

17
2 es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LOS PRINCIPALES
COMPONENTES CAPSULARES DE *Cryptococcus*
neoformans SEROTIPO A.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ADAN CHAVEZ CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS. M. EN C. ENRIQUE SALAS TELLEZ.
O.F.B. ESP. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO VOTOS APROBATORIOS

U N A M
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Estudio del Desarrollo de los Principales Componentes
Capsulares de *Cryptococcus neoformans* Serotipo A.

que presenta el pasante Adán Chávez Castillo
con número de cuenta 8910308-7 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx., a 10 de Agosto de 199 8

PRESIDENTE Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya *Andrea Becerril Osnaya*

VOCAL M. en C. Tonatiuh Cruz Sánchez *Tonatiuh Cruz Sánchez*

SECRETARIO M. en C. Enrique Salas Téllez *Enrique Salas Téllez*

PRIMER SUPLENTE Dra. Susana E. Mendoza Elvira *Susana E. Mendoza Elvira*

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Andrés Romero Rojas *Andrés Romero Rojas*

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por que sin ti nada de lo que yo significa hubiera sido posible...

"Detrás de tu risa,
Detrás de tus ojos,
Detrás de tus caricias
Estamos tus hijos..."

Vivimos por ti...
Morimos por ti...

Ejemplo invaluable de fuerza...
De lucha constante...
De sufrimientos vencidos...
De alegría vigorizante...

Pero sobre todo de amor y comprensión que mira hacia la eternidad..."

TE AMO...

A mi padre, por que gracias a tus consejos, a tu cultura y a tu "ejemplo" provocaste en mi el amor hacia la ciencia y el odio hacia la degradación...

A mis hermanos:

Rubén Chávez, por ser el pilar que ha ayudado a Bety durante estos últimos años y por ser un ejemplo potencial para mi...
Ama y cuida a tu familia...

A Gabriela Torres, por haberme brindado la oportunidad de tener ese super sobrino...

A Yaxben, por tu inocencia, tu niñez y por que te amo...
Vive...

No puedo dejar pasar a alguien que ha sido la columna que me ha sostenido durante toda mi vida y que fue y sigue siendo mi guía en muchas de las cosas por las que luché...

David Chávez (bizmicó), por ser mi compañero, mi amigo, mi ejemplo y una caricia en el momento oportuno...
Vuela Libre...

A Ivonne Callejas Chávez, por haberme enseñado valores que nunca hubiera entendido sino te hubiera conocido...

Sin ti, no sé que hubiera sucedido...
Gracias por darme ese impulso para vivir...

A mis Asesores de Tesis:

Enrique Salas Téllez, por todas las cosas útiles que he aprendido de usted y por ser un buen amigo al que se puede acudir en cualquier momento...
Duro con la Tesis...

Carolina Segundo Zaragoza, por que sin su ayuda no hubiera podido integrarme a este equipo de trabajo...
Gracias por los regaños y jalones de orejas...

Alma Nuñez del Arco, por tu amabilidad y por tu disponibilidad para ayudarme siempre que lo necesité...
¿ya mero la tesis...?

"A todos mis profesores, que desde que era pequeño y hasta la actualidad han contribuido a mi formación."

Agradeciendo en especial a:

Lourdes Forey y Carlos López Marín, por su amistad y enseñanzas...

José Proal, por su ejemplo como académico y como persona...

Gerardo Cruz, por sus valiosas enseñanzas y por su sencillez...

Susana Mendoza Elvira, por su amabilidad y por haberme hechado tanto la mano...

"A todos mis compañeros de clase, que de alguna u otra forma han contribuido a la finalización de esta etapa"....

En especial a: Alberto Bobadilla, Adrián Contreras, Saúl García, Julio Bustos, Alejandra Bahena, Darío, Alejandro Granados, Julio Contreras, al Bart (cuafazo), Jacobo, Alejandro Díaz (enfermo), al Zefe, a Hesper (te quiero mucho), a Joaquín, Alejandra, Cynthia, Tony, Tarcila, Sandra, Paty Miranda, Marco, Ricardo, Laura, Heidi, Ernestina, Carlos Quezada, Jorge Espinoza, Edith Gutiérrez, Boni, Mario, Martín y los que me faltan...

Pero de manera supraespecial: a Ivonne Callejas Chávez, por todas las cosas a las que me has ayudado y que sin tu ayuda hubieran sido mucho más difíciles...

A TODA LA FLOTILLA:

A LAM DODA:

Alejandro Jara Guerrero, por tu valentía, determinación y tu locura...
Te quiero mucho enano...

Roberto García Arellano "La vaca", por tu alegría contagiosa, por tu compañía, por...
"No dejes que nos coma el diablo..."

Carlos Arana Rodríguez, por tus impetus de lucha, por tu ejemplo, por...
"hay Juanito siempre tan... hay Juanito cuando cambiaraaaaas..." CUCA...

A Rosa y a Melina, por cuidar de esos muchachos; oigan, ¡!!!! pero no tanto...!!!!

A la KAR-K-JADA:

Alejandro Castro Valencia, por tu filosofía, por tu cinismo, por el Marqués de Sade...
Eres un H.D.T.T.P.M...

Rodolfo Castro Valencia (Rodo), por tus carrillas, por tu bajeo, por que sigues en la lucha...
Tú también eres un ... igual que tu hermano...

A Benito (bara-bara), por tu amistad, por tus trompetazos, por tus "...ahora si voy a ensayar..."

Otra vez a la "vaca", por sus guitarreos tipo gallina, por tus berrinches, por...
Baaaasta...

☆

A Claudia Hernández M., por ser como eres, por tu ternura, por estar medio safada y por otras cosas que tú no sabes...
Es bonito apellido el de Hernández...

A mi gran amiga Doña Jara, por tener siempre las puertas de su casa y de su mente abiertas, por ser una señora poco común, pero sobre todo por ser una de mis mejores amigas, la quiero mucho...
¡¡¡¡¡Hay güerito...!!!!

A Ingrid, por su dulzura, por su amabilidad y su mordacidad, por su jano...
"¿Cómo estás güerito?..."

Aljano, por su locura, por su inteligencia, por sus gritos, por ser un niño...
"¡¡¡¡¡¡AAAAAAAhhhhhhhhh...!!!!!!"

A Nuria, por su voz floja, por sus ideas, por nómada, por su carácter...
"aaaayyyy mamáááá..."

A Don Jara, por enseñarme lo que es saber respetar espacios, por ser el jefe de "los Jara..."

A la abuelita Jara, por haber tenido a esa hija, por ser tan a todo dar, por ser usted...

Garabujos:

A Miguel (Mike), por tu bibra, por que me infectas, por enfermo, por tus poesías, por ser un jmete...
"Gracias por ayudarme a hacer la vida más soportable"... (Mike)

A Mariana, por tu ternura y tu locura, por vivir por encima del suelo...
"las hadas miraban los cielos caer y los demonios arrullaban su piel."

A Maribel, por ser diferente, por tu sonrisa, por tu energía...
"la mar se despidió de sus cabellos y todos volaban hacia el cuarto oscuro..."

A Horacio, por su chamánica personalidad, por su cinismo, por impredecible...
"1,2,3,4,5,6,7,8,8,8,8,5,6,3,3,2,55,¡¡¡¡¡aaaaahhhhh!!!!!!" ...

Otros enfermos:

Alejandro Díaz, por polifacético, por la happy house, por su ojo de gato (cats)...
"ese niño no está tonto... ese niño está enfermo..."

A Fidel Cárdenas, por sus danzas maoris, por los tacos de libro, por los sabmazos...
"Ahora si ya me tienen harto..."

A Oscar Goethe, por ser mi compañero de infancia, por su nueva familia, por todo lo vivido...
"Fiu Fiu Fiuuuuuuuu..."

A Hugo ska, por su musicalidad, por su buena vibra, por ser todo un ajax...
"muy pooooocos ehh"...

A mitocayo, por el blues, por la bohemia, por Rockdrigo González, por su lucha...
"Arriba Tizayuuuca..."

A

Todos aquellos que en estos momentos no llegan a mi memoria pero que sin embargo han estado conmigo de alguna u otra forma... GRACIAS...

A la música y a todos aquellos que la fabrican: Doors, Beatles, Led Zeppelin, Mano Negra, Nirvana, Nusrat Fateh Ali Khan, Creedence, Operation Ivy, Kortatu, El Blues, El Jazz, Jimmy Hendrix, Janis Joplin, Soda Stereo, El Tri, La Maldita, La música clásica, José José, Paquita la del Barrio, José Alfredo, Chente, Caifanes, Rancid, La Polla Records, Rolling Stones, Roberto Carlos, Ali Shankar, Eric Clapton, Ustad Sabri Khan, Bob Marley, Louis Armstrong, Glen Miller, Elvis Presley, Beastie Boys, Sex Pistols, Ska-p, Desorden Público y los que me faltan...
"Por que sin ella estaríamos fritos..."

"La ciencia es un reflejo de la incapacidad del hombre para comprender a la naturaleza..."

A.C.C

INDICE

RESUMEN	2
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	3
1.0 INTRODUCCION	4
2.0 JUSTIFICACION	10
3.0 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	11
4.0 MATERIAL Y METODOS	12
4.1 Curva de Crecimiento de <i>C. neoformans</i> y obtención de las muestras	12
4.2 Extracción de polisacárido mediante el método de Etanol Frio	13
4.3 Cuantificación de Carbohidratos Totales (Método de Dubois)	14
4.4 Cuantificación de Hexosas (Método de Dische)	15
4.5 Cuantificación de Pentosas (Método de Orcinol)	16
4.6 Método de preparación de Curvas Patrón	17
4.6.1 Cuantificación de Carbohidratos Totales (Método de Dubois)	17
4.6.2 Identificación y Cuantificación de Monosacáridos (Espectro de Dische)	17
4.6.3 Cuantificación de Pentosas (Método de Orcinol)	18
5.0 RESULTADOS	20
5.1 Identificación de <i>C. neoformans</i> serotipo A	20
5.2 Curva de Crecimiento de <i>C. neoformans</i> serotipo A	21
5.3 CURVAS PATRÓN	23
5.3.1 Método de Dubois	23
5.3.2 Método de Dische	25
5.3.3 Método de Orcinol	27
5.3.4 Carbohidratos Capsulares vs. Curva de Crecimiento	28
6.0 DISCUSION	30
7.0 CONCLUSIONES	32
8.0 ANEXO	33
8.1 Montaje Experimental	33
8.2 Identificación de <i>C. neoformans</i> serotipo A y preparación de medios de Cultivo	34
8.2.1 Tinción negativa	34
8.2.2 Preparación del Medio de Niger	34
8.2.3 Preparación del Medio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol)	35
8.2.4 Preparación del Medio GGA (Glutamina-Glicina-Asparagina)	36
9.0 BIBLIOGRAFIA	37

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio de la cinética de producción del material capsular de *Cryptococcus neoformans* serotipo A para determinar la producción de cada uno de los principales carbohidratos capsulares (glucosa, xilosa y manosa) durante distintas etapas de cultivo del microorganismo, para lo cual se utilizó una cepa de *Cryptococcus neoformans* serotipo A proveniente de una muestra clínica que se inoculó en caldo GGA para promover el desarrollo capsular, se incubó a 37 °C / 51 hrs. con bombeo constante de oxígeno, durante los cuales se tomaron muestras en cada etapa de cultivo a intervalos de tiempo de 2 horas y a cada muestra se le determinó su absorbancia a 550 nm y se le extrajeron los carbohidratos capsulares por el método de etanol frío para posteriormente cuantificarlos por medio de tres métodos: 1.- El método de Dubois para la cuantificación de carbohidratos totales, 2.- el método de Dische para la cuantificación de hexosas, 3.- el método de Orcinol para la cuantificación de pentosas.

