



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO

"ESTUDIO DE VIRULENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE
Cryptococcus sp EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION."

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el título de

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a :

BLANCA INES TOBIAS GARCIA

A s e s o r a d a p o r :

M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

1993



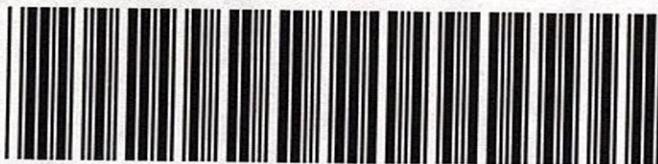
F

QR201

.T5

T6

C.1



1080076868



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO**

**"ESTUDIO DE VIRULENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE
Cryptococcus sp EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION."**

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a :

BLANCA INES TOBIAS GARCIA

Asesorada por:

M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S.I.P.

1993



T
9/12/201
T5
x6



SI QUIERES APRENDER ESTUDIA
SI QUIERES APRENDER MAS ENSEÑA

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido lograr
una de mis metas en esta vida.

A mis Padres y Hermanos:
J. Inés Tobías García
Juana María García De Tobías
Jorge Luis
Héctor Manuel
José Octavio

Por ser lo más importante de
mi vida.

A mis Amigas
Susana, Lupita y Marcela:

Por su apoyo y amistad en
todo momento.

A mi Asesor
M.C. Ismael Acosta Rodríguez

Por la ayuda brindada en la
elaboración de éste trabajo.

INDICE GENERAL

TITULO	PAGINA
Resumen	1
Antecedentes	2
- Criptococosis	4
- Melanina. Biosíntesis de melanina	5
Objetivo General	8
Material y métodos	9
Material biológico	9
Estudios de virulencia	10
- Determinación de virulencia	10
- Observación de levaduras encapsuladas	11
- Producción de ureasa	11
- Crecimiento en medio de Nigger	11
Medios de cultivo	11
Resultados	13
Discusión	22
Conclusiones	23
Bibliografía	24

INDICE DE TABLAS

TITULO	PAGINA
Tabla No. 1.- Propiedades del género <u>Cryptococcus</u>	3
Tabla No. 2.- Características de las diferentes cepas utilizadas.	14
Tabla No. 3.- Cepas utilizadas en el estudio de virulencia en los animales de experimentación.	17

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1.- Biosíntesis de melanina en 2 hongos diferentes.	6
Figura No. 2.- Prueba de la ureasa de las diferentes cepas de <u>Cryptococcus</u> .	15
Figura No. 3.- Pigmentación de diferentes cepas de <u>Cryptococcus sp</u> en medio de Nigger.	16
Figura No. 4.- Porcentaje de sobrevivencia en los ratones inoculados con las diferentes cepas analizadas.	18
Figura No. 5.- Número de colonias por cruces, formadas en el cerebro de los animales infectados.	19
Figura No. 6.- Número de colonias por cruces, formadas en el bazo de los animales infectados.	20
Figura No. 7.- Número de colonias por cruces, formadas en el hígado de los animales infectados.	21

R E S U M E N

La criptococosis es una micosis subaguda o crónica, causada por un hongo levaduriforme oportunista llamado Cryptococcus neoformans, y se caracteriza porque afecta principalmente al Sistema Nervioso Central; se encuentra principalmente en el guano de algunas aves (palomas, pichones, gallinas, etc.) También se han reportado otras especies no patógenas de este género, entre las que se encuentran C. albidus y C. laurentii, los cuales tienen características morfológicas similares a C. neoformans. Se ha sugerido que el factor responsable de la virulencia es la cápsula del hongo, pues se le han comprobado diversos efectos sobre la respuesta inmune del huésped, sobresaliendo la inhibición de la fagocitosis y el estímulo en la producción de linfocitos T supresores. Por otro lado, otros factores que se cree que están involucrados en la virulencia del hongo son: su crecimiento a 37°C y la presencia de una fenol oxidasa activa para la síntesis de melanina a partir de precursores apropiados, ya que se ha reportado que los hongos que producen mayor cantidad de melanina son más patógenos para los animales de experimentación.

En este trabajo se comparó el efecto de algunas cepas de Cryptococcus sp con diferente producción de melanina, sobre la virulencia en animales de experimentación, encontrando que las cepas con mayor producción de melanina presentaron mayor patogenicidad en los animales infectados, con una mortalidad del 100% entre 4 y 6 semanas de incubación. Las cepas con poca producción de melanina provocaron una mortalidad del 10% a las 6 semanas de infectados los ratones, mientras que el control no presentó mortalidad en el mismo período de incubación. Por otro lado, las cepas más pigmentadas, formaron mayor número de colonias en el cerebro, hígado y bazo de los ratones infectados que en los inoculados con la cepa no pigmentada en el mismo período de incubación. Finalmente, la cepa de C. albidus utilizada, presentó una gran producción de melanina y fué muy virulenta en los ratones infectados, lo cual difiere con algunos reportes de la literatura.

ANTECEDENTES

Cryptococcus neoformans (Vuillemin 1901), es el agente etiológico de la criptococosis e incluye 2 variedades Cryptococcus neoformans neoformans y Cryptococcus neoformans gattii. Sus diferencias radican en algunas variantes antigénicas, así como ciertas pruebas fisiológicas; se le ha encontrado en 2 estados perfectos o teleomórficos, que corresponden a basidiosporas y se denominan Fillobasidiella neoformans (Kwon-Chung, 1975) y Fillobasidiella bacillispora (Kwon-Chung, 1976). Microscópicamente, C. neoformans se presenta como un hongo levaduriforme capsulado, de 15 a 20 micras de diámetro con gemas a la mitad de su tamaño, el resto está formado por una capsula que llega a ser hasta 3 veces el tamaño de la levadura. No forma pseudomicelio ni clamidosporas, y en suero no genera tubo germinal, aunque hay algunos reportes de cepas de la variedad gattii que suelen formar pseudomicelio tanto in vivo como in vitro.

Este hongo se desarrolla normalmente en los medios de cultivo habituales como son : Sabouraud, extracto de levadura etc., etc., generando colonias mucoides, limitadas, convexas, brillantes de color blanco amarillento (raramente rosa). Cuando esta cepa se siembra en medio de semilla de alpiste negro (Guizotia abyssinica), genera pigmentos café-marrón, debido a que transforma el ácido cafeico contenido en la semilla, en un compuesto polimérico de estructura química similar a la melanina. (Polacheck y Kwon-Chung, 1988; Staib y cols., 1989; Rubio y cols., 1984).

