

Alteraciones Histopatológicas y de los niveles de Inmunoglobulina G en la Criptococosis inducida en *mus musculus* balb/c a diferentes tiempos de infección.

Lujan Velásquez Manuela, Luyo Padilla Abraham, Chávez Castillo Milciades, Benites Castillo Santiago.

Docentes UCV y UNT

R E S U M E N

El presente estudio tuvo por finalidad evaluar las alteraciones histopatológicas y los niveles de IgG en la criptococosis inducida en *Mus musculus* BALB/c "ratón" a diferentes tiempos de infección. Se trabajó con *Cryptococcus neoformans* y 45 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c de ambos sexos, de 45 días de edad y de aproximadamente 25g, en 5 de los cuales elegidos al azar se descartó infección natural por *C. neoformans* mediante la prueba de tinción negativa con nigrosina al 10 % en muestras de cerebro y pulmones, con los 40 restantes se distribuyeron al azar en grupo control y grupo experimental de 20 ejemplares cada uno y subdividiéndose en 4 subgrupos de 5 ejemplares cada uno. Los ratones del grupo experimental fueron inoculados intraperitonealmente con 0,5 mL de una suspensión del hongo a una concentración similar al tubo No 3 del Nefelómetro de Mac Farland, y para el grupo control se utilizó 0,5 mL solución salina fisiológica (SSF) estéril. A los 10, 15, 20 y 25 días de la inoculación, se tomaron muestras de sangre para evaluar los niveles de IgG en suero, y luego del sacrificio se extrajeron el encéfalo, los pulmones, el bazo, el hígado y los riñones para su evaluación macroscópica e histológica luego de su conservación en formol al 10% y su posterior coloración con Hematoxilina eosina. Se observó cambios macroscópicos como: Aumento de tamaño en longitud presentándose marcada hepatomegalia y esplenomegalia, cambio de color, aspecto hemorrágico y presencia de abscesos que iban aumentando en número a mayor tiempo de infección y alteraciones histopatológicas que variaron de acuerdo al tiempo de infección, así tenemos que : a los 10 y 15 días se observó hiperemia en meninges, infiltración inflamatoria crónica en meninges , alvéolos e intersticio en pulmón, hígado y riñón; edema en corteza cerebral; necrosis en corteza cerebral , bazo, hígado y riñón; zonas de hemorragias en cerebro, pulmón, y tejido adiposo perirrenal; tendencia a formar granuloma en pulmón, e hígado; hiperplasia de nódulos linfáticos y de megacarioblastos en bazo; proliferación de linfocitos en bazo, dilatación de sinusoides en hígado; *Cryptococcus* en meninges, cerebro en forma bilateral, pulmón, hígado y riñón. A los 20 y 25 días de infección además de las alteraciones histopatológicas observadas a los 10 y 15 días, se encontró: Infiltración inflamatoria crónica granulomatosa en meninges y pulmón; hiperemia en corteza cerebral; infiltración inflamatoria crónica en bazo; múltiples focos de necrosis en hígado y riñón; abundantes *Cryptococcus* en meninges, cerebro, bazo, pulmón, hígado y riñón. La evaluación de los niveles de IgG anticriptocócico del grupo experimental y control se realizó mediante la prueba de ELISA, siendo el grupo control negativo para IgG anticriptocócico, y el grupo experimental positivo con títulos de 1/80, 1/320, 1/160, 1/160 correspondientes a los días 10, 15, 20, y 25 días de infección. Se concluyó que a mayores tiempos de infección se presentaron mayores alteraciones histopatológicas en los órganos evaluados y los niveles de IgG aumentan hasta los 15 días de infección y luego disminuyen a partir de los 20 días de infección. Se utilizó la prueba de correlación de Pearson, para determinar si hay relación entre el tamaño de los órganos evaluados y el tiempo de infección con *C. neoformans*, y la prueba de Chi cuadrado para determinar la relación de dependencia entre los niveles de alteración histopatológica y los niveles de Ig G encontrándose que existe relación de dependencia entre estos.

ABSTRACT

The present study had the purpose of evaluate histopatological alterations and IgG levels in induced criptococosis in *Mus musculus* BALB/c "mouse" at different times of infection. For that it was worked with a culture of *Cryptococcus neoformans* and 45 specimens of *Mus musculus* BALB/c of both sexes, of 45 days of age and approximately 25g weigh, in 5 of those randomly chosen natural infection by *C. neoformans* was discarded by means of the test of negative tint with 10% nigrosine in brain samples and lungs, the 40 remaining were distributed at random in control group and experimental group of 20 especimens each one and were subdivided in 4 subgroups of 5 specimens each one. The mice of the experimental group were inoculated intraperitoneally with 0,5 mL of a suspension from the fungus in a similar concentration to the tube N° 3 of of Mac Farland's Nefelometer, and for the control group it was used 0,5 mL of sterile physiologic saline solution (SSF). At the 10, 15, 20 and 25 days of the inoculation, there were taken samples of blood to evaluate the levels of IgG in serum, and after the sacrifice there were extracted the encephal, lungs, spleen, liver and kidneys for their macroscopic and histological evaluation after their conservation in 10% formol and were later colorated with Hematoxylin. eosin. In relation to the control group in the organs of the experimental group were observed macroscopic changes as: size Increase in longitude presenting marked hepatomegalia and esplenomegalia, change of color, hemorrhagic aspect and presence of abscesses that went increasing in number at more time of infection and histopatological alterations were also observed at the days 10 and 15 as hiperemia in meninxes, chronicle inflammatory infiltration in meninxes, alveolus and interstice in lung, liver and kidney; edema in cerebral cortex; necrosis in cerebral cortex, spleen, liver and kidney; areas of hemorrhages in brain, lung, and perirrenal adipose tissue; tendency to form granuloma in lung, and liver; hiperplasia of lymphatic nodules and megacarioblastos in spleen; proliferation of lymphocytes in spleen, sinusoids dilation in liver; *Cryptococcus* in meninxes, brain in bilateral form, lung, liver and kidney. At the 20 and 25 days of infection besides the histopatological alterations observed at the days 10 and 15, it was observed granulomatose chronic inflammatory Infiltration in meninxes and lung; hiperemy in cerebral cortex; chronicle inflammatory infiltration in spleen; multiple necrosis focuses in liver and kidney; abundant *Cryptococcus* in meninxes, brain, spleen, lung, liver and kidney. The evaluation of the levels of anticriptococotic IgG of experimental group and control was carried out by means of ELISA'S test, being the control group negative for anticriptococotic IgG, and the experimental group positive with titles of 1/80, 1/320, 1/160, 1/160 corresponding to the 10, 15, 20, and 25 days of infection. It was concluded that at more times of infection bigger histopatological alterations were presented in the evaluated organs and the levels of IgG increases until the 15 days of infection and then they diminish starting from the 20 days of infection. The test of correlation of Pearson was used, to determine if there is relationship between the size of the evaluated organs and the time of infection with *C. neoformans*, and it was found that it is highly significant, and the test of Chi squared to determine the dependence relationship between the histopatological alterations and the levels of Ig G and it was found that dependence relationship exists.

INTRODUCCION

La criptococosis (Blastomycosis europea ó enfermedad de Busse Buschke), es una infección sistémica subaguda o crónica, causada por *Cryptococcus neoformans* que afecta a nivel de la piel, huesos, pulmón y otras vísceras, pero con marcado tropismo por el sistema nervioso central (1,2,3). *C. neoformans* es una levadura de 5 - 20 um que se multiplica por gemación y posee una cápsula polisacárida que le confiere patogenicidad, por proteger al hongo de la fagocitosis (4,5). El estado perfecto o telemorfo de *C. neoformans* es el basidiomicete *Filobasidiella neoformans*, y presenta dos variedades, *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipos A y D) y *C. neoformans* variedad *gattii* (serotipos B y C), que se diferencian tanto desde el punto de vista patogénico, de distribución geográfica y bioquímica que hacen posible su identificación (6,7).