Los resultados obtenidos muestran que existen variaciones en la cantidad de los carbohidratos capsulares de *C. neoformans* serotipo A (Glucosa, Xilosa y Manosa) durante 51 hrs. de incubación del microorganismo y que hay un aumento significativo en la cantidad de los carbohidratos capsulares en aquellas etapas de crecimiento donde la levadura se multiplica en forma más rápida, aproximadamente entre las 12 y 21 hrs. y entre las 28 y 33 5 hrs. de cultivo

LISTA DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Preparación de la curva patrón por el Método de Dubois	17
2	Preparación de la curva patrón por el Método de Dische	18
3	Preparación de la curva patrón por el Método de Orcinol	18
4	Curva de Crecimiento de <i>C. neoformans</i> serotipo A en medio GGA	21
5	Curva Patrón de Carbohidratos Totales (Dubois)	23
6	Curva Patrón de Glucosa y Manosa (Dische)	25
7	Curva Patrón de Xilosa (Orcinol)	27
8	Cantidad de Carbohidratos Capsulares durante el cultivo de <i>C. neoformans</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Contenido	Página
1 Estructura General de GXM de la cápsula de <i>C. neoformans</i>	8
2 Estructura de GXM del polisacárido capsular de <i>C. neoformans</i> serotipo A	8
3 Tamaño relativo de la cápsula de <i>C. neoformans</i>	20
4 Curva de crecimiento de <i>C. neoformans</i> serotipo A	22
5 Curva patrón de Glucosa (Dubois)	23
6 Curva patrón de Manosa (Dubois)	24
7 Curva patrón de Xilosa (Dubois)	24
8 Curva patrón de Glucosa (Dische)	25
9 Curva patrón de Manosa (Dische)	26
10 Curva patrón de Xilosa (Orcinol)	27
11 Cantidad de carbohidratos capsulares en dif. etapas del cultivo. de <i>C. neoformans</i>	29
12 Montaje Experimental	33

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	micrómetros
µl	microlitros
GGA	Caldo Glutamina-Glicina-Asparagina
CGB	Agar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
P.M.	peso molecular
Kd	kilodalton
°C	grados centígrados
lb	libras
hrs.	horas
min.	minutos
gr.	gramos
ml	mililitros
g	gravedades
nm	nanómetros
r	Coefficiente de correlación de la muestra
m	Pendiente
b	Ordenada al origen
σ	Desviación estándar
λ	Longitud de onda
var.	variedad

1.0 INTRODUCCION

La criptococosis es una micosis de curso subagudo o crónico, causada por un hongo levaduriforme oportunista, denominado *Cryptococcus neoformans* (32); se caracteriza por afectar inicialmente pulmones y posteriormente se disemina a piel y vísceras, con una clara predilección hacia el sistema nervioso central. Esta enfermedad es también conocida como Enfermedad de Busee-Buschke, Torulosis o Blastomicosis Europea (2).

El primer caso conocido de criptococosis ocurrió en Alemania en 1894, y el hongo causal fue aislado de una lesión que fue definida "como un sarcoma". Unos 40 años más tarde, la identidad del aislamiento que fue obtenido era confirmado como *Cryptococcus neoformans*. El primer reporte que involucra al sistema nervioso central fue hecho en 1905 por von Hansemann y el primer diagnóstico ante mortem de la enfermedad en esta forma (meningitis) fue realizada por Versé en 1914 (33).

Cryptococcus neoformans es una levadura potencialmente patógena que es ubicua en nuestro medio ambiente e inusual entre individuos sanos, pero las formas encapsuladas de este organismo pueden producir enfermedades diseminadas en individuos con sistema inmune debilitado (21). Se han reconocido dos factores de virulencia para esta levadura: el polisacárido capsular y la producción de un compuesto con características semejantes a la melanina (15). *Cryptococcus neoformans* es una levadura que ha emergido como un importante patógeno oportunista en pacientes con SIDA (20).

La prevalencia de criptococosis en pacientes con SIDA es de 3-6% en Europa, 6-10% en USA y 10-30% en algunos países tropicales, particularmente en Africa Central (14) En México la prevalencia de esta micosis se encuentra en un rango de entre 5-10%. La criptococosis está considerada como la cuarta causa de infección en pacientes con SIDA. En Africa tropical, la meningitis criptocococica junto con la tuberculosis son las enfermedades oportunistas más importantes en pacientes con SIDA (4) y constituye un problema médico significativo porque los mecanismos de defensa del hospedero contra *Cryptococcus neoformans* no han sido bien comprendidos (41).

La criptococosis es una micosis sistémica que es frecuentemente observada en hospederos inmunocomprometidos, especialmente en aquellos con SIDA. El diagnóstico de la criptococosis está basado en la observación microscópica de la levadura en muestras clínicas o en la detección del antígeno capsular en fluidos corporales utilizando la prueba de aglutinación en látex (1).

El reconocimiento de colonias levaduriformes aisladas de especímenes clínicos, así como la diferenciación preliminar entre el género *Cryptococcus* y *Candida* es generalmente llevada a cabo por la prueba de la ureasa. Desafortunadamente, la presencia de cepas raras de *Cryptococcus neoformans* negativas a la ureasa pueden pasar desapercibidas (1).

A diferencia de muchos hongos patógenos para humanos y animales, *Cryptococcus neoformans* no sufre cambios radicales en su morfología cuando está como parásito en tejidos animales. Este se encuentra presente como células esféricas u ovoides de tamaño variable, pero usualmente en un rango de 5 – 10 μm de diámetro, rodeado por la característica cápsula mucosa, que con la mayoría de los procedimientos de tinción, no se tiñe y aparece como un halo alrededor de la célula (33).

El tamaño de la cápsula se incrementa usualmente al transferir *C. neoformans* de cultivos *in vitro* a cultivos *in vivo* y puede aumentar hasta 5 veces el diámetro de la célula (33); ya que las células de *C. neoformans* en tejidos infectados usualmente tienen grandes y distintivas cápsulas (12). Sin duda que el material capsular juega un importante papel en la relación entre este patógeno y el hospedero, ya que el polisacárido capsular que rodea a *C. neoformans* inhibe la fagocitosis de la levadura por los macrófagos (30), los cuales proveen la defensa inicial contra los microorganismos inhalados (14).

La cápsula de *C. neoformans* es un poderoso activador de la vía alterna del complemento, ya que la presencia de la cápsula bloquea la iniciación de la vía clásica, que puede ocurrir normalmente en la pared celular del microorganismo, y produce una iniciación que es dependiente solamente de la vía alterna ya que una de las características más importantes de la cápsula criptococal es su capacidad para servir como un sitio para la activación y deposición de fragmentos opsonicos de C3 en forma de iC3b (20).

Se ha reportado que la secreción de citocinas por monocitos humanos está muy influenciada por la encapsulación de *C. neoformans* así como por la presencia de polisacárido capsular purificado. De particular interés es la habilidad de GXM para suprimir la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inducida por el lipopolisacárido. La interleucina 10 (IL-10) se ha reportado que es un potente regulador de TNF- α e IL-1 β ; se ha planteado la hipótesis de que la inhibición de la secreción de las citocinas proinflamatorias puede ser mediada por IL-10 producida endógenamente por monocitos humanos en sangre periférica secretada en respuesta a *C. neoformans* y a su material capsular.

Estudiando la fagocitosis de *C. neoformans* por los leucocitos humanos se ha observado que las cepas mutantes con poca cápsula son fagocitadas de 70 a 80% por los leucocitos, pero cepas con cápsula de mayor tamaño sólo son fagocitadas en menos del 20 % (30).

La inmunidad mediada por células (CMI), que puede ser evaluada determinando los niveles de hipersensibilidad retardada (DTH), es un importante mecanismo de defensa en pacientes con criptococosis (27). Estudios previos en un filtrado de antígeno de cultivo de *C. neoformans* han mostrado que el antígeno es útil para detectar hipersensibilidad de tipo tardío y que ésta es específica para *C. neoformans* (28).

Mediciones de clases específicas de anticuerpos anticriptococales en criptococosis activa o reciente han mostrado prevalencia de 9-78 % para Ig G y 22-88 % para Ig M. En individuos normales la Ig G anticriptococal ha sido detectada de 0-61 % y la Ig M en 3-98 % (36).

Así como la presencia de la cápsula, y su tamaño relativo, afectan profundamente la virulencia de *Cryptococcus neoformans*, la variación de la patogenicidad de las levaduras puede ser atribuida a las diferencias en la estructura química de la cápsula (16, 33). *Cryptococcus neoformans* ha recibido mucha atención debido a que los polisacáridos capsulares son responsables de las características serológicas de serotipos particulares (33).

De acuerdo a la composición química de la cápsula y a su especificidad serológica se ha dividido a *Cryptococcus neoformans* en dos variedades y cuatro serotipos: *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*. Cada variedad contiene dos serotipos; serotipos A y D para la variedad *neoformans* y serotipos B y C para la variedad *gattii* (24, 38); y algunos con serotipos como A/D o algunos no tipificables (25). Estas dos variedades de *Cryptococcus neoformans* son diferentes en morfología, fisiología, serología, hábitat, epidemiología y genética. Actualmente se usan dos medios de diagnóstico para distinguir estas dos variedades, agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) y agar cicloheximida-glicina-rojo de fenol. La actividad de la ureasa es una de las más importantes propiedades bioquímicas para miembros del género *Cryptococcus* y basidiomicetos en general (23); ya que a diferencia de otros hongos levaduriformes (*Candida sp.*, *Torulopsis sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon sp.*) el género *Cryptococcus* produce ureasa a diferencia de los hongos ya mencionados (2).

Los resultados de la inhibición de la ureasa y el agar CGB mostraron 100 % de correlación entre aislamientos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* y 98.7 % de correlación entre aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (23). También se ha comprobado que ambas variedades pueden ser separadas en base a la habilidad de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* para utilizar D-prolina como única fuente de carbono (11)

Usando el método auxonográfico se ha demostrado que *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* puede ser diferenciado de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* por su habilidad para asimilar D-prolina como una fuente de nitrógeno (26). La asimilación de D-prolina y el crecimiento en agar CGB son altamente sensibles para realizar la división de las variedades (D-prolina 99.13% y CGB 99.57%) (29).

La envoltura de las células de *Cryptococcus neoformans* está compuesta por una rígida pared celular, constituida principalmente por glucanas (20); un polisacárido capsular, glucuronoxilomanana (GXM), compuesto de manosa (Man), xilosa (Xyl), ácido glucurónico (GlcA), y O-acetil, y dos carbohidratos menores, galactoxilomanana (GalXM), con P.M. de 275 Kd (27); y manoproteína (MP). GXM, GalXM y MP son aislados de medios de crecimiento por precipitación selectiva con etanol y complejación diferencial con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (31, 37, 38).

