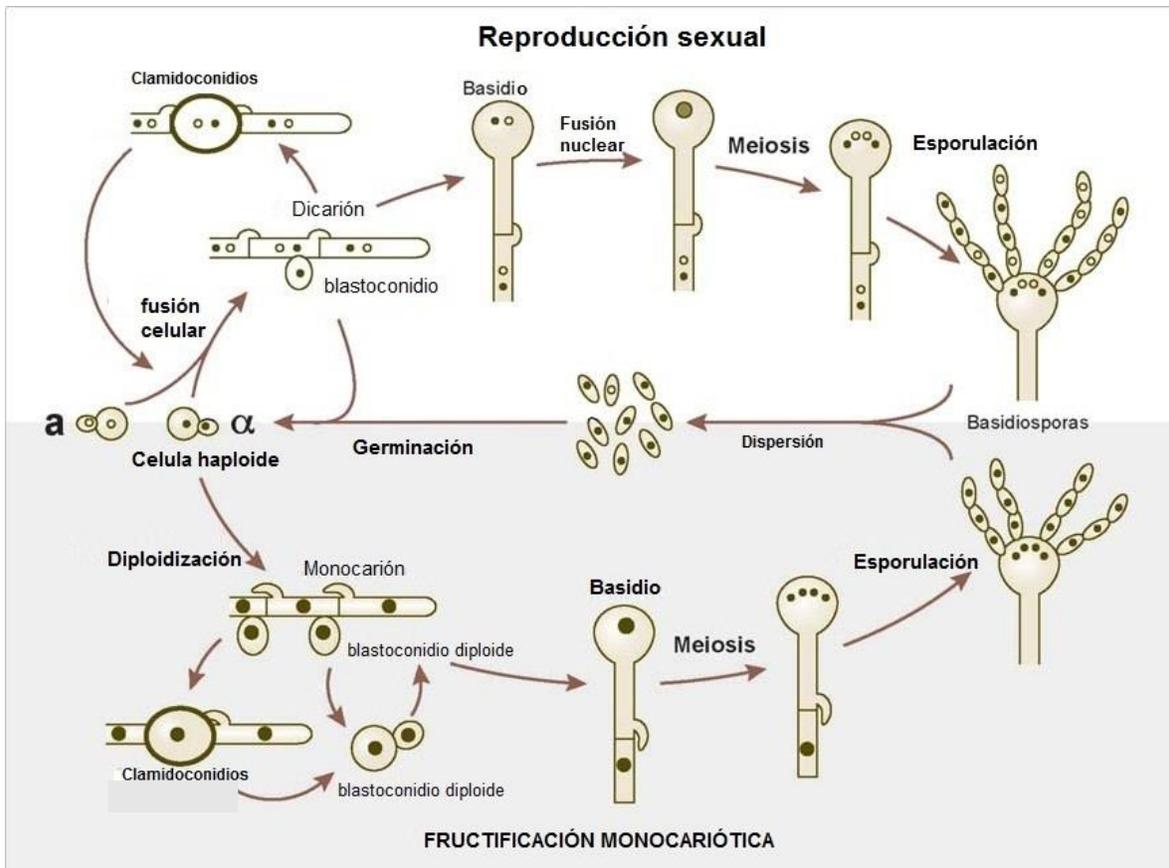


Imagen 10. Ciclo de vida y reproducción sexual de *Cryptococcus neoformans*.
(Tomada de Lin X., et al., 2006)

El ciclo sexual de *C. neoformans* fue descrito en su totalidad en 1977 por Kwon-Chung y a la fase sexual se le denominó *Filiobasidiella neoformans*, que presenta basidiosporas pequeñas redondas de $1.0 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ que nacen del basidio; posteriormente fue descrito el ciclo de *C. gattii* y al observarse diferencias en las esporas producidas se denominó *Filiobasidella bacillispora*, presentando basidiosporas alargadas ligeramente curvados de $1.0 - 1.5 \mu\text{m} \times 3-8 \mu\text{m}$. (Rippon J.W. 1990) Ver imagen 11.

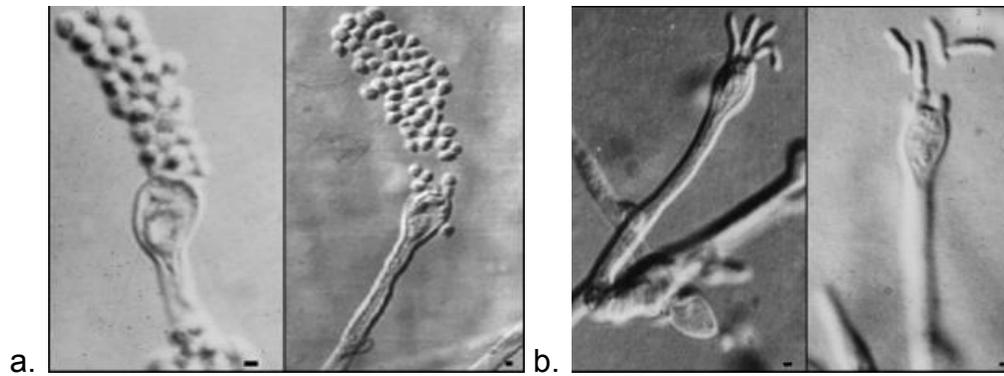


Imagen 11. Diferencias morfológicas de las esporas de a. *C. neoformans* (*Filobasidiella neoformans*) y b. *C. gattii* (*Filobasidiella bacillispora*).
(Tomada de Kwon-Chung K., 2006)

Diferenciación de especies

Es importante mencionar los métodos de identificación y diferenciación del complejo *C. neoformans* para realizar una buena caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos clínicos. Entre los métodos principales se encuentran los siguientes:

Agar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol

La utilización de este medio es un método sencillo para diferenciar a *C. neoformans* de *C. gattii* en el laboratorio clínico. En este medio *C. gattii*, tiene la capacidad de asimilar el aminoácido L-canavanina (estructura análoga de la L-arginina) y degradarlo, continuar su desarrollo y alcaliniza el medio (razón por la cual el indicador azul de bromotimol vira de amarillo a azul). Sin embargo, en *C. neoformans*, la L-canavanina se incorpora a las proteínas generando escrituras terciarias y cuaternarias alteradas, lo cual inhibe el crecimiento de *C. neoformans*. (Imagen 12).

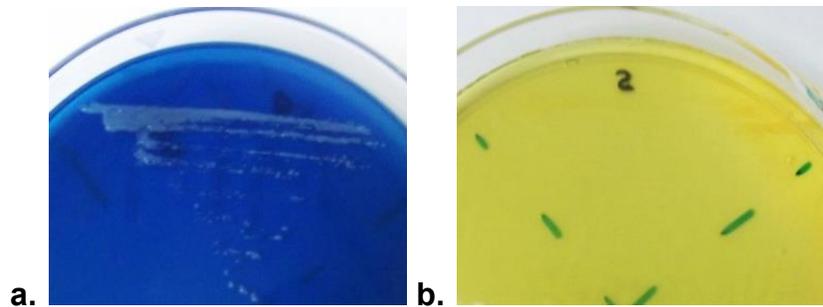


Imagen 12. Agar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol. a. desarrollo de *C. gattii* y b. incapacidad de crecer en este medio de *C. neoformans* después de 48h a 30°C.

Serotipificación (Reacciones de aglutinación de antígenos polisacáridos de su cápsula).

El GXM es un polisacárido antigénico y es el principal componente de la cápsula, y por los estudios realizados por *Benham* en 1956, *Evans* en 1950, *Kessel* en 1951 y *Tsuhciya* en 1963, sabemos que difiere en su estructura: tanto en la ramificación y acetilación de las moléculas de xilosa que lo forman.

Esta variación estructural modifica las características antigénicas de las cepas del complejo *C. neoformans*. *Ikeda* en 1982 desarrolló 4 antisueros que aglutinan el GXM de la cápsula y que sirvieron para la serotipificación de aislamientos. De acuerdo al suero con el que aglutinaron se tipificaron como:

- Serotipo A pertenece a *C. neoformans* var. *grubii*
- Serotipo D y AD* pertenecen a *C. neoformans* var. *neoformans* (*ya que algunos aislamientos aglutinaron con los sueros A y D).
- Serotipo B y C pertenecen a *C. gattii* (en el tiempo en que desarrollaron los antisueros no se reconocía a *C. gattii* como especie, sino como *C. neoformans* var. *gattii*).

Comparando la estructura del GXM, el serotipo B y C presentan una mayor ramificación de residuos de xilosa comparadas con otros serotipos (*McFadden D.*, 2006; Imagen 13). Los componentes de la cápsula son moléculas altamente

antigénicas e importantes en la interacción de este hongo con otros organismos. A continuación se muestran las estructuras de las del GXM de los diferentes serotipos.

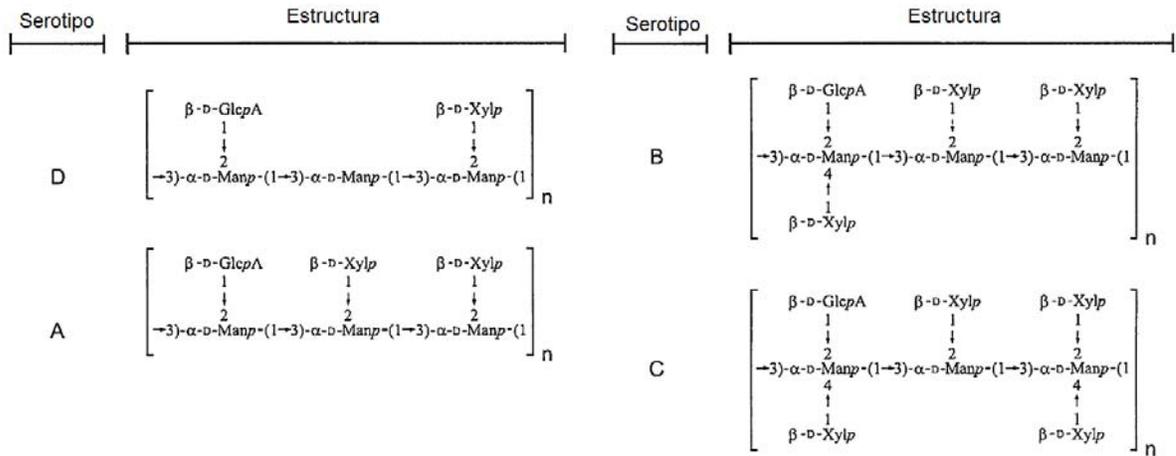


Imagen 13. Estructuras del GXM de los serotipos del complejo *Cryptococcus*. GlcpA, ácido glucopiranosilurónico; Manp, manopironana; Xylp, xilopiranosil (Tomada de Wozniak K. L., Levitz S.M., 2009)

Métodos de identificación molecular de especies de *C. neoformans*

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica que facilita la amplificación *in vitro* de un fragmento de DNA. Utiliza el mismo principio de la DNA polimerasa en la síntesis de una cadena complementaria del DNA en la dirección 5'-3', pero emplea dos cebadores, cada uno complementario a las cadenas de la región del DNA y que dirigen la síntesis del DNA.

En la primera etapa llamada desnaturalización, la temperatura de reacción es de 95°C, durante la cual la doble cadena de ADN se abre, quedando como cadenas sencillas. Posteriormente, en la segunda etapa, alineación hay un enfriamiento de la reacción (40 – 72°C) para realizar la unión de los cebadores (secuencias cortas de DNA) que se unen a la cadena templada, después de este alineamiento, la DNA polimerasa se activa y se une al complejo primer-DNA, tomando los dNTP's de la

reacción para comenzar a extender la cadena. En la última etapa, se eleva la temperatura a 72°C y se lleva a cabo la elongación de la cadena de DNA, por la DNA polimerasa (Imagen 14).

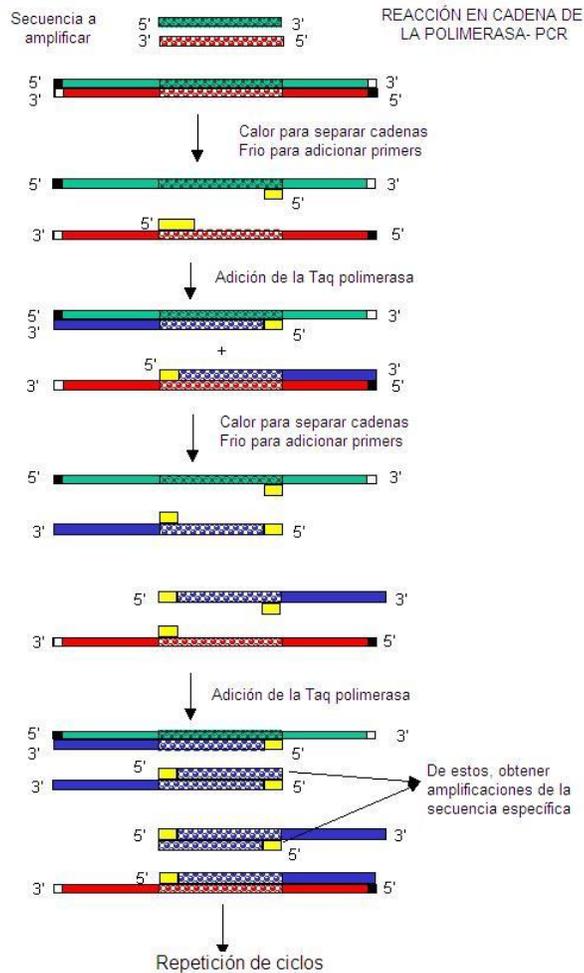


Imagen 14. Esquema general de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
(Tomada de <http://people.uwec.edu/piercech/tox/techniques.htm>)

PCR Touchdown

El método de PCR es aplicado en casos donde la temperatura de alineación de los cebadores no es conocida o cuando hay problemas con la complementariedad del cebador y de la cadena templada. Aquí la temperatura de alineación se reduce a 55°C aproximadamente durante los primeros 20 ciclos, favoreciendo la complementariedad de la bases nitrogenadas, debido a que los cebadores se alinean con menor especificidad. Esta técnica también es aplicada cuando los cebadores utilizados son de 20 nucleótidos o más.

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción se definen como diferencias en el patrón de fragmentos producidos por enzimas de restricción, que revelan variaciones en las secuencias de DNA, estas secuencias pueden verificarse por medio de una electroforesis, que se separaran de acuerdo a su peso molecular (imagen 15)

El gen *GEF1* se encuentra localizado en el *locus* MAT el cual mide >de 100 kb, contiene más de 20 genes. En este gen se determina el genotipo y el tipo sexual. Por otro lado, este *locus* también está ligado a la prevalencia en el ambiente, virulencia y su capacidad para ser diferenciado.

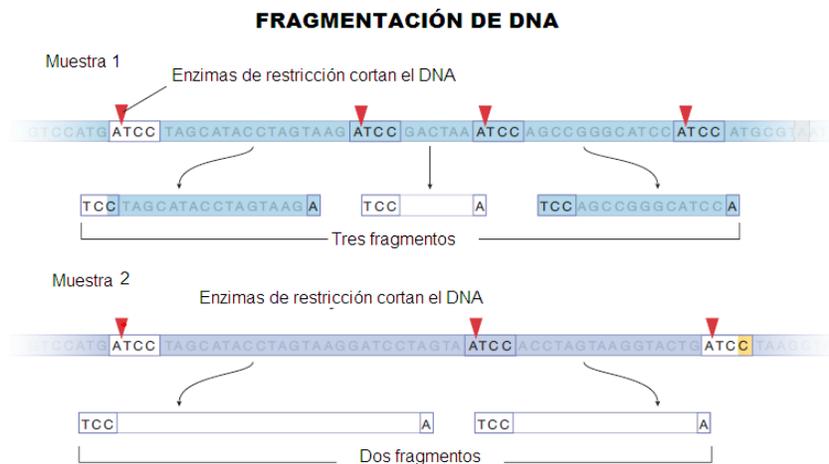


Imagen 15. Esquema general de la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción

Mientras que el gen *CAP59* pesa 1.9Kb y se encuentra localizado en el cromosoma 1, es usado por que es el principal gen en la secreción de la cápsula, además de que está presente en todos los serotipos por lo que puede ser usado en los 8 tipos moleculares usando los mismos cebadores. (Meyer W., et al, 2009). Este gen tiene más del 90% de similitud en la secuencia de nucleótidos entre los serotipos A y D; B y C. Sin embargo no hay diferencias en las secuencia del gen entre las parejas sexuales α y α del mismo serotipo (Nakamura Y. et al, 2000).

Para hacer la diferenciación genotípica de los aislamientos y así obtener el serotipo y el tipo de pareja sexual, se realizó la técnica de RFLP con digestión de enzimas *Styl* y *HpaII*, que proporcionarán diferentes patrones de fragmentos para cada uno de ellos.

Genotipificación

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se buscaron nuevas técnicas más sensibles e informativas para la tipificación de *Cryptococcus*. Utilizando las técnicas PCR huella digital y AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) se amplificaron los fragmentos del microsatélite M13 y del minisatélite (GACA)₄, los cuales permitieron la agrupación de la mayoría de los aislados del complejo en 9 tipos moleculares principales.

Los miembros del *Cryptococcal Working Group* basándose en estos descubrimientos y al observar que tenían correlación con la serotipificación utilizada por (Ikeda y Tsuchiya, 1982) aceptaron a *C. gattii* como una especie independiente de *C. neoformans* en 2003 y además asignaron los siguientes genotipos al complejo *C. neoformans/ C. gattii* (Imagen 16):

- VNI, VNII y VNB que agrupan a las cepas *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A.
- VNIII para cepas híbridas producto de la reproducción sexual entre cepas de serotipos A y D.
- VNIV para las cepas *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo D.
- VGI y VGII que agrupan a las cepas *C. gattii* serotipo B.
- VGIII para las cepas *C. gattii* serotipo C.
- VGIV para cepas híbridas de serotipos B y C.

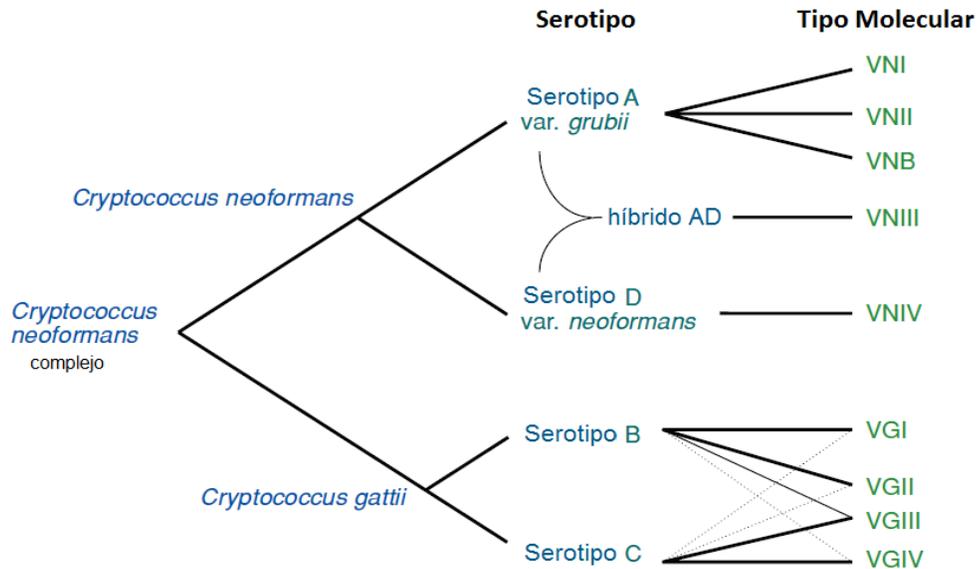


Imagen 16. Clasificación del complejo *Cryptococcus neoformans* (Tomada de Lin X., *et al.*, 2006)

Debido a los genotipos identificados, la correcta identificación y tipificación de los aislamientos clínicos del complejo están basados en estudios moleculares de DNA, entre las cuales se encuentran los siguientes métodos para conocer el serotipo, genotipo y tipo sexuales de las especies y variedades.

- AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados). Esta metodología amplifica fragmentos al azar mediante PCR cuya cantidad y patrones electroforéticos son específicos para cada especie. Es una técnica que genera patrones de más de 20 bandas (Trilles L., *et al*, 2003) Los cebadores utilizados para esta técnica amplifican los microsatélites M13 o el minisatélite (GACA)₄. Este método fue de los primeros en utilizarse para la tipificación, sin embargo su análisis es complicado por la cantidad de patrones de bandas que se obtienen y es necesario la utilización de *software*.

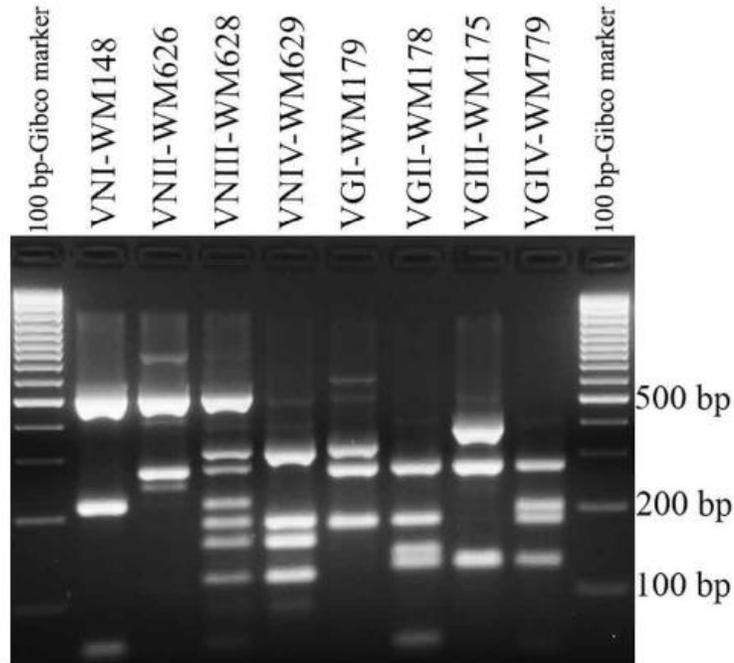


Imagen 18. Patrones de bandas obtenidos por RFLP del gen *URA5* utilizando la enzima de restricción *Sau96I*. (Tomado de Trilles L., 2008)

- MLST (Multilocus Sequence Type). Es el método consensado que el *Cryptococcal Working Group* de la ISHAM (*International Society for Human and Animal Mycology*) ha descrito para la genotipificación mediante la secuenciación de fragmentos de 7 genes: *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* y *IGS1* (Meyer W., et al 2009). Estos genes fueron seleccionados, debido a que se encuentran en los cinco serotipos y presentan una alta diversidad alélica, capaz de distinguir entre los genotipos ya descritos previamente.