Los factores que hacen a *C. neoformans* patógeno puede ser dividido en dos grandes grupos. El primero comprende las características básicas que necesita para establecer una infección y sobrevivir en el huésped humano como son la presencia de una cápsula polisacárida, habilidad para producir melanina (acción de la feniloxidasasa) y crecimiento a 37 °C. El segundo incluye características que pueden contribuir a su virulencia como la secreción de proteinasas, fosfolipasa extracelular, ureasa y producción de manitol (3,8,9).

La cápsula tiene características antifagocíticas por bloquear los efectos opsonicos del complemento y la acción de los anticuerpos anticriptocócicos, igualmente la cápsula interfiere con el proceso de la presentación de los antígenos que inducen la proliferación de la células T y la producción de interleucinas 2 y del interferon gama (4,10).

La criptococosis se adquiere por inhalación de las levaduras dispersas en el medio ambiente, lo que hace que el aparato respiratorio sea el órgano de choque, en individuos inmunocompetentes la infección pulmonar primaria suele ser asintomática ó producir una infección respiratoria similar a la influenza, producir a veces expectoración con estrías sanguinolentas

siendo el cuadro más frecuente el nódulo pulmonar solitario, que simula un carcinoma, también produce una neumonía sintomática que se caracteriza por infiltrados pulmonares difusos (11). En los pacientes inmunocomprometidos las levaduras pueden multiplicarse y diseminarse desde los pulmones a otras partes del cuerpo, pero con preferencia al SNC para producir meningoencefalitis criptocócica, cuyos síntomas suelen consistir en cefaleas, fiebre que se prolonga varias semanas, rigidez o no de la nuca, deficiencias neurológicas y alteraciones a nivel de la conciencia (11,12).

Actualmente se piensa que la morfolopatología de la lesión se relaciona con el estado de los mecanismos de defensa tanto celulares como humorales (7,8). En individuos normales los linfocitos CD4⁺ inducen la formación de células gigantes multinucleadas alrededor de los criptococos, confinándolos en el sitio de infección; en el individuo inmunocomprometido, estas células CD4⁺ disminuyen y el hongo vence las defensas del huésped, se disemina por vía hematológica y va al sistema nervioso central, una vez que ha penetrado la barrera hematoencefálica y contaminado el líquido cefalorraquídeo se disemina por todo el cerebro (6,8).

En el encéfalo, la criptococosis que produce meningitis, meningoencefalitis, granulomas (criptococoma), que adoptan a veces la forma de una masa cerebral expansiva y abscesos que provocan deficiencias neurológicas focales (1,13). A nivel pulmonar puede haber infiltración en la parte inferior del pulmón, siendo las manifestaciones radiológicas múltiples, en algunos casos infiltración en parches o signos de neumonitis intersticial y en otros, lesiones focales únicas (1,13). En algunos estudios el *C. neoformans* ha sido encontrado en el 90% de autopsias de cerebro, médula espinal o meninges, y aproximadamente en el 10% en otras vísceras como riñón, adrenales, próstata, ojo, tracto urinario, hueso, y piel con o sin meningitis (8).

Cuando el *Cryptococcus* llega a los alvéolos pulmonares se desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped (4). La defensa del huésped contra este patógeno es regulada por la inmunidad mediada por células y las células T CD4⁺ juegan un rol central en la limitación de la infección, y el balance entre las citocinas Th1 y Th2 influyen marcadamente el resultado de la infección. La predominancia de la síntesis de Th1 sobre Th2 protege contra la infección, mientras que la infección es exacerbada bajo la dominancia de Th2 (14,15).

La respuesta humoral está dada por la producción de anticuerpos dirigidos contra el glucoronoxilomanano (GMX) de la cápsula los cuales pueden opsonizar a los *Cryptococcus* convirtiéndose en los gatillos de los mecanismos de citotoxicidad anticuerpodependiente (8). Estos anticuerpos se detectan al inicio de la infección, pero con el progreso de la enfermedad hay una rápida multiplicación de células de levaduras con la producción de grandes cantidades de antígeno capsular que neutraliza al anticuerpo (15). El diagnóstico clínico de la criptococosis es difícil, ya que las formas de presentación son inespecíficas, por lo que el diagnóstico definitivo es el microbiológico, para lo cual debe seleccionarse la muestra adecuada, según el foco de infección. Realizándose tinción negativa con tinta china o nigrosina, con mucicarmin de Mayer, cultivo e identificación por pruebas bioquímicas, pruebas inmunológicas para detección del antígeno capsular o de anticuerpos, diagnóstico molecular e histopatología (1,11).

Entre las pruebas inmunológicas para la detección de antígeno capsular de *C. neoformans* se encuentran la prueba de aglutinación en lámina (LA test), y prueba de ELISA con anticuerpos monoclonales. Dentro de las pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos anti *C. neoformans* tenemos inmunofluorescencia indirecta y aglutinación en tubo (8,16). La criptococosis tiene una distribución mundial, pero su prevalencia real se

desconoce debido a la ausencia de pruebas serológicas fiables. Anteriormente era una enfermedad rara que afectaba a pacientes con alguna enfermedad que producía alteración de la inmunidad celular y en la actualidad es la micosis sistémica más frecuente en los pacientes inmunosuprimidos como en el SIDA (4). Sin embargo, un gran número de meningitis criptocócicas se producen en pacientes sin anomalías inmunológicas ni metabólicas de base (4).

En el Perú y en nuestro medio todos los casos reportados y estudiados de criptococosis están relacionados con pacientes que presentan SIDA (17,18,19). En el estudio realizado por Rodríguez y Trigo (1992) encontraron que el 28,5% de muertes de pacientes con SIDA en el Hospital Daniel Alcides Carrión se debió a la criptococosis; sin embargo, dado a que se ha encontrado la existencia saprofítica y la alta patogenicidad de este hongo, constituye una amenaza tanto para niños y adultos inmunocompetentes. Siendo pocos los trabajos de investigación realizados con *C. neoformans* a nivel de laboratorio, dentro de estos tenemos el estudio realizado por Canelo y cols (1999), sobre la determinación de la variedad de *C. neoformans* aislado de un paciente con SIDA y el estudio realizado por Rea (1995) sobre el efecto antimicótico del aceite de *Allium sativum* en la criptococosis inducida en *Mus musculus* var albinus, sin embargo no existen investigaciones para evaluar las alteraciones histopatológicas y los niveles de anticuerpos en la criptococosis inducida en *Mus musculus* BALB/c (18,20,21).

El presente estudio tuvo los siguientes objetivos: Evaluar las alteraciones histopatológicas, evaluar los niveles de Ig G mediante la prueba de ELISA y determinar la relación que existe entre estos, en la Criptococosis inducida en *Mus musculus* BALB/c a diferentes tiempos de infección.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico:

45 especímenes de *Mus musculus* (BALB/c) de ambos sexos, 45 días de nacidos y 25 g de peso, obtenidos del bioterio de la Univ.P. Cayetano Heredia

✍ Cultivo de *Cryptococcus neoformans*, obtenido del Laboratorio del Hospital Regional Docente de Trujillo.

Métodos:

Determinación de la especie de *C. neoformans*: *C. neoformans* fue confirmada mediante las siguientes pruebas:

Crecimiento en Agar Sabouraud a temperatura ambiente.

Crecimiento en medio selectivo para *C. neoformans* propuesto por Shields Ajello y Staib Seeling modificado por Arellano, presencia de cápsula; de ureasa; asimilación de KNO_3 ; desarrollo en agar sabouraud a 37 ° C; patogenicidad: Inoculación intracraneal en ratones (Anexo Fig. 2) (1,22,21,23).

Distribución del material biológico

Se verificó que los ratones se encuentran libres de infección por *C. neoformans*, mediante la prueba de tinción negativa con nigrosina en muestras de cerebro y pulmones de 5 ratones seleccionados al azar. Luego a los 40 ratones restantes se les distribuyó en dos grupos: Un grupo experimental y un grupo control seleccionados al azar, manteniéndose en las mismas condiciones de alimentación.