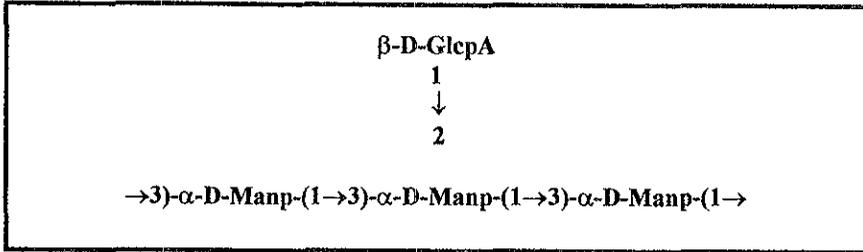


Fig. 1. Estructura de GXM de la cápsula de *Cryptococcus neoformans* (5).

En los serotipos A y D las GXM están sustituidas principalmente en O-2, mientras que en los serotipos B y C las GXM están sustituidas con Xylp en O-2 y en O-4 (38)

A continuación se muestra un modelo de la unidad repetitiva de GXM de *C. neoformans* serotipo A (30).

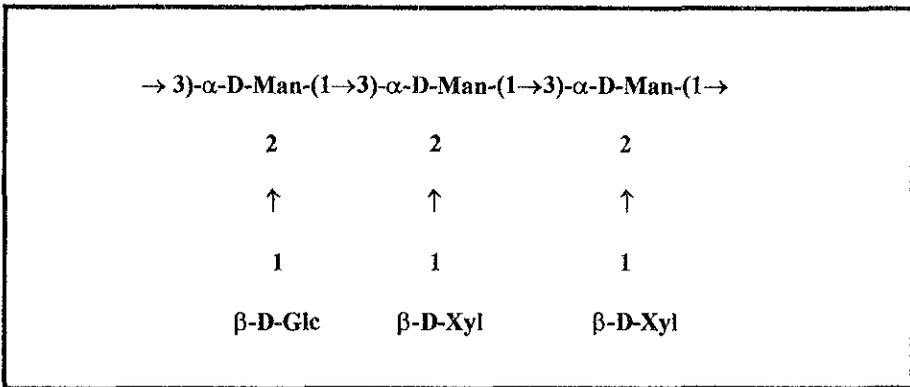


Figura 2. Estructura de GXM del polisacárido capsular de *C. neoformans* serotipo A. Man: Manosa, Xyl: Xilosa, Glc: Acido Glucurónico (30).

Las diferencias esenciales entre los serotipos son el grado de O-acetilación y la extensión de sustitución de xilosa en residuos D-manosil en la cadena principal. Los grupos O-acetil son sensibles a hidrólisis a pH alcalino (19).

El polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* inhibe la fagocitosis de la levadura por los macrófagos. La MP modula la reacción de hipersensibilidad tardía, mientras que GalXM despierta una pequeña respuesta inmune (30). Se ha visto que la MP es el componente primario reconocido por la respuesta inmune celular dirigida contra *Cryptococcus neoformans* en células de ratones (27).

La cápsula es un importante factor de virulencia porque ésta posee propiedades tolerogénicas y antifagocíticas que están relacionadas a una o más de las características estructurales del principal antígeno capsular, glucuronoxilomanana (40).

Con lo que respecta a los métodos de aislamiento del material capsular existen distintos métodos utilizados dependiendo del tipo de cápsula y del microorganismo del cual provenga dicho material; por mencionar algunos existe el método de etanol frío, extracción con detergentes (CTAB), extracción con fenol, extracción con metanol-cloroformo y procedimientos con sonicación.

2.0 JUSTIFICACION

Debido al incremento en la incidencia de infecciones micóticas en el humano, principalmente en el caso de pacientes debilitados donde sus mecanismos normales de defensa están afectados, la diversidad de los agentes micóticos causales, la presencia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la quimioterapia postransplantes, el uso indebido de antibióticos y sustancias inmunosupresoras (corticosteroides) ha ocasionado una disminución de la resistencia del huésped (13).

El SIDA ha sido responsable de un dramático incremento en infecciones causadas por hongos levaduriformes como *Cryptococcus neoformans*, el porcentaje de prevalencia de la criptococosis (3-33%) (13), así como el número creciente de individuos afectados por el SIDA ha aumentado el interés en el estudio de los agentes etiológicos implicados en la criptococosis, los cuales incluyen a *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D) y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C), aunque se han aislado otros agentes causales de criptococosis, principalmente *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii* pero la importancia de estos aislamientos es dudosa (21); siendo a su vez necesarias las investigaciones que ayuden a desarrollar metodologías necesarias para lograr un adecuado diagnóstico y por consiguiente un correcto tratamiento.

Es importante mencionar que no se han reportado estudios en cuanto a cuál es el patrón de desarrollo de la cápsula de *Cryptococcus neoformans* serotipo A, por lo que es útil conocer el modo en el cual se desarrolla ésta tanto en cultivos *in vitro* como *in vivo* para poder saber así más acerca de la fisiología de este microorganismo que ha emergido en los últimos años como un importante patógeno oportunista principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

3.0 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

- ❖ La cinética de producción del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* serotipo A posee un comportamiento similar a su cinética de crecimiento en medio GGA.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Realizar una cinética del desarrollo de los principales componentes capsulares de *Cryptococcus neoformans* serotipo A.

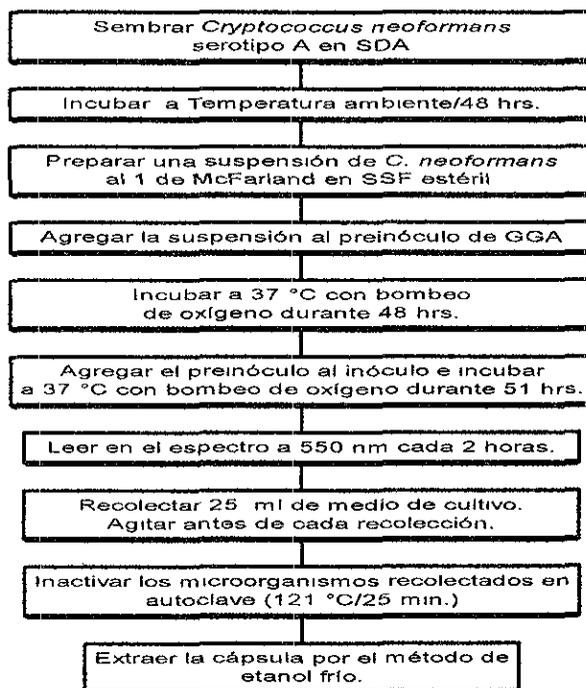
OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la relación cuantitativa que guardan los diferentes carbohidratos que constituyen el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* serotipo A durante distintas etapas de cultivo.
- ❖ Utilizar un medio de cultivo adecuado para producir la máxima cantidad de polisacárido capsular en *Cryptococcus neoformans* serotipo A.
- ❖ Emplear una metodología adecuada para el aislamiento de los principales polisacáridos capsulares de *Cryptococcus neoformans* serotipo A.
- ❖ Utilizar una técnica que permita cuantificar eficientemente los polisacáridos capsulares de *Cryptococcus neoformans* serotipo A.

4.0 MATERIAL Y METODOS

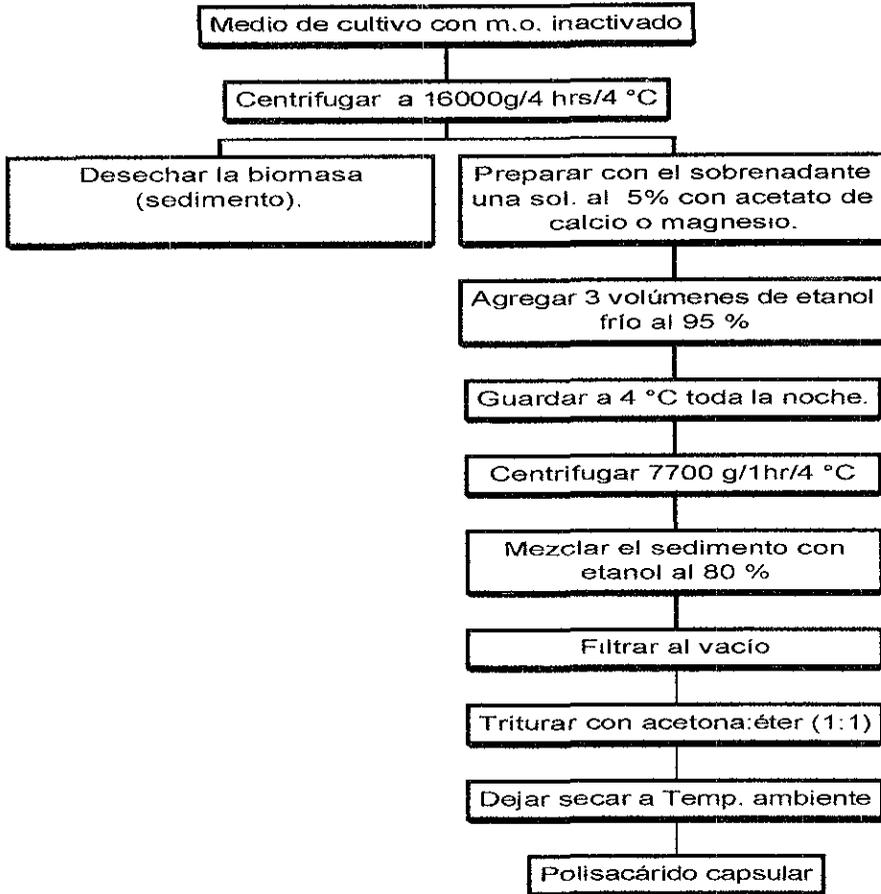
4.1 Realización de la curva de crecimiento de *Cryptococcus neoformans* y obtención de las muestras.

Se sembró *C. neoformans* serotipo A en SDA y se incubó a temperatura ambiente durante 48 hrs., una vez cumplido dicho tiempo se preparó una suspensión del microorganismo a una concentración de 1 en la escala de McFarland (aproximadamente 3×10^8 UFC/ml) en solución salina fisiológica (SSF) estéril, enseguida se agregó la suspensión a un preinóculo de medio GGA y se incubó a 37 °C con bombeo constante de oxígeno durante 48 hrs. Se procedió enseguida a agregar el preinóculo al inoculo, este último también de medio GGA y se incubó a 37 °C con bombeo de oxígeno durante 51 hrs., a partir del primer momento de dicha incubación se procedió a tomar muestras de 25 ml/2 hrs. hasta completar las 51 hrs. de cultivo. Después de recolectar cada muestra se leyó cada una en el espectrofotómetro a 550 nm para realizar la curva de crecimiento. Las 24 muestras recolectadas se inactivaron en autoclave a 121 °C/25 min. Después se extrajeron los componentes capsulares por el método de etanol frío y una vez obtenidos éstos se realizó la cuantificación de los principales azúcares constituyentes de la cápsula mediante el método de Dubois ,el método de Dische y el método de Orcinol A continuación se muestra el diagrama de flujo correspondiente al procedimiento antes mencionado.