Se han reportado otras especies no patógenas de este género, entre las que se encuentran: Cryptococcus albidus y Cryptococcus laurentii, cuyas características morfológicas son similares a las descritas para C. neoformans (Rippon, 1990), y la manera en que se diferencian entre sí, es que C. neoformans se desarrolla a 28 y 37 °C y es patógena para el ratón (aunque se ha reportado que C. albidus también puede causar meningitis) (Melo y Cols., 1980); ya que las características de presencia de cápsula, forma celular, aspecto de la colonia, producción de ureasa, asimilación de nitratos, fermentación y asimilación de azúcares, no sirven para diferenciar el género Cryptococcus de otras levaduras patógenas (Rippon, 1990). (Tabla No. 1).

Se ha sugerido que la responsable de la virulencia es la cápsula del hongo, pues se le han comprobado diversos efectos sobre la respuesta inmune humana, sobresaliendo la inhibición de la fagocitosis y el estímulo en la producción de linfocitos T supresores (Rippon, 1990). Por otro lado, Kwon-Chung y cols., (1986), han sugerido que existen al menos 3 factores involucrados con la virulencia de este hongo: 1.- Su crecimiento a 37 °C, 2.- La producción de una cápsula de polisacáridos y 3.- La presencia de una fenol oxidasa activa para la síntesis de melanina a partir de precursores apropiados, y que estos factores se encuentran localizados en diferentes alelos y son fácilmente mutables. También se ha reportado que mutaciones en cualquiera de los tres factores anteriores, reduce de manera significativa la virulencia del hongo, y si se afecta únicamente la síntesis de melanina se reduce la virulencia (Polacheck y Kwon-Chung, 1988; Kwon-Chung y Cols., 1982; Kwon-Chung y Rhodes, 1986; Polack, 1989).

Tabla No. 1.- PROPIEDADES DEL GENERO Cryptococcus.

Propiedades	<u>C. neoformans</u>	<u>C. albidus</u>	<u>C. laurentii</u>	<u>C. gastricus</u>
Producción de ureasa	+	+	+	+
Crecimiento a 37°C	+	--	+ (") --	--
Crecimiento a 40°C	+	--	--	--
Utilización de nitrato de potasio	--	+	--	--
Virulencia en el ratón	+	--	--	--
Producción de pigmento en medio de alpiste	+	--	--	--

(") Algunas cepas de esta especie crecen a esta temperatura y otras no.

TOMADO DE TRATADO DE MICOLOGIA MEDICA. JOHN W. RIPPON. 1990.

C R I P T O C O C O S I S

Micosis subaguda o crónica, causada por un hongo levaduriforme oportunista llamado Cryptococcus neoformans, y se caracteriza porque afecta inicialmente pulmones y posteriormente se disemina a vísceras, con un fuerte neurotropismo, por lo que produce infecciones letales en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Meningitis criptococócica). Su habitat más frecuente es el guano de algunas aves como palomas, pichones, gallinas, etc., en los cuales se han reportado frecuencias hasta de 69% (Rippon, 1990), y tal vez se debe a que el guano de las aves por lo general es alcalino, y tiene una gran cantidad de productos nitrogenados, los cuales mantienen viable al microorganismo varios meses. Por lo general es más frecuente en el sexo femenino, en una relación aproximada de 2:1, aunque en algunos grupos de alto riesgo como los pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, el predominio es masculino hasta en 4:1, también se presenta frecuentemente en pacientes diabéticos, desnutridos o con colagenopatías, leucemias, linfomas sarcomas y enfermedad de Hodgkin (Bell, 1981).

Se han descrito dos tipos de criptococosis: En el primer tipo, la infección se establece en el paciente normal, después de la inhalación del hongo, pero se elimina en forma rápida con muy pocos síntomas, y por lo general es asintomática; en pocos casos, se establece una infección crónica que puede afectar las meninges, piel u otros órganos.

En el segundo tipo, la enfermedad se presenta en neoplasias, padecimientos debilitantes y huéspedes inmunodeficientes, habitualmente como resultado del tratamiento con fármacos. En estos casos la defensa del huésped no es suficiente y la infección se disemina rápidamente a casi todo el organismo, particularmente al SNC. (Rippon, 1990).

Por otro lado, la clasificación clínica de la criptococosis es la siguiente: Pulmonar 25%, SNC 45%, Cutánea 10%, diseminada (visceral) 15% y ósea 5%.

MELANINA

La melanina es un pigmento café o negro de alto peso molecular, que se encuentra en el hombre, animales, plantas y microorganismos. Químicamente, se han descrito dos tipos de melanina: Las eumelaninas, que son compuestos negros o pardos, insolubles en agua y compuestos orgánicos, heterogéneos, heteropolímeros del 5, 6-dihidroxiindol y de varios de sus precursores biosintéticos. Por otro lado, las feomelaninas son polímeros amarillos o pardo rojizos, y aunque su peso molecular es también elevado, son solubles en álcali diluido, son derivados de la cisteína y la dopaquinona. (Polack, 1989). No es esencial para el crecimiento de los diferentes animales y plantas, y se le han atribuido algunas funciones, entre las que se encuentran: camuflaje en el bosque y en el medio ambiente marino, barrera de protección en pulpos y calamares contra el estrés ambiental, protección a algunos hongos (Aspergillus nidulans) contra las radiaciones gama, ultravioletas, rayos X, calor y frío. (Bell, 1986).

Por otro lado, se ha encontrado en plantas una asociación de la melanina con la respuesta inmune (también en invertebrados y melanomas malignos) (Bell, 1981), pues los vertebrados y algunas plantas son protegidos del ataque de diferentes parásitos y de las células inmunológicas (Pouriart, 1969), también se ha sugerido que participa de manera importante en la virulencia y patogenicidad de algunos hongos, entre los que se encuentran Cryptococcus neoformans y Wangiella dermatitidis. El primero de ellos produce melanina al ser incubado en el medio de Nigger (Staib y cols., 1989), y el segundo es un hongo Dematiáceo, (se ha sugerido que el pigmento de este hongo es melanina) Dixon y Cols., 1987) que causa Faehifomicosis cutánea, y también presenta fuerte neurotropismo (Produce Faehifomicosis en el SNC). El responsable del pigmento oscuro es dihidroxinaftaleno-melanina, y se ha sugerido que puede ser un factor de virulencia, en base a estudios de cepas silvestres y mutantes de W. dermatitidis en animales de laboratorio (Dixon y cols., 1987).

BIOSINTESIS DE MELANINA

La descripción de la biosíntesis de la melanina es complicada por lo prolongado, ramificado e incompleto de su vía biosintética, las estructuras químicas complejas de los heteropolímeros de la melanina y su insolubilidad, todo lo cual obstaculiza su determinación estructural. Las melaninas se sintetizan en los melanosomas, partículas unidas a membranas dentro de los melanocitos.

