

TRABAJOS ORIGINALES

FENOLOXIDASA MODIFICADA: CLAVE PARA IDENTIFICAR CEPAS DE *Cryptococcus neoformans*

Carlos Canelo D¹, José Casquero C².

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² División de Micología, Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

RESUMEN

Cryptococcus neoformans es la única levadura patógena capaz de sintetizar pigmentos como la melanina mediante la actividad de su enzima llamada fenoloxidasas. El objetivo del presente estudio fue implementar y estandarizar la prueba de la fenoloxidasas, como técnica complementaria en la identificación de cepas de *C. neoformans*. Se estudiaron 21 cepas, identificadas previamente con métodos convencionales.

La prueba de la fenoloxidasas fue modificada debido a que su empleo originaba 9,6% (2/21) de falsa negatividad. Esta prueba modificada se optimizó a 28°C a partir de un medio con baja concentración de glucosa. Ningún aislamiento falso negativo fue encontrado luego de repetir tres veces el ensayo, y el pigmento melanina fue detectado con mayor rapidez.

Palabras claves: Monofenol Monooxigenasa; *Cryptococcus neoformans*; Pigmentos (fuente: BIREME).

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is the only pathogenic yeast capable of forming melanin pigment by enzymatic activity of phenoloxidase. The objective of this study was to establish and standardize the phenoloxidase test as a complementary technique for identifying *C. neoformans* strains. We studied 21 strains identified through conventional methods.

The phenoloxidase test was modified because its use caused 9,6% (2/21) false negatives. The test was modified and optimized to 28°C using a medium with low glucose concentration. No false negative results were found in three repeated assays using each one of the strains; melanin pigment was quickly detected.

Key Words: Monophenol Monooxigenasa; *Cryptococcus neoformans*; Pigments (source: BIREME).

INTRODUCCION

Una característica que diferencia las cepas de *C. neoformans* patógenas de las no patógenas y otras especies de *Cryptococcus*, es su habilidad para formar un pigmento marrón o negro (melanina) a partir de componentes difenólicos. Este proceso llamado melanogénesis puede realizarse *in vitro* como una prueba adicional en la identificación de este hongo. La producción de melanina mediante la prueba de la L - DOPA - citrato férrico, es realizada por la enzima difenoloxidasas (laccasa) que por oxidación convierte las catecolaminas (difenoles) tales como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en dopaquinona, siendo este el paso limitante; puesto que, presumiblemente los siguientes pasos en la vía, tales como el rearreglo de dopaquinona a dopacromo y finalmente la autopolimerización a melaninas, son espontáneas^{1,2,3}.

La asociación del fenotipo melanina y la virulencia del *C. neoformans*, ha sido reportada por diversos estudios^{4,5,6} que sustentan la hipótesis que el sistema fenoloxidasas cataliza la producción de pigmentos como la melanina, que protege al hongo frente a los oxidantes generados por las células efectoras del huésped.

Mediante estudios con microscopía de transmisión electrónica se determinó que la melanina de *C. neoformans* parece estar concentrada en el lado interno de la pared celular, localización que le permitiría interactuar con sustancias del lado extracelular y prevenir su penetración dentro de la levadura³.

Estudios basados en la producción de este pigmento que permite la identificación de cepas de *C. neoformans*^{1,7}, y cuyos resultados varían dependiendo de la metodología empleada, así como de las condiciones de temperatura y de concentración de Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) en que se realizan.

Correspondencia: José Casquero Cavero. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado Postal 471. Telf.: (0511) 4719920 - Fax: (0511) 4710179. Email: micolog@ins.sld.pe

En nuestro medio, no se realiza la prueba de la fenoloxidasa como método complementario de identificación de cepas de *C. neoformans*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue implementar y estandarizar una técnica para detectar la actividad de la enzima fenoloxidasa en la levadura.

MATERIALES Y METODOS

Estudio de tipo descriptivo realizado en 1999. Se emplearon 21 cepas de *C. neoformans* las que fueron aisladas a partir de LCR: 18 de las cuales fueron aisladas de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), una de un paciente seronegativo para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y, en dos, no se conoció el factor predisponente por carecer de datos.