Grupo experimental: Conformado por 20 ratones distribuidos en cuatro subgrupos de 5 ratones cada uno, seleccionados al azar. Para evaluar el daño histopatológico y la presencia de IgG específico a los 10, 15, 20, y 25 días de infección.

Grupo control: Conformado por 20 ratones distribuidos en cuatro subgrupos de 5 ratones cada uno, correspondiente a los días 10, 15, 20 y 25 tal como fueron evaluados los ratones del grupo experimental.

Preparación del inóculo : Se preparó a partir de un cultivo de *C. neoformans* en

Agar Sabouraud incubado a 37 ° C durante 72 horas, al cabo de los cuales fueron cosechados con SSF estéril, hasta obtener una turbidez semejante al tubo 3 del Nefelómetro de Mac Farland (21).

Inoculación: A cada uno de los ratones del grupo experimental se les inoculó 0.5 mL de la suspensión de *Cryptococcus neoformans* por vía intraperitoneal (Anexo, Fig. 3); y a los ratones del grupo control se les inoculó 0.5 mL de SSF por vía intraperitoneal.

Evaluación : A cada uno de los grupos que correspondieron a los días 10, 15, 20 y 25 después de inoculados se los evaluó en base a:

1. Determinación de niveles de inmunoglobulinas G (Ig G)

2. Obtención de Suero: Se extrajo sangre por punción cardiaca de los ratones previamente anestesiados con cloroformo (Anexo, Fig. 4). El suero fue obtenido por centrifugación a 3 000 rpm por 20 minutos.

3. Detección y determinación de los títulos de IgG anticriptocócico: La detección y determinación de los títulos de IgG anticriptocócico tanto del grupo experimental como del grupo control se realizó mediante la prueba de ELISA.

Grupo Experimental:

Para la detección y determinación de los títulos de IgG se siguió el siguiente protocolo.

Obtención del antígeno

Se realizó una suspensión densa de *Cryptococcus neoformans* en formol al 5 %, y luego se le aplicó tratamiento térmico a 56 °C durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 2 500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo el sedimento (Kaufman y cols, 1994).

Sensibilización de la placa

Preparación del antígeno

A partir del sedimento obtenido en el paso anterior, se realizó una suspensión en buffer carbonato-bicarbonato 0,2M pH 9,8 a una concentración semejante al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland.

Sensibilización de la placa

Se distribuyó 100 L de la suspensión de Ag en cada pocillo de la placa de ELISA. Se recubrió la placa con una hoja autoadherible y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se dejó en incubación a 4°C para facilitar la adherencia de los antígenos al poliestireno.

Lavado de los pocillos

Luego se eliminó la solución sensibilizante y se lavó 1 vez con PBS.

Bloqueo de las zonas reactivas de la placa

a) Cada uno de los pocillos de la placa fue saturado con 100 L de una solución de gelatina al 0,5 % y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Lavado de los pocillos

Se descartó la solución bloqueadora y se enjuagó 3 veces con PBS-tween₂₀ al 0,1%, cada lavado con un tiempo de cinco minutos y en agitación constante.

Preparación de los sueros

A partir de los sueros correspondientes a los 10, 15, 20 y 25 días de infección se preparó diluciones (1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80/ 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280) en PBS-tween-gelatina

Se distribuyó 100 L de cada dilución en los pocillos

Los dos últimos pocillos de cada hilera corresponden a control positivo (suero de ratón a los 20 días de infección) y control negativo (suero de ratón no infectado)

Se cubrió la placa con una hoja autoadherible y se incubó a 37 °C durante 1-2 horas.

Se lavó las placas 5 veces con PBS-tween₂₀ al 0,1%

Detección del complejo Antígeno-Anticuerpo

Se distribuyó 100 L de la solución al 1/100 del conjugado anti Ig G de ratón-enzima (fosfatasa alcalina) en PBS-tween-gelatina

Se cubrió la placa e incubó a 37 °C durante 1-2 horas

Se lavó la placa 5 veces con PBS-tween₂₀

Se distribuyó 100 L del sustrato (paranitrofenilfosfato PNP disuelto en buffer glicina 9,8)

Se incubó durante 10 a 30 minutos

Se detuvo la reacción con 50 µl de NaOH 3N

Se realizó la lectura.

Grupo Control

Para la detección y determinación de los títulos de IgG anticriptocócico del grupo control se siguió el mismo procedimiento que para el grupo experimental, siendo los pasos A, B, C, y E similares, variando el paso D.

D. Preparación de los sueros

a) A partir de los sueros correspondientes a los ratones no infectados en los días 10, 15, 20, y 25, se preparó diluciones (1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80/ 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280) en PBS-tween-gelatina. Se distribuyó 100 L de cada dilución en los pocillos. Los dos últimos pocillos de cada hilera corresponden a control positivo (suero de ratón a los 20 días de infección) y control negativo (suero de ratón sin infección). Se cubrió la placa con una hoja autoadherible y se incubó a 37 °C durante 1-2 horas. Se lavó las placas 5 veces con PBS-tween₂₀ al 0,1%.

Estudio histopatológico

Luego de extraer la sangre por punción cardíaca, se sacrificaron y disectaron los ratones y se extrajeron los siguientes órganos: Pulmón, hígado, bazo, riñón y encéfalo. Se realizó una evaluación macroscópica y luego se tomó una muestra para sembrar en agar Sabouraud y agar BHI y para observación microscópica con nigrosina al 10% (Anexo, Fig. 2 y 5), el resto fue fijado con formol al 10% para realizar cortes histológicos y coloración Hematoxilina eosina (HE), la evaluación de las alteraciones histopatológicas fue realizada por un médico patólogo. Toda la experiencia fue realizada bajo estrictas medidas de bioseguridad (Anexo, Fig. 6).

Tratamiento estadístico

Se realizó el análisis estadístico mediante las pruebas de correlación de Pearson y la prueba Chi cuadrado. Se usó el paquete estadístico SPSS versión 10.1.

RESULTADOS

C. neoformans se confirmó por su morfología y crecimiento en Agar sabouraud a T° ambiental y a 37 °C; producir ureasa, no asimilar el nitrato de potasio y matar al ratón luego de la inoculación intracraneal y presentar cápsula (Anexo, Fig. 1).

En la evaluación macroscópica de encéfalo, pulmón, bazo, hígado y riñón (Tabla 1, 2, 3, y 4) se encontró que en relación a los órganos del grupo control, los órganos de los ratones del grupo experimental presentaron cambios tales como: Aumento de tamaño de encéfalo, pulmón, bazo, hígado y riñón, se observó hepatomegalia y esplenomegalia (Fig. 1), cambios de color, hemorragia y abscesos en riñón e hígado (Fig. 2).

Las alteraciones en encéfalo tenemos: Infiltrado inflamatorio crónico (Fig. 4), hiperemia (Fig. 5), colonias de *Cryptococcus* (Fig. 6); en pulmón: Zonas hemorrágicas (Fig. 8), granuloma (Fig. 9), tejido con abundantes *Cryptococcus* con gran cápsula (Fig. 10); en bazo tenemos: Hiperplasia de megacarioblastos (Fig. 12), cápsula engrosada con *Cryptococcus* (Fig. 13) y células reticulares con material fagocitado (Fig. 14); en hígado tenemos granuloma y necrosis (Fig. 16) y en riñón

Cryptococcus en zona perirrenal (Fig. 17), estas alteraciones se compararon con cortes histológicos de los órganos de los ratones del grupo control (Fig. 3, 7, 11, y 15).

La tabla 9 muestra el grado de infección de los diferentes órganos en relación al tiempo de infección con *Cryptococcus neoformans*. No se detectaron IgG anticriptocócico en los ratones del grupo control (Tabla 10 y Fig. 23 y 24) y en los ratones del grupo experimental fueron detectados a los 10, 15, 20 y 25 días de infección, encontrándose títulos de 80, 320, 160 y 160 respectivamente (Tabla 10 y Fig. 23 y 25), demostrando un máximo a los 15 días de infección con *C. neoformans* y luego disminuye a partir de los 20 días.