Objetivos

Objetivo general

Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos clínicos y ambientales de *Cryptococcus sp.*

Objetivo Particular

- Caracterización fenotípica de factores de virulencia:
 - Determinar el tiempo de generación de los aislamientos en diferentes condiciones:
 - i. Temperatura 30° y 37°C
 - ii. Medios de cultivo
 - Inducción de cápsula en medios específicos
 - Inducción de la síntesis de melanina
 - Determinar la actividad de ureasa
 - Evaluar la resistencia a diferentes compuestos antifúngicos

- Caracterización genotípica
Identificación del serotipo y pareja sexual de los aislamientos de *Cryptococcus sp.* por PCR-RFLP de los genes *CAP59* y *GEF1*

Metodología

Aislamientos clínicos y ambientales

Se obtuvieron 12 aislamientos a partir de muestras biológicas de pacientes del Hospital Juárez de México OPD. SSA. (2008 a 2013) y 7 aislamientos ambientales obtenidos de excrementos de palomas y de hojas de eucaliptos del Distrito Federal. También se estudió la cepa de la Facultad de Química-UNAM, y las cepas de la ATCC *C. neoformans* 96909 (tipo sexual a) y ATCC *C. neoformans* 96910 (tipo sexual α) que se utilizaron como controles para las diferentes pruebas realizadas.

Factores de virulencia: caracterización fenotípica

Influencia de la temperatura

Se tomó una colonia aislada de cada aislamiento y se incubó en medio Sabouraud líquido (SL) o YPD líquido a 30 o 37°C con agitación constante a 150rpm toda la noche. A partir de ese cultivo se resembró en medio nuevo y se llevó a 0.1 de absorbancia (610nm) y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones. Se midió la absorbancia cada dos horas para determinar el tiempo de generación en las diferentes condiciones. (*Takeo K., et al. 2003. Bruatto M., et al., 1992.*)

Inducción de Cápsula

Para esta prueba se realizó de manera similar el procedimiento de curva de crecimiento, pero las muestras fueron recolectadas en fase logarítmica, y el cultivo recolectado se centrifugó a 3000 rpm/5min y las células se lavaron dos veces con PBS. Las células de cada aislamiento se sembraron en una placa de poliestireno (*Corning Incorporated, COSTAR*) de 6 pozos (un aislamiento en cada pozo;), a una concentración de 5.1×10^6 cel/mL en cada medio de inducción: (Sabouraud líquido, Sabouraud diluido 1:10, Sabouraud diluido amortiguado con MOPS 50 mM y con HEPES 50 mM) y se incubaron durante 72h/30°C, se midió el pH del medio cada 24h. Finalmente se observaron las células en tinta china, con un aumento de 100x,

midiendo la cápsula y el blastoconidio de 50 células de cada medio. (Zaragoza O. et al. 2004) A partir de estos datos, se obtendrá la relación capsula-levadura.

Inducción de la síntesis de melanina

Las células fueron crecidas en medio mínimo (MM) todo la noche e incubándolas a 30°C con agitación constante a 150 rpm. A partir de ese medio, se llevaron a una concentración de 5×10^6 cel/mL, y se lavó tres veces con MM fresco. De este concentrado de células, se depositaron 10 µL en agar MM con glucosa al 15 mM y 222 mM, se incubaron a 30°C durante 7 días. Transcurrido ese tiempo, se adicionó sobre las colonias 10 microlitros L-DOPA (*L-3,4-dihidroxifenilalanina*, Sigma Aldrich, USA) a diferentes concentraciones (0.1mM, 1mM y 10mM). Se observó la formación de un pigmento café oscuro o negro a las 72h de incubación a 30°C. (Chaskes S., 1981; Eisenman H., et al, 2007; Eisenman H., et al, 2011)

Determinación de la actividad de ureasa

Las muestras fueron crecidas en agar YPD a 30°C/48 h. Posteriormente se tomó una asada y se suspendieron en agua destilada estéril, llegando a 1.0 UA (610 nm). Las células se mezclaron con caldo urea 2x (1:1). Las células de cada aislamiento se sembraron en una placa de poliestireno de 24 pozos (un aislamiento por pozo) y se incubaron a 37°C/48h. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron leídas a 560 nm después de 12h de incubación, de la siguiente manera: se tomó 1.5mL de muestra, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, se tomó 1 mL de sobrenadante y se mezcló con 1 mL de agua destilada. Este procedimiento se repitió a las 24 y 48h. Previamente se realizó la cuantificación de proteínas totales de cada aislamiento mediante el método de Lowry posteriormente la actividad específica. (Kwon-Chung K. J., et al., 1987; Torres-Rodríguez J. M., 2008)

Identificación fenotípica de la especie *C. gattii*

Se sembró una colonia aislada de cada aislamiento en medio *canavanina-glicina-azul de bromotimol* a 30°C/72 h. Las cepas *C. neoformans* ATCC 96909 y ATCC 96910 fueron usados como controles negativos y la cepa FQ como control positivo.

La prueba se considera positiva, cuando hay cambio de color de amarillo a azul en el medio. (*Polacheck I., et al., 1986; Klein KR, et al 2009*)

Caracterización molecular

Extracción de DNA

Se tomaron de 2 a 3 colonias aisladas de 48h/30°C de incubación, y se depositaron en 1mL de buffer urea a 37°C durante una hora, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min, se colocaron en un tubo Eppendorf con 400 µL de buffer de lisis, 400 µL de cloroformo y 400 µg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Las células se lisaron por agitación en vortex constante durante 10 min. Después se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 rpm, la fase acuosa fue removida y se lavó con 400 µL de cloroformo, mezclando las fases en el vortex durante 2 min y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 14 000 rpm.

La fase acuosa se pasó a un tubo Eppendorf nuevo, se adicionaron 400 µL de isopropanol frío y se dejó precipitar a -20°C. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. El precipitado de DNA se lavó con etanol al 70%, se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante a una temperatura entre 60 y 65°C. El botón de DNA se resuspendió en 25 µL de buffer TE, dejando disolverlo por 1h a 60°C. Por último se cuantificó la concentración de DNA (280 nm) y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% presente en la muestra para verificar su integridad (*Mirhendi H., 2006*)

Amplificación de la región CAP 59 por PCR

Se utilizaron los cebadores *CAP59F* (5'-CCTTGCCGAAGTTCGAACG-3') y *CAP59R* (5'- AATCGGTGGTTGGATTCAAGTGT-3'). La reacción se realizó en un volumen final de 20µL, conteniendo 100 ng de DNA aproximadamente, 1.2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNT's, 1.6 mM de cada uno de los cebadores y 0.5 U de Taq polimerasa. El producto de amplificación se verificó en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x.

Amplificación de la región *GEF1* por PCR

Se utilizaron los cebadores *GEF1R* (5'- TACGCTTGCCCCGATCTG-3') y *GEF1F* (5'-GGACCCATGCCTGAAATGTG-3'). La PCR se realizó en un volumen final de 20µL, conteniendo entre 100 - 200 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNT's, 10 mM de cada uno de los cebadores y 1.5 U de Taq polimerasa. El producto de amplificación se verificó en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x.

Digestión del fragmento de amplificación con *HpaII*

Para la reacción de digestión se adicionaron 10µL del producto amplificado, 2.5 µL de Buffer tango 10x, 1µL de *HpaII*. Las reacciones finales se llevaron a un volumen final de 25 µL. La incubación fue realizada a 37°C durante 12 h. Los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3 % en buffer TBE 1x.

Digestión del fragmento de amplificación con *StyI*

Para la reacción de digestión se adicionaron 10 µL del producto amplificado, 2µL de Buffer tango 10x, 0.5 µL de *StyI* y 7.5 µL de agua. Las reacciones finales se llevaron a un volumen final de 20 µL. La incubación fue realizada a 37°C durante 1h. Los productos de digestión fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1x. (*Romeo O., et al, 2011; Feng X, et al, 2008*)

Resistencia a antifúngicos

Del cultivo de 48 h en Agar Dextrosa de Sabouraud de cada aislamiento se tomaron 2 colonias y se hizo una suspensión celular en 3 mL de agua destilada estéril, llevándolo aproximadamente a 3x10⁶ lev/mL, y se realizó una dilución 1:20 en agua destilada estéril. De estas suspensión se tomaron 20µL y se inocularon en el medio de suspensión, y se depositaron 100 µL de esta solución en cada pozo de la microplaca de Fungitest, incubándose a 30°C/72 h. Esta prueba utiliza los siguientes antifúngicos: Fluconazol, Anfotericina B, Itraconazol, Miconazol, Ketoconazol y 5-fluoroscitocina. (*Determinación de la sensibilidad de los hongos a los agentes antifúngicos. FUNGITEST. Biorad*)

Resultados

Aislamientos clínicos y ambientales

Los aislamientos analizados fueron sometidos a pruebas de rutina para la identificación de cada uno de ellos, como son la observación de la cápsula en tinta china, desarrollo de pigmento en alpiste negro, determinación de urea en agar de Christensen y crecimiento en medio BCG (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol) para la identificación presuntiva de especie. El resultado de estas pruebas, indican que todos los aislamientos pertenecen a la especie *C. neoformans*.

Influencia de la temperatura

Para analizar las diferencias de crecimiento entre los aislamientos clínicos y ambientales se realizaron curvas de crecimiento y se obtuvieron tiempos de generación (Tg) en dos medios de cultivo: Sabouraud líquido que es un medio mínimo (SL) y extracto de levadura líquido (YPD) que es un medio rico. El cultivo del aislamiento se hizo a 30°C (crecimiento en el ambiente) y a 37°C (crecimiento dentro del hospedero). La fase exponencial de todos los aislamientos se presentó entre las 5 y 10 h de incubación. Los resultados fueron los siguientes:

Con respecto a los aislamientos clínicos: en medio ADS a 30°C el Tg fue de 1.48 a 3.28h; a 37°C los aislamientos crecen más lento y el Tg aumentó 1 h aproximadamente, excepto el aislamiento clínico 6. En medio YPD a 30°C, se observó una cinética similar a la que se observó en ADS a esta temperatura. A 37°C en YPD los únicos aislamientos que presentaron un ligero incremento en el Tg fueron el 3, 6 y 12. Con respecto a las cepas ATCC, se observó que el mejor crecimiento fue en YPD a 30°C para ambas cepas, ya que en ADS a 37°C la cepa 969010 elevó su Tg 6h (Ver imagen 19 y 20).

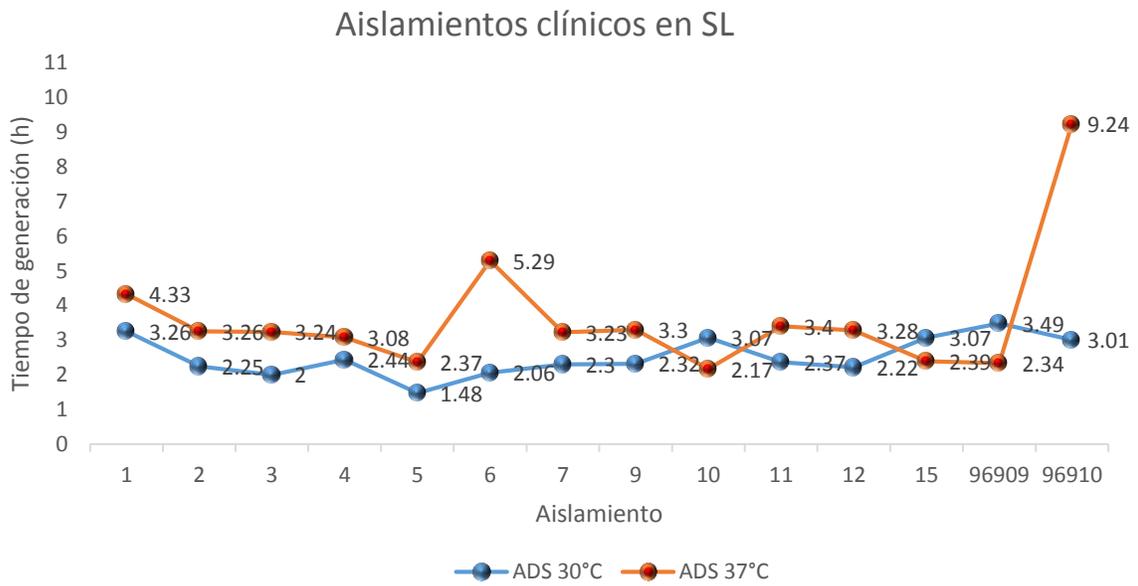


Imagen 19. Tiempos de generación de aislamientos clínicos y cepas ATCC en medio SL.

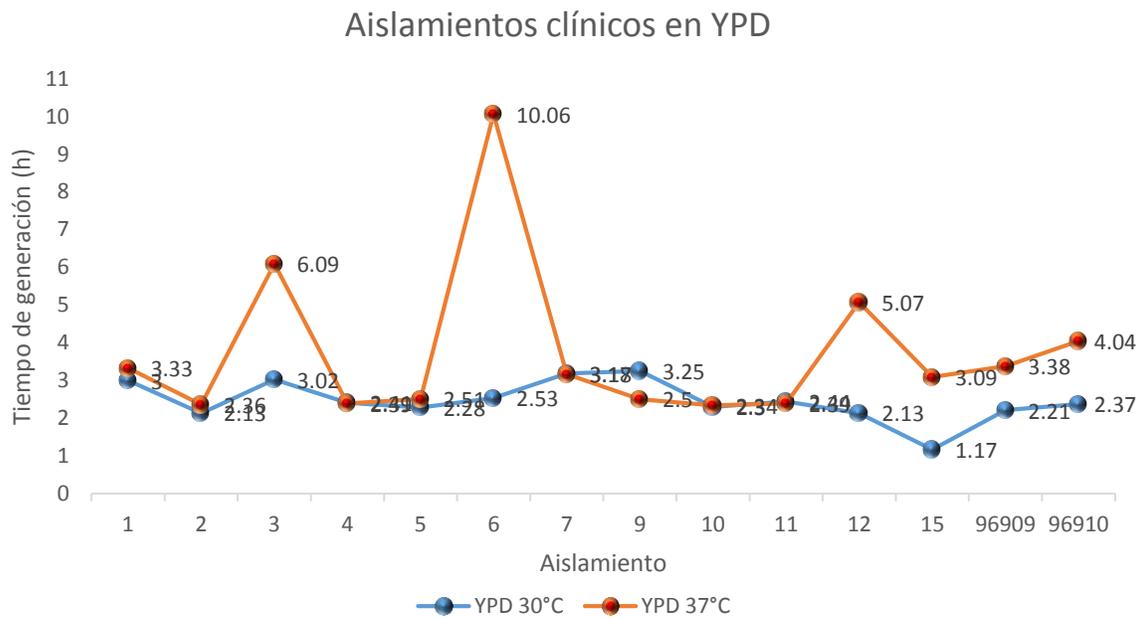


Imagen 20. Tiempos de generación de aislamientos clínicos y cepas ATCC en medio YPD.

Con respecto a los aislamientos ambientales: en ADS a 30°C presentaron Tg de 2 a 3.20 h, a 37°C los Tg son similares a los de 30°C, excepto V003, V030 y CN10. En medio YPD a 37°C se observó una ligera inhibición del crecimiento con respecto a 30°C en este mismo medio, aumentando el Tg en la mayoría de las muestras excepto el aislamiento VOON (Ver Imagen 21 y 22).

Aislamientos ambientales en SL

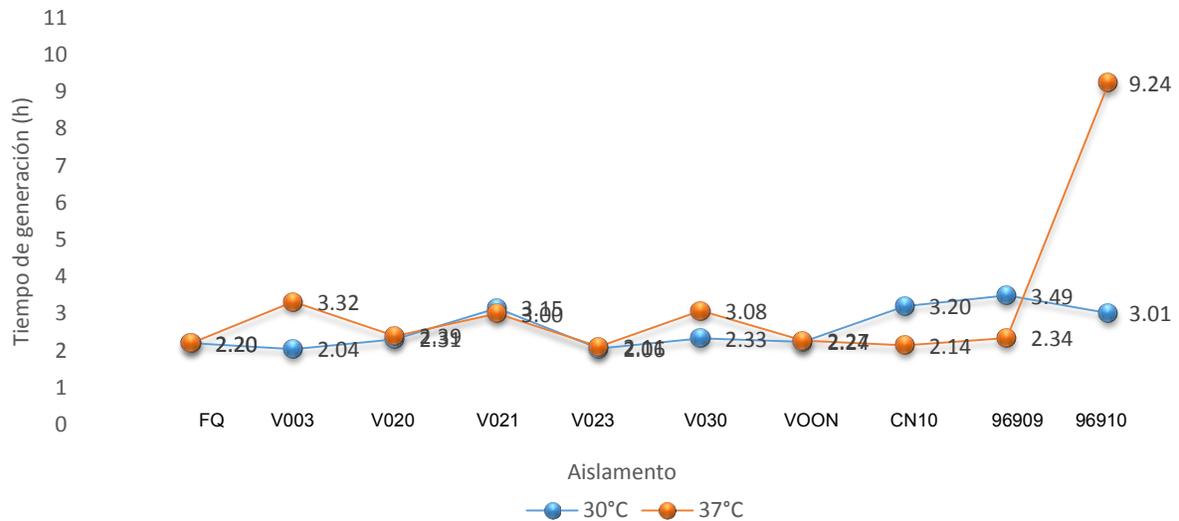


Imagen 21: Tiempos de generación de aislamientos ambientales y cepas ATCC en medio SL.

Aislamientos ambientales en YPD

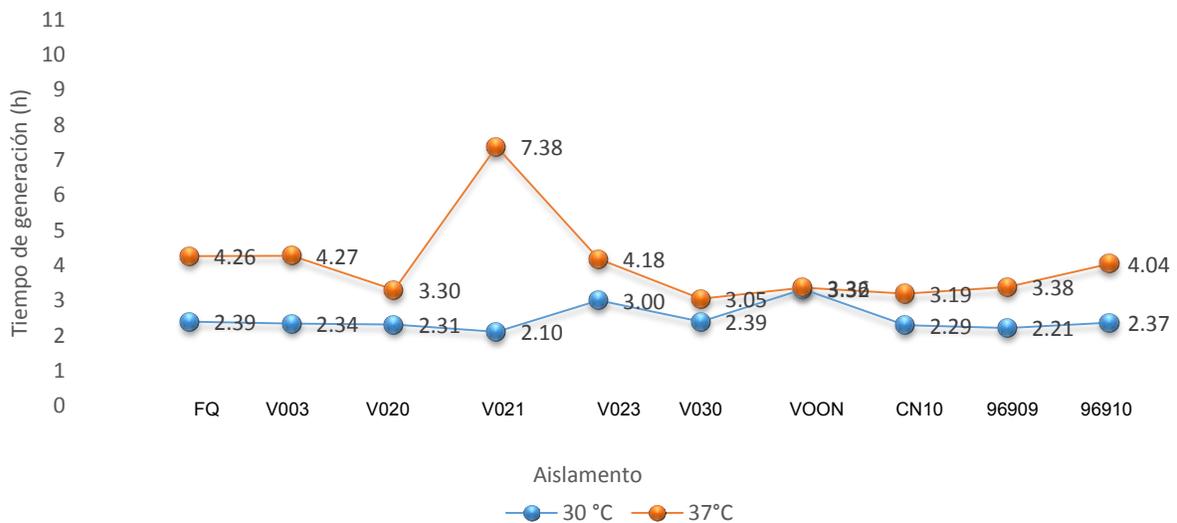


Imagen 22: Tiempos de generación de aislamientos ambientales y cepas ATCC en medio YPD.

Inducción de cápsula

En este estudio se comparó la relación cápsula – blastoconidio de los aislamientos clínicos y ambientales en diferentes medios (*Zaragoza O. et al. 2004*). Los medios utilizados fueron:

- Sabouraud líquido (SL): glucosa 4%, pH 5.6
- Sabouraud líquido dil 1:10 en agua: glucosa 0.4%, pH 5.6
- Sabouraud líquido dil 1:10 con MOPS 50mM: glucosa 0.4%, pH 7.3
- Sabouraud líquido dil 1:10 con HEPES 50mM: glucosa 0.4%, pH 7.3

Los resultados fueron los siguientes: La inducción de cápsula en el medio con glucosa al 0.4% (SL diluido 1:10) fue ligeramente mayor en comparación con el SL (4% glucosa). Esto sugiere que no hay una dependencia por la concentración de glucosa (ver Imagen 23)

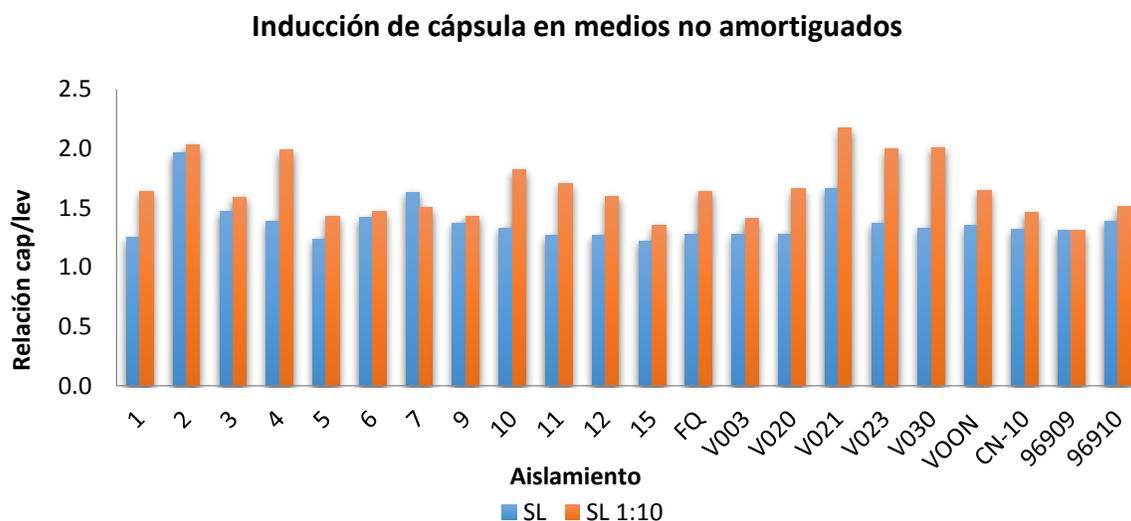


Imagen 23. Inducción de cápsula en medio SL y SL dil 1:10

La inducción de cápsula en medios amortiguados a pH 7.3, mostró diferencias importantes entre los aislamientos. En los clínicos la inducción de cápsula se observó en medio SL 1:10-Hepes pH 7.3, únicamente los aislamientos 3 y 6 tuvieron mejor inducción en SL 1:10 MOPS pH 7.3.

En los aislamientos ambientales, al igual que los clínicos presentaron mejor inducción de síntesis de la cápsula en el medio SL 1:10 HEPES pH 7.3, sin embargo la diferencia entre MOPS y HEPES es mayor en estos aislamientos (Imagen 24). Los aislamientos V003 y CN10, tuvieron una mejor inducción en SL 1:10 MOPS y el aislamiento VOON no sintetizó cápsula en ninguna de estas dos condiciones, al igual que las cepas ATCC 96909 y ATCC 96910.