Como controles se emplearon las cepas H – 0058 - 620 de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotipo A y H – 0058 - 628 de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo B. Adicionalmente, se utilizó un aislamiento local de *Candida albicans* previamente tipificado.

Las cepas fueron repicadas en tubos con Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) y se incubaron a 28°C por 5 días. Después de haber logrado la reactivación de los cultivos, éstos fueron sembrados en tubos con ASD e incubados a 28°C por 2 días. Previamente se realizó la identificación de las cepas por métodos convencionales⁵⁻¹¹.

PRUEBA DE LA FENOLOXIDASA MODIFICADA

Se estandarizó la prueba de la fenoloxidasa desarrollada por Kaufmann y Merz¹² a temperaturas de 37°C y 28°C, para lo cual, cada una de las cepas incluidos los controles se repicaron en cuatro tubos, dos con ASD al 4% y dos con ASD al 0,1%.

Uno de los tubos con ASD al 4% y otro con ASD al 0,1% repicados previamente, fueron incubados a 37°C por 2 días. Los dos tubos restantes fueron incubados a 28°C por 2 días.

Después de la incubación, las cepas fueron sometidas a la prueba de la fenoloxidasa, la que se realizó por lo menos tres veces. Para la realización de esta prueba, se recortó un pedazo de papel Watman N° 1 en cuadraditos de 1 cm², los cuales se colocaron en una placa de Petri estéril; se envolvió la placa con papel de aluminio y papel kraft, después se autoclavó. Luego con una pinza estéril se colocaron los cuadraditos de papel blanco autoclavados en una placa Petri estéril, con una micropipeta se inculó a cada cuadradito 45 µl de la solución de L – DOPA – citrato férrico y se dejó secar en la incubadora. Se guardaron en frascos de boca ancha de color ámbar.

Los cuadraditos impregnados previamente con la solución de L – DOPA – citrato férrico se humedecieron con 25 µl de buffer fosfato, inoculándose 1 a 2 colonias de levaduras de cada cepa en estudio sobre la superficie de cada cuadradito de papel humedecido, éstos se colocaron en número de seis en cada placa Petri estéril y se incubaron en cámara húmeda, los que fueron inoculados con levaduras que crecieron a 37°C ó 28°C fueron incubados a 37°C ó 28°C por 18 h, y se examinaron cada 30 minutos, las tres primeras horas, y luego a las 18 horas en busca de la producción de un pigmento marrón o negro (reacción positiva).

RESULTADOS

En las 21 cepas de *C. neoformans* se observaron levaduras redondas con cápsulas pequeñas mediante la tinción negativa con tinta china, crecimiento a 37°C en ASD, incapacidad para producir tubo germinativo en suero humano, no formaron hifas o pseudohifas ni clamidosporas en Agar Corn Meal – Tween 80, y tampoco formaron película en caldo. Todas fueron ureasa positiva, y se verificó la incapacidad de *C. neoformans* de reducir el nitrato a nitrito. Respecto al patrón de asimilación de azúcares, 100% (21/21) de los aislamientos asimilaron la glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa, pero no asimilaron la lactosa. La asimilación de rafinosa fue variable.

PRUEBA DE LA FENOLOXIDASA A 37°C REALIZADA EN LAS CEPAS CULTIVADAS EN ASD AL 4%

Al hacer la lectura luego de 3h de incubación, 52,3% (11/21) de las cepas produjeron un pigmento marrón y, luego de 18h de incubación, 90,4% (19/21) produjeron este pigmento, es decir que, al término de la lectura se encontró 9,6% (2/21) de cepas de *C. neoformans* falsas negativas para la prueba de la fenoloxidasa a estas condiciones. Luego de 90 minutos de iniciada la prueba, las dos cepas control de *C. neoformans* produjeron el pigmento marrón.