Se realizó la prueba de correlación de Pearson y se encontró que es altamente significativo, con un nivel de significancia del 0,01, es decir, que el tamaño está en relación con el tiempo de infección (Anexo, Tabla 2). Y se empleó la prueba de Chi cuadrado para determinar la relación de dependencia entre los niveles de alteración histopatológica y los niveles de Ig G, se encontró que existe dependencia entre estos (Anexo Tabla 3).

TABLA 1. Parámetros evaluados en el estudio macroscópico de encéfalo, pulmones, bazo, hígado y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 10 días de infección con *Cryptococcus neoformans*.

Parámetros	Órganos									
	Encéfalo		Pulmón		Bazo		Hígado		Riñón	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Tamaño en longitud (cm)	1	1	1,5	1,7	1,7	2,0	2,5	2,5	0,9	1,0
Color	Crema brillante	Crema brillante	Blanco	Blanco rojizo	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso
Hemorragias	-	-	-	Si	-	-	-	-	-	-
Abscesos	-	-	-	-	-	-	-	Si	-	-

C = Grupo control

E = Grupo experimental

TABLA 2. Parámetros evaluados en el estudio macroscópico de encéfalo, pulmones, bazo, hígado y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 15 días de infección con *Cryptococcus neoformans*.

Parámetros		Órganos									
		Encéfalo		Pulmón		Bazo		Hígado		Riñón	
		C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
tamaño	en	1	1	1,5	1,9	1,7	2,2	2,5	3,0	0,9	1,2
(cm)											
Color		Crema brillante	Crema rojizo	Blanco	Blanco rojizo	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso	Rojo vinoso
Hemorragias		-	Si	-	Si	-	Si	-	Si	-	Si
Abscesos		-	-	-	-	-	-	-	Si	-	-

C = Grupo control

E = Grupo experimental

TABLA 3. Parámetros evaluados en el estudio macroscópico de encéfalo, pulmones, bazo, hígado, y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 20 días de infección con *Cryptococcus neoformans*.

Parámetros		Órganos									
		Encéfalo		Pulmón		Bazo		Hígado		Riñón	
		C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Tamaño	en	1	1,2	1,5	2,0	1,7	2,2	2,5	3,0	0,9	1,2
longitud	(cm)										
Color		Crema brillante	Crema rojizo	Blanco	Crema rojizo	Rojo vinoso	Rojo oscuro	Rojo vinoso	Rojo oscuro	Rojo vinoso	Rojo oscuro
Hemorragias		-	Si	-	Si	-	Si	-	Si	-	Si
Abscesos		-	-	-	-	-	-	-	Si	-	Si

C = Grupo control

E = Grupo experimental

TABLA 4. Parámetros evaluados en el estudio macroscópico de encéfalo, pulmones, bazo, hígado, y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 25 días de infección con *Cryptococcus neoformans*.

Parámetros		Órganos									
		Encéfalo		Pulmón		Bazo		Hígado		Riñón	
		C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Tamaño	en	1	1,5	1,5	2,5	1,7	2,5	2,5	3,5	0,9	1,2
longitud	(cm)										
Color		Crema brillante	Crema rojizo	Blanco	Crema rojizo	Rojo vinoso	Rojo oscuro	Rojo vinoso	Rojo oscuro	Rojo vinoso	Rojo oscuro
Hemorragias		-	Si	-	Si	-	Si	-	Si	-	Si
Abscesos		-	-	-	-	-	-	-	Si*	-	Si

C = Grupo control

E = Grupo experimental

* = Numerosos abscesos.

FIG. 1. Aumento de tamaño del bazo (esplenomegalia) de *Mus musculus* BALB/c a los 10 (b), 15 (c), 20 (d), y 25(e) días de infección con *C. neoformans* comparado con uno no infectado (a)



TABLA 5. Alteraciones histopatológicas de encéfalo, pulmón, bazo, hígado y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 10 días de infección con *Cryptococcus neoformans*.

ORGANOS	ALTERACIONES
ENCÉFALO	
MENINGES	Infiltración inflamatoria crónica
CEREBRO	Edema de parénquima de corteza cerebral
PULMÓN	- Zonas de hemorragias, acúmulo de <i>Cryptococcus</i> en el vértice de los lóbulos - Infiltración inflamatoria crónica - Tendencia a formar granulomas
BAZO	Hiperplasia de nódulos linfáticos y de megacarioblastos
HÍGADO	Algunos focos de necrosis
RIÑÓN	Tejido adiposo perirrenal con hemorragia, necrosis de corteza subcapsular.

TABLA 7. Alteraciones histopatológicas de encéfalo, pulmón, bazo, hígado y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 20 días de

ORGANOS	ALTERACIONES
ENCEFALO	
MENINGES	Hiperemia, infiltración inflamatoria crónica, infiltración crónica granulomatosa.
CEREBRO	Edema, hiperemia en corteza cerebral, necrosis y hemorragia, abundantes <i>Cryptococcus</i> .
PULMÓN	Zonas con infiltración inflamatoria crónica, abundantes <i>Cryptococcus</i> .
BAZO	Cápsula engrosada con infiltración inflamatoria crónica, acúmulos de <i>Cryptococcus</i> , hiperplasia en nódulos linfáticos.
HÍGADO	Múltiples focos de necrosis, gruesos tabiques fibrosos con infiltración inflamatoria crónica, abundantes <i>Cryptococcus</i> .
RIÑÓN	Cápsula engrosada con infiltración inflamatoria crónica, necrosis en parénquima subcapsular, abundantes <i>Cryptococcus</i> .

FIG. 5. Corte histológico de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. Neoformans*

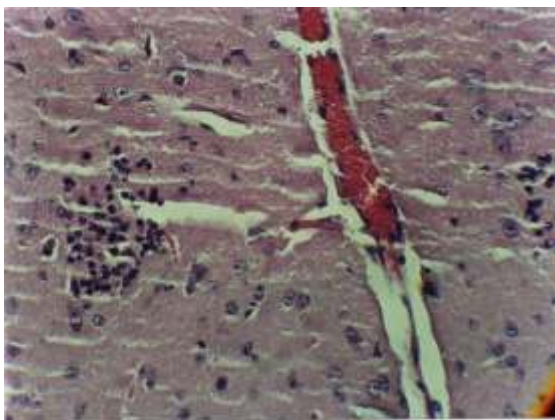


FIG 2. Hígado de *Mus musculus* BALB/c mostrando los abscesos (flechas) a los 25 días de infección con *C. Neoformans*.



TABLA 6. Alteraciones histopatológicas de encéfalo, pulmón, bazo, hígado y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los 15 días de infección con *Cryptococcus neoformans*.

ORGANOS	ALTERACIONES
ENCÉFALO	
MENINGES	Hiperemia, infiltración inflamatoria crónica con algunos <i>Cryptococcus</i> .
CEREBRO	Necrosis en parénquima de corteza cerebral, hemorragia, colonia de <i>Cryptococcus</i> en forma bilateral.
PULMÓN	Densa infiltración inflamatoria crónica en alvéolos e intersticio, abundante <i>Cryptococcus</i> en ganglios hiliares.
BAZO	Necrosis en parénquima, hiperplasia de megacarioblastos, proliferación de linfocitos y reticulocitos con material fagocitado.
HÍGADO	Algunos focos de necrosis, infiltración inflamatoria crónica, tendencia a formar pequeños granulomas, dilatación de capilares sinusoides, acúmulo de <i>Cryptococcus</i> .
RIÑÓN	Necrosis en parénquima subcapsular y corticomedular, infiltración inflamatoria crónica en cápsula y presencia de <i>Cryptococcus</i> .

