

ESTUDIOS SOBRE EL *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS*

*III. - La formación capsular*

Por P. NEGRONI y C. A. LANATA

En esta serie de investigaciones nos hemos propuesto verificar: 1º) la influencia de las fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la formación de la cápsula; 2º) la acción enzimática de las amilasas de origen animal y vegetal, así como la de la hialuronidasa extraída del testículo de toro; 3º) extracción de la substancia capsular en medio ácido y alcalino para su estudio ulterior; 4) tentativas de inmunización de conejos con células totales y decapsuladas con el objeto de estudiar la constitución antigénica de las diversas cepas.

1ª *Serie de experiencias.* — Influencia de las fuentes de C. y de N.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

Las cepas utilizadas en este trabajo son las siguientes: N° 714 aislada de un caso de torulopsis generalizada, en Buenos Aires; y N° 1653, 1 procedente de "Northern Regional Research Laboratories (cepa N° 381), EE. UU.

Empleamos los medios sólidos de Lodder adicionados de 1 % de las diferentes fuentes de carbono y de 1 por mil de las de nitrógeno repartidos en tubos de ensayo de 18 mm. de diámetro e inclinados en pico de clarinete. Las siembras se efectuaron con células de un cultivo de 48 horas en medio sólido, previamente lavadas con solución fisiológica y las lecturas se hicieron a las 48 horas, 7 y 15 días de incubación a 28° C. con los resultados que se consignan en los cuadros adjuntos. Las cruces indican la amplitud de la cápsula según la apreciación subjetiva de las observaciones efectuadas en las preparaciones mon-

tadas con tinta china. El material se tomó, en todos los casos, de la parte media de los tubos.

La reacción de Molisch utilizando una solución alcohólica de naftol  $\alpha$  da resultados positivos con una suspensión de células en solución salina isotónica. Empleando material de los diferentes cultivos comprobamos que la intensidad de la reacción guarda cierta relación con la amplitud de la cápsula observada en los exámenes microscópicos.

Como notáramos que en el medio con glicerol la formación capsular era escasa, efectuamos 15 pasajes (un trasplante cada 48 hs. de incubación a 28° C.) en el medio mineral adicionado de 5,8 % de glicerina, al final de los cuales sembramos en caja de Petri, conteniendo el mismo medio de cultivo, por diseminación. Obtuvimos, así, la formación de dos tipos de colonias: a) brillante y húmeda, y b) opaca y algo rugosa. Los caracteres del tipo (b) desaparecieron en los trasplantes sucesivos y el examen microscópico no reveló reducción alguna en la formación capsular.

Igualmente infructuosas fueron las tentativas efectuadas para obtener la formación de pseudomicelio. La cepa N<sup>o</sup> 1653,1 en el medio mineral con glicerol produjo un esbozo de pseudomicelio, razón por la cual la sembramos en medios con 1 % de ácido oleico, de grasas animales y vegetales, así como con el correspondiente medio líquido adicionada de Tween 80 (0,05 %) con los resultados más arriba consignados.

Como se puede apreciar en los cuadros adjuntos, la manosa y su alcohol correspondiente, el manitol, así como la trehalosa y la dextrina favorecen la formación capsular en presencia de 5 por mil de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Es probable que la manosa y el manitol sean precursores útiles en la síntesis del polisacárido capsular. En presencia del 1 % de glucosa, la formación de la cápsula ha sido mayor en los cultivos con peptona.

2<sup>a</sup> Serie de experiencias. — Acción enzimática de las amilasas y hialuronidasas.

Utilizamos en estas experiencias la amilasa producida por el *Aspergillus oryzae* en los cultivos en afrecho (15) y la amilasa pancreática preparada con páncreas de cerdo (14) disolviendo el polvo obtenido en agua glicerinada cuya concentración final en glicerina es 29 %. Respecto

a la hialuronidasa utilizamos en unas experiencias la enzima cruda (11) y en otras la enzima purificada por el método de Medinaveitia (10).

Efectuamos una suspensión densa de las células bien capsuladas de un cultivo de 48 hs. en agar miel de Sabouraud en las siguientes soluciones: 1) amilasa pancreática, 2) amilasa aspergilar de título igual a 2,5 unidades por mililitro.

3) hialuronidasa purificada a razón de 5 mg./ml.; 4) solución salina isotónica, 5) agua glicerinada al 29 %, llevando estas soluciones la misma concentración de células de *Cryptococcus*, cuya opacidad correspondía a la del tubo N° 7 de la escala de Mc Farland.