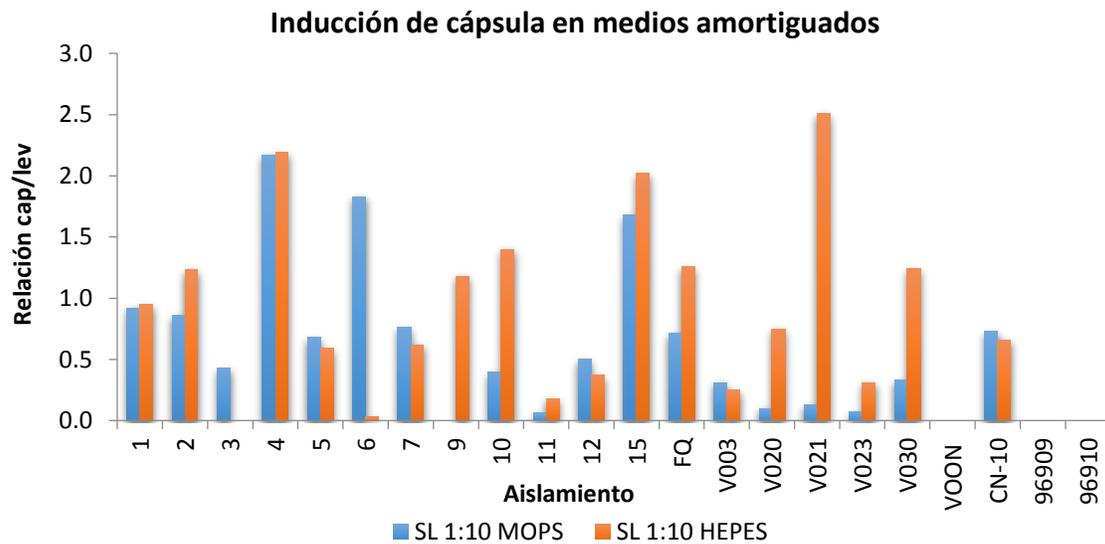


Imagen 24. Inducción de cápsula en medio SL dil 1:10 con MOPS y HEPES

Se ha descrito que el pH neutro es importante para la formación de la cápsula en *Cryptococcus* por lo que se midió el pH cada 24 h; los medios amortiguados con MOPS y HEPES presentaron pH final de 5.33 después de 72 h mientras que los medios no amortiguados tuvieron pH de 3.4-3.85, confirmando que el pH tuvo mayor influencia para el tamaño de la cápsula, que la concentración de glucosa.

| Medio de inducción | pH (inicial-final) |
|---------------------------------|--------------------|
| Sabouraud | 5.12 – 3.85 |
| Sabouraud dil 1:10 | 5.48 – 3.41 |
| Sabouraud dil 1:10 + MOPS 50mM | 7.25 – 5.33 |
| Sabouraud dil 1:10 + HEPES 50mM | 7.29 – 5.33 |

Tabla 2. Intervalo de pH de los medios de incubación para la Inducción de cápsula. (pH inicial y final a 72h de incubación)

Estos resultados fueron sometidos al método estadístico de T de Student con corrección de Welch, que nos permitieron concluir sobre las diferencias significativas entre dichos medios. Los resultados estadísticos, se muestran en el anexo 3.

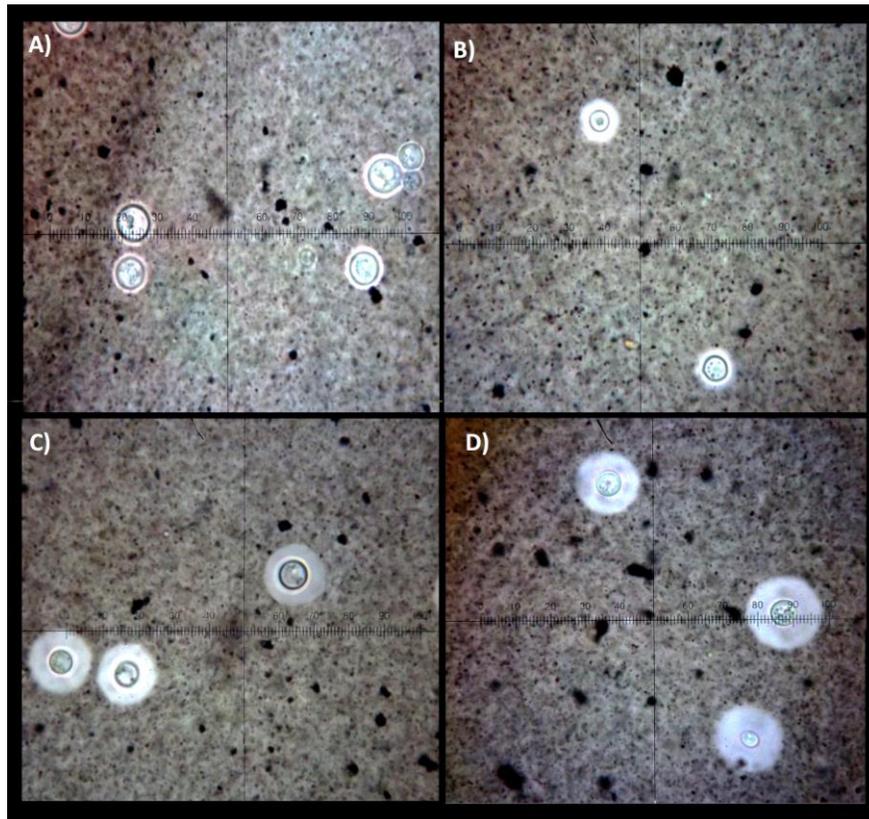


Imagen 25. Examen directo de cápsula en medios de incubación (72h). A) SL; B) SL dil 1:10; C) SL dil + MOPS 50mM y D) SL dil + HEPES 50mM. Aislamiento clínico 10. Aumento 100x

Inducción de la síntesis de Melanina

En este estudio se comparó la capacidad de los aislamientos para sintetizar melanina, se utilizaron dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de L-DOPA.

Los aislamientos se incubaron 7 días en medio mínimo (MM): suplementado con glucosa 15 mM (0.27%) y 222 mM (4%) (*Chaskes S. et al, 1981*), y diferentes cantidades de L-DOPA. Los resultados fueron los siguientes: todos los aislamientos

analizados generaron depósitos de pigmento en diferentes intensidades, observando que la mayor pigmentación se dió con una concentración de 10mM de DOPA, mientras que en MM con glucosa 222mM no se presentó el pigmento en ninguna de las concentraciones de L-DOPA agregadas (Ver Imagen 26)

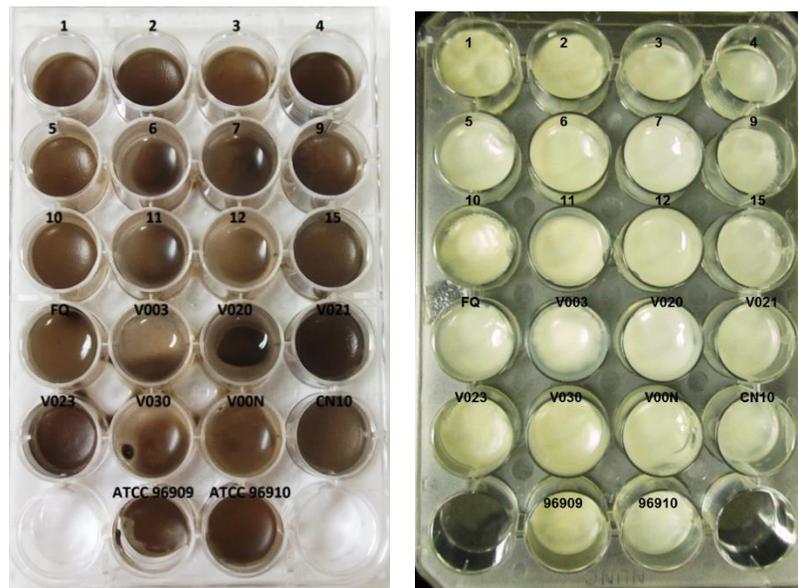


Imagen 26. Muestras en MM con glucosa 15 mM y 222 mM con L-DOPA 10 mM con L-DOPA 10 mM, presentando el pigmento melánico a los 10 días de incubación (izquierda). Inhibición del pigmento en MM (derecha)

Determinación de la actividad de Ureasa

En esta prueba se determinó la actividad específica de la ureasa de los aislamientos, se utilizó como estándar de referencia para la curva de calibración- la ureasa comercial con 3U de enzima (*Jack bean Type III, Urease from Canavalia ensiformes*, Sigma Aldrich). Para determinar esta actividad específica (unidades de enzima por miligramo de proteína), se usó el lisado de una suspensión que contenía 5×10^6 cel/mL, que fueron incubadas por 48h, y su absorbancia 560_{nm} fue monitoreada a las 12, 24 y 48 h. La unidad de enzima es la cantidad de sustrato convertido en producto por unidad de tiempo bajo condiciones específicas de pH y temperatura.

| Clínicas | | | | Ambientales | | | |
|----------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Muestra | Unidad enzimática (U) | Conc de proteína total (µg/mL) | Actividad específica (U/mg proteína) | Muestra | Unidad enzimática (U) | Conc de proteína total (µg/mL) | Actividad específica (U/mg proteína) |
| 1 | 2.10x10 ⁻³ | 21.32 | 9.26 | <i>C. gattii</i> | 1.41 x10 ⁻² | 6.04 | 46.62 |
| 2 | 6.40x10 ⁻³ | 32.00 | 3.99 | V003 | 1.81 x10 ⁻² | 4.60 | 4.43 |
| 3 | 9.10x10 ⁻³ | 31.90 | 7.85 | V020 | 1.58 x10 ⁻² | 6.93 | 16.67 |
| 4 | 1.25 x10 ⁻² | 11.32 | 8.61 | V021 | 1.00 x10 ⁻³ | 20.86 | 1.00 |
| 5 | 4.90x10 ⁻³ | 24.19 | 11.95 | V023 | 3.70 x10 ⁻³ | 16.48 | 10.32 |
| 6 | 9.90x10 ⁻³ | 12.45 | 22.83 | V030 | 1.00 x10 ⁻³ | 41.26 | 1.79 |
| 7 | 1.52 x10 ⁻² | 25.58 | 11.91 | VOON | 8.50 x10 ⁻³ | 8.26 | 16.62 |
| 9 | 1.45 x10 ⁻² | 6.07 | 31.73 | CN10 | 1.17 x10 ⁻² | 15.88 | 14.69 |
| 10 | 1.49 x10 ⁻² | 23.08 | 12.92 | 96909 | 6.90 x10 ⁻³ | 9.25 | 39.12 |
| 11 | 1.42 x10 ⁻² | 42.70 | 4.25 | 96910 | 5.80 x10 ⁻³ | 19.51 | 16.18 |
| 12 | 9.60x10 ⁻³ | 18.08 | 2.38 | | | | |
| 15 | 4.40x10 ⁻³ | 2.02 | 43.82 | | | | |

Tabla 3. Actividad específica de las muestras analizadas, considerando las unidades enzimáticas, y la concentración total de proteínas.

En estos resultados se observó una gran variabilidad de la actividad específica de los aislamientos clínicos (2 a 43 U/mg proteína), mientras que los aislamientos ambientales, presentan una menor actividad, la cual también es variable entre ellos (1 y 17U/mg de proteína). En los aislamientos se pueden ver tres grupos, los cuales tienen actividad < 10U/mg; el segundo grupo tiene actividad de 10 a 22 U/mg y finalmente los que tienen actividad mayor a 22 U/mg. La cepa ATCC 96909 tiene mayor actividad con respecto a la cepa ATCC 96910 (Ver Imagen 27)

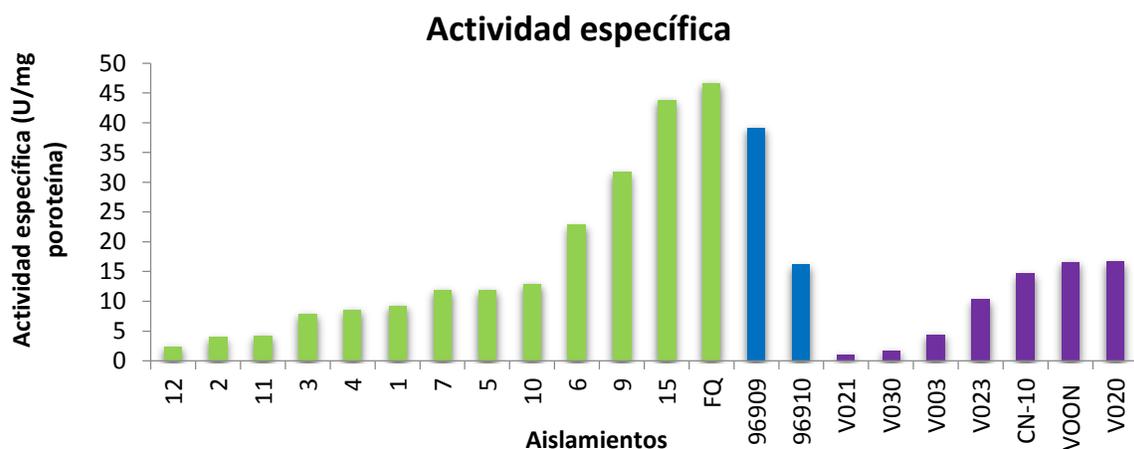


Imagen 27. Actividad específica de ureasa de los aislamientos clínicos (barras verdes), ambientales (barras azules) y controles (morado)

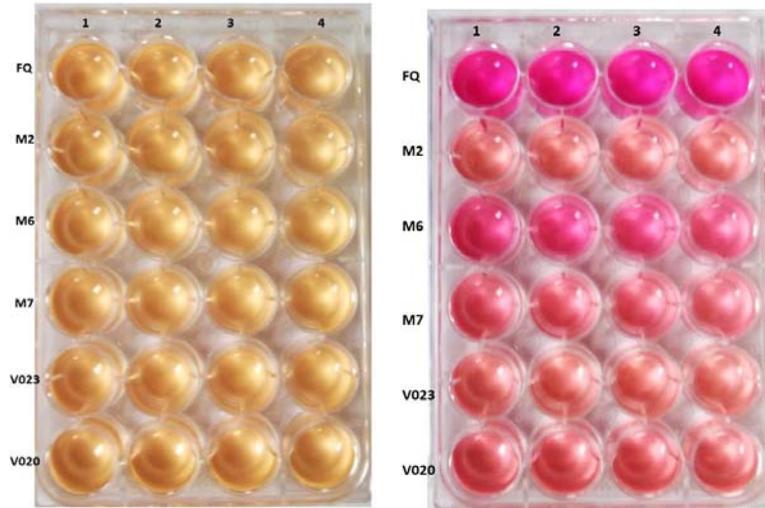


Imagen 28: Actividad de ureasa en medio RUH de *C. gattii* (FQ); muestras clínicas 2, 6 y 7 (M2, M6 y M7 respectivamente); muestras ambientales V023 y V020. Después de 48 h de incubación. (1-4) indican el número de repeticiones realizadas para cada aislamiento.

Identificación en medio L-canavanina glicina azul de bromotimol

Los aislamientos fueron sembrados en medio L-canavanina 30°C/72h, transcurrido este tiempo se generó el cambio de color en el medio, y se identificó al aislamiento de la FQ, como *Cryptococcus gattii*, que posteriormente fue usado como control positivo, mientras que el resto de las muestras se identificaron como *Cryptococcus neoformans*.

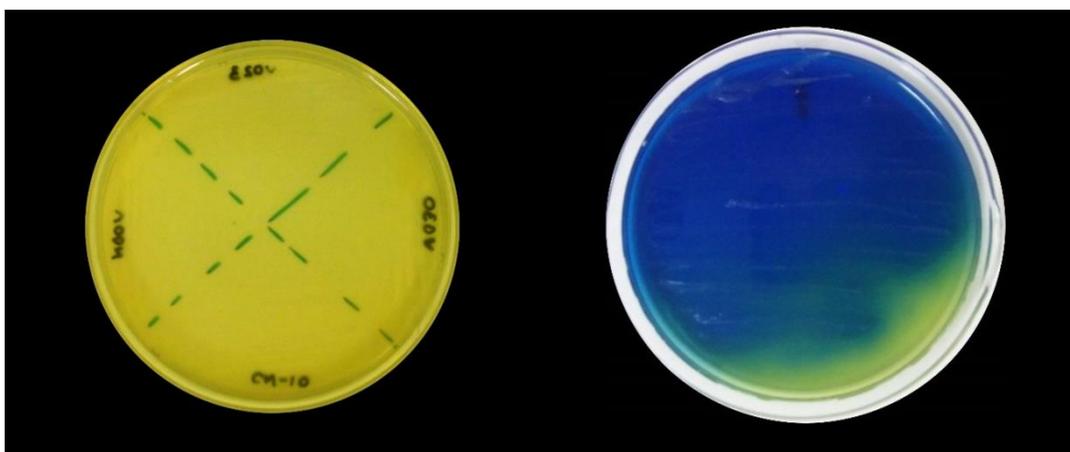


Imagen 29. Medio L-canavanina glicina azul de bromotimol. Aislamientos clínicos (derecha), muestra FQ identificada como *C. gattii* (derecha).

Resistencia antifúngica

Las muestras analizadas presentaron sensibilidad a todos los antifúngicos en la concentración alta, con excepción de la muestra clínica 9, que fue resistente a 5-fluoroscitocina a 32 µg/mL. Por otro lado, las cepas ATCC (96909 y 96910) y la muestra ambiental CN10 presentaron una sensibilidad a todos los antifungicos en ambas concentraciones. La anfotericina B generó inhibición en todos los aislamientos, mientras que la mayoría de las muestras clínicas y ambientales presentaron resistencia a la 5-fluorocitosina (2µg/mL).

| Sensibilidad anti fúngica (FUNGITEST BIORAD) | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| aislamiento | 5-FLU (2 µg/mL) | 5-FLU (32 µg/mL) | AB (2 µg/mL) | AB (8 µg/mL) | MCZ (0.5 µg/mL) | MCZ (8 µg/mL) | KET (0.5 µg/mL) | KET (4 µg/mL) | ITRA (0.5 µg/mL) | ITRA (4 µg/mL) | FLU (8 µg/mL) | FLU (64 µg/mL) |
| 1 | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2 | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3 | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4 | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 5 | R | S | S | S | R | S | S | S | I | S | R | S |
| 6 | R | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S |
| 7 | I | S | S | S | R | S | S | S | R | S | R | S |
| 9 | R | R | S | S | R | S | R | S | R | S | R | S |
| 10 | R | S | S | S | R | S | I | S | R | S | S | S |
| 11 | R | S | S | S | I | S | S | S | R | S | S | S |
| 12 | R | S | S | S | R | S | R | S | R | S | R | S |
| 15 | R | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S |
| FQ | R | S | S | S | R | S | R | S | R | S | R | S |
| V003 | S | S | S | S | R | S | S | S | I | S | R | S |
| V020 | R | S | S | S | R | S | S | S | I | S | R | S |
| V021 | R | S | S | S | R | S | I | S | I | S | S | S |
| V023 | R | S | S | S | R | S | S | S | I | S | S | S |
| V030 | S | S | S | S | R | S | S | S | I | S | R | S |
| V00N | R | S | S | S | R | S | I | S | R | S | S | S |
| CN10 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 96909 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 96910 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

Tabla 4. Determinación de la sensibilidad de los aislamientos a los agentes antifúngicos. 5FC (5-fluorocitosina); AB (amfotericina); MCZ (miconazol); KET (ketoconazol); ITR (itraconazol); FLU (fluconazol). (R) Resistencia, crecimiento de cepa; (S) sensibilidad, ausencia de cepa;(I) Cepa de crecimiento lento.

Identificación molecular

Debido a que *Cryptococcus neoformans*, presenta dos variedades, y dos tipos de pareja sexual, es importante su identificación para llevar estudios epidemiológicos. En este estudio, la identificación se realizó con los genes *CAP59*, involucrado en la formación de cápsula e identifica el serotipo y *GEF1* que identifica el tipo de pareja sexual (mating a/ α).

El DNA de los aislamientos fue extraído por ruptura mecánica (perlas de vidrio), y se realizó la PCR con los cebadores *CAP59F* y *CAP59R* que amplificó un fragmento de 400 pb para todos los serotipos (Imagen 31); Este fragmento amplificado fue secuenciado y analizado por medio del software *Serial Cloner* y nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), identificando a los aislamientos clínicos y ambientales como *Cryptococcus neoformans var. grubii* con una similitud del 99% con la cepa *Cryptococcus neoformans var. grubii H99*, mientras que el aislamiento de la Facultad de Química se corroboró como *C. gattii*.