TABLA 8. Alteraciones histopatológicas de encéfalo, pulmón, bazo, hígado y riñón de *Mus musculus* BALB/c a los

ORGANOS	LESIONES
ENCEFALO	
MENINGES	Hiperemia, infiltración inflamatoria crónica, aumento de fibroblastos y <i>Cryptococcus</i> .
CEREBRO	Infiltración inflamatoria crónica perivascular, abundantes <i>Cryptococcus</i> .
PULMÓN	Zonas con infiltración inflamatoria crónica granulomatosa, abundantes <i>Cryptococcus</i> .
BAZO	Cápsula engrosada, hiperplasia de nódulos linfáticos, tejido circundante con abundantes <i>Cryptococcus</i> .
HÍGADO	Múltiples focos de necrosis e infiltración inflamatoria crónica, tendencia a formar granulomas, gruesos tabiques, abundantes <i>Cryptococcus</i> .
RIÑÓN	Tejido adiposo y cápsula con infiltración inflamatoria crónica, necrosis en parénquima, necrosis en médula, abundantes <i>Cryptococcus</i> .

FIG. 6. Corte histológico de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans* mostrando: C =

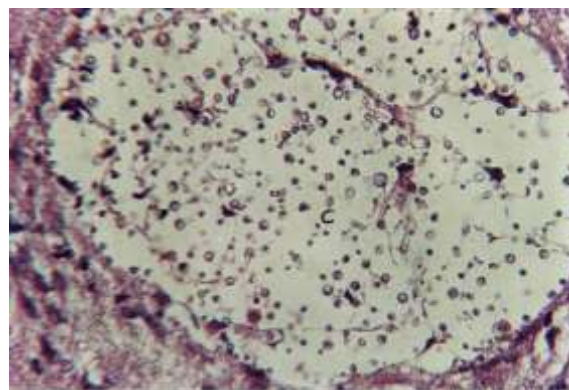


FIG. 7. Corte histológico de pulmón de *Mus musculus* BALB/c no infectado con *C. neoformans*. Coloración H.E. 40X

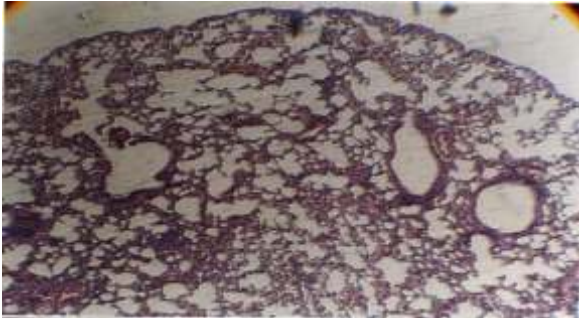


FIG. 9. Corte histológico de pulmón de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando: Granuloma. Coloración H.E. 40 X

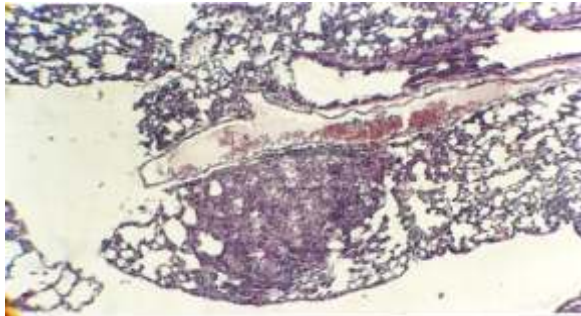


FIG. 11. Corte histológico de bazo de *Mus musculus* BALB/c no infectado con *C. neoformans*. Coloración H.E. 40 X

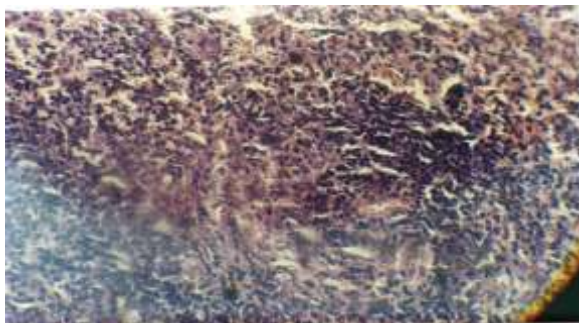


FIG. 13. Corte histológico de bazo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando cápsula engrosada con *Cryptococcus*. Coloración H.E. 40 X

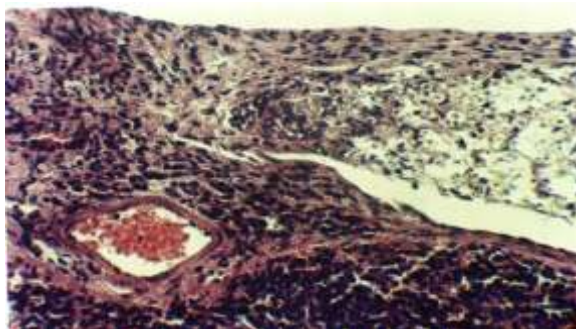


FIG. 8. Corte histológico de pulmón de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*; mostrando ZH: zona hemorrágica. Coloración H.E. 40 X.

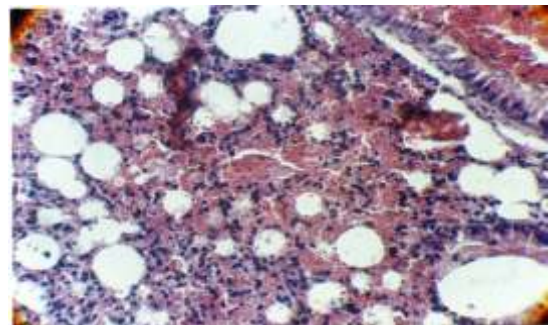


FIG. 10. Corte histológico de pulmón de *Mus musculus* BALB/c mostrando: Cn: *C. neoformans* con una gran cápsula. Coloración H.E. 100X

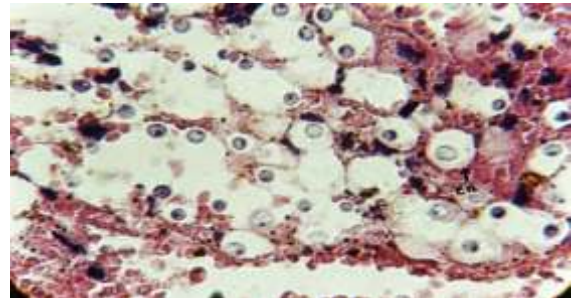


FIG. 12. Corte histológico de bazo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando Hiperplasia de megacarioblastos. Coloración H.E. 40 X

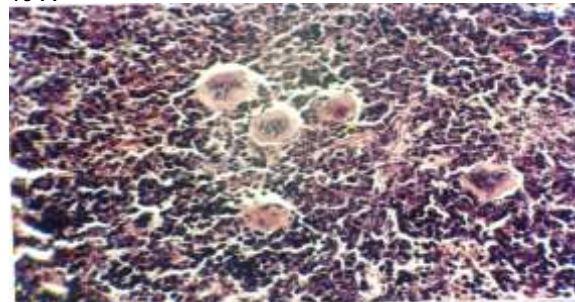


Fig. 14. Corte histológico de bazo de *Mus musculus* BALB/c con *C. neoformans*, células reticulares con material fagocitado en su citoplasma. Coloración H.E. 100 X

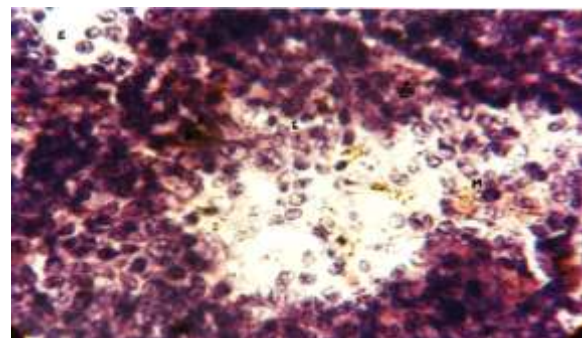


FIG. 15. Corte histológico de hígado de *Mus musculus* BALB/c no infectado con *C. neoformans*. Coloración H.E. 40X.