Las lecturas se efectuaron mediante preparaciones microscópicas del sedimento montadas en tinta china al cabo de 1 y de 24 horas de contacto a 37° C., comprobando la ausencia de toda acción lítica de las amilasas ensayadas y de la hialuronidasa. Las suspensiones 4) y 5) sirvieron de testigos.

Efectuamos igualmente 15 pasajes (uno cada 48 horas de incubación a 28° C.) en el medio sólido de Lodder con sulfato de amonio, glucosa, 10 microgramos de tiamina por ml. adicionado de 1/3 de amilasa pancreática y en los tubos testigos, de igual volumen de agua glicerinada al 29% con el objeto de comprobar si conseguíamos reducir la formación capsular. Los resultados fueron negativos en este sentido. En el medio con glicerina el *C. neoformans* se desarrolló formando un barniz mate en tanto que era húmedo y brillante en el medio adicionado de amilasa pancreática. Los exámenes microscópicos revelaron, en ocasiones, que la cápsula era más amplia en los medios con amilasa debido, probablemente, a la presencia de fuentes nitrogenadas favorable para su formación.

3ª Serie de experiencias. — Extracción de la sustancia capsular.

Efectuamos estas operaciones en medio alcalino y en medio ácido. En la primera utilizamos células lavadas de un cultivo en agar miel de 48 hs. de incubación a 30° C., extrayendo con una solución N/10 de OHNa 24 h. en la cámara fría. El líquido sobrenadante fué llevado a pH. 8 y precipitado con 3 volúmenes de alcohol acetato de sodio, operación que se repitió varias veces previa disolución del precipitado en agua destilada.

Para la extracción en medio ácido seguimos la técnica de Kligman, 1947. Las células de un cultivo de 2 semanas fueron lavadas 4 veces y luego extraídas a 75° C. durante 35 minutos con una solución 0,5/N de ClH. El líquido sobrenadante fué llevado a pH 7 y precipitado en la misma forma que el lote anterior.

La identificación de los polisacáridos obtenidos está aún en estudio. Podemos sin embargo adelantar que las reacciones de Millon, Biuret y Xantoproteicas son negativas. Dan reacción de Molisch positiva y solamente reducen el licor de Fehling previa hidrólisis ácida.

4ª *Serie de experiencias.* — Producción de anticuerpos circulantes.

Inyectamos, en estas experiencias, conejos de 1.500 a 2.000 g. con los materiales siguientes: 1) células vivas, 2) células muertas por el calor, 3) células decapsuladas por el OHNa N/10, 4) células tratadas por la hialuronidasa, 5) células decapsuladas y rotas y 6) fracción proteica. Se utilizó, frecuentemente, las vías intramuscular y venosa combinadas, comenzando con la primera o la vía venosa solamente prolongando el tratamiento de los animales durante 2 a 3 meses.

Las fracciones 5) y 6) fueron preparadas en la siguiente forma: El sedimento celular obtenido de la extracción capsular en medio ácido (con una solución 0,5/N de ClH) se colocó en un molinillo provisto de bolas de agata de 2 cm. de diámetro, haciéndolo actuar durante 3 a 4 días con interrupciones de 8 a 12 horas diarias. Ese material suspendido en solución salina isotónica y centrifugado, permitió comprobar que el sedimento contenía regular cantidad de células rotas. El líquido sobrenadante tratado por una solución de ácido tricloroacético al 10 % hasta obtener la precipitación óptima, proporcionó una sustancia soluble en agua que fué precipitada dos veces más con ácido tricloroacético. El precipitado obtenido en la última operación fué lavado con alcohol éter y se disolvió a razón de 400 mg. de peso húmedo por 25 ml. de agua destilada a pH 7 dejando sin embargo un pequeño residuo insoluble. Este material dió positivas las reacciones de Molisch y xantoproteicas.

Hasta el presente no hemos logrado la formación de aglutininas y precipitinas en los animales así tratados.

## RESUMEN

Utilizando los medios sólidos de Lodder para los auxanogramas, con el objeto de revelar su influencia sobre la formación capsular, hemos comprobado que la manosa, el manitol, la trehalosa y la dextrina, favorecen su formación en presencia de 5 por mil de sulfato de amonio y que la peptona ejerce la misma influencia en presencia de 1 por ciento de glucosa.

No hemos notado que exista siempre relación entre la amplitud del desarrollo (multiplicación celular) y la de la formación capsular.

Mediante los exámenes microscópicos de las células montadas en tinta china no hemos observado que se logre extraer en forma apreciable la substancia capsular mediante las amilasas pancreáticas o aspergilar (moldy-bran), la hialuronidasa, la solución N/10 de hidrato de sodio o la 0,5/N de ácido clorhídrico. Tampoco hemos logrado obtener, hasta el presente, una mutante sin cápsula.