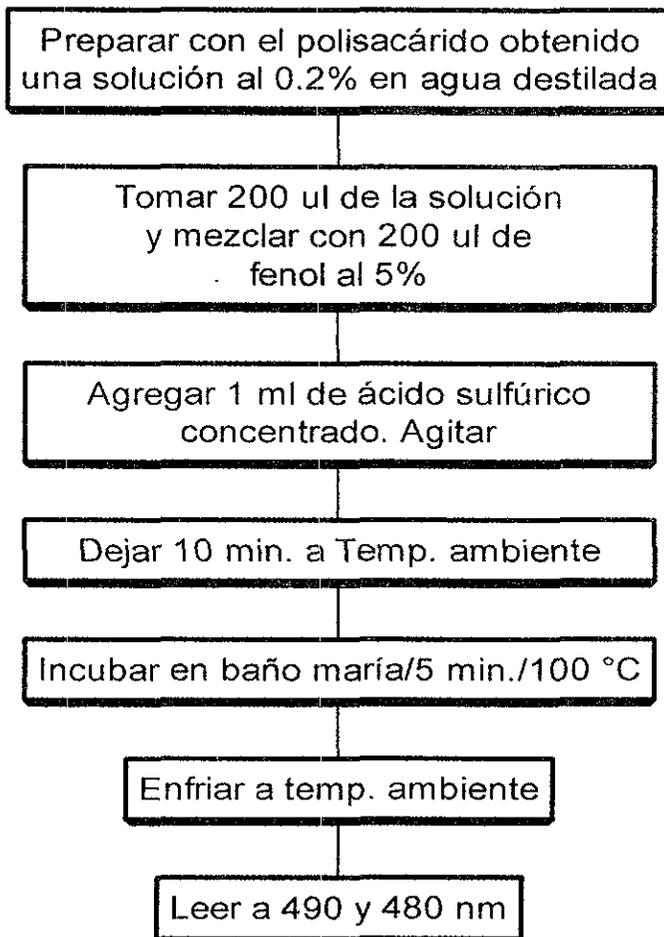
4.2 Extracción del polisacárido capsular mediante el método de Etanol Frío (6).

Cada una de las muestras inactivadas se centrifugaron a 16000 g a 4 °C/4 hrs. A partir del centrifugado se desechó la biomasa (sedimento) y con el sobrenadante se preparó una solución al 5% con acetato de calcio (aunque puede también usarse acetato de magnesio) a cada una de las cuales se agregaron 3 volúmenes de etanol frío al 95% y se guardaron a 4 °C durante toda la noche. Enseguida se centrifugaron las muestras a 7700 g / 4 °C durante una hora y se mezcló el sedimento con etanol al 80%, se filtraron al vacío cada una de las muestras y el filtrado se trituró en un mortero con una mezcla acetona-éter 1:1 y se dejaron secar a temperatura ambiente, después de lo cual se obtuvo el polisacárido capsular. A continuación se muestra el diagrama de flujo correspondiente al procedimiento antes mencionado.



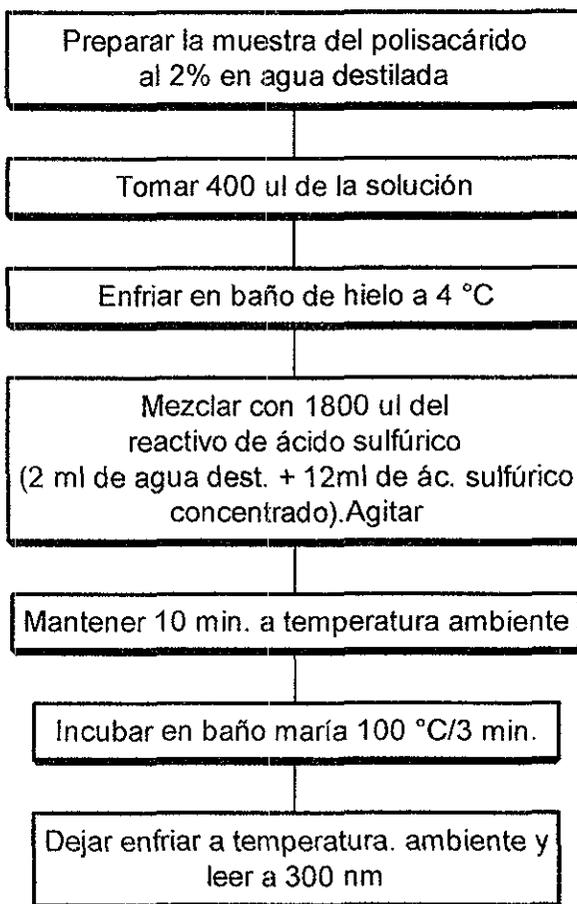
4.3 Cuantificación de Carbohidratos Totales (Método de Dubois).

Se prepararon soluciones del polisacárido obtenido a una concentración de 0.2 % en agua destilada, se tomaron 200 μ l de dicha solución y se mezclaron con 200 μ l de fenol al 5%, enseguida se agregó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agitó vigorosamente toda la mezcla. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. y después se incubó 5 min./100 °C en baño María. Se esperó a que enfriara a temperatura ambiente y se leyó a 490 nm para la cuantificación de glucosa y manosa y a 480 nm para la cuantificación de xilosa. Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva patrón realizada para glucosa, xilosa y manosa, las cuales pueden ser vistas en las Figuras 5, 6 y 7 (18, 10). A continuación se muestra el diagrama de flujo correspondiente al procedimiento antes mencionado



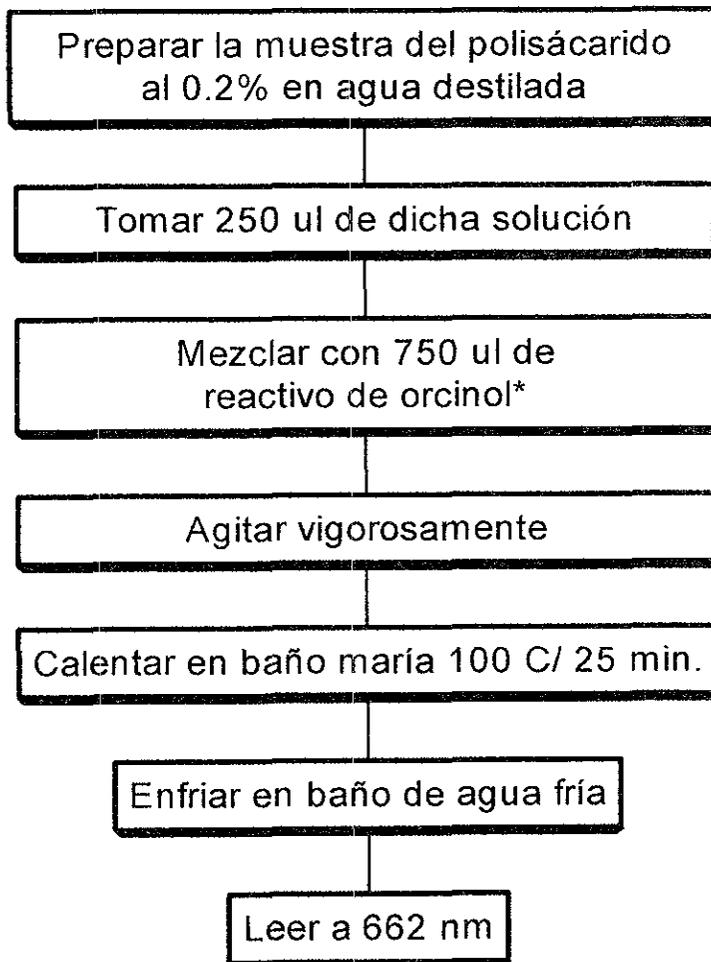
4.4 Cuantificación de Hexosas (Método de Dische).

Se prepararon soluciones del polisacárido obtenido a una concentración de 0.2 % en agua destilada, se tomaron 400 μ l de dicha solución, se enfriaron a 4 °C en baño de hielo después de lo cual se mezclaron con 1800 μ l de reactivo de ácido sulfúrico (2 ml de agua destilada + 12 ml de ácido sulfúrico concentrado). Se agitó vigorosamente y se mantuvo 10 min. a temperatura ambiente, tras de lo cual se colocó en baño de ebullición por exactamente 3 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó a 300 nm. Las cuantificaciones obtenidas fueron interpoladas en una curva patrón realizada para glucosa y manosa las cuales pueden verse en las Figuras 8 y 9 (18, 8). A continuación se muestra el diagrama de flujo correspondiente al procedimiento antes mencionado



4.5 Cuantificación de Pentosas (Método de Orcinol).

Se prepararon soluciones del polisacárido obtenido a una concentración de 0.2 % en agua destilada, se tomaron 250 µl de dicha solución, se mezclaron con 750 µl de reactivo de orcinol y se agitó vigorosamente. Enseguida se calentaron las muestras en baño de ebullición durante 25 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en baño de agua fría, después de lo cual se leyó a 662 nm. Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva patrón realizada para xilosa la cual puede ser vista en la Figura 10 (18, 3). A continuación se muestra el diagrama de flujo correspondiente al procedimiento antes mencionado.



*Ver la preparación del reactivo de Orcinol en "METODO DE PREPARACION DE LAS CURVAS PATRON"

4.6 METODO DE PREPARACION DE LAS CURVAS PATRON

4.6.1 Cuantificación de Carbohidratos Totales (Método de Dubois) (fenol-ácido sulfúrico).

FUNDAMENTO: Este es un método para la estimación cuantitativa de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados con grupos reducidos o potencialmente reducidos. Tiene la ventaja de que no requiere de una hidrólisis previa. Sin embargo esto no es aplicable con aminoazúcares, azúcares con alcoholes, y no es suficientemente sensitivo con pentosas. El método es particularmente usado para la estimación de azúcares separados por cromatografía en papel (18, 10)

Este método fue utilizado para la realización de las curvas patrón que permitieron cuantificar los principales carbohidratos capsulares de *C. neoformans* (glucosa, xilosa y manosa).

Tabla 1. PREPARACION DE LA CURVA PATRON POR EL METODO DE DUBOIS

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	Muestra
Carbohidrato*	0	20	40	80	120	160	200	0
Muestra	0	0	0	0	0	0	0	200
Agua Destilada	200	180	160	120	80	40	0	0
Fenol 5%	200	200	200	200	200	200	200	200
Acido Sulfúrico conc.	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800

* A partir de una solución al 0.2 % de carbohidrato en agua destilada se preparó una dilución 1:20 usando el mismo disolvente

NOTA: Todas las unidades están dadas en microlitros

4.6.2 Identificación y cuantificación de monosacáridos (Espectro de Dische)

FUNDAMENTO: Este método es útil en la identificación y cuantificación tentativa de monosacáridos. Después de calentamiento con ácido sulfúrico, se forman productos de hidrólisis de carbohidratos cada uno de los cuales es característico e identificable por su absorbancia entre 230 y 700 nm (18, 8).