PRUEBA DE LA FENOLOXIDASA A 28°C REALIZADA EN LAS CEPAS QUE CRECIERON EN ASD AL 4%

Luego de la tercera hora de incubación, 90,4% (19/21) de las cepas fueron positivas a la prueba, y después de 18 h de incubación, 100% (21/21) de las cepas produjeron un pigmento de color marrón oscuro a negro, no encontrándose, por tanto, ninguna cepa falsa negativa. Al realizar la lectura a los 60 minutos, las dos cepas control dieron un resultado positivo evidente.

PRUEBA DE LA FENOLOXIDASA A 37°C REALIZADA EN LAS CEPAS QUE EN ASD AL 0,1%

La producción de pigmento fue menor, ya que después de la tercera hora de iniciada la prueba, sólo 42,8% (9/21) de las cepas fueron positivas y, después de 18h de incubación, fueron sólo 57,1% (12/21). En estas condiciones, la prueba de la fenoloxidasa dió 42,8% (9/21) de cepas de *C. neoformans* falsos negativos. A las dos horas de incubación, una de las cepas control de *C. neoformans* formó pigmento y la otra lo hizo entre las 15 y 18 h de iniciada la prueba.

PRUEBA DE LA FENOLOXIDASA A 28°C REALIZADA EN LAS CEPAS QUE CRECIERON EN ASD AL 0,1%

La producción de pigmento fue de 95,2% (20/21) luego de 90 minutos de incubación, siendo la cepa restante positiva entre las 3 y 18h. Es decir, luego de 18 h de empezada la prueba, 100% (21/21) de las cepas de *C. neoformans* fueron fenoloxidasas positivas. Respecto a las cepas control de *C. neoformans*, ambas produjeron pigmento marrón oscuro a negro en los primeros 30 minutos de iniciada la prueba.

Los resultados de los diferentes ensayos realizados para estandarizar la prueba de la fenoloxidasa se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de los porcentajes acumulados de las cepas positivas a la prueba de la fenoloxidasa.

| Referencia | Condición | Nº de cepas probadas | Porcentaje acumulativo de las cepas positivas | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------------------|--------|--------|------|------|-------------------|
| | | | 30 min | 60 min | 90 min | 2 h | 3 h | 18 h |
| Kaufmann y Merz ²¹ | ASD 4% y 37°C | 30 | 10 | 32 | 63 | 82 | 100 | 100 ^a |
| Canelo C. (1999) | ASD 4% y 37°C | 21 | 9,5 | 23,8 | 42,8 | 47,6 | 52,3 | 90,4 ^b |
| Canelo C. (1999) | ASD 0,1% y 28°C | 21 | 90,4 | 90,4 | 95,2 | 95,2 | 95,2 | 100 |
| Canelo C. (1999) | ASD 4% y 28°C | 21 | 42,8 | 71,4 | 76,1 | 85,7 | 90,4 | 100 |
| Canelo C. (1999) | ASD 0,1% y 37°C | 21 | 0 | 9,5 | 9,5 | 33,3 | 42,8 | 57,1 ^c |

^a Kaufmann y Merz¹² reportaron no haber encontrado ninguna cepa falsa negativa a partir de 30 cepas de origen clínico.

^b Se encontraron 2/21 cepas falsas negativas, al realizar la prueba de la fenoloxidasa bajo las mismas condiciones descritas por Kaufmann y Merz¹².

^c Se encontraron 9/21 cepas con resultados falsos negativos.

La melanina formada por *C. neoformans* mediante la prueba de la fenoloxidasa, realizada a diferentes condiciones de crecimiento del hongo se observan en las Figuras 1 y 2.



Figura 1. Trazas de pigmentación marrón de 5 cepas de *C. neoformans* para la prueba de la fenoloxidasa a 37° C y en medio ASD al 4%. A la izquierda, el control negativo (*Candida*).



Figura 2. Manchas de pigmentación oscuro a negro de 5 cepas de *C. neoformans* para la prueba de la fenoloxidasa a 28° C en medio ASD al 0,1%. A la izquierda, el control negativo (*Candida*).