Hay varios tipos de melaninas que se sintetizan por vías específicas de especies, por ejemplo, en el hombre el precursor inicial es la tirosina y el producto final es dopa melanina (Polack, 1989). En hongos, la síntesis varía según la especie, en C. neoformans (Basidiomicete) hay una fenol oxidasa activa, pero no puede utilizar tirosina como sustrato y sintetiza la melanina a partir de Dopa. En algunos hongos imperfectos (incluyendo algunos patógenos de humanos y plantas) se sintetiza a partir de dihidroxi-naftaleno y metabolitos relacionados (Fig. No. 1) (Geis y cols., 1984; Polack, 1989). La última etapa de síntesis en las células fúngicas y humanas no es enzimática, sino que es una polimerización espontánea dando polímeros de alta complejidad y diversidad estructural, lo que puede ser una razón de que no se conozcan enzimas que hidrolicen melanina y que tampoco se haya identificado un anticuerpo que la reconozca (Polack, 1989).

Cryptococcus neoformans

HOMBRE

Wangiella dermatitidis

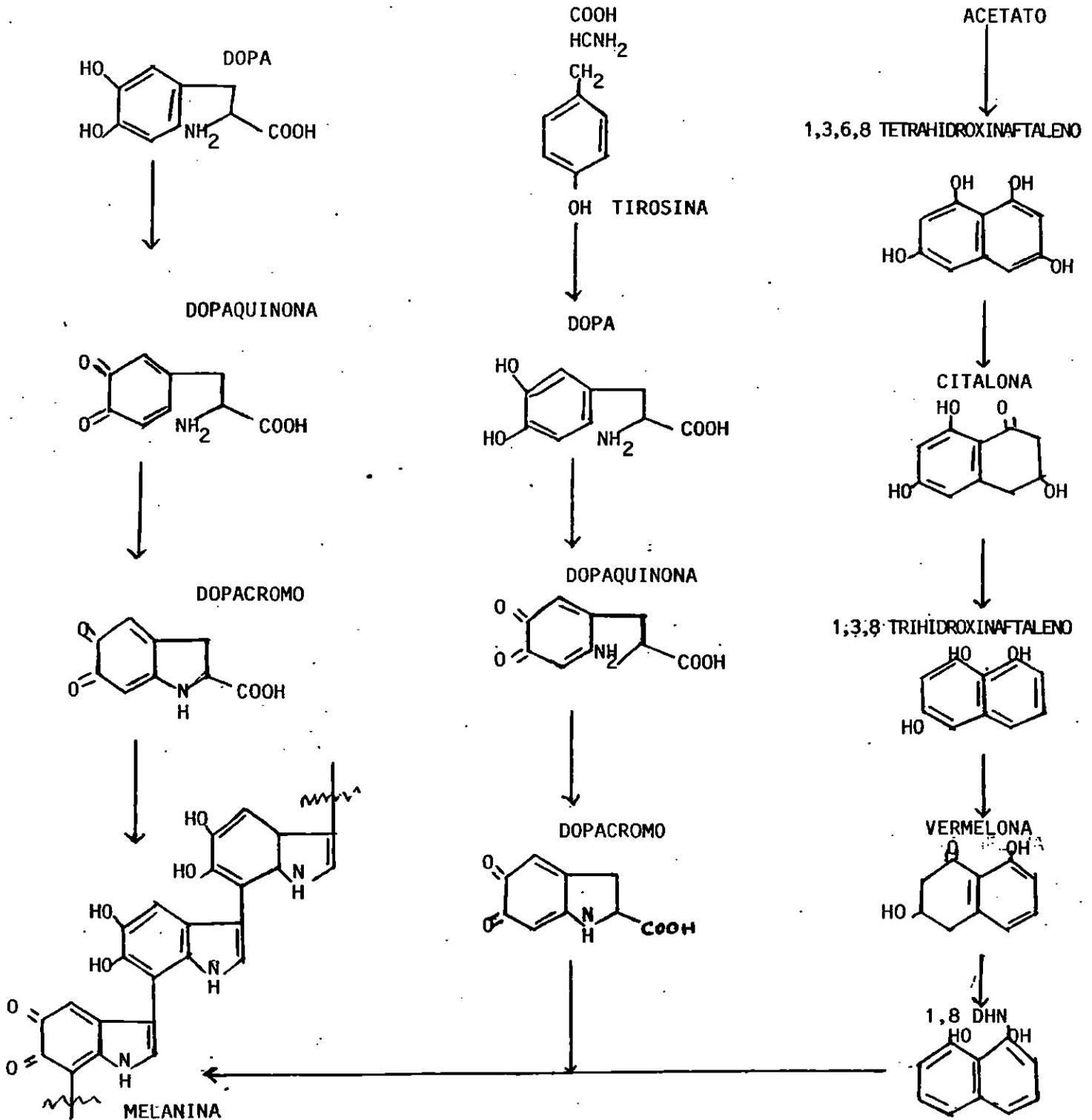


FIG. Nº 1 BIOSINTESIS DE MELANINA EN EL HOMBRE Y DOS HONGOS DIFERENTES. (Polack, 1989).

Por otra parte, Cryptococcus neoformans y Wangiella dermatitidis crecen perfectamente en el cerebro, el cual es rico en catecolaminas, que es uno de los sustratos de la fenol oxidasa del hongo y precursor de la melanina, aunque las células que crecen en el tejido cerebral nunca son cafés o negras, y solamente son débilmente coloreadas. Las colonias crecidas en medio con 1 microgramo/ml de dopamina o norepinefrina (concentración encontrada en tejido cerebral de rata) son claras o cafés. Una tercera observación es que a altas concentraciones de catecolaminas hay un aumento en la velocidad de crecimiento, así como en la producción de la cápsula de polisacáridos (esto no se ha demostrado in vitro) (Dixon y cols., 1987; Kwon-Chung y Rhodes, 1986; Polacheck y Kwon-Chung, 1988).

En conclusión, aparentemente la producción de melanina tiene un papel muy importante en la virulencia y patogenicidad del hongo y se localiza principalmente en el cerebro en donde se multiplica libremente y no se sabe porque tiende a invadir otros órganos, pues se ha reportado que forma un nicho en la prostata de pacientes con SIDA (se ha sugerido que sirve para una reinfección) (Polack, 1989).

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de algunas cepas de Cryptococcus sp, con diferente -- producción de melanina sobre la virulencia en animales de experimentación (ratones).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 11 diferentes cepas de Cryptococcus sp del cepario del laboratorio del Area Biológica del Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, las cuales fueron obtenidas de diferentes aislados clínicos, y se les realizaron las siguientes pruebas:

- 1.- Observación de levaduras encapsuladas.
- 2.- Crecimiento en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) para observar el aspecto mucoide de las colonias
- 3.- Producción de ureasa.
- 4.- Crecimiento en ASD a 37°C
- 5.- Crecimiento en medio de Nigger, con objeto de clasificar las cepas en base a su producción de melanina.