Se realizó una curva patrón para poder cuantificar cada una de las principales hexosas que constituyen el polisacárido capsular de *C. neoformans* (glucosa, manosa), de la forma que se indica a continuación:

Tabla 2. PREPARACION DE LA CURVA PATRON POR EL METODO DE DISCHE

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	Muestra
Carbohidrato*	0	40	80	160	240	320	400	0
Muestra**	0	0	0	0	0	0	0	400
Agua Destilada	400	360	320	240	160	80	0	0
Acido Sulfúrico conc.***	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800

* A partir de una solución al 0.2 % de carbohidrato en agua destilada se preparó una dilución 1:20 usando el mismo disolvente

** A una concentración de 0.2% en agua destilada

*** 2 ml de agua destilada + 12 ml de ácido sulfúrico concentrado (18)

NOTA: Todas las unidades están dadas en µl

4.6.3 Cuantificación de pentosas (Método de Orcinol)

FUNDAMENTO. La determinación de pentosas libres o fosforiladas en presencia de adenosina, AMP, ADP o ATP consiste en una hidrólisis ácida preliminar de la muestra, donde las pentosas libres y fosforiladas se descomponen completamente, pero los azúcares unidos a purinas no son afectados (18, 3).

Mediante este método se realizó una curva patrón para la cuantificación de xilosa (uno de los principales carbohidratos que constituyen el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*).

Tabla 3. PREPARACION DE LA CURVA PATRON POR EL METODO DE ORCINOL

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Muestra
Xilosa 0.002%	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	0
Agua Destilada	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0	0
Muestra*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	500
Orcinol**	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500

* A una concentración de 0.2% en agua destilada

NOTA: Todas las unidades están dadas en µl

REACTIVO DE ORCINOL (18, 3).

- ** 1.-1 gramo de orcinol
- 2.- 375 mg de Cloruro férrico hexahidratado.
- 3.- Diluir a 25 ml con agua.
- 4.- Enfriar en baño de hielo a 4 °C
- 5.- Adicionar 475 ml de HCl del "reactivo de ácido clorhídrico".
- 6.- Almacenar en una botella oscura a temperatura de refrigeración por no más de 6 semanas

REACTIVO DE ACIDO CLORHIDRICO Adicionar 500 ml de ácido clorhídrico
concentrado a 100 ml de agua destilada.

5.0 RESULTADOS

5.1 Identificación de *Cryptococcus neoformans* serotipo A.

La cepa de *C. neoformans* serotipo A proveniente de una muestra clínica usada para la realización de la cinética de desarrollo capsular se observó en la tinción de tinta china con una cápsula poco abundante*, una forma esférica y ligeramente ovalada, como se muestra en la Figura 3 y acomodadas en pequeños conglomerados o presentes como levaduras individuales.

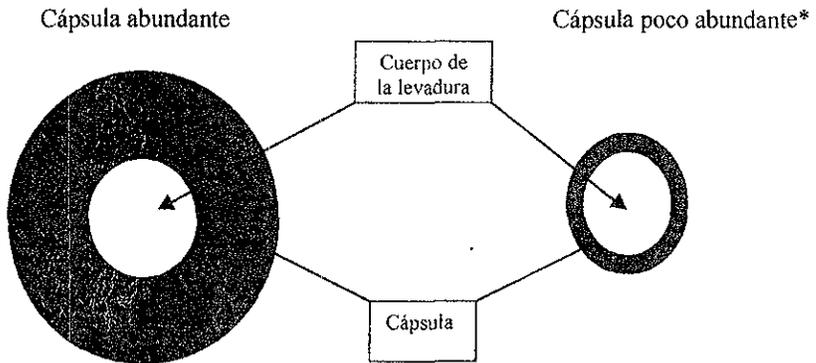


Figura 3. Tamaño relativo de la cápsula de *C. neoformans* vista al microscopio con tinción de tinta china.

En el crecimiento en medio Niger de la levadura se observaron colonias convexas y mucoides de color café oscuro, lo cual es indicativo del crecimiento de *C. neoformans*.

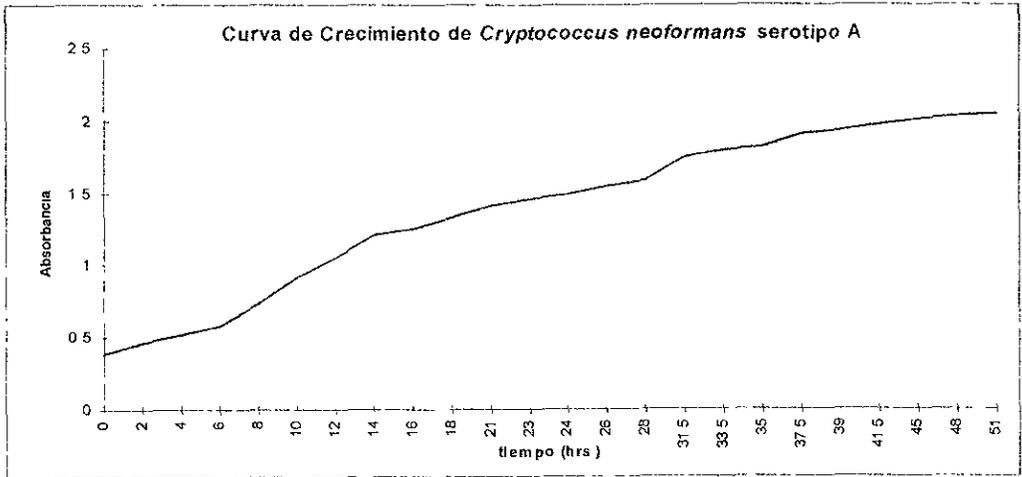
El crecimiento de *C. neoformans* en el medio CGB fue nulo, ya que se trabajó con el serotipo A, y éste por pertenecer a la variedad *neoformans* no se desarrolla en este medio.

5.2 Curva de crecimiento de *Cryptococcus neoformans* serotipo A en medio GGA.

Tabla 4. Medidas de absorbancia del cultivo de *C. neoformans* serotipo A en medio GGA a 37 °C durante 51 hrs con bombeo constante de oxígeno (ver Figura 12.). La longitud de onda (λ) empleada para la obtención de las lecturas de absorbancia fue de 550 nm

Curva de crecimiento de <i>Cryptococcus neoformans</i> serotipo A (37 °C/51 hrs.)		
Horas	Absorbancia	$\lambda=550$ nm
0		0.384
2		0.459
4		0.514
6		0.585
8		0.735
10		0.917
12		1.05
14		1.209
16		1.249
18		1.333
21		1.406
23		1.457
24		1.485
26		1.546
28		1.582
31.5		1.743
33.5		1.788
35		1.816
37.5		1.903
39		1.929
41.5		1.965
45		2.01
48		2.03
51		2.05

Figura 4. Curva de crecimiento de *Cryptococcus neoformans* serotipo A obtenida a partir de los datos de tiempo (hrs) y absorbancia mostrados en la Tabla 4.



El cultivo de *C. neoformans* serotipo A se llevó a cabo en medio GGA con una concentración de 2% de glucosa y con bombeo constante de oxígeno durante 51 hrs / 37 °C

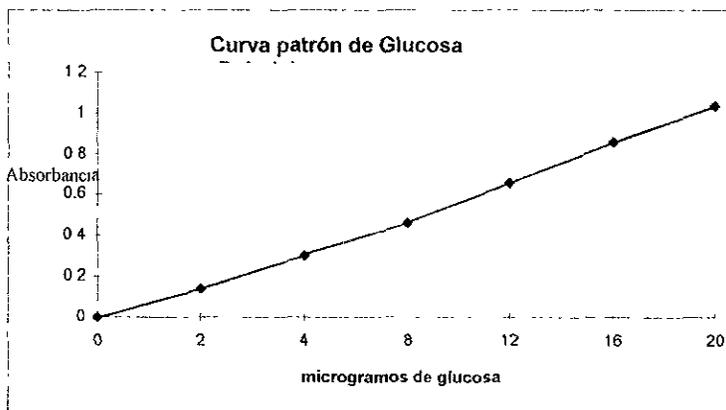
5.3 CURVAS PATRON

5.3.1 Cuantificación de Carbohidratos Totales (Método de Dubois)

Tabla 5. Curva patrón de carbohidratos totales mediante el método de Dubois en la cual se muestran los microgramos de cada carbohidrato (glucosa, xilosa y manosa) y sus respectivas lecturas de absorbancia. La longitud de onda utilizada para obtener las lecturas de absorbancia para glucosa y manosa fue de 490 nm, mientras que para xilosa fue de 480 nm. Se muestran los valores de r^2 , m , b y σ para cada curva patrón.

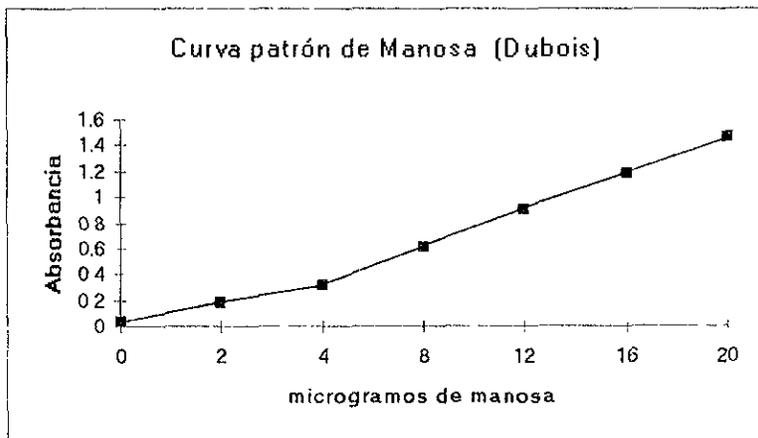
Microgramos	Glucosa $\lambda= 490 \text{ nm}$	Xilosa $\lambda= 480 \text{ nm}$	Manosa $\lambda= 490 \text{ nm}$
0	0	0	0
2	0.143	0.143	0.177
4	0.252	0.232	0.321
8	0.466	0.461	0.660
12	0.677	0.798	0.918
16	0.856	0.938	1.185
20	1.035	1.175	1.429
r^2	0.9956	0.9934	0.9960
m	0.0512	0.0591	0.0714
b	0.0356	0.0116	0.0369
σ	± 0.002	± 0.005	± 0.003

Figura 5. Curva patrón de glucosa realizada mediante el método de Dubois la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia a 490 nm contra los microgramos de glucosa mostrados en la Tabla 5.



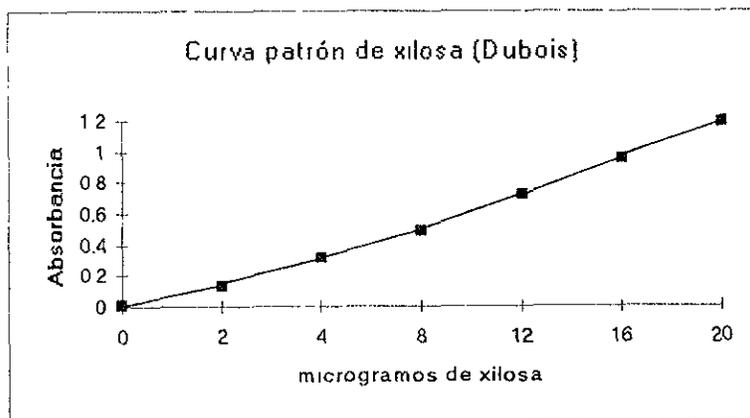
En la Tabla 1 puede apreciarse el modo de preparación para la realización de la curva patrón de glucosa. Los valores aquí mostrados son un promedio de cada una de las cinco repeticiones de esta curva patrón.

Figura 6. Curva patrón de manosa realizada mediante el método de Dubois la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia a 490 nm contra los microgramos de manosa mostrados en la Tabla 5.