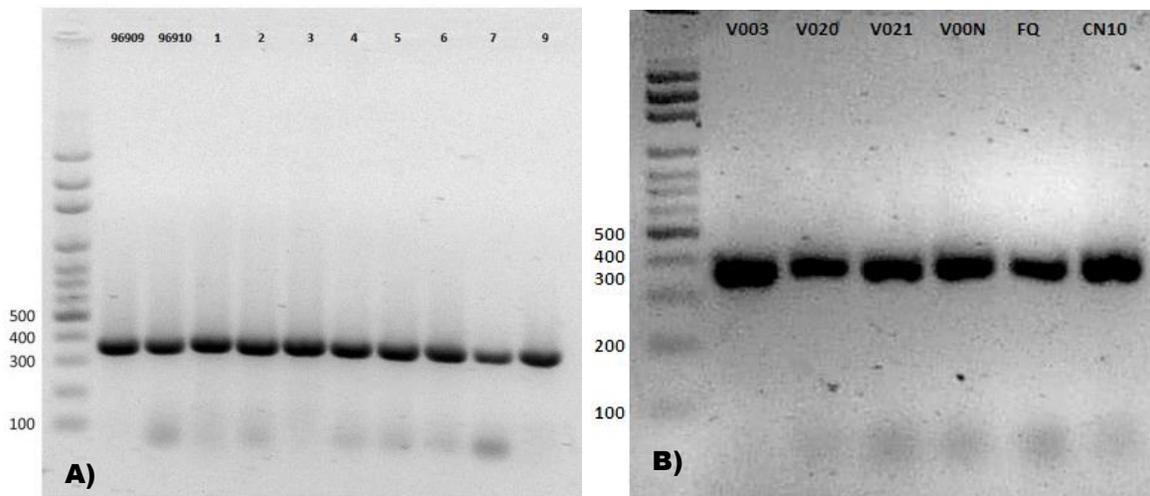


Imagen 31. Productos de amplificación del gen *CAP59*, mostrando bandas de 400 pb para todas las muestras, en gel de agarosa al 3% en TAE 1x. A) Muestras clínicas; B) Muestras ambientales y FQ

Para obtener la diferenciación del serotipo de los aislamientos, se realizó la digestión con la enzima *HpaII*, los patrones esperados son: para el serotipo D presentó

fragmentos de aproximadamente 211 y 160 pb, para el serotipo A no hay digestión, por lo que se observa una banda de 400 pb; finalmente para el serotipo B/C fragmentos de 270 y 100 pb. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

- Aislamientos clínicos y ambientales: Serotipo A
- Cepas ATCC 96909 y ATCC 96910: Serotipo D
- Aislamiento FQ: Serotipo B ó C

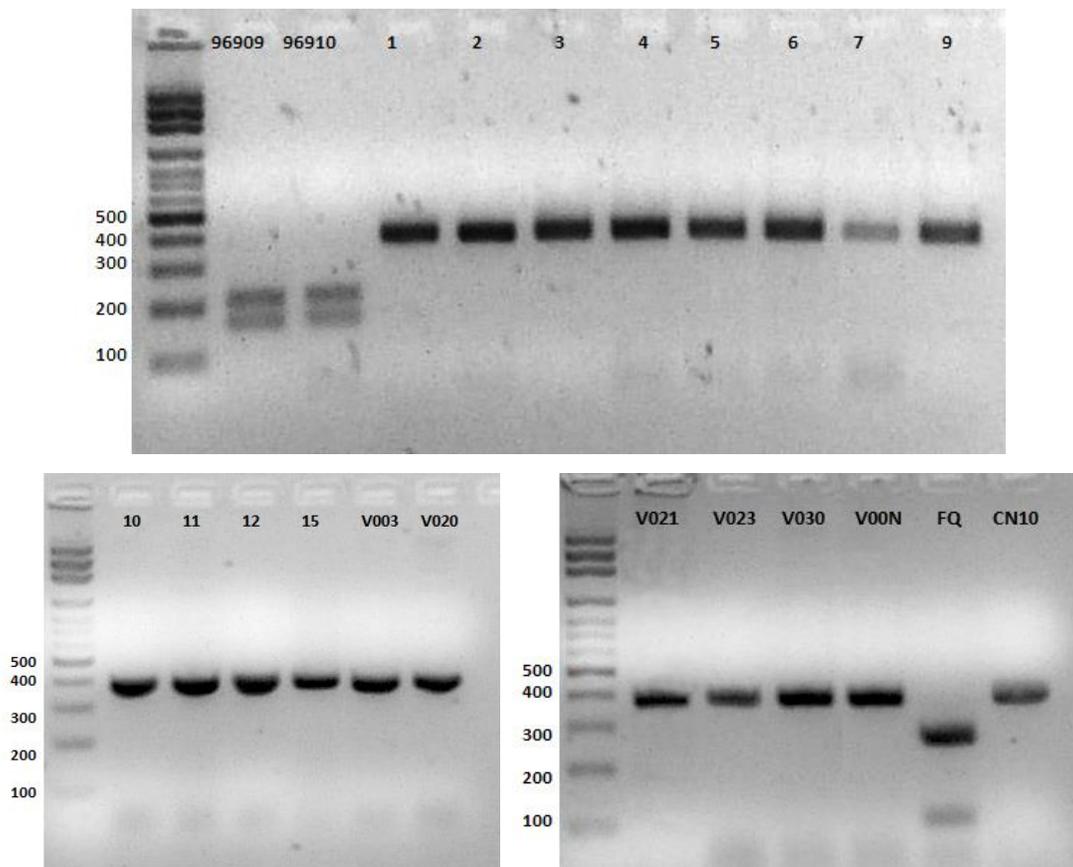


Imagen 32. Análisis de restricción de *CAP59* con digestión de HpaI en gel de agarosa al 3% en TBE 1x: ATCC 969090 y 96910 serotipo D; serotipo A para muestras clínicas y ambientales (1-15 y V003-CN10), serotipo B/C para muestra de FQ.

Para determinar el genotipo y el tipo de pareja sexual se realizó la amplificación con los cebadores del gen *GEF1*, el cual generó un fragmento de 1300 pb en todos los aislamientos independientemente del serotipo (Ver imagen 33)

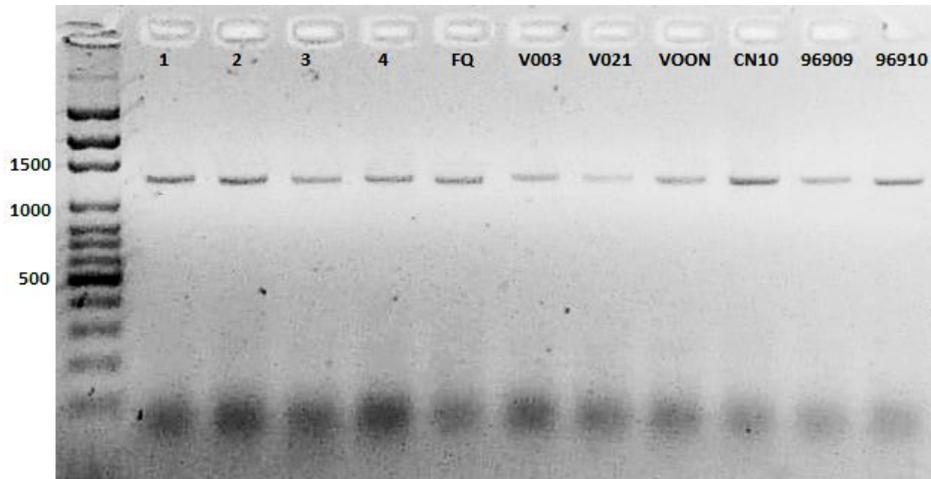


Imagen 33. Producto de amplificación del gen *GEF1*. Se generó un fragmento de 1300 pb para todas las muestras. Gel de agarosa al 2% en TAE 1x

Todas las muestras amplificadas con *GEF1* fueron digeridas con la enzima *HpaII* y *StyI* con el fin de identificar el tipo sexual, obteniendo los siguientes patrones:

- Los tamaños de fragmentos de RFLP con *StyI* para el gen *GEF1*, son los siguientes: para *C. neoformans var grubii* (NVI/a) se obtienen fragmentos de 1000 y 500pb, para la pareja sexual α los fragmentos esperados son de 1000, 300 y 120pb aproximadamente. Los fragmentos de RFLP con *HpaII* para el gen *GEF1*, se obtienen fragmentos de 400, 300 y 150pb para *C. neoformans var grubii* (NVI/a), para la pareja sexual α los fragmentos esperados son de 400, 380, 300 y 150pb aproximadamente.
- Para *C. neoformans var neoformans* (NIVI/a), la digestión con *StyI* para el gen *GEF1* se obtienen fragmentos de 1000 y 600pb, la pareja sexual α no presenta digestión por lo que solo se espera una banda de 1300pb. La digestión con *HpaII*, para ambas parejas sexuales se obtienen fragmentos de 600, 400 y 350pb.

Los resultados indican que:

- Se confirmó la pareja sexual de las cepas ATCC: 96909 es α y 96910 es α (imagen 34).

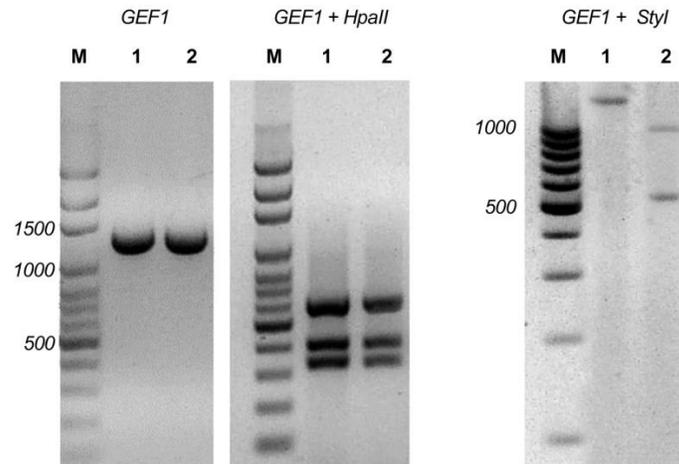


Imagen 34. Producto de amplificación de muestras ATCC 96910 (carril 1) y ATCC 96909 (carril 2) del gen *GEF1* (derecha), digestión con *HpaII* (centro) y digestión con *StyI* (izquierda) en gel de agarosa al 2% en TBE 1x.

- Las muestras clínicas y ambientales fueron identificadas como *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, mating α .

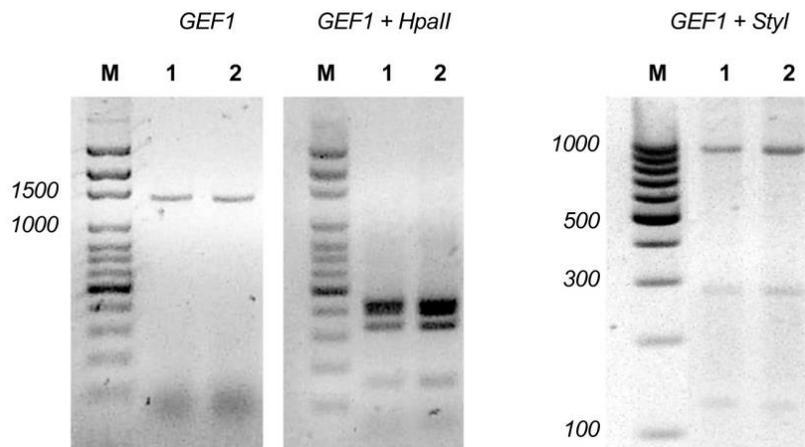


Imagen 35. Producto de amplificación de muestras clínicas y ambientales, (carril 1 y 2 respectivamente) del gen *GEF1* (izquierda), digestión con *HpaII* (centro) y digestión con *StyI* (izquierda) en gel de agarosa al 2% en TBE 1x.

Para la muestra FQ (*C. gattii*), presentó los siguientes patrones: con la enzima *HpaII* se generaron fragmentos de 900 y 650 pb, para la segunda enzima *StyI* se obtuvieron fragmentos de 900 y 350 pb, identificando a la muestra como *C. gattii*, serotipo B mating α , genotipo VGI (Ver imagen 36).

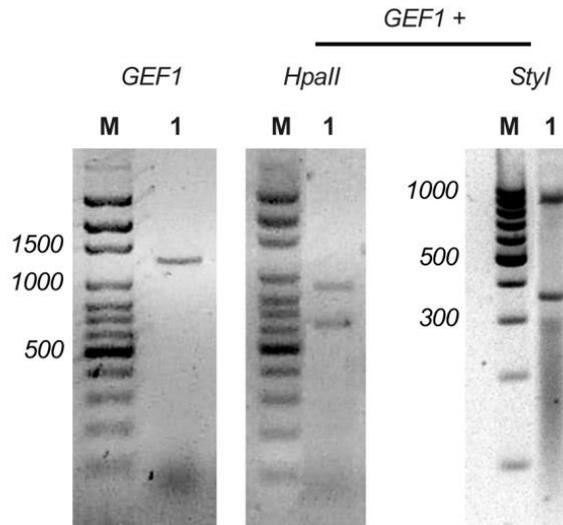


Imagen 36. Producto de amplificación de muestra FQ (Facultad de Química) del gen *GEF1* (izquierda), digestión con *Hpall* (centro) y digestión con *Styl* (izquierda) en gel de agarosa al 2% en TBE 1x.

En resumen:

- La mayoría de los aislamientos tienen un menor Tg a 30°C en medio Sabouraud líquido.
- La cápsula se indujo con mayor eficiencia en medio Sabouraud 1:10-HEPES 50mM. La cápsula no se vió afectada por la concentración de glucosa.
- La melanina se generó con mayor intensidad en MM suplementado con glucosa al 15mM (0.27%)/10mM de L-DOPA, mientras que el medio suplementado con glucosa al 222mM (4%) inhibió la formación de melanina.
- La actividad específica de la ureasa de los aislamientos mostraron una gran variabilidad: 1-43 U/mg. Los aislamientos ambientales presentaron una menor actividad en comparación con los clínicos.
- La identificación molecular, indicó lo siguiente:
 - ✓ Muestras clínicas y ambientales: *C. neoformans var. grubii*, serotipo A, pareja sexual α , genotipo NVI
 - ✓ La cepa ATCC 96909 *C. neoformans var neoformans*, serotipo D, pareja sexual α , y la cepa ATCC 96910 como *C. neoformans var neoformans*, serotipo D, pareja sexual α .
 - ✓ Muestra FQ: *C. gattii*, serotipo B, pareja sexual α , genotipo VGI

Discusión

C. neoformans es el agente causal de la criptococosis, micosis oportunista que se ha visto más frecuentemente por el aumento de pacientes con VIH/SIDA, y a pesar de los estudios realizados sobre este hongo, aún se desconocen diversos aspectos de su metabolismo, virulencia y ecología. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípicamente a aislamientos de origen clínico y ambiental, para poder establecer alguna relación entre ellos, aun cuando todos pertenecen a la variedad *grubii* y son serotipo A, pareja sexual α .

El primer factor de virulencia analizado es el crecimiento a 37 °C ya que le permite crecer, invadir los tejidos y generar enfermedad. Al comparar nuestros resultados, encontramos que los aislamientos clínicos mostraron mayor variabilidad en el Tg a 37°C por lo tanto su capacidad de crecimiento se ve afectada en comparación con el desarrollo presentado a 30°C; mientras que las muestras ambientales (ver imagen 19), presentaron una mejor adaptación al medio ADS en ambas temperaturas, esto puede deberse a las condiciones naturales en las que se encuentran este tipo de aislamientos. Resultados similares fueron reportados por *Heere L.* en 1975 y por *Takeo y Ohsuku* en 2003, indicando que el tiempo de generación es de 2h cuando se crece a 28°C y que éste aumenta hasta 8 h cuando se crecen a 34°C. Se ha demostrado que para el crecimiento de *C. neoformans* en el hospedero se requiere de la calcineurina (codificada por el gen *CNA1*) y del gen *RAS1* que están involucrados en la respuesta al estrés fisiológico y al crecimiento en temperaturas elevadas (37°C), de tal manera que éstos no son necesarios cuando se desarrollan a 30°C *in vitro* y presentan un mejor crecimiento (*Steen B. et al., 2003*).

Es importante mencionar que las cepas ATCC (serotipo D), presentaron un Tg mayor a 37°C en ambos medios, esto es porque el serotipo D es más sensible a temperaturas altas, debido a la distribución geográfica que presenta, y a la alta expresión de proteínas de shock térmico cuando son expuestos a estas

condiciones, mientras que las cepas serotipo A expresan estas proteínas en menor cantidad (*Steen B.R. et al., 2003*). Sin embargo en esta prueba sobresalieron algunos aislamientos como los clínicos 3, 6 y 12, presentando un aumento en el Tg a 37°C, y la muestra ambiental V021 (única muestra con Tg mayor a todos los demás aislamientos) presentó la misma situación.

La siguiente característica analizada es la cápsula, que es principal factor de virulencia, ésta modifica la osmolaridad del LCR, aumenta la presión intracraneal, inhibe la proliferación de células T y la fagocitosis (*Villena et al., 2008*). A través de diversos estudios se ha demostrado que la presión osmótica, fuente de carbono, presencia de dióxido de carbono, concentración de glucosa y el pH, (parámetros analizados en este trabajo) intervienen en el tamaño de la cápsula y sobre los macrófagos, replicándose dentro de estos y causando su muerte (*Tucker S., et al., 2002*), además de que su tamaño es dependiente del órgano infectado, en pulmón es de mayor tamaño que en cerebro, lo que refleja la importancia del medio en el que se desarrolla. Algunos autores indican que se ve inhibida a una concentración de 16% de glucosa (*Dykstra M., et al., 1977*), sin embargo en nuestro experimento la inhibición de la cápsula se presentó al 4% de glucosa.

Al medir y comparar estadísticamente (T de Student con corrección de Welch), nuestros resultados de la relación cápsula-blastoconidio se obtuvieron diferencias significativas en la síntesis de la cápsula. Se pudo observar que los aislamientos clínicos en medio diluido amortiguado con HEPES presentaron una mayor relación en promedio (2.52 ± 0.028) a diferencia de medio SL 1:10 ($1,63 \pm 0.092$); al igual que los aislamientos ambientales: en medio diluido amortiguado con HEPES (2.61 ± 0.021) y SL 1:10 ($1,36 \pm 0.058$). Los datos numéricos de esta prueba pueden observarse en el anexo 3. Debido a que la cápsula se desarrolla adecuadamente en un medio con pH 7.3, es importante tener en cuenta la capacidad amortiguadora de las soluciones utilizadas, HEPES (6.8 a 8.2) y MOPS (6.5 a 7.9), de tal manera que HEPES al tener un rango más amplio, le da ventaja de amortiguar más otros medios, situación contraria a la reportada por *Oscar Zaragosa* en 2004.

Recordemos que las muestras clínicas 3 y 6 mostraron poca adaptabilidad a 37°C (Tg alto), sin embargo, también indujeron síntesis de cápsula únicamente en medio amortiguado con MOPS, de manera inversa la muestra 9 solo mostró inducción en HEPES, al igual que V021 y este sintetizó la cápsula más grande de todos los aislamientos ambientales. Es importante mencionar que la variabilidad del tamaño de la cápsula, se debe a la baja reproducibilidad del experimento, además de que no se está considerando uno o varios factores que están afectando la síntesis de cápsula, ya que hay variación en el comportamiento de las muestras y que las condiciones óptimas para obtener una cápsula grande debe ser estandarizada para cada aislamiento. También, la forma de medición influye en los resultados, ya que la parte más externa de la cápsula es porosa, permitiendo que la tinta se “introduzca”, causando una baja estimación del tamaño. (Maxson M., et al., 2007). Desafortunadamente, la falta de correlación entre el pH, concentración de glucosa y tamaño de la cápsula, se debe a que la cápsula *in vitro* no predice el grado de encapsulación durante la infección *in vivo* (Zaragosa O. et al., 2003).

Otro factor involucrado en la virulencia de *C. neoformans* en la formación de melanina, ya que *in vivo* brinda protección contra especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno e impide la fagocitosis, los aislamientos ambientales se protegen contra cambios de temperatura, desecación y muerte por luz UV. En nuestro experimento, el 100% de los aislamientos (sin importar el origen) mostraron un pigmento de mayor intensidad cuando la L-DOPA agregada fue a 10mM, mientras que en las otras concentraciones el pigmento fue producido en menores intensidades (Ver anexo 4). Dado que produjeron la misma intensidad de pigmento, podrían considerarse con la misma capacidad de virulencia, es decir que tienen la misma capacidad de estar presentes en el medio ambiente, siendo buenos reservorios de estas levaduras y después al ser inhaladas pueden causar enfermedad en humanos. Por otro lado, si se establecieran otras concentraciones de L-DOPA, diferentes tiempos para ver la formación melanina o bien que ésta fuese cuantificada (por ejemplo espectrofotométricamente) se podría determinar cuál de

los aislamientos presenta una mayor virulencia, y así poder establecer alguna relación entre los aislamientos clínicos y ambientales.

Por otro lado, se sabe que la lacasa utiliza los neurotransmisores como adrenalina, noradrenalina y dopamina que se encuentran en el SNC (lo que podría explicar el neurotropismo). Es importante tener en cuenta que el pigmento no se ha encontrado *in vivo*, debido a que las concentraciones de estos neurotransmisores son muy pequeñas ($\mu\text{g/g}$ en cerebro y nM en SNC), sin embargo la dopamina presenta una alta concentración en el ganglio basal, región donde este agente etiológico ha sido encontrado (*Eisenman, et al, 2011*).

C. neoformans, tiene procesos metabólicos necesarios para la virulencia por ejemplo la ureasa, que es una metaloenzima que ha sido usada como prueba bioquímica de identificación, sin embargo en los últimos años se ha considerado como factor de virulencia ya que podría influir en la transmigración del hongo (*Torres J., et al.2008*), además de que las cepas que presentan mayor actividad de ureasa (*in vivo*) generan mayor daño al hospedero (*Rutherford J. et al, 2014*),

Como resultado de esta prueba, se obtuvo que todos los aislamientos presentaron actividad de la enzima ureasa, característica propia de *Cryptococcus* y al compararla cuantitativamente, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos, ya que en los aislamientos clínicos se observaron 3 grupos: los que presentan poca, mediana y alta actividad, mientras que los aislamiento ambientales presentaron una actividad promedio (menor a la de los clínicos), lo que las podría hacer menos virulentas con respecto a las otras. Entre los aislamientos que destacan con alta actividad son: 15 y 9 (inducción de cápsula en HEPES únicamente), V020 y VOON (no presentó síntesis de cápsula en ningún medio), la muestra FQ (*C. gattii*) con la mayor actividad de ureasa, situación contraria a la reportada por *Torres Rodríguez J.* en el 2008.

Se ha demostrado que la ureasa y la lacasa juegan un papel sinérgico en la invasión del SNC, la primera es para la transferencia de *C. neoformans* de la sangre al cerebro ya que el amonio producido, es tóxico para el tejido endotelial afectando los astrocitos, debilitando la integridad de la barrera hematoencefálica y permitiendo la diseminación (*Olszewski M. et al, 2004*), mientras que la segunda promueve la supervivencia y replicación del hongo dentro del cerebro, de ahí la importancia de realizar un estudio con estas dos enzimas.

En los últimos años se ha reportado un incremento en la resistencia a antifúngicos como fluconazol o anfotericina B (*Sharma R., et al. 2014*), por lo que ha sido considerado como factor de virulencia, además de que genera una gran problemática en países donde el número de personas con VIH va en aumento. Previamente, se han dado a conocer las MIC de cada antifúngico, en nuestro trabajo se usó la prueba comercial Fungitest® BIORAD, la cual permite una fácil interpretación y confiabilidad de los resultados.

El 100% de los aislamientos mostraron una sensibilidad a la anfotericina B en ambas concentraciones (2 y 8 $\mu\text{m}/\text{mL}$). Con respecto al ketoconazol, se reporta una MIC 90 de 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para el itraconazol de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Meng Lia, et al, 2012*), nuestros resultados mostraron resistencia variable al itraconazol de esta concentración. El fluconazol también mostró resistencia variable a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo ésta la MIC 90 reportada por *Li Meng en 2012*. El último antifúngico es la 5-fluocitosina, donde todas las muestras fueron resistentes a la concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sensibles a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estos resultados son similares a los reportados previamente por *Rajani Sharma en 2014* (MIC 90 de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Es muy importante resaltar que el aislamiento clínico 9 mostró resistencia a todos los antifúngicos de baja concentración (excepto anfotericina B) y a la 5-fluocitosina de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (además de que presentó una gran cápsula en medio amortiguado HEPES, alta actividad enzimática de urea) lo que la hace más virulenta que otros aislamientos. Por el contrario tenemos muestras ambientales como la CN10 que

tuvo sensibilidad en todos los antifúngicos en ambas concentraciones, presentó síntesis de cápsula en ambos medios, por lo que su virulencia está relacionada a otros factores como la ureasa (actividad enzimática alta) y melanina.