DISCUSION

En todos los ensayos para estandarizar la prueba de la fenoloxidasa, se inoculó 45 µl de la solución de L - dopa - citrato férrico y 25 µl de buffer fosfato, por cada cepa en estudio. Estos volúmenes no son críticos para la prueba y fueron empleados en el presente estudio por los resultados satisfactorios que se obtuvieron en pruebas anteriores. Sin embargo, estas cantidades pueden ser modificadas de acuerdo a los requerimientos de cada laboratorio.

Uno de los principales aportes de esta investigación es que se encontró un 9,5% (2/21) de aislamientos de *C. neoformans* falsos negativos en la prueba de la fenoloxidasa a 37°C , luego que los aislamientos fueran mantenidos en ASD al 4%. Este ensayo estuvo basado en la metodología de Kaufman y Merz¹²; excepto que, como ellos no especificaron la concentración de glucosa del ASD y sólo lo mencionaron como tal, se empleó el convencional ASD simple utilizado para el aislamiento, identificación y mantenimiento de la gran mayoría de hongos patógenos. Este agar tiene una concentración igual a 4% de glucosa [peso/volumen].

Al comparar nuestros resultados con la utilizada en la metodología de Kaufmann y Merz, a 28°C y 37°C en ASD al 0,1% y 4% de concentración de glucosa [peso/volumen], obtuvimos mejores resultados a 28°C y cuando las cepas crecieron en ASD al 0,1%. En estas condiciones, no se encontró ninguna cepa falsa negativa y los porcentajes acumulados de las cepas positivas a la prueba de la fenoloxidasa fueron: 90,4%, 95,2% y 100% luego de 30 min - 60 min - 90 min - 2h y 18h de incubación, respectivamente (Tabla 1). Además se pudo distinguir que, de manera general, el pigmento producido a 28°C se visualizó como manchas de color marrón oscuro a negro intenso, lo cual facilitó la lectura (Figura 2).

La producción más rápida de melanina fue a 28°C que a 37°C, similar a lo observado por Jacobson¹³, quien al estudiar las actividades de la superóxido dismutasa (SOD) y fenoloxidasa en *C. neoformans*, encontró que la actividad de ésta última era mayor a 25°C que a 37°C. Asimismo, Ikeda¹⁴, demostró que la actividad de la fenoloxidasa cuando es producida en cultivos a 37°C es menor que la

producida a 25°C, sugiriendo que enzimas químicamente distintas (isoenzimas) son sintetizadas a estas temperaturas. Estos experimentos apoyan la hipótesis de la regulación de la síntesis de la fenoloxidasas mediante la temperatura, pero la explicación de ello, es todavía desconocida.

Antes de realizar la prueba de la fenoloxidasas a 28°C, los cultivos fueron mantenidos a esta temperatura por 48h en ASD al 0,1% teniendo en cuenta que en los aislamientos primarios en agar Sabouraud Dextrosa simple, *C. neoformans* var. *neoformans* crecen bien a 37°C y sus colonias llegan a ser visibles dentro de 2 a 3 días, en cambio, muchos aislamientos *C. neoformans* var. *gattii* crecen pobremente a 37°C y puede tomar hasta 4 ó 5 días para formar colonias visibles. Es por ello, que las cepas de *C. neoformans* fueron incubadas a temperaturas menores a 37°C y cercanas a sus temperaturas óptimas de crecimiento de 30°C a 32°C.

La modificación del ASD simple por uno al 0,1% fue planteada en este estudio como una alternativa para evitar resultados falsos negativos en la producción de pigmentos como la melanina y, estuvo basado en que la fenoloxidasas de *C. neoformans* es una enzima constitutiva se sintetiza en la fase estacionaria del crecimiento, cuando la mayor parte de glucosa es consumida. Esto fue observado por Polacheck⁴, quien descubrió que la glucosa reprimía la actividad de la fenoloxidasas, en tanto que, Kwon - Chung y Bennett⁷ encontró que una concentración mayor al 0,1% de glucosa en los medios de cultivos inhiben la formación de melanina.