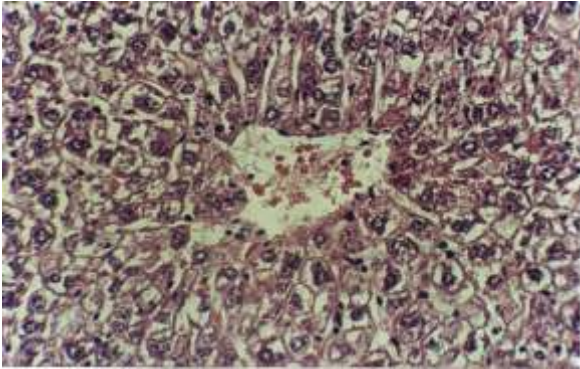


FIG. 16. Corte histológico de hígado de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando: N: necrosis; G: granuloma. Coloración H.E. 40 X.

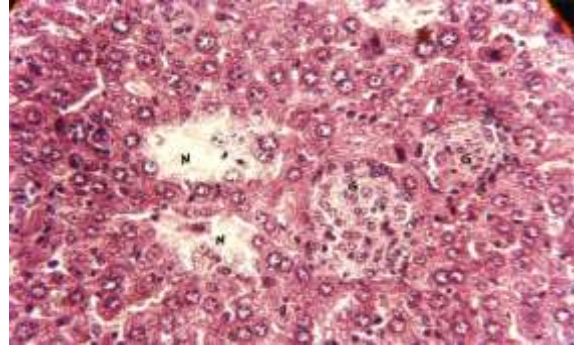


FIG. 17. Corte histológico de riñón de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando al hongo encapsulado a nivel de tejido adiposo perirrenal. Coloración H.E. 40X.

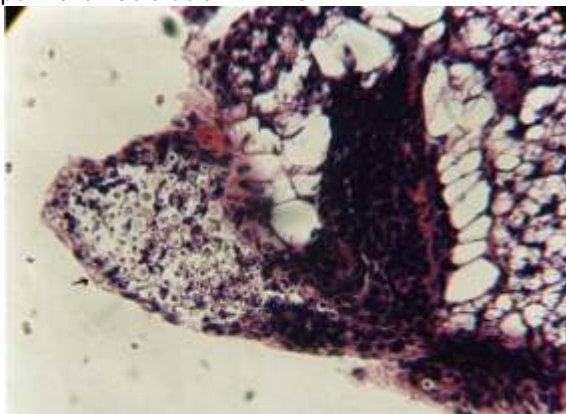


TABLA 9. Grado de infección de los diferentes órganos en relación al tiempo de infección en la criptocosis inducida en *Mus musculus* BALB/c.

DÍAS	ORGANOS				
	ENCÉFALO	PULMÓN	BAZO	HÍGADO	RIÑÓN
0	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-
15	++	++	+	++	+
20	+++	++	++	+++	++
25	+++	+++	+++	+++	+++

1 10 levaduras por campo: +
10 20 levaduras por campo: ++

FIG. 18. Corte histológico de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c no infectado con *C. neoformans*. Coloración H.E. 40 X.

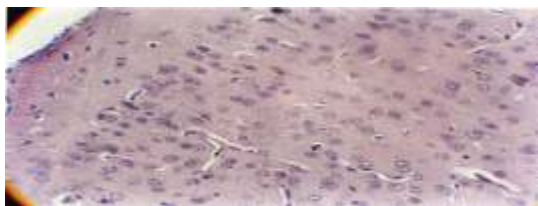


FIG. 19. Corte histológico de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. Neoformans*,

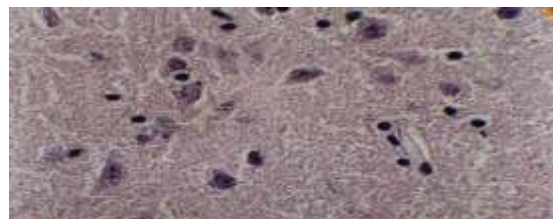


FIG. 20. Corte histológico de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando el grado de infección (++) a los 15 días de infección. Coloración H.E. 100X.



FIG. 21. Corte histológico de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c infectado con *C. neoformans*, mostrando el grado de infección (+++) a los 20 días de infección. Coloración H.E. 100X

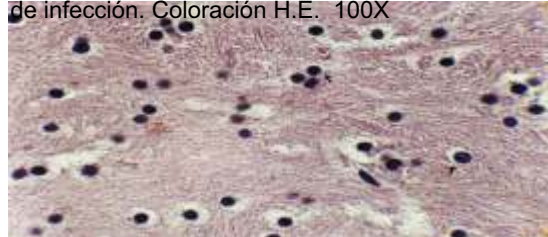


TABLA 10. Título de Ig G anti *Cryptococcus neoformans* en el grupo control y grupo experimental de *Mus musculus* BALB/c en

TÍTULO	10	20	40	80	160	320	640
GRUPO CONTROL	-	-	-	-	-	-	-
EXPERIMENTAL							
10 DÍAS				+			
15 DÍAS						+	
20 DÍAS					+		
25 DÍAS					+		

FIG. 24. Determinación del título de Ig G anticriptocócico a diferentes diluciones, a partir de sueros obtenidos de *Mus musculus* BALB/c del grupo control, mediante la prueba de ELISA.



FIG. 23. Título de Ig G anti *C. neoformans* en los ratones del grupo control (A) y del grupo experimental (B) de *Mus musculus* BALB/c en relación al tiempo de infección, mediante la prueba de ELISA.

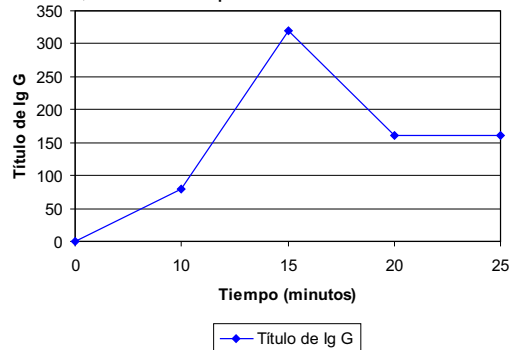
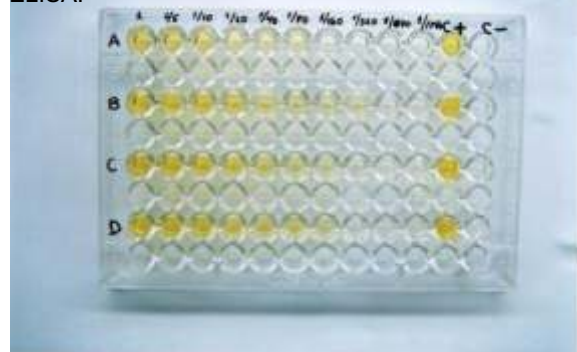


FIG: 25. Determinación del título de Ig G anticriptocócico a diferentes diluciones, a partir de sueros obtenidos de *Mus musculus* BALB/c del grupo experimental a diferentes tiempos de infección con *Cryptococcus neoformans*. Mediante la prueba de ELISA.



DISCUSION

C. neoformans en humanos puede causar lesiones variadas desde micosis superficiales hasta micosis profundas de gran variedad. Se presentan lesiones en piel, pulmones, mucosas, riñones, hígado, cerebro y meninges (4, 11). Macroscópicamente, se distinguen dos clases de lesiones principalmente: Focos de tamaño variable que presentan aspecto gelatinoso, se observan masas mucoides sobre todo en las leptomeninges, pero también pueden encontrarse en el encéfalo y en otros órganos. En esta clase de lesiones se presentan numerosas células fúngicas; Granulomas y focos nodulares que alcanzan varios centímetros de diámetro y que son de aspecto tumoral. En

focos grandes se llaman criptococomas. En estos nódulos, de color grisáceo-blanquecino, las células fúngicas son más bien escasas (4). Microscópicamente se observan: Una proliferación histiocitaria o una reacción celular más bien escasa o poco característica a nivel de las lesiones macróscopicamente gelatinosas y de aspecto mucoso que tienen numerosas células capsuladas. Una reacción granulomatosa en los focos sólidos o nodulares con pocos hongos. En estos focos pueden formarse tubérculos que no se distinguen de los granulomas que se ven en la tuberculosis (26,27). *C. neoformans* es patógeno para el ratón (*Mus musculus* BALB/c).