En la actualidad, la biología molecular ha proporcionado útiles técnicas para la genotipificación de *C. neoformans*. En este trabajo se utilizó la técnica de la PCR-RFLP con los genes *CAP59* y *GEF1*, permitiendo la identificación de nuestros aislamientos (clínicos y ambientales): *Cryptococcus neoformans* variedad *grubii*, serotipo A, MAT α .

Para obtener el genotipo de este hongo se han propuesto las siguientes técnicas: PCR huella digital con indicadores universales, RFLP con los genes *URA 5* y *PLB1*, AFLP y MSLT. Sin embargo, nosotros al realizar la PCR-RFLP con los genes ya mencionados, obtenemos patrones de bandas, que ya han sido establecidos para la obtención del genotipo (Romeo O. et al., 2011 y Feng X., et al., 2008), en este caso los aislamientos estudiando corresponden al genotipo VNI; siendo el más común en México, Estados Unidos y Sudamérica (Cogliati M, et al 2013). Además de que se confirmó la variedad, serotipo y genotipo de las cepas ATCC 96909 y 96910 (VNIV) usadas como control. La muestra FQ se identificó como *C. gattii*, serotipo B, MAT a (VGI), la cual se había identificado previamente como *C. neoformans*.

Esta técnica utilizada proporcionó ventajas como exactitud y reproducibilidad, además de que su identificación se pudo confirmar con la amplificación y secuenciación del gen *CAP59* (similitud de 99% a la cepa *C. neoformans* var *grubii* H99).

Es importante recordar que los aislamientos clínicos provienen de pacientes con VIH/SIDA, los ambientales provienen de árboles y excrementos de palomas, y que en todas las pruebas se presentaron particularidades que no permitieron establecer una relación al 100%. A continuación se describen algunos aislamientos que sobresalieron a lo largo del estudio:

- Aislamiento 9: síntesis de cápsula únicamente en HEPES, actividad enzimática alta (31.73U/mg), resistencia a 5-fluocitosina de 32µg/mL.
- Aislamiento 1 y 4: cápsula similar en ambos medios, resistencia y sensibilidad a los mismos antifúngicos, y actividad enzimática de 9.26 y 8.61 U/mg, respectivamente.
- Aislamiento 5 y 7: cápsula similar en ambos medios, resistencia y sensibilidad a los mismos antifúngicos, y actividad enzimática intermedia de 11.9 U/mg.
- Aislamiento CN10: cápsula similar en ambos medios, alta actividad enzimática (14.69 U/mg) y sensibilidad a todos los antifungicos.
- Aislamiento VOON: presentó el mismo Tg en todas las condiciones establecidas, actividad enzimática de 16.62 U/mg, sensibilidad a antifúngicos de alta concentración.

Conclusiones

- Los aislamientos de origen ambiental, presentaron menor variabilidad en los Tg, lo que les podría dar ventajas de adaptación a condiciones ambientales o en el hospedero.
- La técnica PCR-RFLP y secuencia del gen *CAP59* son métodos exactos y fáciles que permitieron la identificación de las muestras, obteniendo serotipo y pareja sexual (*Cryptococcus neoformans* var *grubii*, Serotipo A, MAT α), además del genotipo VNI por medio de la correlación de patrones de bandas ya establecidos.
- La síntesis de cápsula se vió afectada principalmente por el pH y no por la concentración de glucosa del medio.
- Debido a que la ureasa y lacasa, presentan una actividad ligada para la migración y supervivencia del hongo en el hospedero, es importante un análisis cuantitativo de ambas enzimas y así establecer relaciones entre estas.
- El análisis cuantitativo de la melanina, permitiría determinar cuál de los aislamientos presenta mayor capacidad para producir este pigmento y así relacionarlo con la virulencia.
- El aislamiento clínico 9 presenta características de alta virulencia, al sintetizar gran cápsula en medio amortiguado con HEPES, una alta actividad enzimática y ser resistente a 5-fluocitosina de 32 μ g/mL
- El aislamiento ambiental VOON, mostró características de baja virulencia al no presentar cápsula en ningún medio inductor, y ser sensible a todas las concentraciones de antifúngicos.
- Debido a la variabilidad de las características fenotípicas presentadas, no se puede establecer relación entre los grupos de aislamientos.
- La virulencia de este hongo está en función de sus características fenotípicas y enzimáticas, de tal manera que al encontrar variabilidad en éstas, se podría establecer una virulencia intermedia para estos aislamientos

Referencias

1. Aller A.I., Claro R., Castro C. *et al.*, ***Antifungal Susceptibility of Cryptococcus neoformans Isolates in HIV-Infected Patients to Fluconazole, Itraconazole and Voriconazole in Spain: 1994–1996 and 1997–2005.*** Chemotherapy 2007; 53:300–305
2. Arenas R., ***Micología Médica Ilustrada***, México D.F. Mc Graw-Hill/Interamericana, 1993.
3. Archibald L., Tuohy M., Wilson D., *et al.* ***Antifungal Susceptibilities of Cryptococcus neoformans.*** Emerging Infectious Diseases Vol. 10, No. 1, January 2004
4. Benham, R. W. ***The genus Cryptococcus.*** Bacteriology 1956. Rev. 20:189-201.
5. Bonifaz, A. ***Micología Médica Básica.*** 2012. Editorial Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A.
6. Bose I., Reese A, Ory J., *et al.*, ***A Yeast under Cover: the Capsule of Cryptococcus neoformans.*** Eukaryotic cell, Vol. 2, No. 4Aug. 2003, p. 655–663
7. Bovers M, Hagen F & Boekhout T (2008a) ***Diversity of the Cryptococcus neoformans–Cryptococcus gattii species complex.*** Rev Iberoam Micol 25: S4–S12.
8. Bruatto M., Vidotto V., Maina A., ***Growth of Cryptococcus neoformans in a thiamine-free medium.*** Mycopathologia 1992; 119: 129-132
9. Canteros C., Rodero L., Rivas M., *et al.*, ***A rapid urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans.*** Mycopathologia 136: 21-23, 1996.
10. Casadevall A., Rosas A., Nosanchuk J. ***Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans.*** Curr Opin Microbiol. 2000 Aug;3 (4):354-8.
11. Castañón O. L., Martínez K., *et al.*, ***Genotyping of Mexican Cryptococcus neoformans and C. gattii isolates by PCR-fingerprinting.*** Medical Mycology. November 2009, 47, 713–72.

12. Chaskes Stuart, Edberg S.C., Singer J. ***A DL-DOPA drop test for the identification of Cryptococcus neoformans.*** Mycopathologia 74, 143-148 (1981).
13. Chayakulkeeree Methee, ***Diagnosis and treatment of human mycoses.*** . Humana Press 2008;255-274
14. Cogliati M. ***Global Molecular Epidemiology of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: An Atlas of the Molecular Types.*** Hindawi Publishing Corporation Scientica. Volumen 2013
15. Cox G., Mukherjee J., Cole G., et al., ***Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis.*** Infection and immunity, Feb. 2000, p. 443–448 Vol. 68, No. 2
16. Dismukes W., ***Clinical Micology*** Oxford University 2003. Pag 188-201
17. Dykstra M. A., Friedman L., Juneann Murphy W., ***Capsule Size of Cryptococcus neoformans: Control and Relationship to Virulence.*** Infection and immunity, Apr. 1977, p. 129-135
18. Eisenman H C., Chow S., Tsé K., et al., ***The effect of L-DOPA on Cryptococcus neoformans growth and gene expression.*** August 2011, Virulence 2:4, 329-336.
19. Eisenman H C., Mues M., Weber S., et al., ***Cryptococcus neoformans laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA.*** Microbiology (2007), 153, 3954–3962
20. Ellerbroek P., Vecchiarelli A., Hoepelman A., et al., ***Inmunology of infections with Cryptococcus neoformans.*** Immunology of fungal infections 2007: 383-407.
21. Enache-Angoulvant A., Chandenier J., et al., ***Molecular Identification of Cryptococcus neoformans Serotypes.*** Journal of clinical microbiology, Apr. 2007, p. 1261–1265
22. Escandon P., Montilla A., ***Tipificación molecular de aislamientos del complejo Cryptococcus neoformans / Cryptococcus gattii.*** Infectología 2010: 14(52):127-130

23. Evans, E. E. ***The antigenic composition of Cryptococcus neoformans. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions.*** J. Immunol 1950. 64:423-430
24. Feng X., Yao Z., Ren D., *et al.*, ***Genotype and mating type analysis of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients.*** FEMS Yeast Res 8 (2008) 930–938.
25. Feng X., Yao Z., Ren D., *et al.*, ***Simultaneous identification of molecular and mating types within the Cryptococcus species complex by PCR-RFLP analysis.*** Journal of Medical Microbiology (2008), 57, 1481–1490
26. Frases S., Pontes B., *et al.*, ***Elastic properties of the Cryptococcus neoformans capsule.*** Biophysical Journal August 2009, p. 937 – 945.
27. Granger D. L., Perfect J. R., Durack D. T., ***Virulence of Cryptococcus neoformans regulation of capsule synthesis by carbon dioxide.*** The Journal of Clinical Investigation. Volume 76, August 1985, 508-516.
28. Hanson K., Alexander B., Perfect J., ***Drug Resistance in Cryptococcus neoformans.*** Infectious Disease 2009; pp 967-985
29. Heere L. J., Mahvi T.A. Annable M., ***Effect of temperature on growth and macromolecular biosynthesis in Cryptococcus Species.*** Mycopathologia vol. 55, 2, pag. 105-113, 1975
30. Hogan L. H., Klein B. S., Levitz S M., ***Virulence Factors of Medically Important Fungi.*** Clinical Microbiology Reviews, Oct. 1996, Vol. 9, No. 4p. 469–488.
31. Huérfano S., Caridad C., Castañeda E., ***Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de Cryptococcus neoformans.***, Biomédica 2003; 23: 328-40
32. Ikeda R., Shinoda T., *et al.*, ***Antigenic Characterization of Cryptococcus neoformans Serotypes and Its Application to Serotyping of Clinical Isolates.*** Journal Of Clinical Microbiology, July 1982, p. 22-29 Vol. 16, No. 1

33. Kiesling C., Goulart L., et al., ***Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul.*** FEMS Yeast Research 3 (2003) 405-415.
34. Klein K. R., Hall L., Deml S. M., et al. ***Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of I-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing.*** J Clin Microbiol. 2009 Nov; 47(11): 3669–3672.
35. Krajewska B., Eldik R., Brindell M., ***Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism.*** J Biol Inorg Chem (2012) 17:1123–1134
36. Kraus P R., ***Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray.***, Eukaryotic cell, Oct. 2004, p. 1249–1260
37. Kwon-Chung K., Ashok V., ***Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?*** FEMS Yeast Res 6 (2006) 574–587
38. Kwon-Chung K. J., Wickes B., Booth J., et al., ***Urease Inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*.*** Infection and immunity, Aug. 1987, p. 1751-1754
39. Kwon-Chung, K. J., B. Wickes, et al. ***"Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.*** Infect Immun. 1992, 60: 1869-74.
40. Lia M., Liaoo Y., Chen M., et al., ***Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China.*** The Brazilian Journal of infectious diseases, 2012;16 (2):175-179
41. Liaw S-J., Wu H-C., Hsueh P.R., ***Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes. Mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility.*** Clinical Microbiology and Infectious 2010; 16: 696-703.
42. Lin X., Heitman J., ***The Biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex.*** Annu. Rev. Microbiol. 2006. 60:69–105

43. López-Martínez R., Córdova E., *et al.*, ***Frecuencia de serotipos de Cryptococcus neoformans/C. gattii en México.*** Rev Latinoamericana Patología Clínica Medicina de Laboratorio, 2014; 61 (2): 125-128
44. Martínez L., García-Rivera J., Casadevall A., ***Cryptococcus neoformans var. neoformans (Serotype D) strains are more susceptible to heat than C. neoformans var. grubii (Serotype A) strains.*** Journal of Clinical Microbiology. Sept. 2001, p. 3365–3367
45. Maxson M. E., Cook E., Casadevall A., ***The volume and hydration of the Cryptococcus neoformans polysaccharide capsule.*** Fungal Genetics and Biology 44 (2007) 180–186
46. Meyer W., Aanensen D., Boekhout T., ***Consensus multi-locus sequence typing scheme for Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii.*** Med Mycol. 2009; 47(6): 561–570.
47. McClelland E. E., Casadevall A., Eisenman H.C., ***Phatogenesis of Cryptococcus neoformans.*** Springer 2007.
48. McFadden D., Zaragoza O., Casadevall A., ***The capsular dynamics of Cryptococcus neoformans.*** Trends in Microbiology. Elsevier 2006 Vol.14 No.11. 497-505
49. McLaughlin DJ., Spatafora JW., *et al.* ***The mycota, voll III Part B: Systematics and evolution.*** Springer, Second edition. 2001
50. Mirhendi, H., Makimura, K., Mohamadreza, K., *et al.* ***A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida Species.*** Japanese Journal of Medical Mycology 2006; 47: 225-229
51. Nakamura Y., Kano R., *et al.*, ***Molecular Analysis of CAP59 Gene Sequences from Five Serotypes of Cryptococcus neoformans.*** Journal of clinical microbiology, Mar. 2000, p. 992–995
52. Navarathna D., Harris S., Roberts D., ***Evolutionary aspects of urea utilization by fungi.*** FEMS Yeast Res 10 (2010) 209–213
53. Ngamskulrungrroj P., Meyer W., ***Melanin production at 37°C is linked to the high virulent Cryptococcus gattii Vancouver Island outbreak genotype VGIIa.*** Australasian Mycologist (2009) 28, 9–14

54. Odom A., Muir S., Lim E., *et al.*, ***Calcineurin is required for virulence of Cryptococcus neoformans.*** The EMBO Journal Vol.16 No.10 pp.2576–2589, 1997
55. Okabayashi K, Kano R, Watanabe S. *et al.*, ***Expression of capsule-associated genes of Cryptococcus neoformans.*** Mycopathologia (2005) 160: 1–7
56. Polachek I., Hearing V.I., Kwon-Chung KJ. ***Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in Cryptococcus neoformans.*** J. Bacteriol. 1982. 150, 1212-1220.
57. Raimondi A., Ticozzi R., *et al.*, ***Genotype-based differentiation of the Cryptococcus neoformans serotypes by combined PCR-RFLP analysis of the capsule-associated genes CAP10 and CAP59.*** Medical Mycology September 2007, 45, 491-501.
58. Rippon, J. N. Tratado de Micología Médica. Interamericana Mc Graw-Hill. Tercera edición 1990; pág 629-659
59. Roberts G., Horstmire C., Land g., ***Rapid Urea Broth test for yeast.*** Journal of Clinical Microbiology, June 1978, p. 584-588
60. Romeo O, Scordino F., Criseo G., ***Environmental Isolation of Cryptococcus gattii Serotype B, VGI/MATa Strains in Southern Italy.*** Mycopathologia (2011) 171:423–430
61. Ruane P., Walker L., Lance G., ***Disseminated infection caused by urease-negative Cryptococcus neoformans.*** Journal Of Clinical Microbiology, Oct. 1988, p. 2224-2225
62. Rutherford J. ***The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor.*** PLOS Pathogens, May 2014, Volume 10, Issue 5, e1004062.
63. Sharma R., Duggal N., Malhotra S., *et al.* ***Antifungal susceptibility of cryptococcus neoformans isolates from fungal meningitis in AIDS patients in India.*** International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 6, Issue 7, 2014

64. Singh A., Panting R., Varma Ashok, *et al.*, **Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans***. MBio May/June 2013 Volume 4 Issue 3 e00220-13
65. Steen B. R., Zuyderduyn S., *et al.*, ***Cryptococcus neoformans* Gene Expression during Experimental Cryptococcal Meningitis**. Eukaryotic cell, Dec. 2003, p. 1336–1349
66. Takeo K., Ohkusu M., Kawamoto S., **Effects of growth temperature upshift on cell cycle progression in *Cryptococcus neoformans***. Mycoscience (2003) 44:465–471
67. Torres-Rodríguez J., Alvarado-Ramírez E., Gutiérrez-Gallego R. **Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii***. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 27-31
68. Trilles L., Lazera M., Wanke B., **Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil**. Medical Mycology October 2003, 4 1, 383 -390.
69. Trilles L., Lazera M., Wanke B. *et al.*, **Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil**. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103 (5) August 2008: 455-462
70. Tsuchiya, T., Kawakita S., Udagawa M., **Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* by serology**. Sabouraudia 1963 2:209-214.
71. Ulloa M. Hanlin R. T. **Diccionario ilustrado de micología Instituto de Biología**, UNAM. 1991. p.310
72. Vidotto V., Defina N., Pugliese A., **Effect of different K⁺ concentrations on *Cryptococcus neoformans* phenol oxidase activity**. Mycopathologia 2002; 156: 171–176.
73. Wang Y., Aisen P., and Casadevall A. ***Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action**. Infection and immunity, Aug. 1995, p. 3131–3136
74. Wang Y., Casadevall A., **Decreased Susceptibility of Melanized *Cryptococcus neoformans* to UV Light**., Applied and environmental microbiology, Oct. 1994, p. 3864-3866

75. Williamson P., ***Laccase and melanin in the pathogenesis of Cryptococcus neoformans***. *Frontiers in bioscience* 2, e99-107, November 1, 1997.
76. Williamson P., Wakamatsu K., ITO S. ***Melanin Biosynthesis in Cryptococcus neoformans***. *Journal of bacteriology*. Mar. 1998, p. 1570–1572
77. Wozniak K. L., Levitz S.M., ***Isolation and Purification of Antigenic Components of Cryptococcus***. *Methods Mol Biol*. 2009; 470: 71–83.
78. Zaragoza O. Casadevall A. ***Experimental modulation of capsule size in Cryptococcus neoformans***. *Biological Procedures Online* 2004;6 (1): 10-15.
79. Zaragoza O., Fries B., Casadevall A., ***Induction of Capsule Growth in Cryptococcus neoformans by Mammalian Serum and CO₂***. *Infection and immunity*, Nov. 2003, p. 6155–6164
80. Zaragoza O., Rodrigues M., ***The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans***. *Adv Appl Microbiol*. 2009; 68: 133–216.

Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones utilizadas

Medio Sabouraud líquido (SL)

| | |
|----------------|---------|
| Dextrosa | 40 g |
| Peptona | 10 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

Disolver los ingredientes en la cantidad de agua elegida. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15psi y 121°C. Finalmente servir en los contenedores en los que se utilizará dicho medio.

Agar Extracto de levadura-peptona-dextrosa:

| | |
|----------------------|---------|
| Extracto de levadura | 10 g |
| Peptona | 20 g |
| Dextrosa | 20 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

Disolver los ingredientes en la cantidad de agua elegida y calentar a ebullición hasta disolver el agar completamente. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15psi y 121°C. Finalmente servir en los contenedores en los que se utilizará dicho medio.

Soluciones y medios para inducción de cápsula

Sabouraud líquido
 Sabouraud líquido dil 1:10 en agua
 Sabouraud líquido dil 1:10 con MOPS 50mM
 Sabouraud líquido dil 1:10 con HEPES 50mM

Agar alpiste negro

| | |
|---|---------|
| Semilla de alpiste negro (<i>Guizotia abyssinica</i>) | 50g |
| KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| Dextrosa | 1 g |
| Creatinina | 1 g |
| Agar | 15 g |
| Cloranfenicol | 1 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

Hervir la semilla en 100mL de agua destilada durante media hora. Filtrar el medio a través de cuatro capas de gasas y posteriormente, pasar el líquido en un papel filtro. Adicionar la cantidad suficiente de agua para llevar a 1L y adicionar los ingredientes restantes. Mezclar bien y calentar a ebullición hasta disolver el agar completamente. Se esteriliza a 121°C a 15 psi, durante 15 minutos. Finalmente servir en los contenedores en los que se utilizará dicho medio.

Medio líquido mínimo para melanina

| | |
|---------------------------------|---------|
| Glucosa | 2.7, 4g |
| MgSO ₄ | 2.45 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4.0 g |
| Glicina | 0.974 g |
| Tiamina | 1mL |
| Agar | 20 g |
| Agua | 1000 mL |

Disolver los reactivos en la cantidad de agua deseada y ajustar el pH a 5.5. El medio debe ser esterilizado a 121°C, durante 15 min. Una vez que el medio este esterilizado, dejar enfriar y cuando se encuentre a temperatura ambiente, adicionar la tiamina y agitar.

Caldo rápido de Urea (2x)

| | |
|----------------------------------|---------|
| Urea | 4.0 g |
| Extracto de levadura | 0.02 g |
| Rojo de fenol | 2.0 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 0.273 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.285 g |

Disolver todos los reactivos en 100 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8. El medio es esterilizado por filtración en un matraz previamente estéril.

Agar canavanina-glicina-azul de bromotimol

| <i>Solución A:</i> | | <i>Solución B (Azul de bromotimol)</i> | |
|---------------------------------|------|--|-------|
| Glicina | 10 g | Azul de bromotimol | 0.4 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1g | NaOH 0.01N | 64 mL |
| MgSO ₄ | 1g | Agua destilada | 36 mL |
| Cloruro de tiamina | 1 mg | | |

| | |
|-------------------------|--------|
| Sulfato de L-canavanina | 30 mg |
| Agua destilada | 100 mL |

Disolver los ingredientes de la solución A y ajustar el pH a 5.6, esterilizarlo por filtración en una malla de 0.22 μm y mantener en refrigeración. Para la solución B, disolver el azul de bromotimol en NaOH y adicionar agua. Para preparar 100 mL de medio, es necesario disolver 88mL de agua destilada, 2 mL de la solución B, 10 mL de la solución A y 2 g de agar.

Soluciones para PCR

Buffer de reacción (Fermentas, Life Technologies):

Tris-HCl 100mM
KCl 500mM
Nonident P40
pH=8.8 a 25°C

Solución de trabajo de MgCl_2 20mM (Fermentas, Life Technologies)

Solución de trabajo de dNTP's (Fermentas, Life Technologies):

ATP 2mM
TTP 2mM
GTP 2mM
CTP 2mM

Taq polimerasa (Fermentas, Life Technologies):

100U en 100 μL de disolvente (Tris-HCl 20 mM, DTT 1mM, EDTA 0.1 mM, KCl 100mM, Nonident P40 0.5% (v/v) y glicerol 50 (v/v).

Soluciones para Electroforesis

Buffer TAE 10x

| | |
|-----------------------|---------|
| Formula por litro | |
| Tris base | 48.4 g |
| EDTA disódico | 3.7 g |
| Acido acético glacial | 11.4 mL |
| Agua bidestilada | c.b.p. |

Disolver en 250 mL de agua bidestilada el Tris base y el EDTA disódico. Agregar el ácido acético glacial y completar con agua destilada a un volumen de 1.0 L

Buffer TAE 1x

Diluir un volumen de buffer TAE 10x en 9 volúmenes de agua bidestilada.