En la Tabla 1 puede apreciarse el modo de preparación para la realización de la curva patrón de manosa. Los valores aquí mostrados son un promedio de cada una de las cinco repeticiones de esta curva patrón.

Figura 7. Curva patrón de xilosa realizada mediante el método de Dubois la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia a 480 nm contra los microgramos de xilosa mostrados en la Tabla 5.



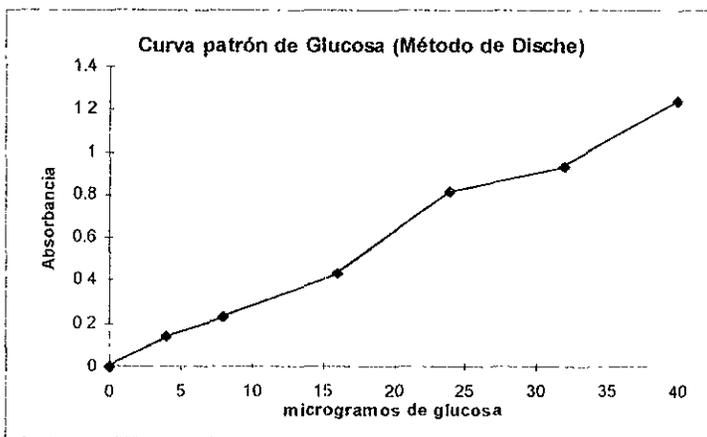
En la Tabla 1 puede apreciarse el modo de preparación para la realización de la curva patrón de xilosa. Los valores aquí mostrados son un promedio de cada una de las cinco repeticiones de esta curva patrón.

5.3.2 Cuantificación de Hexosas (Método de Dische)

Tabla 6. Curva patrón de hexosas mediante el método de Dische en la cual se muestran los microgramos de cada carbohidrato (glucosa y manosa) y sus respectivas lecturas de absorbancia. La longitud de onda utilizada para obtener las lecturas de absorbancia fue de 300 nm. Se muestran además los valores de r^2 , m , b y σ para cada curva patrón.

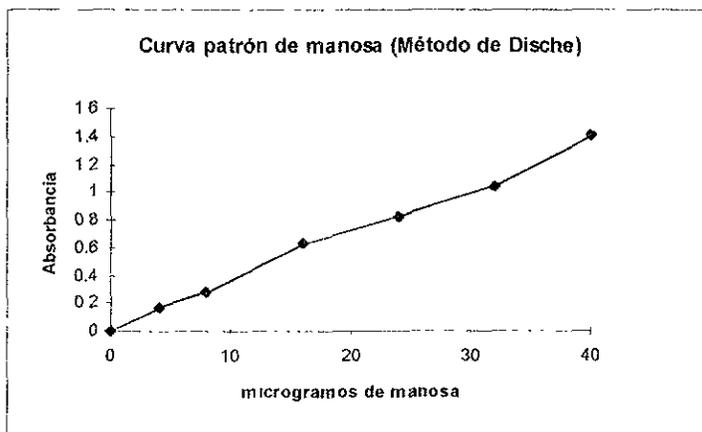
Microgramos	Glucosa $\lambda=300\text{ nm}$	Manosa $\lambda=300\text{ nm}$
0	0	0
4	0.14	0.167
8	0.226	0.278
16	0.432	0.633
24	0.814	0.824
32	0.933	1.033
40	1.238	1.404
r^2	0.9901	0.9923
m	0.030	0.033
b	-4.172×10^{-3}	0.022
σ	± 0.016	± 0.033

Figura 8. Curva patrón de glucosa realizada mediante el método de Dische la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia a 300 nm contra los microgramos de glucosa mostrados en la Tabla 6.



En la Tabla 2 puede apreciarse el modo de preparación para la realización de la curva patrón de glucosa. Los valores aquí mostrados son un promedio de cada una de las cinco repeticiones de esta curva patrón.

Figura 9. Curva patrón de manosa realizada mediante el método de Dische la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia a 300 nm contra los microgramos de manosa mostrados en la Tabla 6.



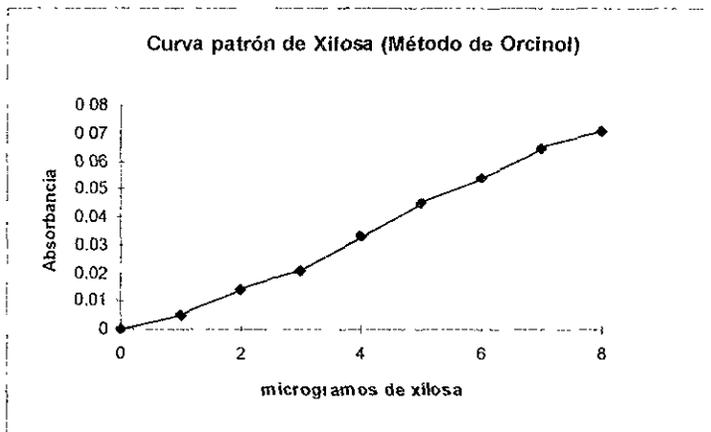
En la Tabla 2 puede apreciarse el modo de preparación para la realización de la curva patrón de manosa. Los valores aquí mostrados son un promedio de cada una de las cinco repeticiones de esta curva patrón

5.3.3 Cuantificación de pentosas (Método de Orcinol)

Tabla 7. Curva patrón de xilosa mediante el método de Orcinol en la cual se muestran los microgramos de xilosa y sus respectivas lecturas de absorbancia. La longitud de onda utilizada para obtener las lecturas de absorbancia fue de 662 nm. Se muestran además los valores de r^2 , m, b y σ para cada curva patrón.

Microgramos	Xilosa $\lambda = 662 \text{ nm}$
0	0
1	0.005
2	0.014
3	0.021
4	0.033
5	0.045
6	0.054
7	0.065
8	0.071
r^2	0.992
m	9.466×10^{-3}
b	-3.644×10^{-3}
σ	± 0.024

Figura 10. Curva patrón de xilosa realizada mediante el método de Orcinol la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia a 662 nm contra los microgramos de xilosa mostrados en la Tabla 7.



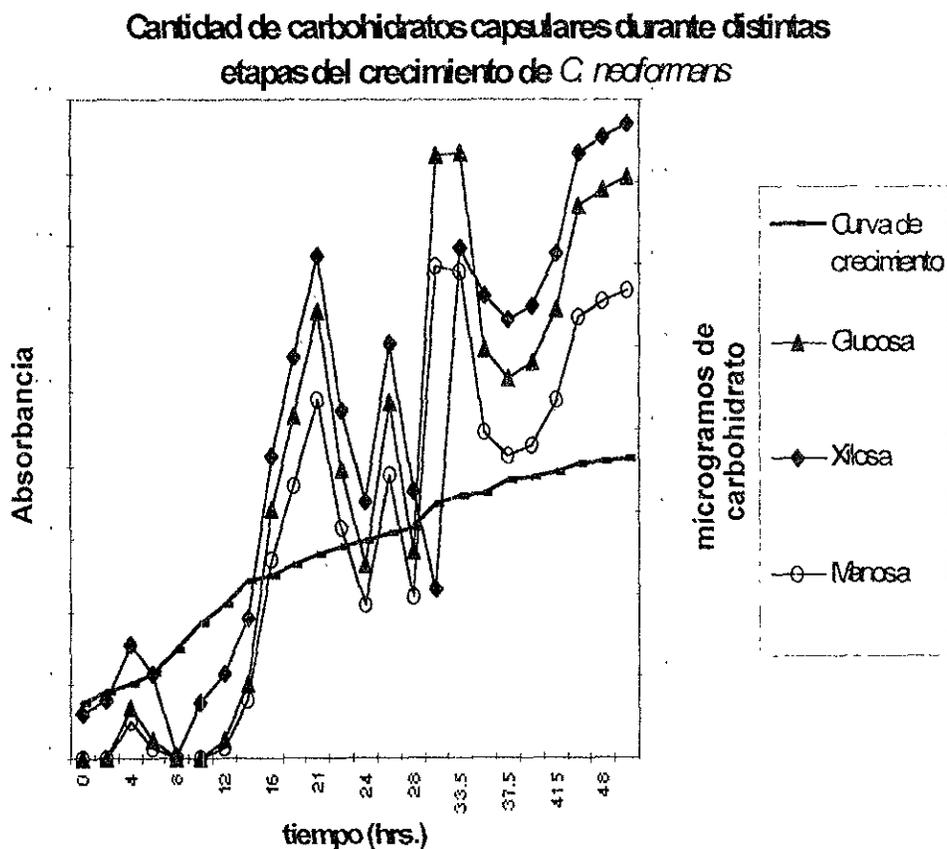
En la Tabla 3 puede apreciarse el modo de preparación para la realización de la curva patrón de xilosa. Los valores aquí mostrados son un promedio de cada una de las cinco repeticiones de esta curva patrón.

5.3.4 Cantidad de carbohidratos capsulares durante las distintas etapas de crecimiento de *Cryptococcus neoformans* serotipo A.

Tabla 8. Cantidad (μg) de los carbohidratos capsulares de *C. neoformans* serotipo A (glucosa, xilosa y manosa) durante diferentes etapas de cultivo en medio GGA. Los microgramos de cada uno de los carbohidratos capsulares fueron obtenidos interpolando los valores de absorbancia en las curvas patrón realizadas mediante el método de Dubois las cuales corresponden a las mostradas en las Figuras 5, 6 y 7.

MICROGRAMOS DE CARBOHIDRATOS CAPSULARES DURANTE EL CULTIVO DE <i>Cryptococcus neoformans</i> SEROTIPO A EN MEDIO GGA DETERMINADOS POR EL METODO DE DUBOIS			
horas de cultivo	Glucosa (μg)	Xilosa (μg)	Manosa (μg)
0	0	0.277	0
2	0	0.361	0
4	0.338	0.7	0.224
6	0.123	0.514	0.07
8	0	0.023	0
10	0	0.344	0
12	0.123	0.514	0.07
14	0.513	0.052	0.35
16	1.703	1.044	1.204
18	2.346	2.442	1.665
21	3.05	3.05	2.17
23	1.976	2.12	1.4
24	1.332	1.56	0.930
26	2.424	2.51	1.721
28	1.41	1.63	0.99
31.5	4.120	1.04	2.99
33.5	4.14	3.1	2.95
35	2.0	2.8	1.90
37.5	2.5	2.662	1.84
39	2.7	2.74	1.91
41.5	3.060	3.060	2.10
45	3.77	3.67	2.60
48	3.007	3.770	2.77
51	3.98	3.062	2.64

Figura 11. Gráfica que muestra la relación entre la curva de crecimiento de *C. neoformans* serotipo A y la cantidad de cada uno de los carbohidratos capsulares (glucosa, xilosa y manosa) durante distintas etapas del cultivo del microorganismo en medio GGA. La cantidad (μg) de carbohidratos capsulares mostrada en esta figura fue obtenida graficando los microgramos de dichos carbohidratos contra el tiempo (hrs.) mostrado en la Tabla 8. La curva de crecimiento es la que se muestra en la Figura 4.