Después de realizar las pruebas anteriores, las cepas estudiadas se clasificaron en base a las características observadas (Tabla No. 1).

MATERIAL

1.- Cristalería.

Cajas de Petri de vidrio

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.

Tubos de ensaye de 8 y 10 ml.

Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml.

2.- VARIOS.

Gradilla metálica

Mechero Bunsen

Micropipetas de 100, 200 y 1 000 microlitros.

Espátula

Balanza Analítica

Estufa bacteriológica a 28 y 37°C

Asa bacteriológica

Jeringas desechables de 1 ml

Baño metabólico Yamato Shaking Bath, Model BT-25.

3.- REACTIVOS.

Solución salina estéril al 0.85%

Violeta de Genciana (Laboratorios Jaloma, S.A.)

Alcohol etílico industrial (Monterrey, S.A.)

ESTUDIOS DE VIRULENCIA

Estos estudios se llevaron a cabo bajo el siguiente protocolo:

I GRUPO CONTROL.- Ratonés inoculados con solución salina estéril.

II GRUPOS PROBLEMA.-

a.- C. neoformans con poca producción de melanina.

b.- C. neoformans con mucha producción de melanina.

c.- C. albidus con mucha producción de melanina.

NOTA: Todos los experimentos se realizaron por duplicado y 3 veces como mínimo, con una población promedio de 7 ratones por grupo por experimento.

DETERMINACION DE VIRULENCIA

Se utilizaron ratones hembras blancos, de 18-20 gramos (gr) de peso. Las cepas en estudio, crecieron en caldo de extracto de levadura-glucosa, durante 48 horas (hrs) a 25°C a 100 revoluciones por minuto (RPM) en un baño metabólico con agitación constante. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron 2 veces con solución salina estéril al 0.85%, y se contaron en un Hematocitómetro. Después se inocularon 1 000 000 células/ml en un volumen final de 0.25 ml de solución salina estéril al 0.85% por vía intravenosa (vena lateral de la cola), en los animales de experimentación. La viabilidad del inóculo se -- confirmó por sembrar en ASD y posterior incubación a 28°C.

Los ratones se sometieron a un seguimiento diario hasta su muerte, cuando se obtuvo asépticamente el cerebro, hígado y bazo, se observó la formación de acúmulos de levaduras, y se homogenizaron los cerebros asépticamente en solución salina y se sembraron diluciones apropiadas en ASD, incubándose a 28°C hasta la aparición de colonias, a las cuales se les realizaron las mismas pruebas descritas anteriormente, con objeto de comparar con las cepas control y los inóculos iniciales.

Para la determinación de acúmulos de levaduras, en los órganos de los ratones infectados, se realizaron 2 experimentos por separado, independientes de los estudios de virulencia, con un promedio de 6 ratones por grupo por experimento, graficando los resultados obtenidos.

OBSERVACION DE LEVADURAS ENCAPSULADAS

Para esto, se realizó un frotis, para el cual se tomó una asada de la colonia a analizar y se fijó al mechero y posteriormente se tiñó con tinta china y se observó al microscopio.

PRODUCCION DE UREASA

Se tomó una asada de cada una de las cepas a analizar y se sembraron en caldo urea a 37°C durante 4-6 días, observando la producción de ureasa por un cambio de color en el medio, el cual vira de anaranjado a rosa fuerte, lo que indica la producción de ureasa de las cepas estudiadas.

CRECIMIENTO A 37°C

Se inoculó una asada de cada cepa a analizar en ASD a 37°C durante 72 hrs. y se observó su crecimiento en base a un control incubado a 28°C.

CRECIMIENTO EN MEDIO DE NIGGER

Se inoculó una asada de cada una de las cepas en estudio en medio de Nigger (Ver página No.12) y se incubaron a 28°C durante 14-21 días, y se observó la producción de melanina de las diferentes cepas por la producción de un pigmento oscuro en las colonias en crecimiento.

NOTA: Todos los experimentos se realizaron por duplicado un mínimo de 2 veces cada uno.

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR SABOURAUD DEXTROSA (ASD)

Componente	Concentración (gr/lt)
Dextrosa	20
Peptona	10
Agar bacteriológico	20
Agua destilada c.b.p.	1 000 ml
pH final	6.5

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

USO: Medio rutinario para el aislamiento inicial y conservación de diferentes hongos.

CALDO UREA

Componente	Concentración (gr/lt)
Urea	20
Extracto de levadura	0.10
Fosfato monopotásico	9.10
Fosfato de sodio	9.50
Rojo de fenol	0.01
Agua destilada c.b.p.	1 000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 5-8 libras de presión durante 15 minutos

USO: Observar la producción de ureasa de diferentes microorganismos.

MEDIO DE NIGGER (MEDIO DE ALPISTE NEGRO AGAR)

Componente	Concentración (gr/lt)
Alpiste negro o Nigger pulverizado	70
Cloranfenicol	0.05
Agar bacteriológico	20
Agua destilada c.b.p.	1 000 ml

Remojar el alpiste negro en 1 lt de agua destilada, hervir durante 30 min. Posteriormente filtrar en gasa y papel filtro. Aforar a 1 lt con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 110°C durante 15 min.

USO: Medio de incubación y de producción de melanina de C. neoformans.

CALDO DE EXTRACTO DE LEVADURA Y GLUCOSA

Componente	Concentración (gr/lt)
Extracto de levadura	15
Glucosa	20
Agua destilada c.b.p.	1 000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

USO: Crecimiento de C. neoformans, para la obtención del inóculo de levadura.

RESULTADOS

En este estudio se utilizaron 11 cepas de Cryptococcus sp., de las cuales 8 fueron C. neoformans, 2 C. albidus Y 1 C. laurentii (Tabla No. 2), todas presentaron levaduras encapsuladas al ser teñidas con tinta china y aspecto mucoso al sembrarlas en ASD (Tabla No. 2).

Todas las cepas de C. neoformans crecieron bien a 37°C en ASD, mientras que las cepas de C. albidus y C. laurentii tuvieron menor crecimiento (Tabla No. 2). Al ser crecidas en medio de urea todas presentaron producción de ureasa en diferente proporción (Tabla No. 2, Fig. No. 2). Con respecto a la producción de melanina en medio de Nigger, todas presentaron síntesis de melanina en mayor o menor intensidad (Tabla No. 2, Fig. No. 3).