Si se inyecta por vía intraperitoneal produce masas gelatinosas en el mesenterio y en el cerebro y ocasiona la muerte de los animales en 3 o 4 semanas (1,27).

Esto concuerda con lo observado en la presente investigación, en la que se observó cambios macroscópicos en encéfalo, pulmones, bazo, y riñones, tal como se describe en las Tablas 1, 2, 3, y 4. Estos cambios como aumento de tamaño, pueden deberse a la producción de masas gelatinosas en los órganos, sin embargo, el cambio de tamaño en encéfalo y pulmones es mínimo (Tablas 1, 2, y 3) y según Gutiérrez (2000), se debe a que hay ocupación de los espacios por parte de los *Cryptococcus*, observándose en estos órganos solo cambio de consistencia y cambio de color. El cambio de color a un tono rojizo hemorrágico presentado en el encéfalo puede deberse a que se presentan hemorragias debido al aumento de la presión intracraneana. En relación a la presencia de abscesos estos se deben a la acumulación y/o establecimiento del hongo (27).

El cambio de color a un tono más oscuro observado en hígado y bazo, no concuerda con lo reportado por Rea (1995) quien describe que en la cryptococosis experimental en ratones, estos órganos se vuelven hipocrómicos. Las alteraciones histopatológicas que se muestran en las Tablas 5, 6, 7, y 8 observadas en los ratones del grupo experimental son semejantes a las reportadas para cryptococosis humana. Así tenemos que en casos humanos se presenta un proceso infeccioso granulomatoso con escasas células gigantes multifocal en pulmón, bazo, meninges y tejido nervioso con abundantes levaduras rodeadas de un halo mucoso (3).

Gutiérrez (2000), y Pérez y Carrasco (2000) afirman que la reacción inflamatoria en esta infección es variable de unos pacientes a otros. Y si se presenta respuesta inflamatoria pueden participar células multinucleadas gigantes (con decenas de *Cryptococcus* fagocitados), macrófagos (con o sin fagocitosis de elementos micóticos), linfocitos, células plasmáticas y leucocitos neutrófilos que típicamente son poco

numerosos ya que salvo en los abscesos, las lesiones no suelen ser supurativas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los que se observa reacción inflamatoria de tipo crónica y tipo crónica granulomatosa (28).

La tabla 9 muestra el grado de infección de acuerdo al número de levaduras por campo, presentes en los diferentes órganos; En el cual se observa que al inicio de la infección hay pocas levaduras en cada órgano, pero estas van aumentando a medida que transcurre el tiempo de infección, a los 25 días está completamente invadido por la levadura, esto a pesar que no se utilizó ningún inmunosupresor. Esto podría ocurrir porque la cantidad de levaduras vence la resistencia natural del huésped y la invade completamente, resultando en micosis sistémica, o porque los productos que constituyen la cápsula (glucuronoxilomanano y galactoxilomanano) previenen la migración de los leucocitos a los sitios de inflamación aguda, inducen supresión de los linfocitos T y supresión de la respuesta de los anticuerpos anticriptococos (8), y según Kawahami, *C. neoformans* infecta los pulmones a través de la vía aérea y causa lesiones granulomatosas, que previenen la diseminación del microorganismo fuera de los sitios de infección primaria. Sin embargo, la infección puede diseminarse vía hematogena al sistema nervioso central y que la defensa del huésped contra este patógeno fúngico es regulado por inmunidad mediada por células y las células CD4 y T juegan un rol central en la limitación de la infección. El balance entre citocinas Th1 y Th2 influye marcadamente en el resultado de la infección, la síntesis predominante de citosina Th1 sobre Th2 protege a los ratones contra esta infección, mientras que la infección es exacerbada bajo la dominancia de Th2 y además propone el rol de las NKT (Células T Natural Killer) en la respuesta contra la infección criptocócica. La virulencia de *C. neoformans* depende en parte de la cápsula polisacárida. Las interrelaciones que puedan existir entre la virulencia del hongo y las características de la cápsula con la respuesta inflamatoria tisular que provoca, deben encontrarse

modificados por el estado de inmunodeficiencia del huésped y además el suero humano normal inhibe el crecimiento de *C. neoformans* y la encapsulación viene a representar la expresión de una forma de resistencia (12,28). Esto concuerda con lo observado en nuestra experiencia ya que a los ratones no se les administró ningún inmunosupresor, y se observó una considerable cápsula en los diferentes órganos infectados.

Se observa un mayor daño al encéfalo, lo que coincide con la literatura, lo cual se explica por la ausencia de factores anticriptocócicos solubles y de activación del complemento en el LCR, la escasa respuesta inflamatoria en el encéfalo y los altos niveles de dopamina dentro del SNC que favorecen la infección en este nivel (3).

En relación a la producción de anticuerpos Mendoza y Arias (1999); Rose y cols (1993) sostienen que durante la infección criptocócica los anticuerpos no son formados, pero si se producen lo hacen en bajos títulos y pueden opsonizar los criptococos, convirtiéndose en los gatillos de mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. El nivel de IgG en ratones del grupo experimental fue mayor a los 15 días (título 320) y luego disminuyó a 160 a los 20 y 25 días (Figuras 22 y 24).

⁷Esto concuerda con Rose y cols (1983), quienes afirman que al principio del curso de la criptocosis, las pruebas serológicas ⁸demostraron anticuerpos pero no antígenos. Con el progreso de la enfermedad, hay una ⁹rápida multiplicación de las células de levaduras, con gran producción de antígeno capsular que neutraliza al anticuerpo. Además concuerda con Parra y cols (2001) quienes trabajando con modelos murinos, encontraron en cepas de ratones BALB/c y

CONCLUSIONES

El *C. Neoformans* en *Mus musculus* BALB/C produce criptocosis sistémica con compromiso de encéfalo, pulmones, bazo, hígado, riñones, páncreas y ganglios linfáticos, cuyos cambios macroscópicos y alteraciones histopatológicas varían en relación al tiempo de infección.

ratones C57BL/6 similar respuesta. Estos hallazgos difieren con Chinchilla (2002) que encontró una mayor producción de Ig G a los 8 días de infección y disminuye en el día 13.

En la presente investigación se encontró que la relación entre las alteraciones histopatológicas y los niveles de Ig G es inversa, mientras mayor es el daño histológico (Tabla 5, 6, 7, y 8) y mayor la cantidad de levaduras (Tabla 9) son menores los niveles de Ig G. Por lo tanto mientras mayor es el tiempo de infección transcurrida, los niveles de Ig G van disminuyendo. Este conocimiento adquiere importancia en el diagnóstico de la criptocosis. La prueba de ELISA es una propuesta para la detección temprana de anticuerpos de tipo Ig G contra la cápsula (glucoronoxilomanano o GXM), tal como lo reportan Parra y cols (2001) en su investigación con modelos murinos. Esto en comparación con el estudio realizado por López y Castañón-Olivares (1996) que reportan la detección y cuantificación del antígeno criptocócico como prueba sensible (83,3 %) pero que no se puede correlacionar clínicamente (29).

Además, por la importancia de esta enfermedad es necesario aumentar las oportunidades diagnósticas, razón por la cual se propuso ²implementar el presente estudio con el objeto de relacionar el daño histopatológico y los niveles de IgG en *Mus musculus* ²BALB/c empleándose la prueba de ELISA para la detección y determinación de los ²títulos de IgG, en la cual se fijó a la placa como antígeno al hongo capsulado de naturaleza polisacárida a diferencia de otros procedimientos de la prueba de ELISA que fija antígeno soluble y de naturaleza proteica.