*La técnica definitiva que se utilizó para cuantificar los carbohidratos capsulares de *C. neoformans* serotipo A fue mediante el método de Dubois

6.0 DISCUSION

El polisacárido obtenido a partir de *C. neoformans* fue evaluado mediante tres métodos de cuantificación de carbohidratos, el método de Dubois, el método de Dische y el método de Orcinol, siendo el método de Dubois el que presentó mayor homogeneidad de los resultados al realizar varias cuantificaciones; además de ser la técnica más sencilla y económica en cuanto a su realización, comparada con los otros dos métodos de cuantificación de carbohidratos.

Se optó por probar los tres métodos ya que inicialmente sólo se contaba con dos de ellos (método de Dubois y método de Dische) para poder cuantificar el polisacárido capsular; sin embargo, el método de Dische no resultó ser reproducible para cuantificar xilosa, ya que este es un método que se utiliza primordialmente para la cuantificación de hexosas y las pentosas muchas veces no arrojan resultados fácilmente reproducibles (8), por lo que se decidió probar con un método únicamente para la cuantificación de pentosas (método de orcinol), y aunque el método es específico no ofreció la reproducibilidad esperada. Es por este motivo que el método de orcinol no se utilizó como método definitivo para la cuantificación de xilosa.

Es importante citar que existen varias técnicas descritas para el aislamiento del polisacárido capsular de *C. neoformans*, entre ellas se encuentran técnicas de extracción con detergentes como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), extracción con fenol al 45% en la cual se realiza una diálisis durante que involucra tiempos de hasta 60 hrs. y después de esa primera extracción involucra otras diálisis de tres días en agua desionizada lo cual implica un gasto de tiempo muy grande. Existe otro método que involucra extracción con cloroformo-metanol (2:1) en la cual se utiliza un proceso de sonicación y debido a falta de infraestructura es por lo que no se pudo emplear esta técnica. Por todo lo anteriormente mencionado se prefirió utilizar la técnica de extracción con etanol frío la cual es una técnica relativamente económica, de fácil realización y que permite obtener buenos rendimientos de material capsular, suficientes para poder cuantificar los carbohidratos capsulares por los tres distintos métodos que se probaron.

Para cultivar la cepa de *C. neoformans* serotipo A empleada para llevar a cabo la cinética de crecimiento se utilizó el medio GGA (Glutamina-Glicina-Asparagina) (5) el cual dio buenos rendimientos en cuanto a la cantidad de levaduras que se desarrollaron, aunque cuando éstas se observaban al microscopio después de cierto tiempo de incubación en este medio de cultivo (por ejemplo después de 24 hrs.) no se veía un aumento significativo del tamaño capsular (ver Figura 3). Los factores que pueden influir en el grado de encapsulación no son claramente entendidos aunque hay evidencia de que el control puede estar influido por alguno de los factores medioambientales o por condiciones nutricionales (12) El medio GGA resultó ser relativamente sencillo de preparar, aunque debe de tenerse mucho cuidado de guardar la esterilidad durante su preparación ya que es un medio que se contamina muy fácilmente por lo que se recomienda suplirlo con algún antibiótico. Para la preparación del medio se realizó una modificación de la metodología original y ésta consistió en suplir la glucosa no al 1%, sino al 2% con lo cual se obtuvieron mejores resultados en cuanto a la velocidad de crecimiento y cantidad de polisacárido capsular obtenido. Aunque se ha reportado que las altas concentraciones de azúcar (por ejemplo 16 %) suprimen la encapsulación mientras que las bajas concentraciones (por ejemplo 1 %) proveen la máxima encapsulación. La tiamina adicionada

al medio de cultivo puede estimular algunos aislamientos no mucoides para que se vuelvan mucoides (12).

Con lo que respecta a la cantidad de componentes capsulares de *C. neoformans* serotipo A obtenidos durante distintas etapas de cultivo (ver Figura 10), se observa claramente que existen fluctuaciones en la cantidad de los tres carbohidratos capsulares que se cuantificaron (Glucosa, Xilosa y Manosa) durante el tiempo que duró el cultivo del microorganismo (51 hrs.), observándose que en aquellas etapas donde el crecimiento es más veloz (aproximadamente entre las 12 y 21 hrs. y entre las 28 y 33.5 hrs.) es donde se da el incremento más pronunciado en cuanto a la producción de dichos carbohidratos.

En la Tabla 8 se puede observar que a las 0, 2, 8 y 10 hrs de cultivo existen valores de 0 para los carbohidratos glucosa y manosa, esto es debido a que en estas etapas de cultivo la cantidad aislada de dichos carbohidratos fue tan poca que no se pudieron cuantificar.

El tiempo que duró la cinética (51 horas) se determinó en base a ensayos previos realizados durante este trabajo en los cuales se observó que después de aproximadamente 45 horas la absorbancia variaba muy poco; además, tomando en cuenta la cantidad de mililitros que se tomaban para cada muestra (25 ml) en aproximadamente 51 horas se agotaba el volumen máximo que podía contener el fermentador.

Debe señalarse que sólo se cuantificaron los polisacáridos capsulares que se pudieron aislar a partir del sobrenadante mediante la utilización del método de etanol frío el cual emplea ultracentrifugación lo que provoca un desprendimiento de la cápsula del cuerpo de la levadura y dicho polisacárido se solubiliza en la fase del sobrenadante, pero no se puede descartar la posibilidad de que cierta cantidad del polisacárido capsular pudo haber quedado retenido en la biomasa (pellet), por lo que es importante utilizar técnicas alternativas que permitan cuantificar la cantidad de polisacárido capsular que pudiera quedar retenido en la biomasa, para obtener un estudio más completo de la cinética de desarrollo del polisacárido capsular de *C. neoformans in vitro*.

7.0 CONCLUSIONES

* La metodología empleada para el aislamiento del polisacárido capsular de *C. neoformans* serotipo A utilizando el método de etanol frío resultó ser de fácil realización y de costo relativamente bajo, además de que es una técnica que permite obtener buenos rendimientos del polisacárido, por lo que puede emplearse para posteriores estudios en donde se requiera el aislamiento de otros tipos de material capsular

* La cuantificación de los polisacáridos capsulares mediante el método de Dubois puede ser usada para realizar estimaciones confiables de azúcares en solución. Las coloraciones producidas son usualmente estables y poseen un pico de absorción definido. La cantidad de color producido a una concentración de fenol constante es proporcional a la cantidad de azúcar presente. Las curvas patrón obtenidas, graficando la concentración de azúcar vs. absorbancia pueden ser fácilmente reproducibles. Además, los reactivos son baratos, estables, y disponibles. Es por estas características que esta técnica se utilizó como la técnica definitiva para la cuantificación del polisacárido capsular de *C. neoformans* serotipo A.

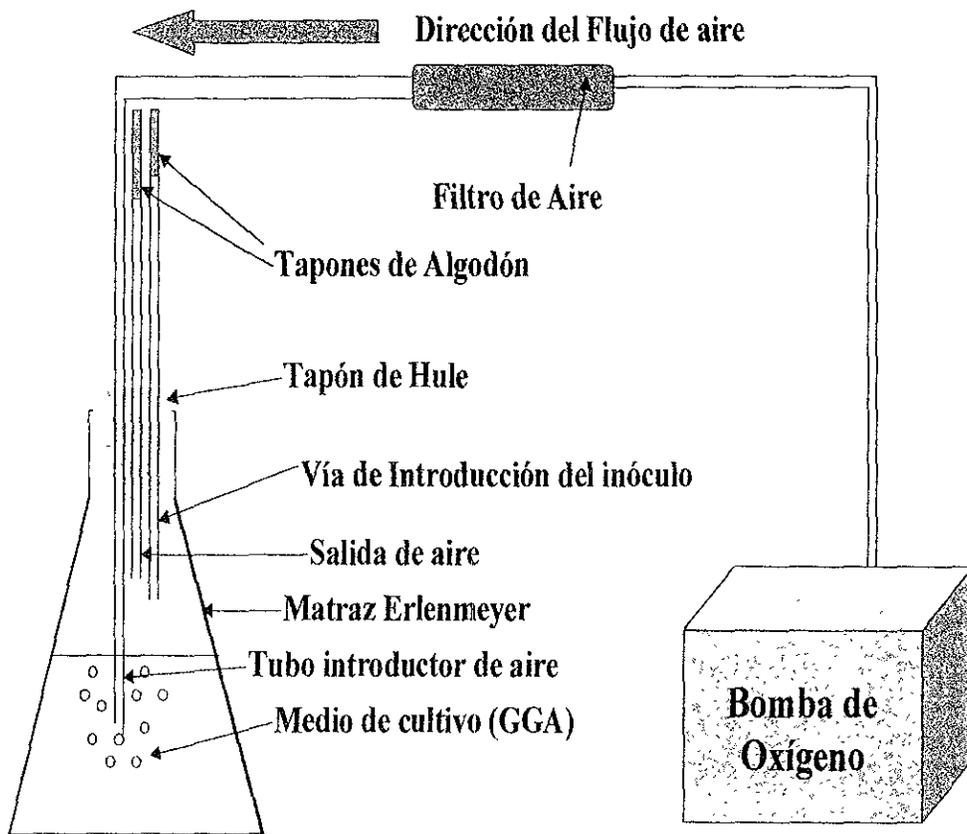
* El medio GGA resultó ser adecuado para obtener buenos rendimientos en cuanto al volumen de biomasa y de aportar los requerimientos necesarios para la producción de una buena cantidad de material capsular.

* Durante el cultivo *in vitro* de *C. neoformans* serotipo A existen variaciones en cuanto a la cantidad de los carbohidratos capsulares producidos (glucosa, xilosa y manosa); así como un aumento drástico de los mismos en etapas de desarrollo donde las levaduras se multiplican más rápidamente.

8.0 ANEXO

8.1 Montaje Experimental

Figura 12. Diseño del Fermentador utilizado para llevar a cabo la cinética de producción del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* serotipo A.



NOTA El tubo de introductor de aire, la salida de aire y la vía de introducción del inoculo son tubos de vidrio, se utilizó una manguera de látex directamente conectada a la bomba de oxígeno

8.2 IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* SEROTIPO A Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

La cepa de *C. neoformans* serotipo A que se utilizó para la realización de la cinética de producción del polisacárido capsular es una muestra proveniente de un aislamiento a partir de un caso clínico, la cual fue donada por el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria en Ciudad Universitaria-UNAM.

8.2.1 Tinción negativa (30).

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

En un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado se coloca una gota de tinta china color azul, con una asa bacteriológica previamente esterilizada a fuego directo, se toma una pequeña muestra de la colonia aislada que se desea observar, inmediatamente después se coloca un cubreobjetos sobre la muestra y se observa al microscopio.

INTERPRETACION: Al microscopio las células de *C. neoformans* se observan de forma esférica y con cápsula alrededor (ver Figura 3), algunas pueden presentar gemación, o bien estar en forma agrupada; se revela la presencia de la cápsula por un halo refringente el cual se tiñe negativamente

8.2.2 Preparación del medio de Niger (30).

FUNDAMENTO: El crecimiento diferencial de *C. neoformans* en el medio de Niger se ha usado como una prueba para su identificación, ya que es la única levadura de su género capaz de asimilar la purina creatina que se encuentra en estas semillas (Niger), produciendo un pigmento café oscuro.

Para la preparación de este medio se utilizan los siguientes reactivos.

