

192

LIBRO DE REGISTRO  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

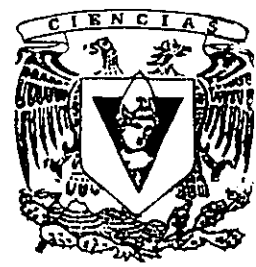
"Aislamiento de *Cryptococcus* spp de  
Importancia médica asociados a  
*Eucalyptus* spp sanos, en Ciudad  
Universitaria, UNAM."

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
**EDITH SANCHEZ PAREDES**

DIRECTORA DE TESIS:  
M. en Med. Trop. LAURA ROCIO CASTANON OLIVARES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
" Aislamiento de Cryptococcus spp de importancia médica asociados a  
Eucalyptus spp sanos, en Ciudad Universitaria, UNAM".

realizado por Sánchez Paredes Edith.

con número de cuenta 9354972-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

*Laura R. Castañón*

Director de Tesis M. en Med. Trop. Laura Rocío Castañón Olivares.  
Propietario

✓ Propietario Biól. Elva Bazán Mora. *Elva Bazán Mora*

✓ Propietario Biól. Rosario Vázquez Bravo. *Rosario Vázquez Bravo*

✓ Suplente M. en C. Efraín Tovar Sánchez. *Efraín Tovar Sánchez*

✓ Suplente M. en C. Rebeca Martínez Flores. *Rebeca Martínez Flores*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M

*Edna María Suárez Díaz*  
Consejo Departamental de Biología  
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

A mis padres por todo su apoyo, amor y comprensión y por enseñarme a valorar todo lo que me ha dado la vida.

A la memoria de un gran hombre que me brindó todo su cariño, que siempre confió y creyó en mí, a mi abuelito Guillermo Sánchez Valerio +.

Estos agradecimientos son para todas aquellas personas e instituciones que directa e indirectamente, hicieron posible la realización de esta tesis.

Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis M. en Med. Trop. Laura Rocío Castañón Olivares, por confiar en mí la realización de ésta investigación. Gracias por su apoyo, dedicación y conocimientos que fueron la base para la realización de este trabajo.

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a mi maestro Dr. Rubén López Martínez, por brindarme su amistad y confianza. Gracias por cada una de sus enseñanzas y por sembrar en mí, el amor y admiración hacia un mundo fantástico, el de..... los hongos.

Este trabajo fue financiado por el apoyo al proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IN-215997 a cargo del Dr. Rubén López Martínez y de la M. en Med. Trop. Laura Rocío Castañón Olivares.

Gracias a DGAPA-UNAM por su apoyo al otorgarme una beca durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Micología Médica y al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM, por darme su apoyo, brindándome asilo durante la realización de esta tesis.

Gracias a la Dra. Francisca Hernández Hernández y a la Dra. Patricia Manzano Gayosso, por el interés y comentarios a mi trabajo que sin duda ayudaron a enriquecerlo y por brindarme todas las facilidades para realizarlo; así como a la Pas.QFB. Erika Córdova Martínez por su amistad, apoyo y consejos.

A la Biol. Elva Bazán Mora, gracias por ser mi guía y la voz de mi conciencia en el mundo de los hongos. Le agradezco sinceramente la amistad que me ha brindado, además de la incalculable ayuda en la elaboración de esta tesis, así como sus excelentes comentarios y sugerencias para que este trabajo fuera mucho mejor, además de agradecerle profundamente su participación como parte del jurado.

Gracias a la Biól. Rosario Vázquez Bravo y a la M. en C. Rebeca Martínez Flores por aceptar ser parte del jurado, por sus comentarios y correcciones a este trabajo que sin duda lo enriquecieron.

Mi más grande agradecimiento y cariño al M. en C. Efraín Tovar Sánchez, por brindarme su enorme ternura y apoyo en todo momento y sobre todo por ser mi gran amigo. Además por sus aportaciones a este trabajo y por su participación en el jurado.

Agradezco al Laboratorio de Micología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en particular al Dr. Luis Javier Méndez Tovar, por su interés en esta tesis y al Sr. Alfredo Carmona Castañón por su valiosa ayuda en la identificación de las cepas de *Cryptococcus*.