Buffer TBE 10x

Fórmula por litro

| | |
|---------------|-----------------------|
| Tris base | 108 g |
| Acido bórico | 55 g |
| EDTA disódico | 20 mL, 0.5 M a pH 8.0 |
| Agua | c.b.p. |

Disolver en 250mL de agua bidestilada el Tris base y el ácido bórico. Agregar el EDTA disódico y completar con agua destilada a un volumen de 1.0 L

Gel agarosa al n%

| | |
|--|--------------|
| Agarose para biología molecular | ng |
| Solución de bromuro de etidio 10 µg/mL | 5.0 µL |
| Agua bidestilada | c.p.b. 100mL |
| (n%)= 1%, 2%, 3% etc. | |

Agregar agarosa a 50mL de agua bidestilada, añadir los 5.0 µL de la solución de bromuro de etidio y llevar a un volumen final de 100mL. Calentar hasta que la agarose se disuelva por completo. Vaciar sobre la cámara de electroforesis un volumen aproximado de 20mL y permitir que se solidifique.

Anexo 2. Influencia de la temperatura

En este anexo se encuentran los tiempos de generación de horas y las curvas de crecimiento de los aislamientos clínicos, ambientales y controles a diferentes condiciones.

| Tiempos de generación (h) | | | | |
|---------------------------|----------|---------|-----------|----------|
| Muestras Clínicas | | | | |
| Medios y temperaturas | | | | |
| Muestra | SL 30 °C | SL 37°C | YPD 30 °C | YPD 37°C |
| 1 | 3.26 | 4.33 | 3.00 | 3.33 |
| 2 | 2.25 | 3.26 | 2.13 | 2.36 |
| 3 | 2.00 | 3.24 | 3.02 | 6.09 |
| 4 | 2.44 | 3.08 | 2.41 | 2.39 |
| 5 | 1.48 | 2.37 | 2.28 | 2.51 |
| 6 | 2.06 | 5.29 | 2.53 | 10.06 |
| 7 | 2.30 | 3.23 | 3.18 | 3.17 |
| 9 | 2.32 | 3.30 | 3.25 | 2.50 |
| 10 | 3.07 | 2.17 | 2.30 | 2.34 |
| 11 | 2.37 | 3.40 | 2.44 | 2.39 |
| 12 | 2.22 | 3.28 | 2.13 | 5.07 |
| 15 | 3.07 | 2.39 | 1.17 | 3.09 |

Tabla 1. Tiempos de generación de las muestras clínicas en los medios de crecimiento.

| Tiempos de generación (h) | | | | |
|---------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| Ambientales | | | | |
| Medios y temperaturas | | | | |
| Muestra | SL 30 °C | SL 37 °C | YPD 30 °C | YPD 37 °C |
| FQ | 2.20 | 2.20 | 2.39 | 4.26 |
| V003 | 2.04 | 3.32 | 2.34 | 4.27 |
| V020 | 2.31 | 2.39 | 2.31 | 3.30 |
| V021 | 3.15 | 3.00 | 2.10 | 7.38 |
| V023 | 2.06 | 2.11 | 3.00 | 4.18 |
| V030 | 2.33 | 3.08 | 2.39 | 3.05 |
| VOON | 2.24 | 2.27 | 3.32 | 3.36 |
| CN10 | 3.20 | 2.14 | 2.29 | 3.19 |
| 96909 | 3.49 | 2.34 | 2.21 | 3.38 |
| 96910 | 3.01 | 9.24 | 2.37 | 4.04 |

Tabla 2. Tiempos de generación de las muestras ambientales y cepas ATCC en los medios de crecimiento.

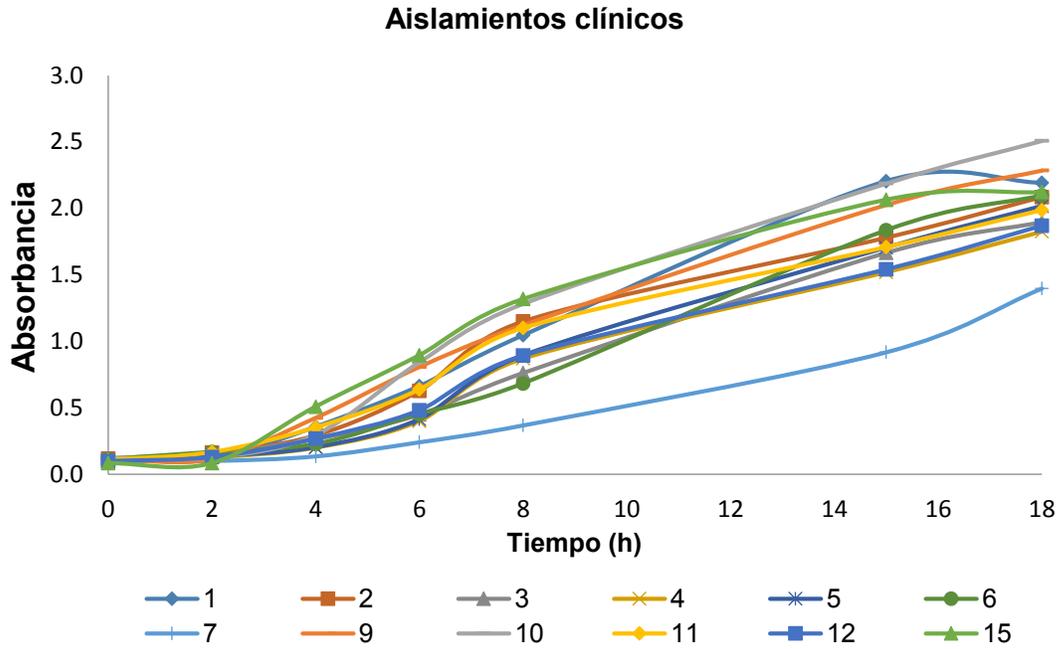


Gráfico 1. Curvas de crecimiento de aislamientos clínicos a 30°C en YPD.

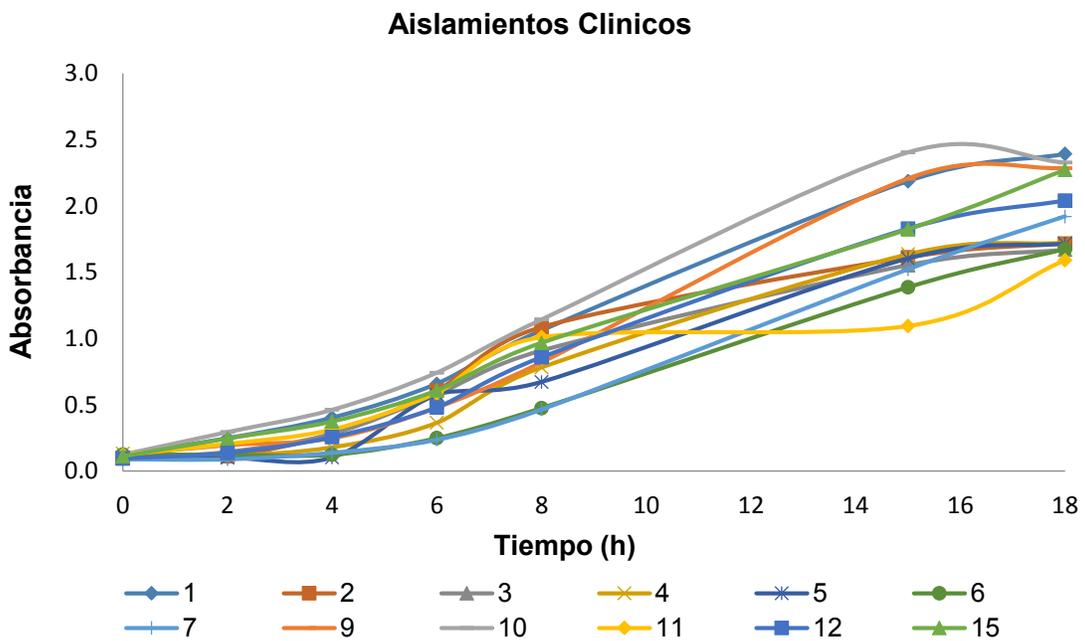


Gráfico 2. Curvas de crecimiento de aislamientos clínicos a 30°C en SL.

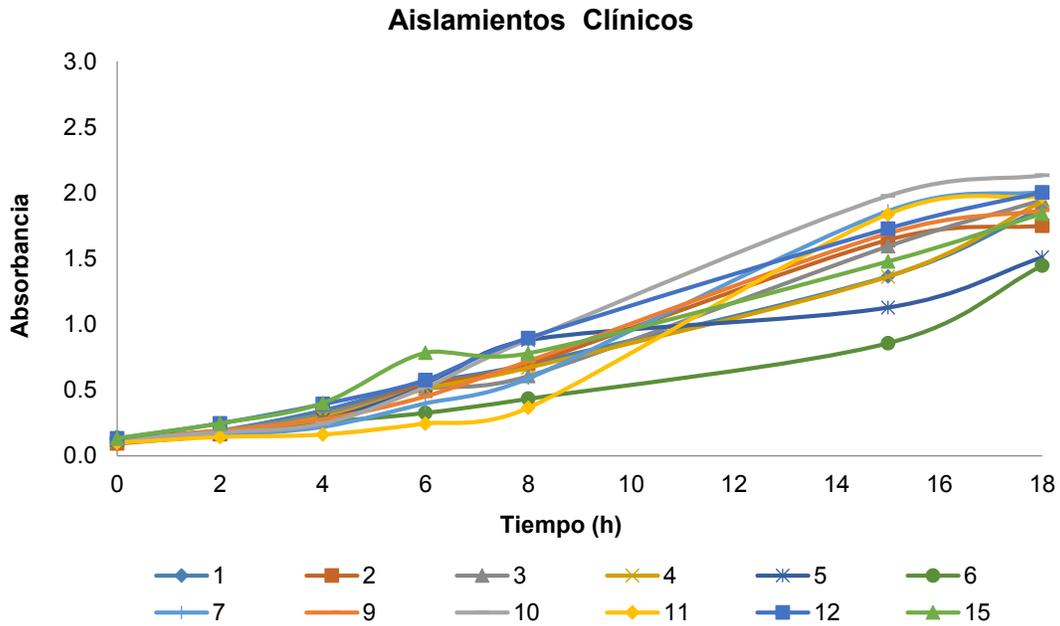


Gráfico 3. Curvas de crecimiento de aislamientos clínicos a 37°C en SL.

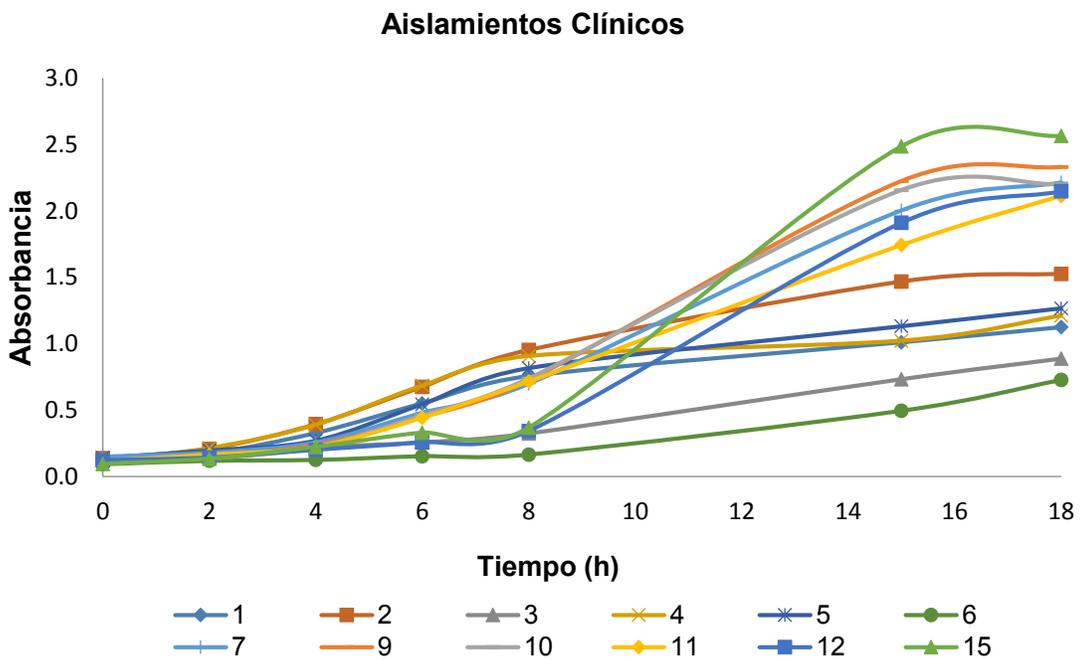


Gráfico 4. Curvas de crecimiento de aislamientos clínicos a 37°C en YPD.

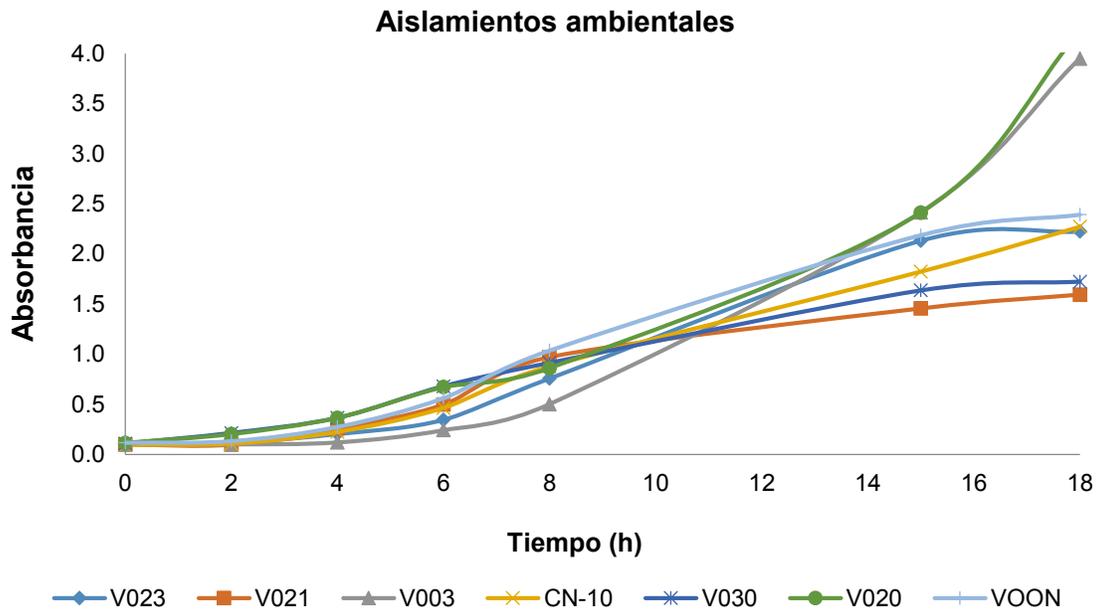


Gráfico 5. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 30°C en YPD.

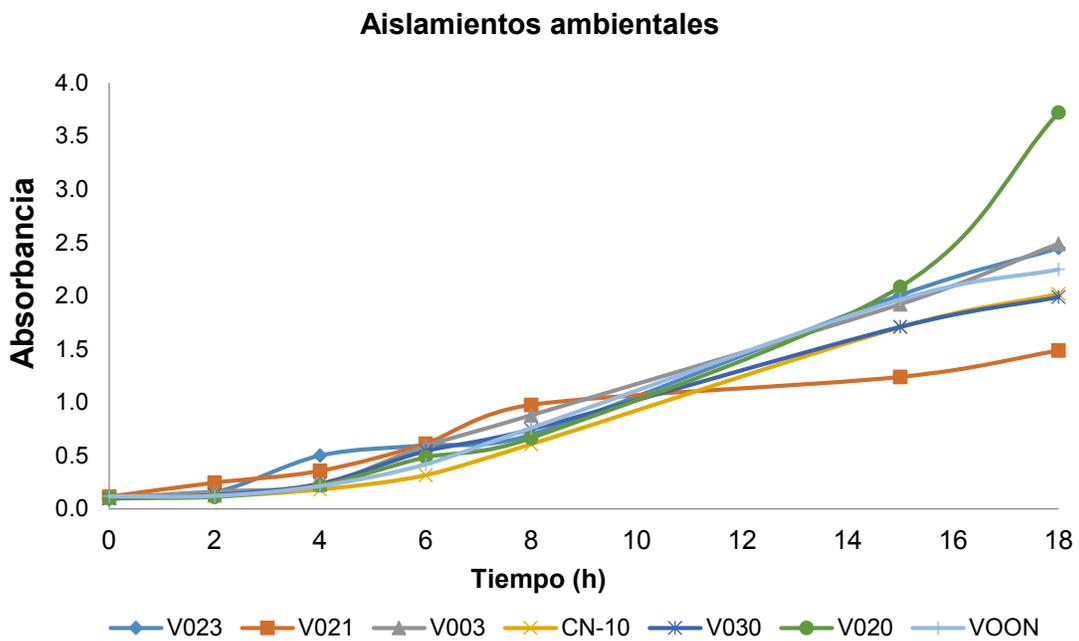


Gráfico 6. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 30°C en SL.

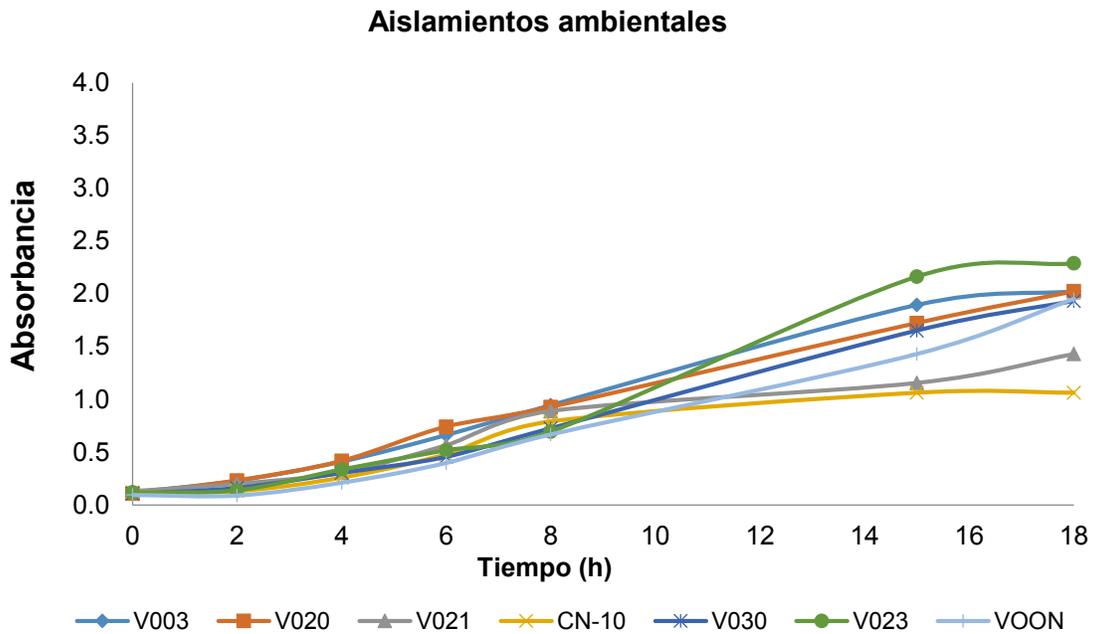


Gráfico 7. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 37°C en SL.

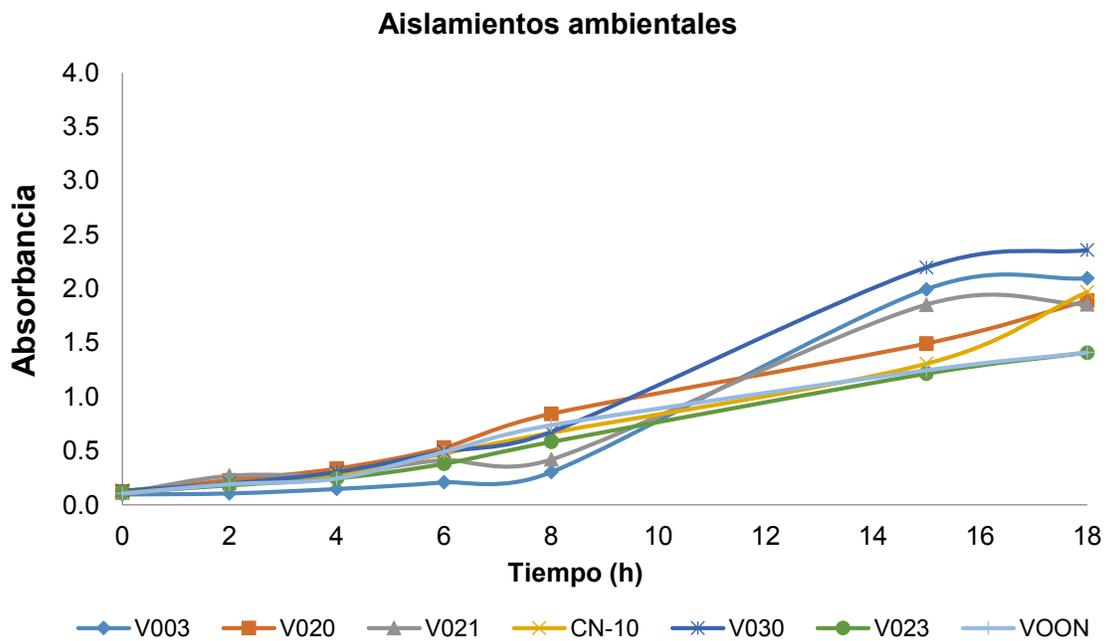


Gráfico 8. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 37°C en YPD.

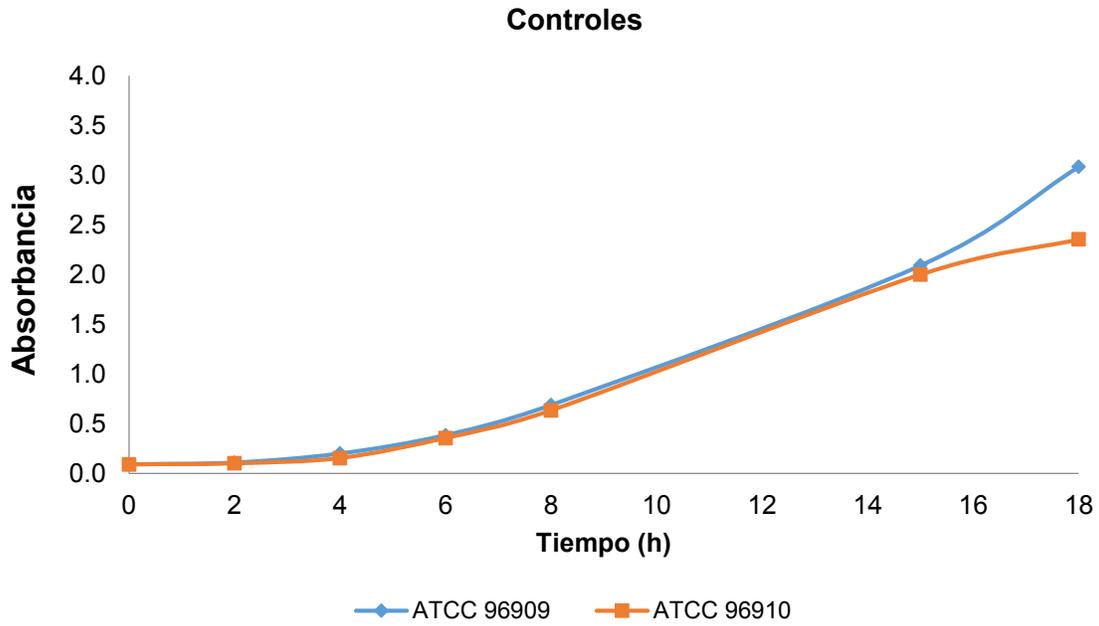


Gráfico 9. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 30°C en SL.