Semillas de <i>Guzotia abyssinica</i> (Niger)50 gr
Agar bacteriológico15gr
Cloranfenicol	50 mg
Agua destilada.....	1000ml

INTERPRETACION: Se desarrollan colonias convexas, lisas, de bordes regulares, de color café oscuro, con apariencia vidriosa y húmeda debido a la gran cantidad de material capsular presente.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8.2.3 Preparación del medio CGB (30, 22).

FUNDAMENTO: Este medio cuenta con glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, y canavanina (un análogo de la arginina) como un inhibidor selectivo. Se adiciona azul de bromotimol al medio como indicador de pH.

Este medio permite la diferenciación de las variedades *neoformans* y *gattii*, ya que las cepas que corresponden a la variedad *gattii* no son inhibidas por la canavanina a diferencia de las cepas de la variedad *neoformans* que sí lo son. Los resultados dependen de la pureza del cultivo, el tamaño de inóculo y la correcta inoculación del medio (29).

La preparación del medio CGB es la siguiente:

SOLUCION A.

Glicina... ..10 gr
K₂PO₄... .. 1 gr
MgSO₄... .. 1 gr
Tiamina-HCl1 mg
Sulfato de Canavanina ...30 mg
Agua destilada..... 100 ml

Mezclar y disolver en el agua destilada, ajustar a pH = 5.6 con HCl y filtrar con membranas de 0.45µm.

SOLUCION B (indicador de pH):

Azul de Bromotimol. ...0.4 gr
NaOH 0.01 N 64 ml
Agua destilada36 ml

Disolver el azul de bromotimol en el NaOH posteriormente adicionar agua destilada.

Agua destilada .. .880 ml
SOLUCION B. ... 20 ml
Agar purificado . . . 20 gr

Esterilizar en autoclave a 121 °C o a 15 lb/15 min. Enfriar hasta aproximadamente 50 °C y adicionar 100 ml de solución A, mezclar y servir en cajas petri estériles.

INTERPRETACION: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* no crece y no produce cambio en la coloración del medio, permaneciendo amarillo. *C. neoformans* var *gattii* sí crece y produce cambio en la coloración del medio, de amarillo a azul.

8.2.4 Preparación del medio GGA (5).

Para cultivar *C. neoformans* serotipo A se utilizó el caldo GGA (caldo Glutamina-Glicina-Asparagina) , el cual se seleccionó por su excelente reproducibilidad, además de proveer a *C. neoformans* de un mayor tamaño de cápsula.

El medio constó de la siguiente formulación

Glutamina.....	1.0 gr
Glicina.....	1.0 gr.
Asparagina.....	1.0 gr.
Sulfato de Magnesio.....	0.2 gr
Cloruro de Calcio.....	.0.1 gr.
Fosfato ácido de sodio hidratado.....	1.0 gr
Sulfato Ferroso.....	.0.01 gr
Glucosa.....	.20 gr.
Tiamina.....	0.001 gr

Se disuelve en 100 ml de agua desionizada y se esteriliza por filtración (poro 0.22 μ m).

Una vez realizado, se mezcla con 900 ml de una solución con 6.0 gr de fosfato ácido de potasio previamente esterilizado a 15 lb/15 min. en autoclave. El medio se somete a prueba de esterilidad (incubar a 37 °C / 24 hrs)

*NOTA: Se recomienda suplir el medio de cultivo con algún antibiótico (Bencetacil), para disminuir el riesgo de contaminación

9.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.-Bava, A. J. ; Negroni, R. and Bianchi, M. (1993). Cryptococcosis Produced by a Ureasa Negative Strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**, 87-89.
- 2.- Bonifaz, A. (1990). *Micología Médica Básica*. Méndez Cervantes. México D.F., p.p. 305-317.
- 3.- Brown, A. H. (1946). *Archives of Biochemistry*. **11**, 269.
- 4.-Castañón, L. R. ; López, R.; Barriga, G. (1997). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in Mexico. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**, 57-59.
- 5.- Chaskes, S. and Tyndall, R. L. (1975). Pigment production by *C. neoformans* from para and ortho-diphenols: effect to the nitrogen source. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 509-514.
- 6.-Cherniak, R.; Reiss, E.; et. al. (1980) Structure and Antigenic Activity of Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* Serotype A. *Mol. Immunol.* **17**, 1025
- 7.- Cherniak, R.; Reiss, E. and Turner, S. H. (1982). A Galactoxylomannan Antigen of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity.* **60**(3), 1084-1088.
- 8.- Dische, Z.; Shettles, L.B. and Osnos, M. (1949). New Specific Color Reactions of Hexoses and Spectrophotometric Micromethods for their Determination. *Archives of Biochemistry.* **22**(1), 169-184.
- 9.- Dromer, F.; Salameo, J.; Contrepois, A.; Carbon, C., and Yeni, P. (1987). Production, Characterization, and Antibody Specificity of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive *C. neoformans* Capsular Polysaccharide. *Infection and Immunity.* **55**, 742-748.
- 10.- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28** (3), 350-356.
- 11.-Dufait, R.; Velho, R. and De Vroey, C. (1987) Rapid Identification of the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline Assimilation. *Mykosen.* **30**, 483.
- 12.-Dykstra, M.A.; Friedman, L.; Murphy, J. W. (1977) Capsule Size of *Cryptococcus neoformans*: Control and Relationship to Virulence. *Infect. Immun* **16**, 129-135.
- 13.- Ellis, D. H. (1994). *Clinical Micology the Human Opportunistic Mycoses*. Pfizer, 128-136.
- 14.-Gross N. T.; Nessa, K.; Cammer, P. ; et. al. (1997) Interaction Between *Cryptococcus neoformans* and Alveolar Macrophages *J. Med. Vet. Mycol.* **35**, 263-269.

- 15.-Jacobson, E. S., et. al. (1996). Discordante Regulation of Phenoloxidase and Capsular Polysaccharide in *Cryptococcus neoformans* J. Med. Vet. Mycol. **34**, 289-291.
- 16.-Jacobson, S. and Tingler, M. J. (1994) Strains of *Cryptococcus neoformans* with Defined Capsular Phenotypes. J. Med. Vet. Mycol **32**, 401-404.
- 17.- James, P. G. and Cherniak, R. (1992). Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. **60**, 1084-1088
- 18.- Keleti, G. and Lederer, W.H. (1974) Handbook of Micromethods for the Biological Sciences. Van Nostrand Reinhold. New York, p.p. 51, 72-73, 79-80.
- 19.- Kozel, T. R. and Hermerath, C. A. (1988) Benzoquinone Activation of *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide for Construction of Immunoaffinity Column. *Journal of Immunological Methods*. **107**,53-58.
- 20.-Kozel, T. R.; Wilson, M. A.; Murphy, J. W. (1991) Early Events in Initiation of Alternative Complement Pathway Activation by the Capsule of *Cryptococcus neoformans* . *Infect. Immun* **59** (9), 3101-3110.
- 21.-Kwon Chung, K. J. and Bennett J. E. (1992). Medical Mycology. Lea and Febinger, Malvern, Pa , p.p. 397-417
- 22.-Kwon Chung, K. J.; Potachek, I. and Bennett, J. E. (1982). Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol* **15**, 535-537
- 23.-Kwon Chung, K. J.; Wickes, B. L.; et. al. (1987) Ureasa Inhibition by EDTA in Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun* **55** (8), 1751-1754
- 24.- Kwon Chung K. J.; Wickes B. L.; Stockman L.; Roberts G. D.; Ellis D. and Howard D. H. (1992). Virulence, Serotype, and Molecular Characteristics of Environmental Strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infection and Immunity* **60**, 1869-1864.
- 25.-Laurenson, I. F.; Lalloo; D. G.; et. al. (1997) *Cryptococcus neoformans* in Papua New Guinea: a common pathogen but an elusive source. *J. Med. Vet. Mycol*. **35**, 437-440
- 26.-Mukamurangwa, P. ; et. al. (1995) *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can be separated from var. *neoformans* by its ability to assimilate D-Tryptophan. *J. Med. Vet. Mycol* **33**,419-420
- 27.-Murphy, J. W.; Mosley, R. L.; Cherniak, R. ; et. al. (1988) Serological, Electrophoretic, and Biological Properties of *Cryptococcus neoformans* Antigens *Infect. Immun*. **56**, 424-431.
- 28.-Murphy, J. W.; Pahlavan, N. (1979). Cryptococcal Culture Filtrate Antigen for Deteccion of Delayed-Type Hypersensitivity in Cryptococcosis. *Infect. Immun* **25** (1), 284-292

- 29.-Nishikawa, M. M.; et. al. (1996) Use of D-proline assimilation an CGB Medium for Screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* Isolates *J. Med. Vet. Mycol* **34**, 365-366.
- 30.- Nuñez, A.; Garrido, M. (1995) Estudio de la Estructura del Polisacárido Capsular de *Cryptococcus neoformans* serotipo C y D Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo de Méx UNAM
- 31.-Pitzurra, L., Vecchiarelli, A.; et. al. (1997). Identification of a 105 Kilodalton *Cryptococcus neoformans* Mannoprotein Involved in Human Cell-Mediated Immune Response *J. Med. Vet. Mycol.* **35**, 299-303.
- 32.-Prariyachatigul, C. ; et. al. (1996). Assessment of a PCR Technique for the Detection and Identification of *Cryptococcus neoformans* *J. Med. Vet. Mycol.* **34**, 251-258
- 33.-. Rose, A. (1986) The Yeast, vol. 1 , Acad Press London and New York, 143-186
- 34.- Sarvamangala, J.N. et. al. (1991). *C. neoformans* serotype A Glucuronoxylomannan Protein Conjugate Vaccines Synthesis, Characterization and Immunogenicity *Infect. Immun* **59**, 3700-3707.
- 35.- Small J. M.; Mitchell T. J. and Wheat R. W. (1986) Strain Variation in Composition an Molecular Size of the Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* Serotype A. *Infection and Immunity* **54**, 735-741
- 36.-Speed, B. R.; et. al. (1996). Serum Antybody Response to Active to Infection with *Cryptococcus neoformans* and its Varieties in Immunocompetent Subjects *J Med. Vet. Mycol* **34**, 187-193
- 37.-Turner S. H.; Cherniak R. and Reiss E. (1984) Fractionation and Characterization of Galactoxylomannan from *Cryptococcus neoformans*. *Carbohydrate Research* **125**, 343-349
- 38.-Turner S. H.; Cherniak R.; Reiss E.; Kwon Chung K. J. (1992). Structural Variability in the Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* serotype A Isolates Determined by C13 NMR Spectroscopy *Carbohydrate Research* **233**, 205-218
- 39.-Vartivarian, S.E.; Reyes G. II.; et. al. (1989). Localization of Manoprotein in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol* **171**, 6850-6852.
- 40.-Vecchiarelli, A.; Retini, C.; et. al. (1996) Purified Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* Induces Interleukin-10 Secretion by Human Monocytes *Infect. Immun.* **64** (7), 2846-2849
- 41.-Zwinder; R. L.; et. al. (1994) Biochemical Basis for the Killing of *Cryptococcus neoformans* by Rat Peritoneal Cells. *J. Med. Vet. Mycol* **32**, 405-414

El presente trabajo de Tesis de Licenciatura fue elaborado en el Laboratorio 10 de la Sección de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán -- Campo 1 de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del M en C Enrique Salas Téllez, la Q F B Esp. Carolina segundo Zaragoza y la M en C Alma L. Nuñez del Arco