Para la identificación definitiva de *C. neoformans*, se incluyeron en nuestro estudio, dos pruebas adicionales, una para descartar la presencia de la enzima nitrato reductasa, y otra para detectar el pigmento melanina del hongo. Ambas pruebas no son empleadas de rutina en los laboratorios, debiéndose considerar siempre, puesto que otra especie de *Cryptococcus* tal como *C. albidus* ha sido aislada de especímenes clínicos¹⁴.

Mediante el presente trabajo de investigación se estandarizó y modificó la prueba de la fenoloxidasas desarrollada por Kaufmann y Merz¹². El empleo de ésta eliminó los resultados falsos negativos que eran encontrados con la prueba original y permitió la identificación específica de *C. neoformans*, puesto que, esta especie es la única dentro de su género con actividad demostrable de fenoloxidasas. La metodología seguida en este trabajo, para la identificación bioquímica de los aislamientos clínicos, es también recomendable para aislamientos de origen ambiental.

En caso de encontrar, aunque es muy raro, algún aislamiento sospechoso de *Cryptococcus neoformans* ureasa negativa, se sugiere emplear la prueba de la fenoloxidasas modificada en el presente estudio, puesto que la producción de melanina es específica para esta levadura.

Si la prueba de la fenoloxidasas se realiza a 28°C en el medio de ASD al 4%, se debe tener en cuenta que un medio rico en glucosa puede demorar o inhibir la formación de melanina. Si esto ocurriera, se recomienda utilizar la prueba anterior en el medio de ASD al 0,1%.

Se concluye que la detección del pigmento melanina mediante la prueba de la fenoloxidasas realizada en el medio de ASD al 0,1% y a 28°C, fue más rápida que la realizada a partir de ASD al 4% y a 37°C, siendo además de fácil implementación y sin resultados falsos negativos.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Instituto Nacional de Salud de Colombia por habernos proporcionado las cepas controles H - 0058 - 620 de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotipo A, y H - 0058 - 628 de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo B.

REFERENCIAS

1. **Chaskes SR, Tyndall L.** Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 146-52.
2. **Williamson PR.** Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 1994; 176(3): 656-64.
3. **Wang Y, Aisen P, Casadevall A.** *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun* 1995; 63(8): 3131-6.
4. **Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ.** Biochemical studies of phenoloxidasas and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1982; 150(3): 1212-20.
5. **Rhodes JC, Polacheck I, Kwon - Chung KJ.** Phenoloxidasas activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1982; 36(3): 1175-84.
6. **Wang Y, Casadevall A.** Susceptibility of melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen - and oxygen - derived oxidants. *Infect Immun* 1994; 62(7): 3004-7.
7. **Kwon - Chung KJ, Bennet JE.** *Medical Mycology*. Ed. Lea and Lebigier. 1st. Ed. Philadelphia. 1992. p.397-446.
8. **Casquero J, Zurita S.** Manual de procedimientos de Laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunista y profunda. Serie de Normas Técnicas N° 23. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud. 1997.
9. **Koneman EW, Roberts ED.** *Micología*. Práctica de laboratorio. Editorial Médica Panamericana. 3a Ed. Buenos Aires. 1992. p.176-95.
10. **Hunter MS, Cooper BH.** Yeast of medical importance. In: Lenette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP. *Manual of clinical microbiology*, 3th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1980. p. 562-76.
11. **Rippon JW.** *Micología Médica*. Hongos y actinomicetos patógenos, Nueva Editorial Interamericana, S.A. 3ª ed. México. 1990. p. 629-59.
12. **Kaufmann CS, Merz WG.** Two rapid pigmentation test for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1982; 15(2): 339-41.
13. **Jacobson ES, Jenkins ND, Tood JM.** Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect Immun* 1994; 62(9): 4085-6.
14. **Bava AJ, Robles AM, Negroni R, Arechavala A, Bianchi M.** Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de *Cryptococcosis*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 111-4.