Una vez caracterizadas en base a su producción de melanina se tomaron 4 cepas para realizar los estudios de virulencia en ratones (Tabla No. 3), los cuales se inocularon en la vena lateral de la cola (Ver material y métodos), observándose cada tercer día para medir el índice de mortalidad en los ratones infectados. Las cepas con más producción de melanina presentaron mayor patogenicidad en los ratones infectados, con una mortalidad del 100% entre 4 y 6 semanas (Fig. No. 4), mientras que la cepa con poca producción de melanina presenta una mortalidad del 10% a las 6 semanas de infectados los ratones (Fig. No. 4), mientras que el control no presenta mortalidad en el mismo período de incubación (Fig. No. 4). Por otro lado, las cepas más pigmentadas, formaron mayor número de colonias en el cerebro, hígado y bazo de los ratones infectados que los inoculados con la cepa no pigmentada, los cuales, después de 8 semanas, se sacrificaron, y no se encontraron colonias del hongo en ninguno de los 3 órganos analizados (Figuras No. 5, 6 y 7). Se comprobó la viabilidad de las colonias por siembra en ASD e incubadas a 28°C, así como por el análisis de sus principales características (ver material y métodos). con resultados similares a los reportados en la Tabla No. 2.

TABLA Nº 2 CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES CEPAS UTILIZADAS.

Nº	C E P A	LEVADURAS ENCAPSULADAS	ASPECTO MUCOIDE	U R E A S A	CRECIMIENTO A 37°C	PRODUCCION DE MELANINA
1	C. neoformans	+	+	+	+	++
2	"	+	+	+++	+	+++
3	"	+	+	+++	+	++++
4	"	+	+	+++	+	+
5	"	+	+	+	+	++++
6	"	+	+	+++	+	++++
7	"	+	+	+++	+	++++
8	"	+	+	+++	+	+++
9	C. albidus	+	+	+++	-	+
10	"	+	+	+	-	+++
11	C. laurentii	+	+	+++	-	+



Figura No. 2.- Prueba de la ureasa de las diferentes cepas de Cryptococcus sp

- 1.- Control negativo.
- 2.- Control positivo.
- 3 y 4.- Problemas positivos.
- 5.- Problema negativo.



Figura No. 3.- Pigmentación de diferentes cepas de Cryptococcus sp en medio de Nigler.

1.- Control negativo (Candida albicans)

2 y 3.- Cepas problema de Cryptococcus neoformans.

Tabla No. 3.- CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE VIRULENCIA EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

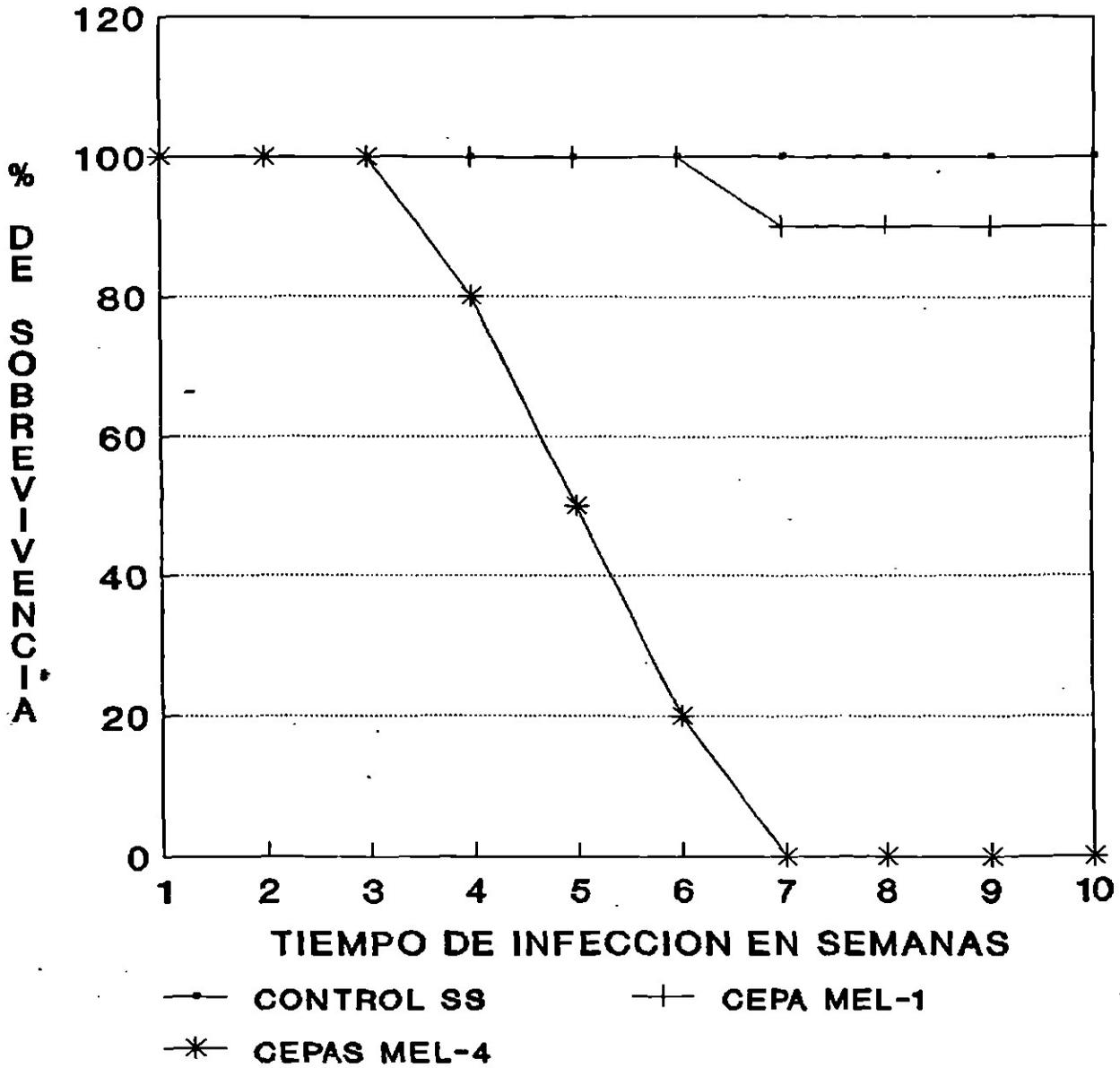
Número	cepa	Producción de melanina
1.-	Solución salina estéril	----
2.- Cepa No. 1 de la tabla No. 2 MEL-1	<u>C. neoformans</u>	++
3.- Cepa No. 5 de la tabla No. 2 MEL-4(")	<u>C. neoformans</u>	++++
4.- Cepa No. 7 de la tabla No. 2 MEL-4(")	<u>C. neoformans</u>	++++
5.- Cepa No. 10 de la tabla No. 2 MEL-4(")	<u>C. albidus</u>	+++

(") Cepas con mayor producción de melanina.

