

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar semilla de girasol

Lic. Iliana del C. Valdés Hernández,¹ Dr. Gerardo Martínez Machín,² Lic. Carlos M. Fernández Andreu³ y Dra. María Teresa Illnait Zaragozí⁴

RESUMEN

Se determinó la producción de melanina sobre el medio agar extracto de semilla de girasol de 86 cepas de *Cryptococcus neoformans*, pertenecientes al Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; de estas, 54,7 % produjo colonias con pigmento carmelita intenso, 5,8 % un pigmento claro y 37,2 % una tonalidad intermedia. Se creó un cuarto grupo para aquellas cepas que presentaron un pigmento verdínico (2,3 %). Con este trabajo se contribuyó de forma importante a una mejor caracterización de las cepas pertenecientes a la colección de la institución y sirve de base a estudios posteriores de patogenicidad y susceptibilidad.

DeCS: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS; HELIANTHUS; SEMILLAS; AGAR; SINDROMES DE INMUNODEFICIENCIA.

Cryptococcus neoformans es una levadura capsulada que presenta una baja virulencia en individuos inmunocompetentes, pero que puede comprometer seriamente la vida de pacientes inmunodeprimidos.^{1,2} La forma más frecuente y devastadora de la enfermedad es la meningoencefalitis, que se acompaña de una marcada reducción de la expectativa de vida en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).¹ El incremento de los casos de criptococosis al nivel mundial, especialmente aquellos asociados con el SIDA, ha motivado el interés por profundizar en el conocimiento de su agente causal y sus marcadores de virulencia. De estos los más ampliamente estudiados han sido la cápsula y la producción de enzima fenoloxidas.³ La función de esta enzima en los nichos ecológicos naturales de la levadura es desconocida; en otros hongos ha sido asociada a la degradación de lignina,

al desarrollo conidial y a la senescencia.⁴ Por otro lado, se ha podido conocer que las células melanizadas inhiben la fagocitosis mediada por anticuerpos y reducen la susceptibilidad a los agentes antifúngicos.⁵⁻⁸

Se estudiaron 86 aislamientos de *C. neoformans* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Como control negativo fue usada una cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028). Las cepas se encontraban conservadas en agua destilada estéril a temperatura ambiente.

Para determinar la actividad de la fenoloxidas, las colonias fueron transferidas a agar Sabouraud dextrosa (ASD) durante 7 d a 37 °C y luego a agar extracto de carne sin glucosa (Lab-Lemco powder, OXOID LMT, Basingstoke, Hampshire, England) bajo las mismas condiciones. Una vez

¹ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Agregado.

³ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

⁴ Máster en Bacteriología-Micología. Especialista de I Grado en Microbiología. Investigadora Agregada.

obtenido el crecimiento, se tomaron colonias aisladas y se inocularon en agar semilla de girasol (ASG) (creatinina 780 mg/L, diphenil 100 mg/L, extracto de semilla 200 mL/L, glucosa 10 mg/L, agar 10 g/L) durante 5 d a 28 °C, porque la actividad de la enzima parece ser inhibida por temperaturas cercanas a los 37 °C.⁹

La producción de pigmento carmelita fue tomada como indicador de la producción de fenoloxidasas y las cepas fueron agrupadas atendiendo a la intensidad de este (fig.). Del total de los aislamientos estudiados, 54,7 % produjo pigmento café intenso, 5,8 % una pigmentación débil y 37,2 % un color intermedio entre los 2 grupos anteriores. *Kwon-Chung* y otros utilizaron este mismo criterio para comparar la actividad de la fenoloxidasas entre aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* var. *gattii*.¹⁰

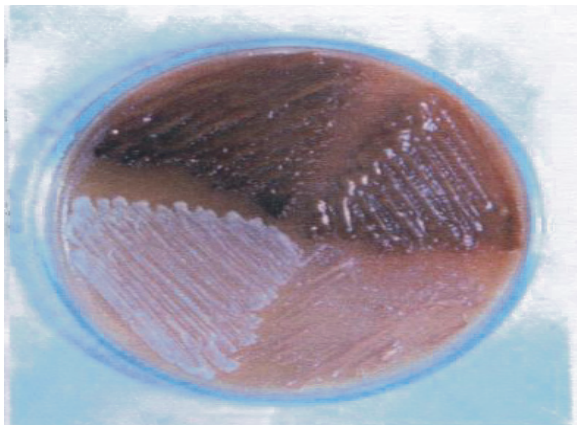


Fig. Intensidad de la pigmentación sobre el ASG. Parte superior pigmento intenso; a la derecha pigmentación intermedia; abajo pigmentación débil; a la izquierda cepa no pigmentada (control negativo).

Además de encontrar un predominio de cepas intensamente pigmentadas, se comprobó la presencia de 2 cepas (2,3 %) que produjeron pigmento verde. El efecto verde sobre el medio ASG fue reportado por *Staib*, quien lo relacionó con una fuerte asimilación de la creatinina por el microorganismo con la consecuente alcalinización del medio. Este fenómeno fue descrito para la mayoría de los aislamientos de *Sporothrix schinckii* y para algunas cepas de *C. laurentii* y *C. neoformans*, aisladas en su totalidad de casos clínicos,¹¹ esto concuerda con los hallazgos en el presente estudio.

El conocimiento que brinda este trabajo, constituye un paso de avance en la caracterización de las cepas de *C. neoformans* pertenecientes a la

colección del IPK y puede servir de base a posteriores estudios de patogenicidad y susceptibilidad *in vitro*.

SUMMARY

The production of melanin on a medium of sunflower seeds extract agar from 86 strains of *Cryptococcus neoformans* belonging to the Mycology Laboratory of "Pedro Kouri" Institute of Tropical Medicine was determined. 54.7 % of them produced colonies with dark brown pigment, 5.8 % a light pigment and 37.2 % an intermediate tonality. A fourth group was created for those strains with a true pigment (2.3 %). This paper is an important contribution to attain a better characterization of the strains from the collection of the institution and serves as a basis to further studies of pathogenicity and susceptibility.

Subject headings: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS; HELIANTHUS; SEEDS; AGAR; IMMUNOLOGIC DEFICIENCY SYNDROMES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS- 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):515-48.
- Denning DW, Stevens DA, Hamilton JR. Comparison of *Guizotia abyssinica* seed extract (birdseed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 1990;28(11):2565-7.
- Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? Emerg Infect Dis 1998;4(1):71-83.
- Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. Appl Environ Microbiol 1994;60(10):3864-6.
- Wang Y, Casadevall A. Susceptibility of melanized and non melanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen-derivates oxidants. Infect Immun 1994;67(2):3004-7.
- Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. Infect Immun 1995;63(2):3131-6.
- Nasanchuk DJ, Casadevall A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: Contribution of the capsular polysaccharide, melanin and monoclonal antibody binding. Infect Immun 1997;65(5):1836-41.
- Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC:Ed. ASM Press. 1998.
- Jacobson ES, Jenkins ND, Tood JM. Relationship between superoxidizedismutase and melanin in a pathogenic fungus. Infect Immun 1994;62:4085-6.
- Kwon-Chung KJ, Kozel TR, Edman JC, Polachek I, Ellis D, Shinoda T, Dromer F. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. J Med Vet Mycol 1992;30(1):133-42.
- Staib F. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. Peculiarities and challenge: Opening lecture. Second Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. J Mycol Med 1994;4(1):56-60.

Recibido: 31 de julio de 2000. Aprobado: 4 de enero de 2003.
Dra. María Teresa Illnait Zaragoza. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: mtilnait@ipk.sld.cu