Los conejos inyectados por las vías intramuscular e intravenosa combinadas, con células muertas o vivas, con células tratadas por las amilasas, hialuronidasas, solución N/10 de OHNa o 0,5 de HCl, con células parcialmente rotas por acción mecánica o con la fracción proteica, no han revelado la formación de anticuerpos circulantes (precipitinas y aglutininas).

## SUMMARY

We have tried auxanographic Lodder's media with different carbon and nitrogen sources in order to investigate their influence on the capsule-formation and we have observed that mannose, manitol, trehalose and dextrin enhance capsular-formation in the presence of 5 per mil  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$  and so does peptone in the presence of 1 per cent dextrose. We could not verified any regular relation between amount of development and the degree of capsule-formation. We could neither appreciate any striking reduction of the capsule in cells treated with amylases (pancreatic or moldy-bran), hyaluronidase, 10/N OHNa solution or 0,5/N HCl solution.

Rabbits treated during several months by intramuscu-

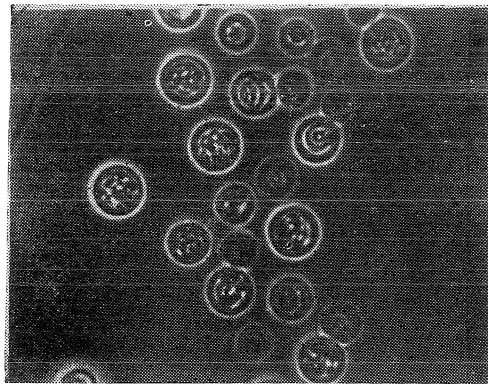
lar and intravenous injections (combined) of dead and lived cells or cells treated with amylases, hyaluronidase, 10/N OHNa. 0,5/CIH solutions or partially broken by mechanical action, and the protein fraction, failed to form precipitins and agglutinins.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1) ASCHNER, M., NAGER, J. and LEIOWITZ J. — *Nature*, 1945, 156, 295.
- 2) BUSSE, O. — *Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. und f. Klin. Med.* 1896, 114, 360.
- 3) BEUCHAM, R. W. — *J. Inf. Dis.* VTCE, 57, 255, *Ann. New York Acad. Soc.* 1950, 50, 1299.
- 4) CURTIS, F. — *Ann. Inst. Pasteur* 1896, 10, 449.
- 5) DROUHET, E. ET SEGRETAİN, G. — *Compend. Soc. Biol.* 1948, 142, 316 y 319.
- 6) HELWE, E. J. AARLSON, A. S. AND HAMILTON, D. M. — *J. Biol. Chem.* 1949, 177, 289.
- 7) HOFF, C. L. — *J. Lab. and Clin. Med.* 1942, 27, 751.
- 8) KLIGMAN, A. M. — *J. Immunol.* 1947, 57, 395.
- 9) MAGER, J. AND ASHNER, M. — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 1946, 62, 71, *JL Bac.* 1947, 53, 283.
- 10) MEDINAVEITIA, J. — *Bioch.* 1938, 32, 1806; *id.* 1941, 35, 447, 453 y 456.
- 11) NEGRONI, P. — *Rev. Inst. Bact. "Malbrán".* 1944. 12, 247; *Rev. Arg. Dermatosisif.* 1951, 34, 228. *An. Soc. Cient. Arg.* 1951, 151, 32.
- 12) NEILL, J. M., CASTILLO, C. G., SMITH, R. H. AND KAPROS, C. E. — *Exper. Med.* 1949.
- 13) SEGRETAİN, G. et DROUHET, E. — *Quinto Congreso Intern. Microbiol.* 1950.
- 14) SUMNER, J. B. AND SOMERS, F. — *Laboratory experiments in biological chemistry.* Acad. Press. Inc. Publ. New York, 1944.
- 15) TAUBER, H. — *Enzyme technology.* John Wiley and Sons, Inc. New York, 1943.
- 16) VERYTY, R. — *Sperimentale*, 1912, 66, 1.
- 17) WEIDMAN, F. D. AND FREEMAN, W. — *J. A. M. A.* 1924, 83, 1163.
- 18) WEIS, J. D. — *J. Med. Research*, 1902, 7, 280.



Aspecto que presenta la cápsula en medio de cultivo adicionado con peptona. (Aumento 1.050 x ).



Aspecto que presenta la cápsula en medio de cultivo adionado con histidina. (Aumento 1.050 x ).