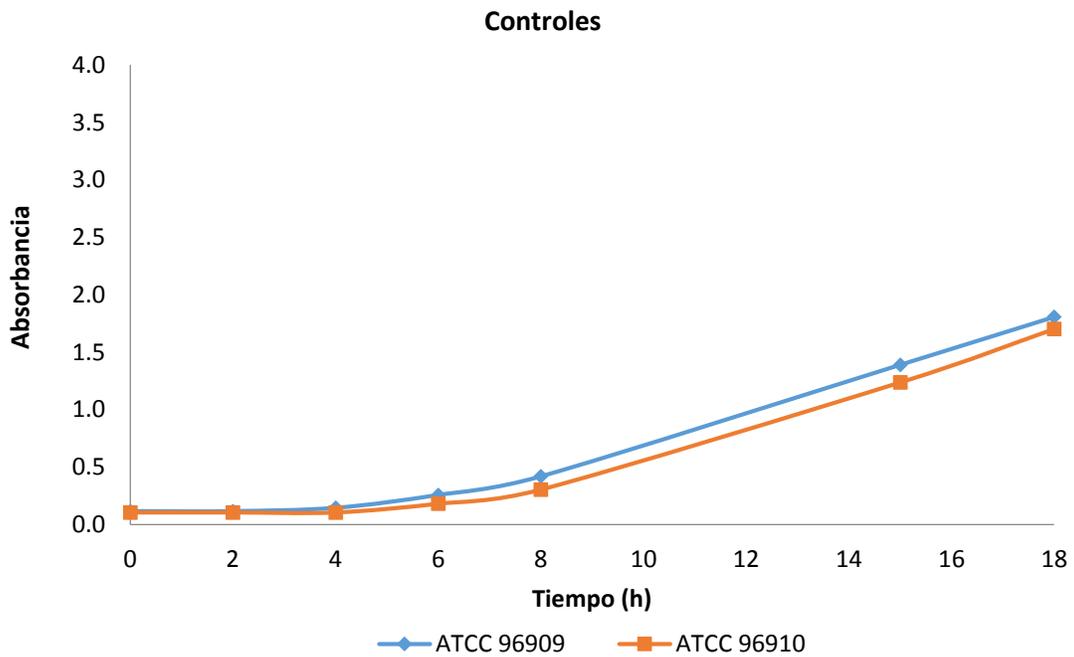


Gráfico 10. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 30°C en YPD.

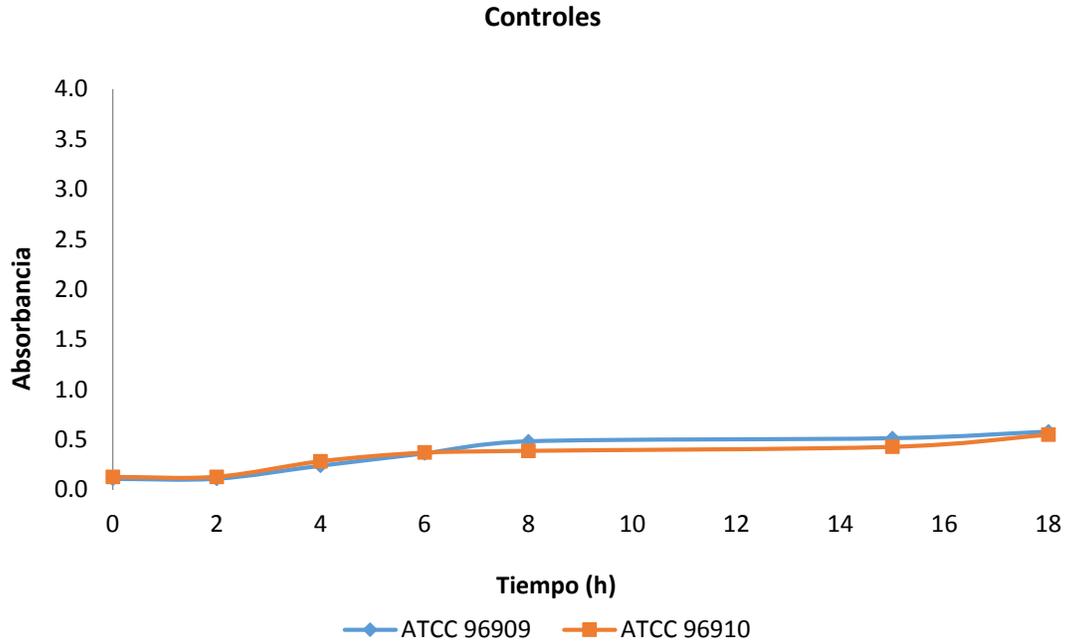


Gráfico 11. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 37°C en SL.

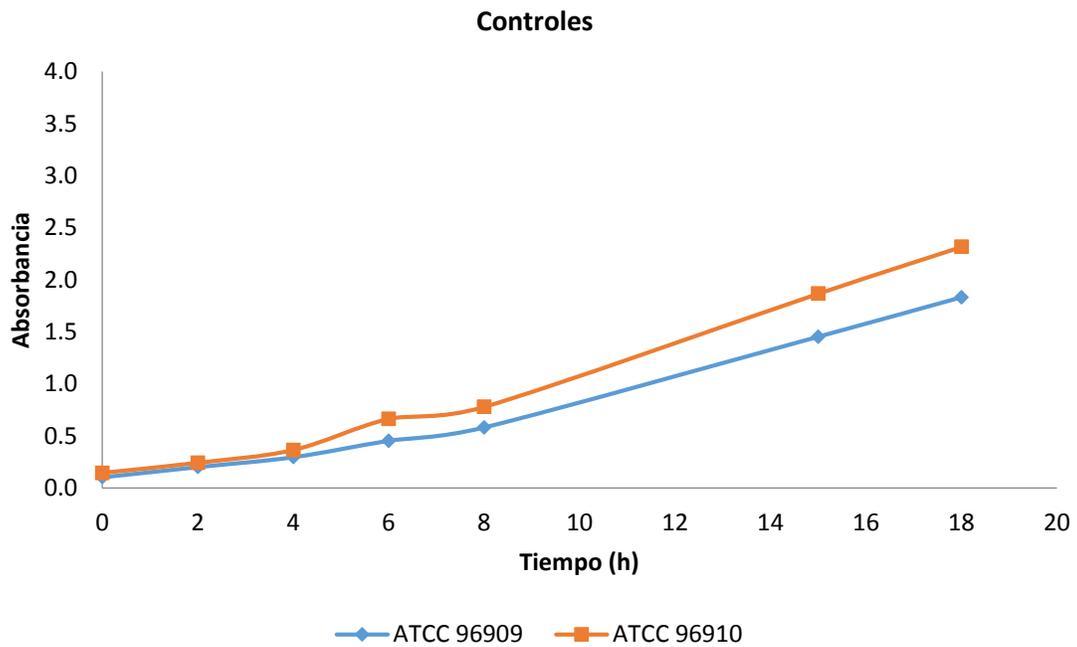


Gráfico 12. Curvas de crecimiento de aislamientos ambientales a 37°C en YPD.

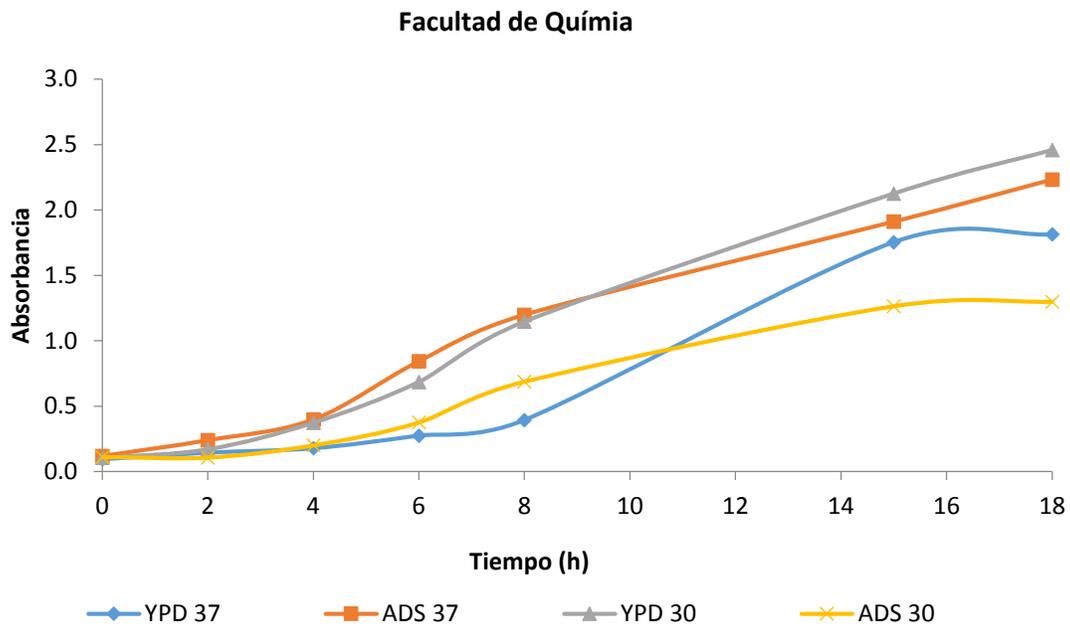


Gráfico13. Curvas de crecimiento de la muestra FQ en las diferentes condiciones analizadas.

Anexo 3. Inducción de cápsula

En este anexo se encuentra los resultados numéricos de la prueba de inducción de cápsula sometidos al método estadístico de T de Student con corrección de Welch.

| Aislamientos clínicos | | | | |
|-----------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Muestra | Medio / Relación (Cap/lev) | | | |
| | SL | SL 1:10 | MOPS | HEPES |
| 1 | 1.25 ± 0.02 | 1.64 ± 0.03 | 2.56 ± 0.05 | 2.59 ± 0.05 |
| 2 | 1.96 ± 0.07 | 2.03 ± 0.05 | 2.89 ± 0.09 | 3.26 ± 0.18 |
| 3 | 1.47 ± 0.03 | 1.59 ± 0.03 | 2.02 ± 0.04 | 1.51 ± 0.02 |
| 4 | 1.39 ± 0.02 | 1.99 ± 0.04 | 4.16 ± 0.12 | 4.18 ± 0.09 |
| 5 | 1.24 ± 0.02 | 1.43 ± 0.04 | 2.11 ± 0.05 | 2.02 ± 0.04 |
| 6 | 1.42 ± 0.03 | 1.47 ± 0.03 | 3.30 ± 0.19 | 1.50 ± 0.02 |
| 7 | 1.63 ± 0.03 | 1.50 ± 0.03 | 2.26 ± 0.05 | 2.12 ± 0.06 |
| 9 | 1.37 ± 0.02 | 1.43 ± 0.03 | 1.30 ± 0.03 | 2.61 ± 0.05 |
| 10 | 1.33 ± 0.02 | 1.82 ± 0.03 | 2.22 ± 0.05 | 3.22 ± 0.12 |
| 11 | 1.27 ± 0.02 | 1.71 ± 0.03 | 1.77 ± 0.04 | 1.89 ± 0.03 |
| 12 | 1.27 ± 0.02 | 1.60 ± 0.03 | 2.10 ± 0.07 | 1.97 ± 0.05 |
| 15 | 1.22 ± 0.03 | 1.35 ± 0.04 | 3.03 ± 0.10 | 3.37 ± 0.09 |

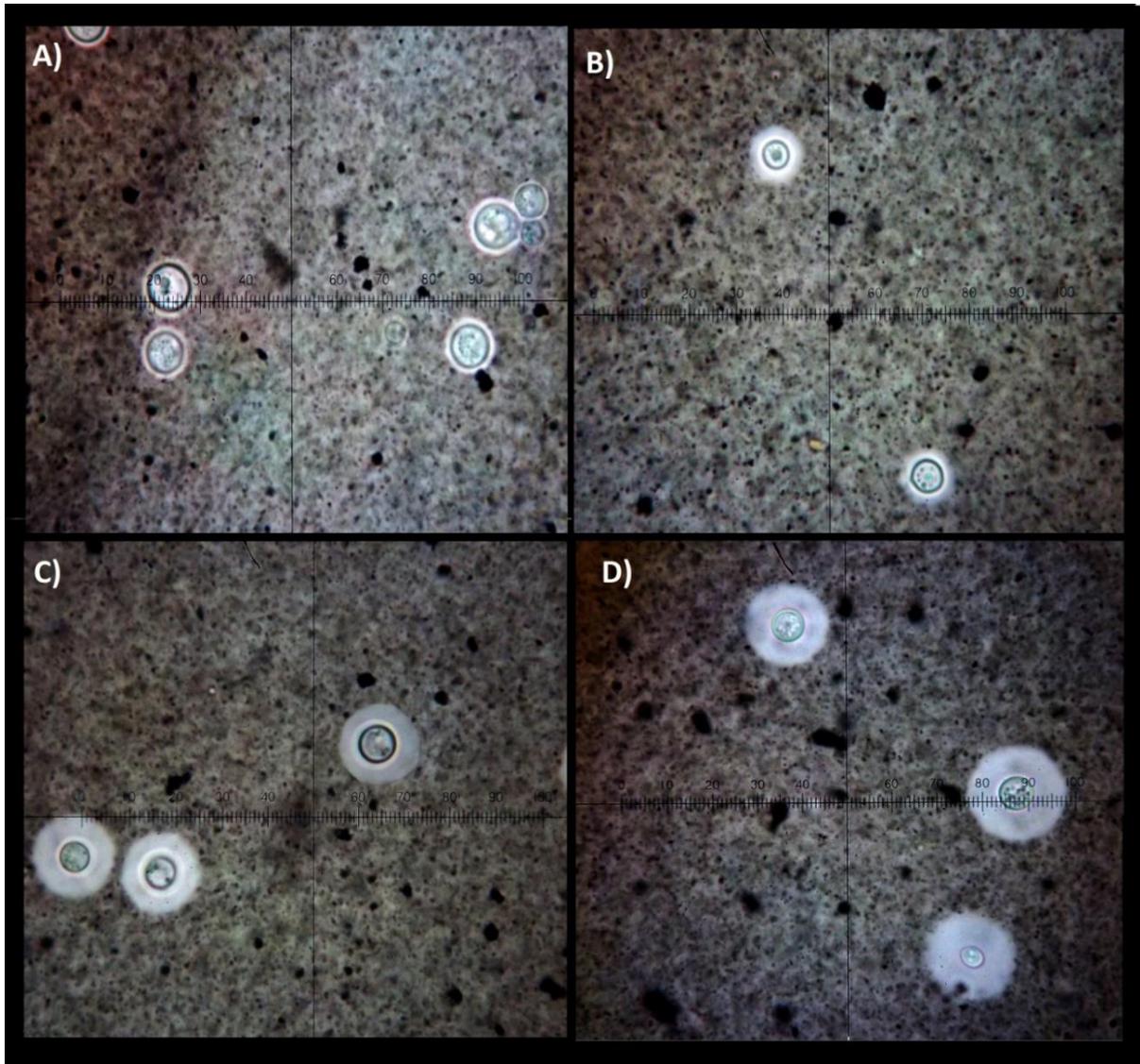
Tabla 1. Relación (cap/lev) de los aislamientos clínicos

| Aislamientos ambientales y cepas ATCC | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Muestras | Medios / Relación (cap/lev) | | | |
| | SL | SL 1:10 | MOPS | HEPES |
| FQ | 1.28 ± 0.03 | 1.64 ± 0.04 | 2.35 ± 0.09 | 2.90 ± 0.10 |
| V003 | 1.28 ± 0.02 | 1.41 ± 0.02 | 1.72 ± 0.07 | 1.66 ± 0.03 |
| V020 | 1.28 ± 0.01 | 1.66 ± 0.03 | 1.76 ± 0.04 | 2.41 ± 0.09 |
| V021 | 1.66 ± 0.02 | 2.17 ± 0.06 | 2.30 ± 0.03 | 4.68 ± 0.10 |
| V023 | 1.37 ± 0.02 | 2.00 ± 0.04 | 2.07 ± 0.04 | 2.31 ± 0.07 |
| V030 | 1.33 ± 0.02 | 2.01 ± 0.05 | 2.34 ± 0.03 | 3.25 ± 0.08 |
| VOON | 1.35 ± 0.02 | 1.65 ± 0.03 | 1.56 ± 0.04 | 1.51 ± 0.04 |
| CN-10 | 1.32 ± 0.02 | 1.46 ± 0.03 | 2.19 ± 0.03 | 2.12 ± 0.04 |
| 96909 | 1.31 ± 0.02 | 1.31 ± 0.02 | 1.15 ± 0.01 | 1.20 ± 0.01 |
| 96910 | 1.39 ± 0.03 | 1.51 ± 0.04 | 1.24 ± 0.01 | 1.20 ± 0.01 |

Tabla 2. Relación (cap/lev) de los aislamientos ambientales.

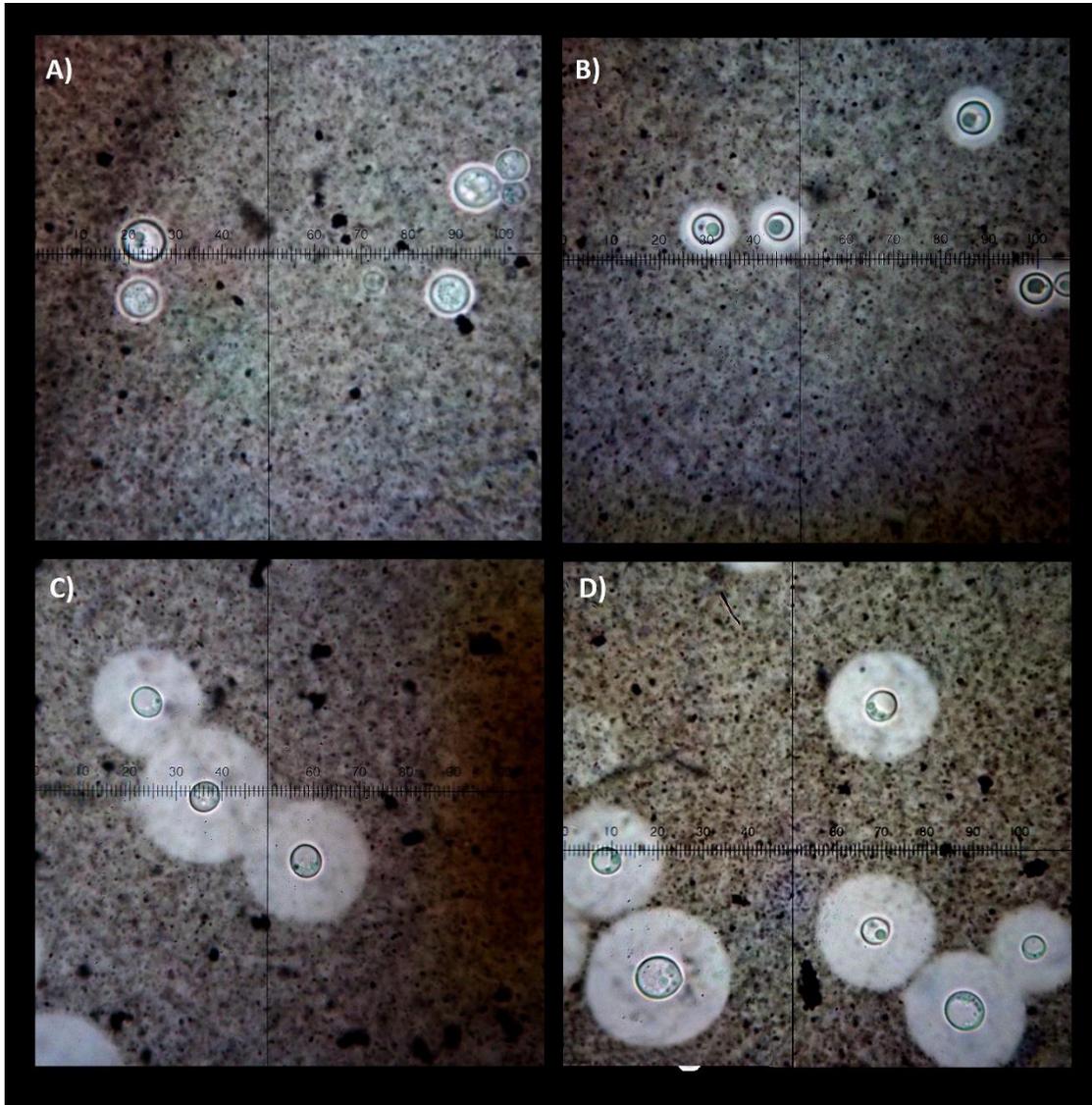
A continuación se muestra el examen directo con tinción negativa de algunos aislamientos analizados, en diferentes medios de incubación (72h) de algas de las muestras analizadas. A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Aumento 100x.