**% DE SOBREVIVENCIA EN LOS RATONES
INOCULADOS CON LAS DIFERENTES CEPAS**

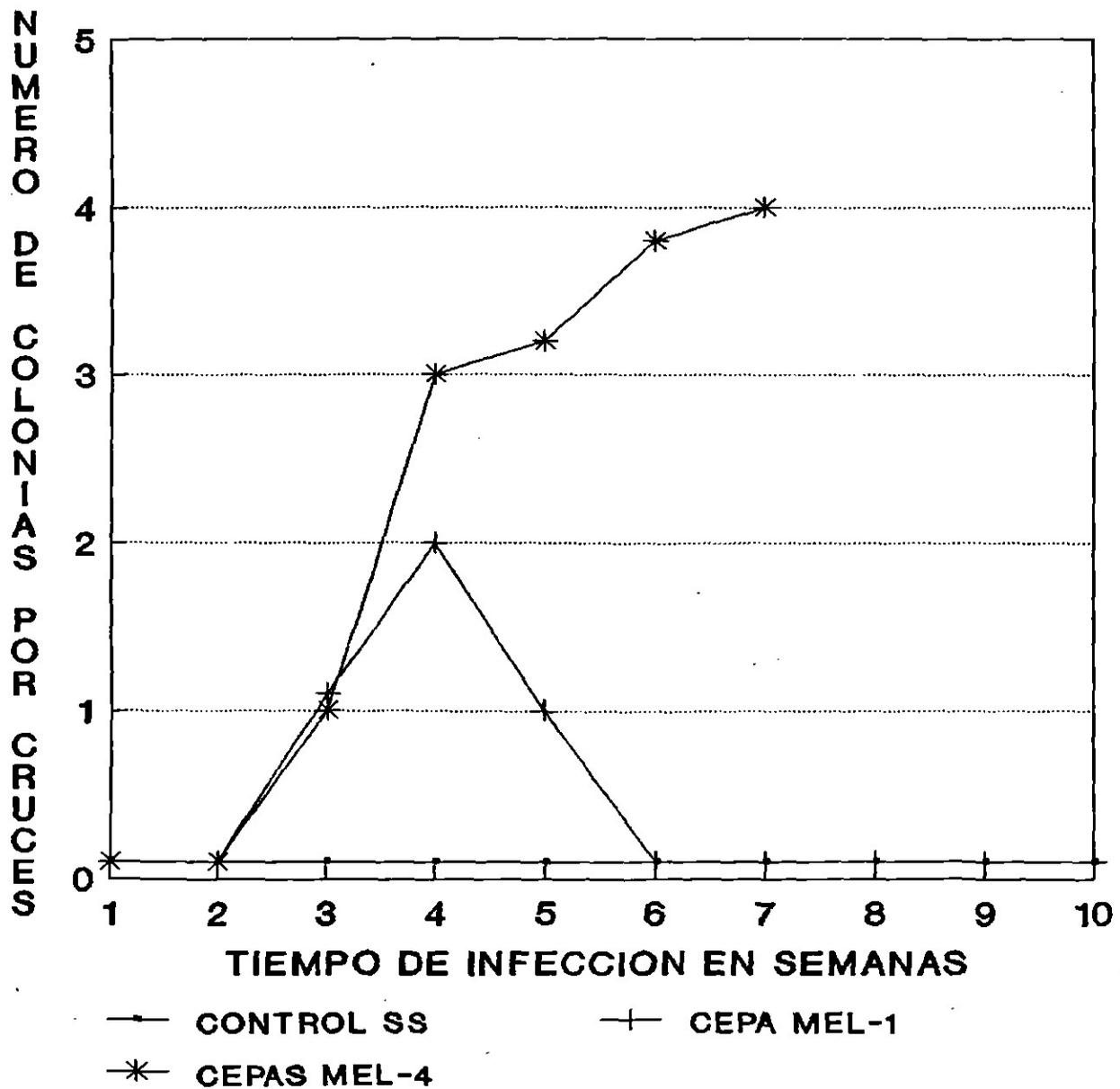
FIGURA No. 4

ANALIZADAS



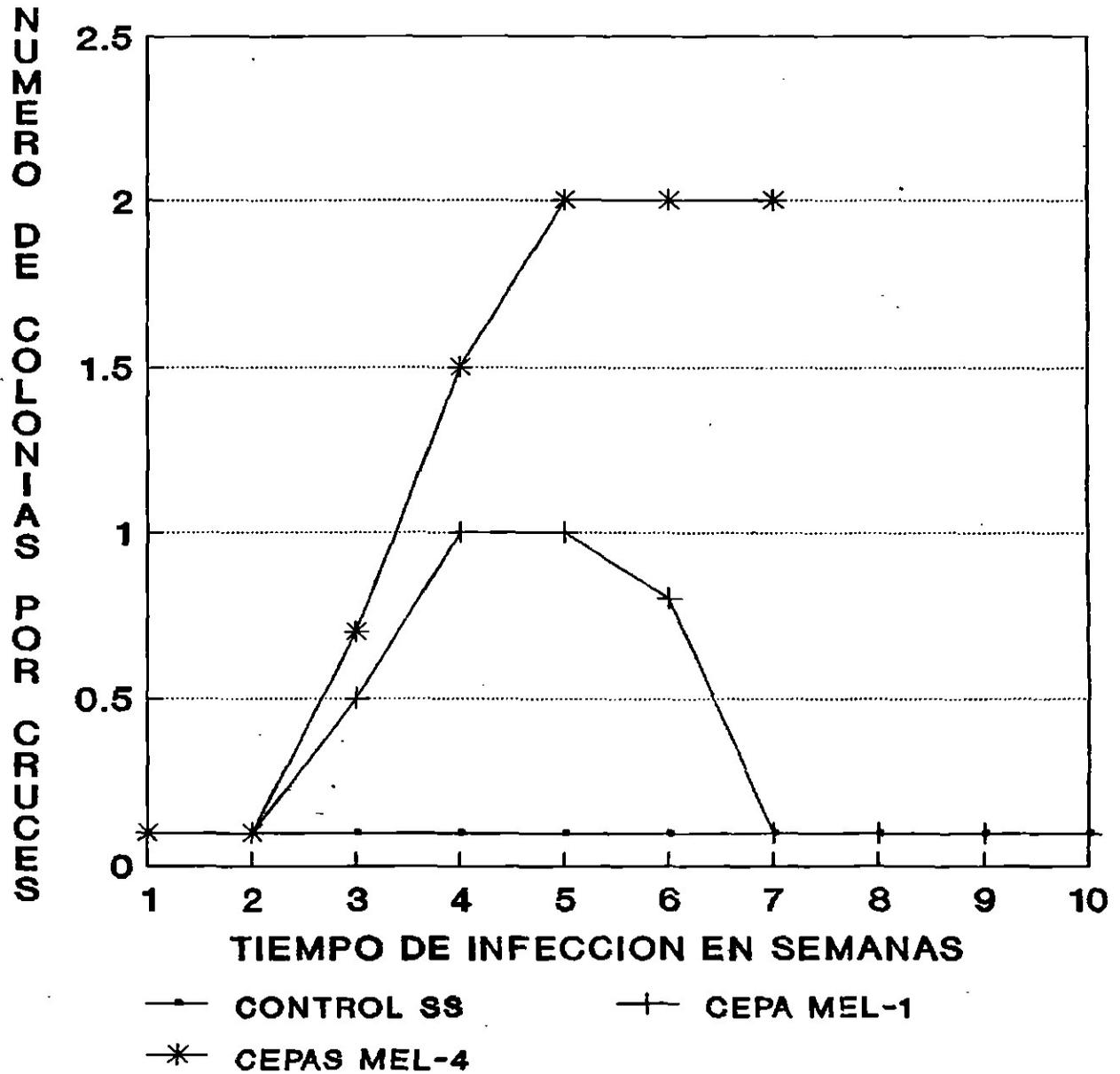
NUMERO DE COLONIAS POR CRUCES FORMADAS EN EL CEREBRO DE LOS ANIMALES INFECTADOS

FIGURA No. 5



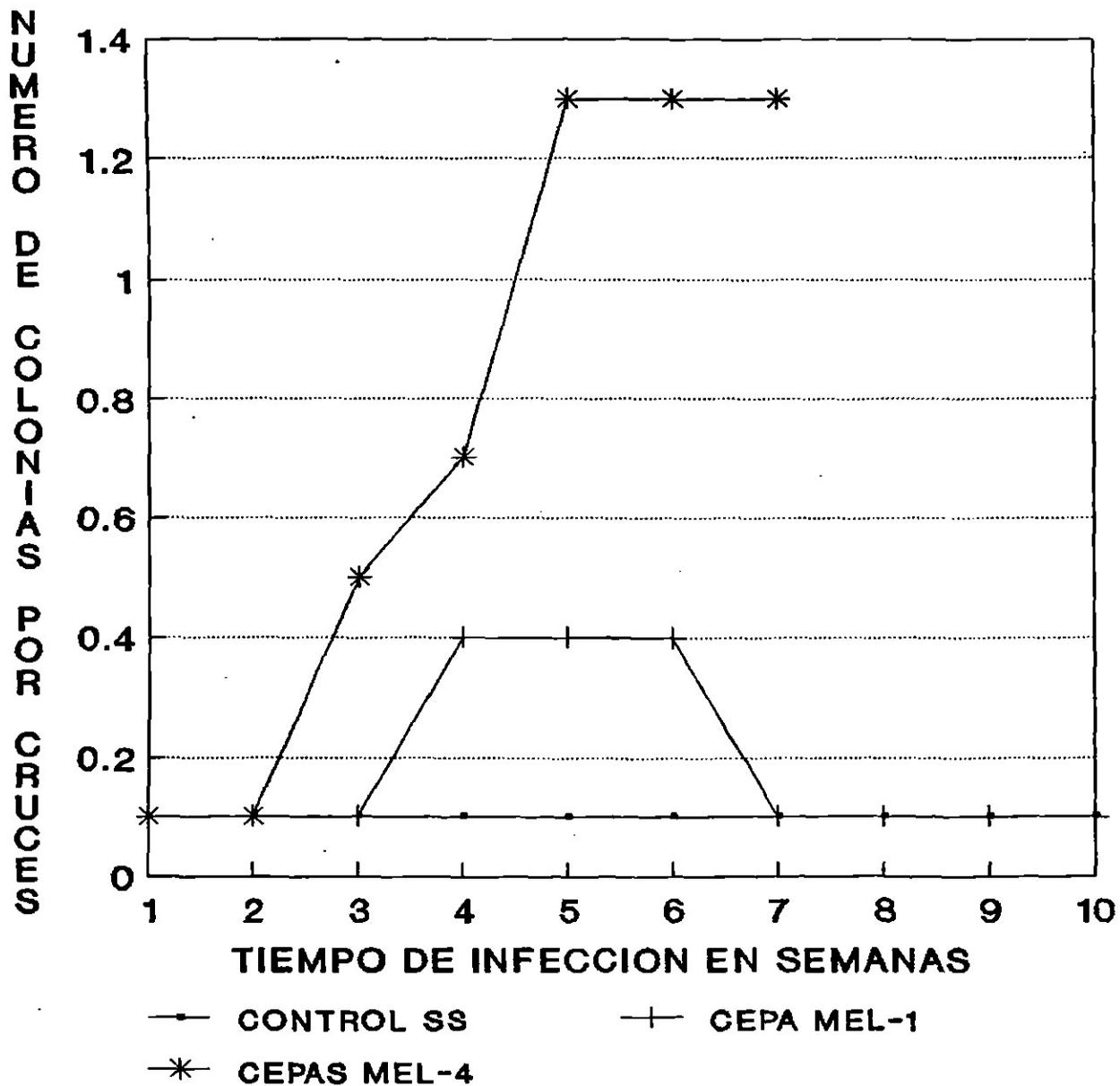
NUMERO DE COLONIAS POR CRUCES FORMADAS
EN EL BAZO DE LOS ANIMALES INFECTADOS

FIGURA No. 6



NUMERO DE COLONIAS POR CRUCES FORMADAS EN EL HIGADO DE LOS ANIMALES INFECTADOS

FIGURA No. 7



DISCUSION

Los hongos dematiáceos son un grupo heterogéneo de organismos pigmentados que incluyen saprofitos, patógenos de plantas y animales. La pigmentación oscura asociada con estos hongos, es producto de un derivado de la melanina en la pared celular, llamado dihidronaftaleno melanina (Bell y Wheeler, 1986; Dixon y cols., 1989) y se ha sugerido que puede participar en la virulencia de dichos hongos (Kwon-Chung y Cols., 1982; Polacheck y Kwon-Chung, 1988; Dixon y cols., 1989; Polack, 1989).

En este trabajo, para realizar estudios de virulencia en ratones, se caracterizaron 11 cepas de Cryptococcus sp en base a su producción de melanina, encontrando características de pigmentación variables de unas cepas con respecto a otras, lo cual coincide con algunos reportes de la literatura (Rippon, 1990; Polacheck y Kwon-Chung, 1988; Polack, 1989), aunque la producción de melanina encontrada en una de la cepas de C. albidus fue mayor a lo reportado en la literatura (Polacheck y Kwon-Chung, 1988; Polack, 1989; Rippon, 1990; Rubio y Cols., 1984), pero sí concuerdan con lo reportado por Melo y cols., (1980) y por Staib y Cols., (1989).