C. neoformans induce la producción de anticuerpos Ig G en *Mus musculus* BALB/C, obteniéndose un máximo a los 15 días y disminuyendo el a los 20 días de infección. A mayor tiempo de infección las alteraciones histopatológicas son mayores y los niveles de Ig G disminuyen.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ZAPATER, R. C. 1981. Micología Médica. Edit. Ateneo. Argentina
2. ALVAREZ, I; J. VELÁSQUEZ; J.PONCE Y J. GAYA. 2001 Criptococosis Infantil: Presentación de 3 casos . Revista Cubana de pediatría. 73(1): 55-59.
3. ILLNAIT, Z, M; G.M. MARINEZ Y C.A.FERNÁNDEZ.1998. Obtención de inmunoglobulina G anti *Cryptococcus neoformans* . Rev. Cubana . Med. Trop. 50(1): 27-30
4. MARTÍN, E. y A. VALVERDE. 1998. Criptococosis: Diagnóstico Microbiológico y Estudio de la Sensibilidad In vitro. Servicio de Microbiología. Hospital universitario de Sevilla.
5. BROOKS, G.; S. MORSE y J. BUTEL. 1999. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16ª Edic. Edit. Manual Moderno. México D. F.
6. KWON, CH.K.1992. Cryptococosis in Medical Mycology. Edit. Lea and Flobiger. London.
7. RESTREPO, A. 1996. Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas 5ª edic. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín Colombia.
8. MENDOZA, L. A. y G. M. ARIAS. 1999. Meningitis Criptocócica en la infancia. Salud UIS. 31(2): 76-85.
9. KIESLING, A. C.; L. GOULART; L. METZCH; A. MEDEIROS; A. ALMEIDA; S. HARTZ; A. S. CHRANK; W. MEYER Y M. HENNING. 2003. Molecular Typing of Clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State. Rio Grande Do Sul. FEMS Yeast Research 1559:1-11
10. KOZEL, T.R. 1993. Activation of the complement system by the capsule
a. of *Cryptococcus neoformans* . Curr Trop Med Mycol, 5: 1-26.
11. LOBOS, M. T. 1997. Laboratorio de Micología. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile; 26: 165-168.
12. MONACO, L. S. ; N.F. SILVA; E. WARLEY Y M.R. CERVELLI. 2001. Criptococosis Meningea Asociado al SIDA en el Hospital Diego Paroisen en periodo de 1996/1998. Rev. Arg. De Microbiología.3 (2): 2-4 .
13. GONZÁLES, N.; N. TORALE Y D. GÓMEZ.1999. Infectología Clínica Pediátrica. 6ª ed. Edit. Trillos. México.
14. PARRA, C. M.; J. M. GONZÁLES; E. CASTAÑEDA; y S. FIORENTINO. 2001. Factores inmunológicos Implicados en la resistencia o susceptibilidad a la infección por *Cryptococcus neoformans* en modelos murinos. Pontificia Universidad Javeriana e Instituto Nacional de salud. En : <http://www.infectio.org/V6n2/resa05.htm>.
15. KAWAHAMI, K. 2002. Role of Natural Killer T Cells in Host Defense Against *Cryptococcus* Infection. Rev. Iberoamericana de Micología, 19: 149 154.
16. KAUFMAN, L.; J. KOVACS; y E. REISS. 1994. Serodiagnosis os Fungal Diseases. En: Rose N. R.; H. Friedman; y E. C. Macario. Manual Of Clinical laboratory immunology. 5ª ed. Edit. American Society For Microbiology. Washington D.C. E. U. A.
17. FERNANDEZ, A; A. PARHUANA; M. VASQUEZ; P. SIMON Y J. CASTRO. 1996. Meningitis criptocócica y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Rev. Anales de la Facultad de Medicina. 57 (2): 98 -102.
18. CANELO, C; A. NAVARRO; M. GUEVARA Y F. URCIA. 1999. Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* aislada en pacientes con SIDA. Revista de medicina Experimental. Vol XVI Nº 1-2.
19. COMUNICACIÓN PERSONAL, realizado con microbiólogos del Hospital Regional Docente de Trujillo y del Hospital Belén de Trujillo.
20. RODRÍGUEZ, J.M. Y M. TRIGOSO. 1992. Causas de muerte en pacientes con SIDA en el Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión. Cirugía Pediátrica. Revista especializada. 10: 33 -34.
21. REA, R.M. 1995. Efecto antimicótico del aceite de *Allium Sativum* en la criptococosis inducida en *Mus musculus* var albinus. Tesis. Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.
22. SHIELDS, A y L. AJELLO. 1966. Medium for Selective Isolation of *Cryptococcus neoformans* . Science. 151:1-8.
23. ARELLANO B. J. 1968. Utilización del *Helianthus annuus* L "girasol" en el Medio de Shields-Ajello y Stalb-Seelinger para el aislamiento selectivo de *Cryptococcus neoformans*. Tesis para obtener el grado de bachiller . Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
24. TERNYINCK, T. y S. AVRAMEAS. 1989. Técnicas de Inmunología: Técnicas Inmunoenzimáticas. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. México D.F.
25. HAY, F.C y O.M.R. WESTWOOD. 2000. Practical Immunology. 4ª ed. Edit Blackwell. Science. London.
26. CONANT, N. F. 1968. Micología. 3ª ed. Edit Interamericana S.A. España.
27. SABETTA, R. Y COLS. 1985. Infección criptocócica del SNC. Infecciones del SNC. Clínicas Médicas Norteamericana. 2: 357-365.
28. GUTIERREZ, N.P. 2001. Elaboración y evaluación de un conjugado enzimático formado por anti Ig G humana producida en *Oryctolagus cuniculus* y fosfatasa alcalina obtenida de *Canis familiaris*. Tesis Biólogo Microbiólogo. Fac. Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
29. LOPEZ, M. R. y L. R. CASTAÑON-OLIVARES. 1996. Estudio Comparativo Mediante Pruebas Inmunológicas y Micológicas Para el Diagnóstico de la Criptococosis Meningea. Rev. Med. Hosp.. gen. Mex; 59 (3): 88-92.

FIG. 1. Pruebas para la determinación de *Cryptococcus neoformans* a) Cultivo en Agar sabouraud a temperatura ambiente: Positivo; b) a 37 °C: Positivo c) Cultivo en Agar Úrea: produce ureasa; d) Cultivo en Caldo Nitrato de Potasio: Negativo; e) Cultivo en Agar Shields Ajello y Staibseeling modificado por Arellano: Forma colonias pardas f) Cultivo en placa de Agar Sabouraud: Forma colonias mucosas y cremas.



FIG. 2. *Cryptococcus neoformans*, mostrando gran cápsula en muestras de encéfalo de *Mus musculus* BALB/c infectados (prueba de patogenicidad).



		TIEMPO DE ESTUDIO					
TIEMPO DE ESTUDIO		ESTUDIO	PULMON	ENCEFALO	BAZO	HIGADO	RIÑON
ESTUDIO	Correlación Pearson	1,000	0,991	0,795	0,078	0,901	,919
	Sig. (2 colas)	.	0,001	0,108	0,004	0,037	0,027
	N	5	5	5	5	5	5
PULMON	Correlación Pearson	0,991**	1,000	0,836	0,985	0,951	0,916
	Sig. (2 colas)	0,001	.	0,078	0,002	0,013	0,029
	N	5	5	5	5	5	5
ENCEFALO	Correlación Pearson	0,795	0,836	1,000	0,797	0,873	0,565
	Sig. (2 colas)	0,108	0,078	.	0,106	0,053	0,321
	N	5	5	5	5	5	5
BAZO	Correlación Pearson	0,978**	0,985	0,797	1,000	0,932	0,899
	Sig. (2 colas)	0,004	0,002	0,106	.	0,021	0,038
	N	5	5	5	5	5	5
HIGADO	Correlación Pearson	0,901*	0,951	0,873	0,932	1,000	0,845
	Sig. (2 colas)	0,037	0,013	0,053	0,021	.	0,071
	N	5	5	5	5	5	5
RIÑON	Correlación Pearson	0,919*	0,916	0,565	0,899	0,845	1,000
	Sig. (2 colas)	0,027	0,029	0,321	0,038	0,071	.
	N	5	5	5	5	5	5