Muestra clínica 2



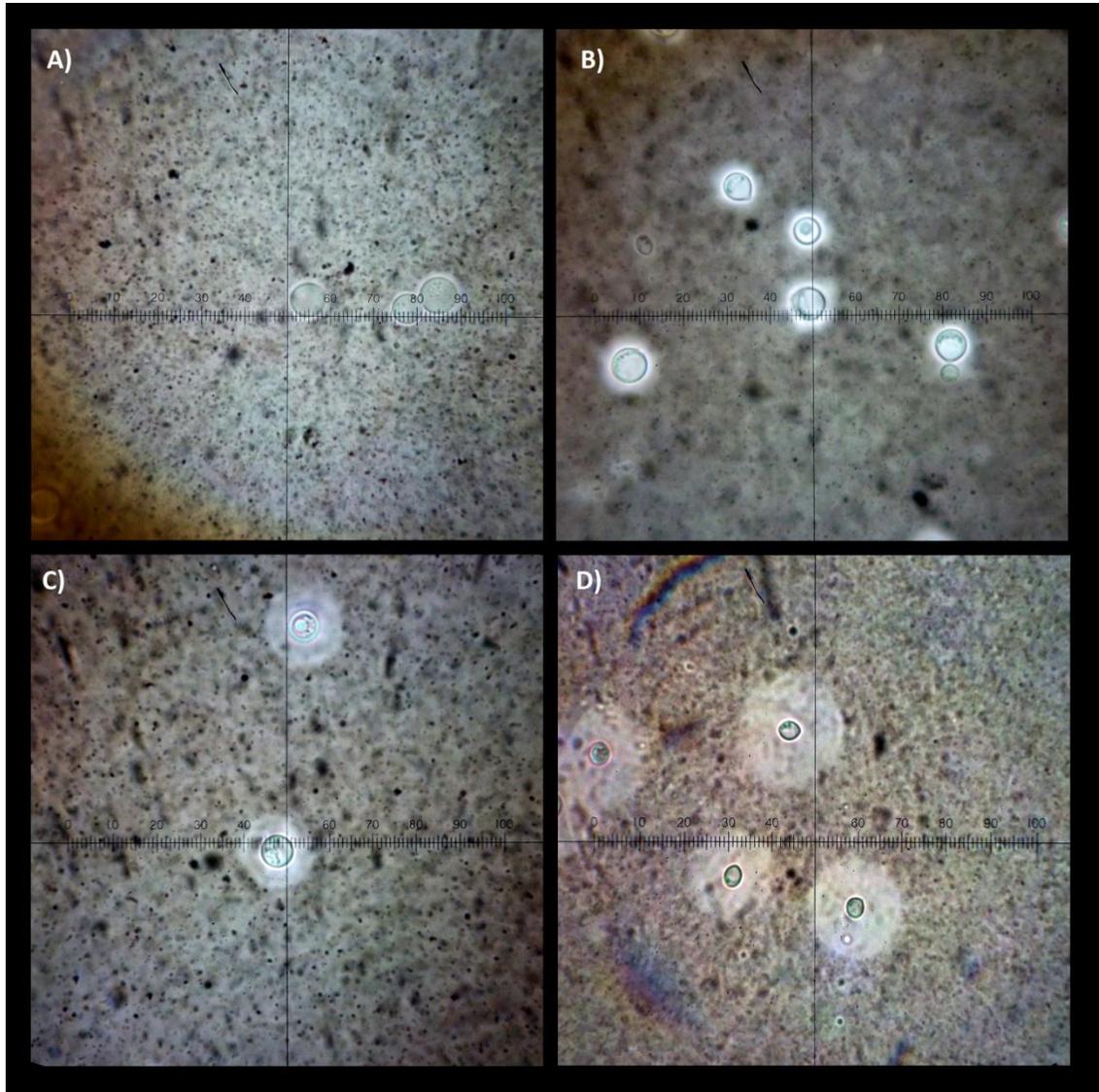
Tinción negativa de aislamiento clínico 4 en A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Observando un aumento en los dos últimos medios. Aumento 100x.

Muestra clínica 4



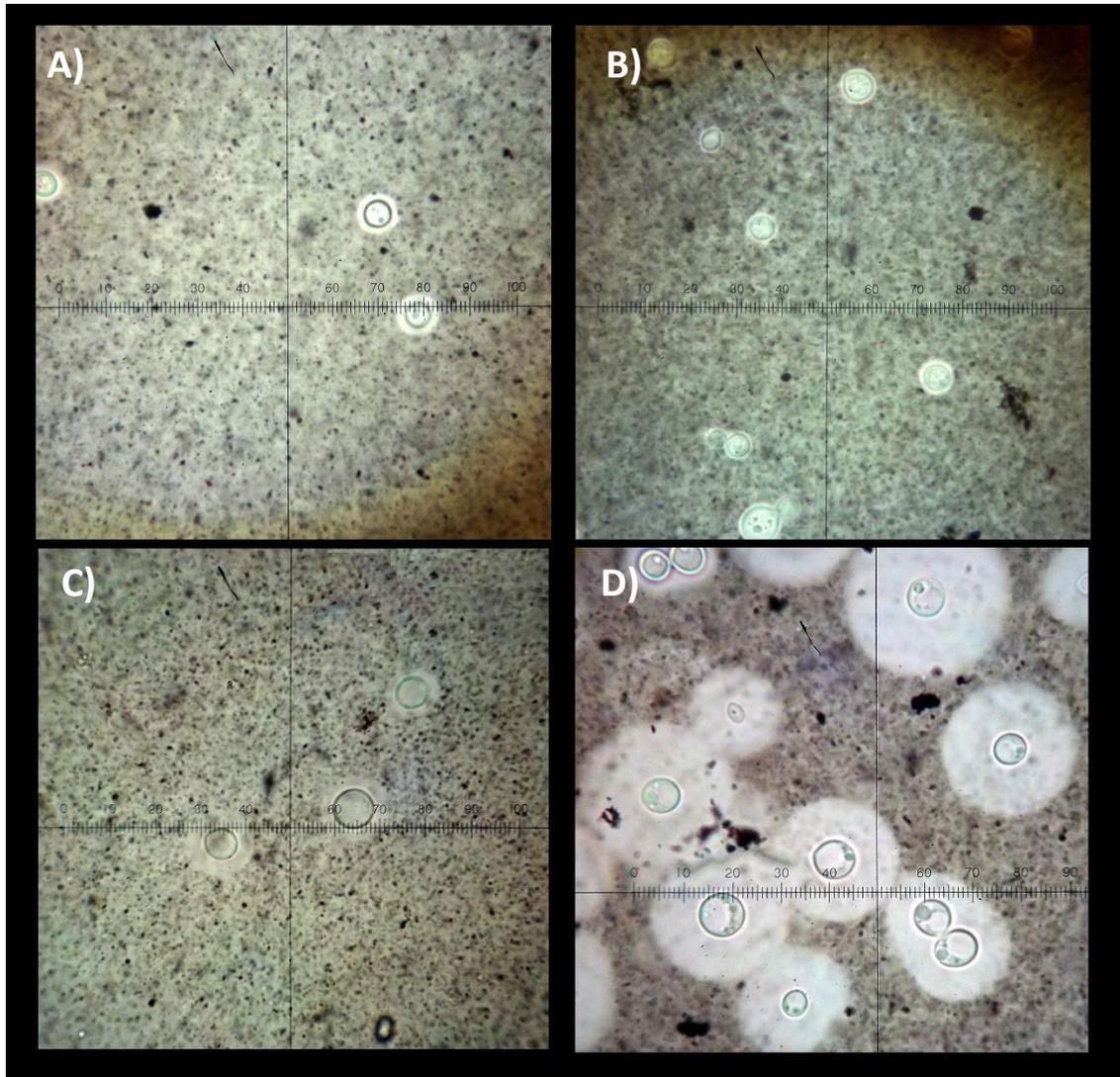
Tinción negativa de aislamiento clínico 10 en A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Observando un aumento de la cápsula en SL con HEPES .Aumento 100x.

Muestra clínica 10



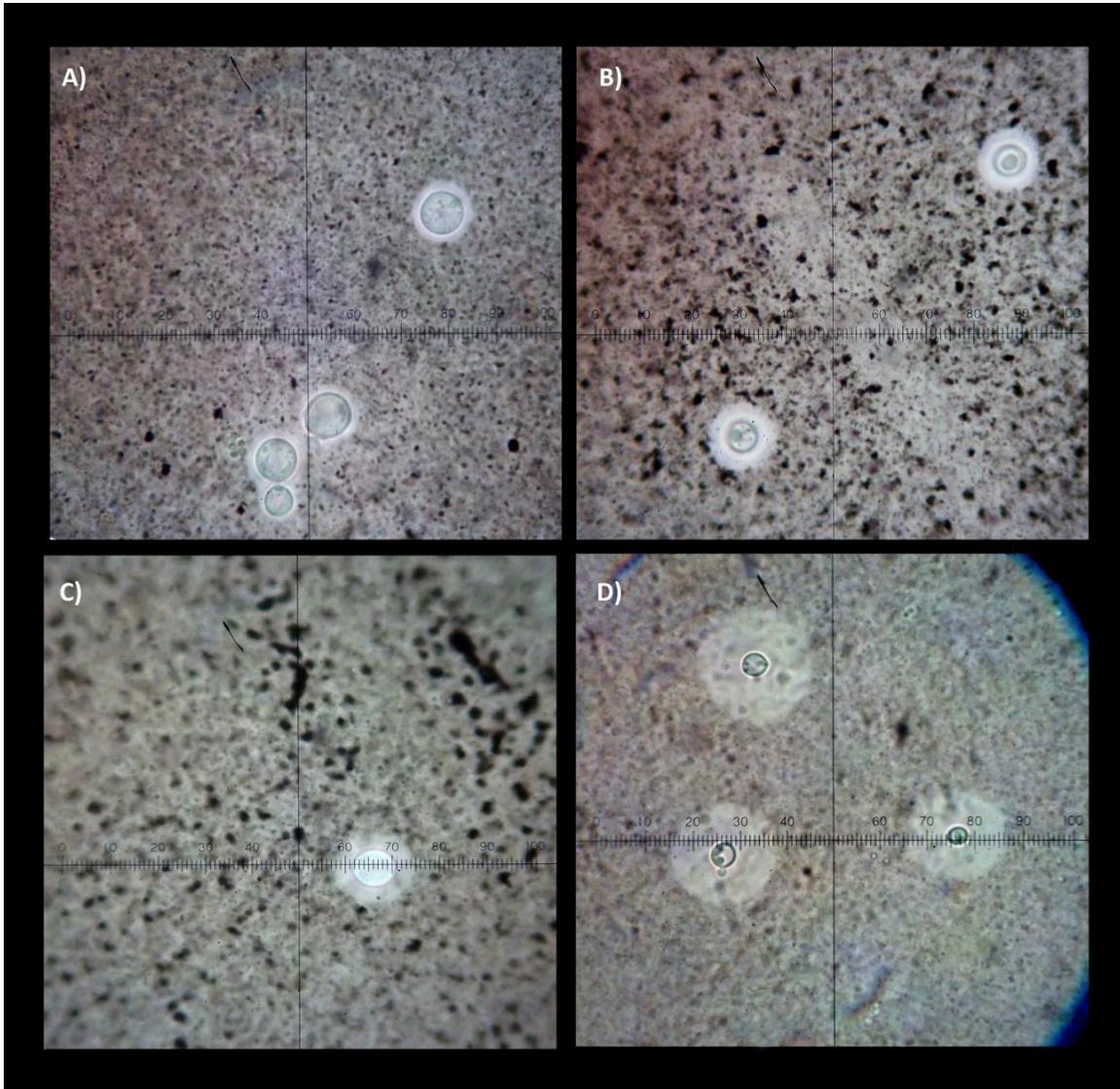
Tinción negativa de aislamiento FQ en A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Observando un aumento de la cápsula en SL con HEPES .Aumento 100x.

Muestra Facultad de Química



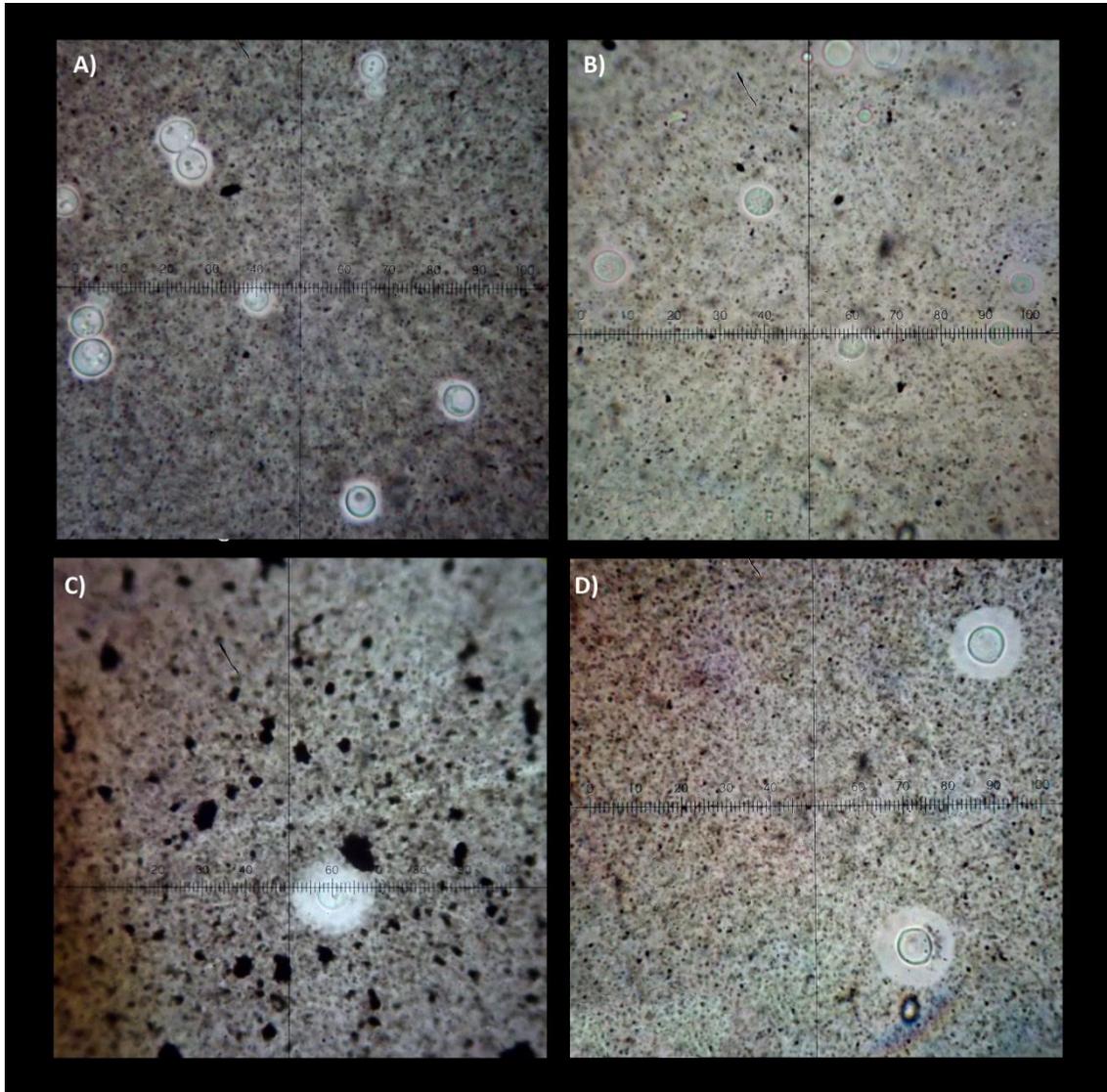
Tinción negativa de aislamiento ambiental V021 en A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Observando un aumento en los dos últimos medios. Aumento 100x.

Muestra ambiental V021



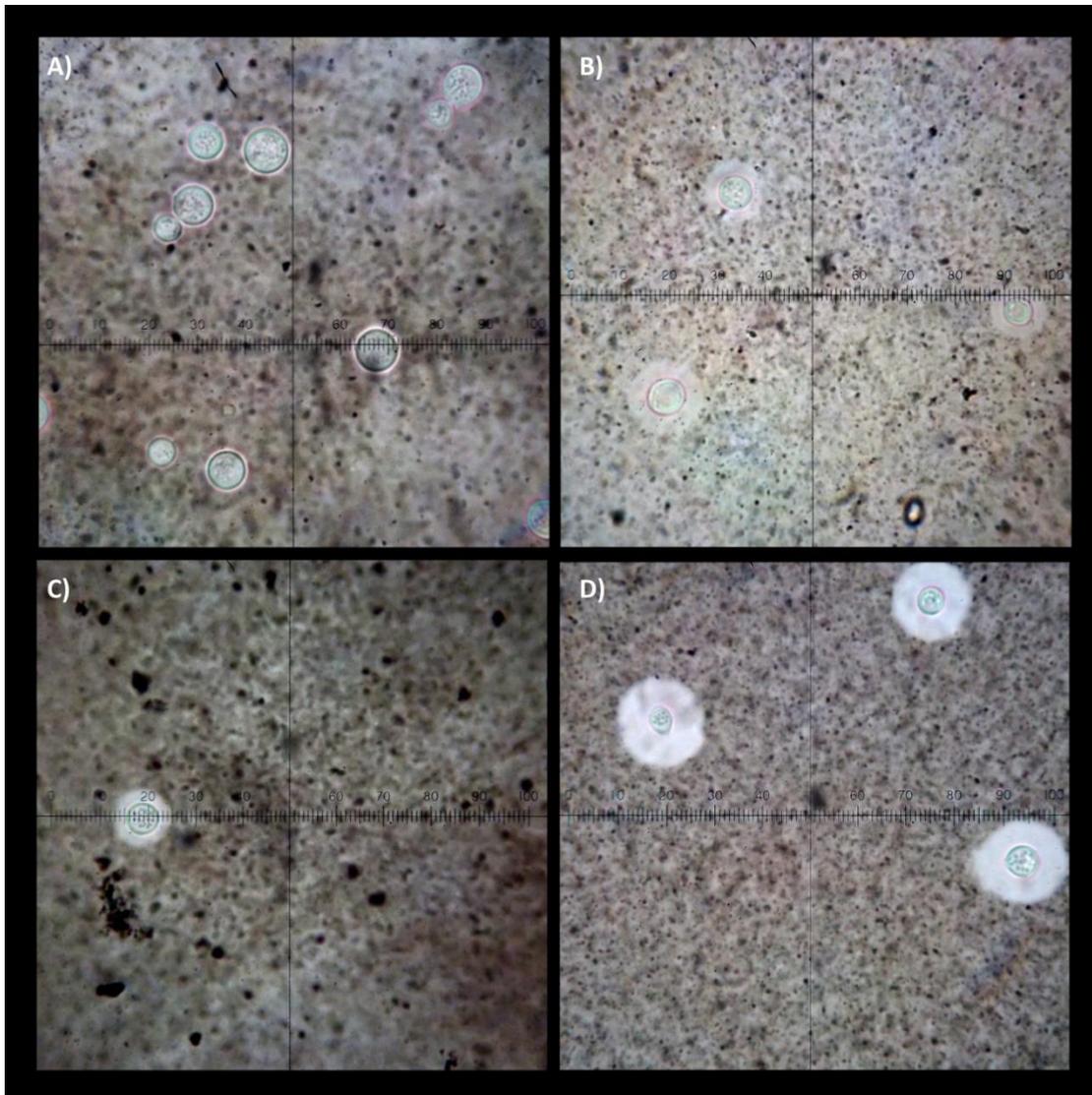
Tinción negativa de aislamiento ambiental V023 en A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Observando un aumento en SL con MOPS. Aumento 100x.

Muestra ambiental V023



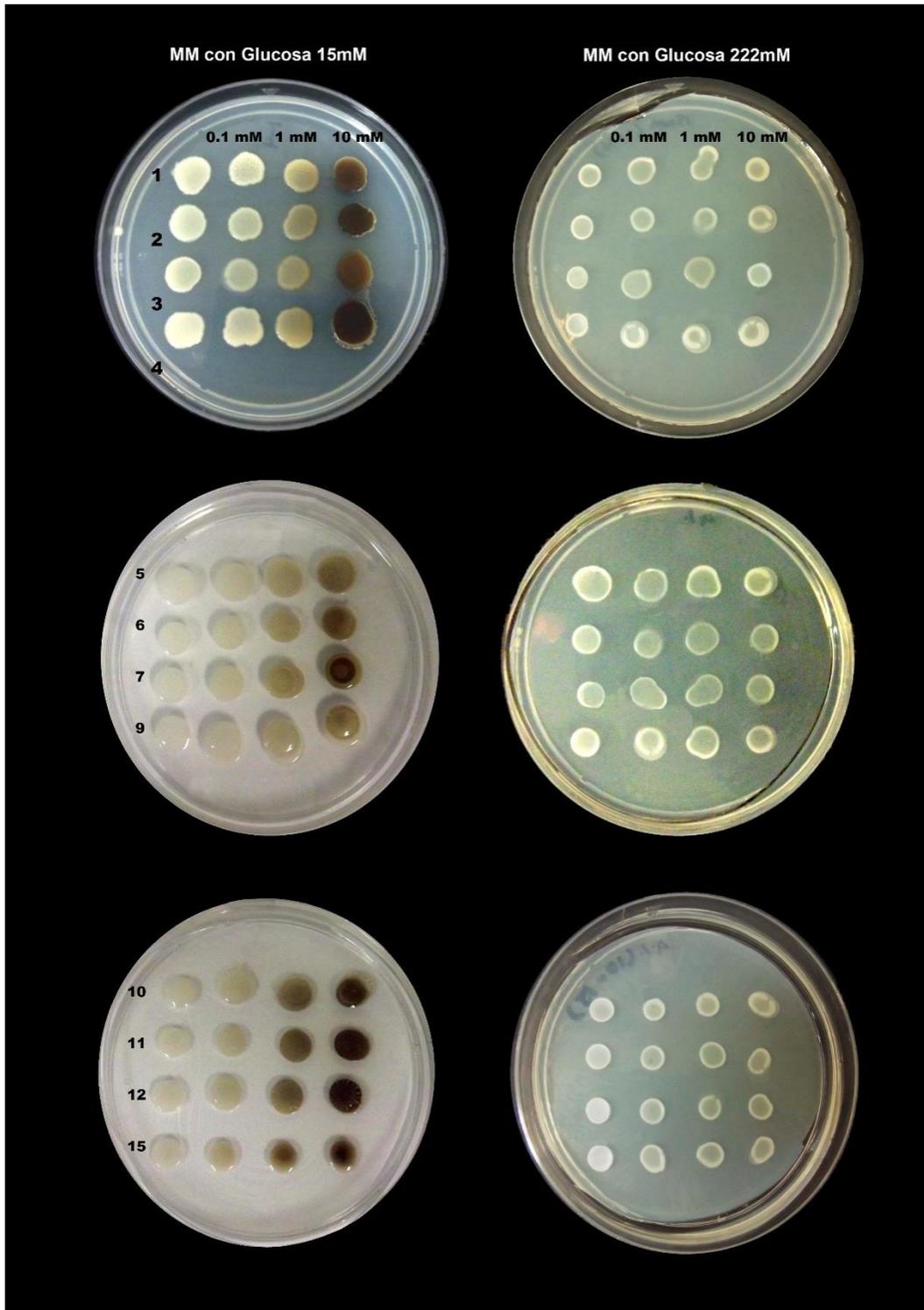
Tinción negativa de aislamiento ambiental V030 en A) Medio SL; B) Medio SL dil 1:10; C) Medio SL dil con MOPS 50mM y D) Medio SL dil con HEPES 50mM. Observando un aumento de la cápsula en SL con HEPES .Aumento 100x.

Muestra ambiental V030



Anexo 4. Melanina

A continuación se muestran los aislamientos clínicos en ambos medios y con diferentes concentraciones de L-DOPA



A continuación se muestran los aislamientos ambientales en ambos medios y con diferentes concentraciones de L-DOPA