Con respecto a los estudios de virulencia, se indujo la infección en ratones de una manera relativamente fácil, coincidiendo con la literatura (Polack, 1989; Dixon y Cols., 1989; Van Cutsem y cols., 1986; y Rippon, 1990). Con respecto al papel de la melanina en la virulencia del hongo, se encontró que las cepas más productoras de melanina son las más patógenas para los ratones infectados, pues en un promedio de 6 semanas se encontró un 100% de letalidad, lo que no se observa con la cepa que produce poca melanina, donde se encontró un 10% de letalidad en el mismo período con respecto a los controles inoculados con solución salina estéril, coincidiendo con lo reportado en la literatura para algunos aislados clínicos del hongo (Kwon-Chung y Cols., 1989; Polack, 1989) para Wangiella dermatitidis (Dixon y Cols., 1989) Verticillum dahliae (Wheeler y Bell, 1985).

Es interesante mencionar, que una de las cepas con gran producción de melanina fue una de las dos cepas de C. albidus analizadas lo cual no concuerda con lo reportado por diferentes autores (Rippon, 1990; Kwon-Chung y Cols., 1989; Satib y Cols., 1989), siendo además muy virulenta para los ratones inoculados, confirmando el papel de la melanina en la patogenicidad del hongo, pues el patrón de virulencia observado es similar al de las cepas de C. neoformans estudiadas y coincide con lo reportado por Melo y Cols., (1980), pudiendo ser una variable hiperproductora de melanina en comparación con las cepas que la producen en bajas concentraciones.

El cerebro de los ratones infectados con las diferentes cepas estudiadas fue el más colonizado confirmando el neurotropismo de Cryptococcus sp seguido del bazo e hígado respectivamente, siendo similares estos resultados con lo reportado por Polack (1989) y Dixon y Cols., (1989).

Por otro lado, la función de la producción de melanina en hongos que producen micetoma (Madurella grisea o Pseudallescheria boydii) no ha sido estudiado, pero se piensa que la melanina extracelular puede ser un factor importante en la formación de los granos del micetoma. Por lo anterior, es evidente que la síntesis de melanina influye en la virulencia y patogenicidad de los hongos productores de la misma, aunque el conocimiento exacto de su papel en dichas funciones no está totalmente entendido.

CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas de Cryptococcus sp utilizadas tienen características similares a las descritas en la literatura.
- 2.- La infección en los animales de experimentación se indujo de manera relativamente fácil en todos los animales inoculados.
- 3.- Las cepas con mayor producción de melanina fueron 100% mortales a las 6 semanas de inoculación, mientras que las cepas con poca producción indujeron muy poca mortalidad.
- 4.- Las cepas más pigmentadas, forman un mayor número de colonias en el cerebro, hígado y bazo en los animales de experimentación que las no pigmentadas.
- 5.- La cepa de C. albidus empleada en este trabajo presenta una gran producción de melanina, y es muy virulenta en los ratones infectados, lo cual difiere con algunos reportes de la literatura.

B I B L I O G R A F I A

- Bell, A. A. and Wheeler, M.H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* Vol. 24. pp 411-451.
- Dixon, D.M., Polak, A. M. and Szaniszlao, P. 1987. Pathogenicity and virulence of wild type and melanin-deficient Wangiella dermatitidis. *J. Med. and Vet. Mycol.* Vol. 25. pp 97-106.
- Edberg, S. C., Chaskes, S., Altire-Werber, E. and Singer, J. 1980. Esculin based medium for isolation and identification of Cryptococcus neoformans. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 12. pp 332-335.
- Kwon-Chung, K., Polacheck, I. and Popkin, T. 1982. Melanin-lacking mutants. of Cryptococcus neoformans and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* Vol. 150. No. 3. pp 1414-1421.
- Kwon-Chung, K. and Rhodes, J.C. 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in Cryptococcus neoformans. *Infect. and Immun.* Vol. 51. No. 1. pp. 218-223.
- Listeman, H. 1986. Mucoid encapsulation in vitro of Cryptococcus neoformans. *Mykosen.* Vol. 29. No. 12. pp 556-558.
- Madeira López J. and Vand Vden, N. 1982. The temperature profile of Cryptococcus neoformans. *Sabouradia.* Vol. 20. pp 331-334.
- Polacheck, I., Hearing, V.J. and Kwon-Chung, K. 1982. Biochemical studies and utilization of catecholamines in Cryptococcus neoformans. *J. Bacteriol.* Vol. 150. No. 3. pp 1212-1220.
- Polacheck, I. and Kwon-Chung, K. 1988. Melanogenesis in Cryptococcus neoformans. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 134. pp 1037-1041.
- Polak, A. 1989. Melanin als virulenfaktor pathogener pilze. *Mykoses.* Vol. 33. No. 5. pp 215-224.
- Rippon, J.W. 1990. *Tratado de Micología Médica* 3a. ed. Interamericana.
- Rhodes, J., Polachek, I. and Kwon-Chung, K. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of Cryptococcus neoformans. *Infect. and Immun.* Vol. 36. No. 3. pp 1175-1184.
- Rubio, M., De Vroey, Ch., Chalon, E. and Swinne, D. 1984. An improved medium for isolation of Cryptococcus neoformans from pigeon droppings. *Sabouradia* Vol. 22. pp 345-346.
- Schonheyder, H. and Stenderup, A. 1982. Isolation of Cryptococcus neoformans from pigeon manure on time media inducing pigment formation. - *Sabouradia.* Vol. 20. pp 193-197.
- Staib, F., Seibold, M., Antweiler, E. and Fröhlich, B. 1989. Staib agar supplemented with a triple antibiotic combination for the detection of --- Cryptococcus neoformans in clinical specimens. *Mycoses.* Vol. 32. No. 9, pp 448-454.

- Swinne, D. 1975. Cryptococcus neoformans of saprophytic origin. Sabouradia. Vol. 13. pp 303-308.
- Van Cutsem, J., Fransen, J., Van Gerven, F. and Janssen, P.A.J. 1986. Experimental cryptococcosis: Dissemination of Cryptococcus neoformans and dermatropism in Guinea Pigs. Mykosen. Vol. 29. No. 12. pp 561-578.
- Wheeler, M.H. and Bell, A.A. 1988. Melanins and their importance in pathogenic fungi: In Current Topics in Medical Mycology-2. Mc Ginnis, M.R. Celd Springer Verlag.

Arista 270, C.P.78000
San Luis Potosi, SLP.