Quiero agradecer muy especialmente al M. en C. Rafael Romero, por su disposición para ayudarme siempre que lo necesité, por compartir conmigo sus conocimientos y por su interés en este trabajo. Gracias sobre todo por brindarme su valiosísima amistad y por sus muy amables comentarios que siempre me levantaron el ánimo.

#### **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

¡ **Muchas gracias** a mi papá ! por todo su amor y apoyo que han hecho posible que cada día me supere más y por hacer de mi una mujer de bien.

Para una extraordinaria mujer, mi más profunda admiración y agradecimiento, por su amistad, apoyo, su inmenso amor, por estar conmigo siempre, por ser la estrella que guía mis pasos..... ¡ **Gracias, Mamá ! Te quiero.**

Quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi hermano Memo, por demostrarme y enseñarme que con trabajo, dedicación y constancia se pueden alcanzar todos los sueños.

Le dedico este trabajo y le agradezco a una persona muy especial para mí, ya que me ha brindado su inmenso cariño, paciencia y comprensión, además de ayudarme en la elaboración de este manuscrito. Por estar conmigo en los buenos y malos momentos, ¡ **gracias Rodolfo, te quiero mucho !**

**Gorgojito:** gracias por tu incondicional amor, paciencia y por alegrar cada uno de los días de mi vida.

A la Diseñadora Verónica González, a la Lic. en Admón. Aida Hernández, a Rita, Lucy, Adriana y Maribel por estar conmigo en todo momento apoyándome y dándome todo su cariño. **Gracias amigas.**

Gracias por su gran apoyo, amistad y cariño a mis amigos Biólogos: Esmeralda Morgan, Mónica Ramirez, Claudia Labias, Judith Jiménez, Belinda Victoria, Isabel Balanzario, Patricia López, Beatriz Romero, Gastón Dehesa, Jesús Solano, Xavier Valencia, Rigo, Juan Carlos Martínez, Daniel Degollado, Carlos Chagoya y Guillermo Téllez.

# ÍNDICE

## AGRADECIMIENTOS

### I. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Género *Cryptococcus* (Reseña Histórica)
- 1.2. Géneros *Filobasidiella* y *Filobasidium* (Fase Teleomórfica)
- 1.3. Descripción del Género *Cryptococcus* (Fase Anamórfica)
- 1.4. Características Fisiológicas y Bioquímicas

### II. ANTECEDENTES

- 2.1. Ecología
- 2.2. Criptococosis
- 2.3. Epidemiología

### III. ESTABLECIMIENTO DE HÁBITAT

### IV. GÉNERO *Eucalyptus*

### V. CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM.

### VI PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

### VII. OBJETIVO

- 7.1. General
- 7.2. Particulares

### VIII. METODOLOGÍA

- 8.1. Toma de muestras
- 8.2. Procesamiento de las muestras
- 8.3. Aislamiento de las muestras
  - 8.3.1. Morfología macroscópica.
  - 8.3.2. Morfología microscópica.
- 8.4. Purificación
- 8.5. Identificación
- 8.6. Pruebas bioquímicas y fisiológicas
  - 8.6.1. Producción de seudomicelio
  - 8.6.2. Tubo germinal

- 8.6.3. Agar-chocolate
- 8.6.4. Sensibilidad a la cicloheximida
- 8.6.5. Crecimiento a 37<sup>a</sup> C
- 8.6.6. Zimograma o prueba de fermentación
- 8.6.7. Pigmentación en agar extracto de malta (AEM)
- 8.6.8. Hidrólisis de urea
- 8.6.9. Prueba de asimilación de fuentes de carbono
  - ❖ Método Vitek
  - ❖ Método de Wickerham
- 8.7. Producción de polisacáridos extracelulares
  - 8.7.1. Degradación de gelatina

IX. RESULTADOS

X. DISCUSIÓN

XI. CONCLUSIONES

XII. LITERATURA CITADA

XIII. ANEXOS



## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo de organismos polimorfos y variables en cuanto a sus requerimientos fisiológicos y bioquímicos. Existen hongos unicelulares, como las levaduras y pluricelulares constituidos por hifas que son estructuras flexuosas, cilíndricas con crecimiento apical, generalmente muy ramificadas que se entrelazan y anastomosan para formar el micelio. La célula fúngica desempeña las funciones de respiración, nutrición y reproducción asexual y/o sexual<sup>56, 103</sup>.

Geográficamente se encuentran ampliamente distribuidos, en climas tropicales hasta desérticos, a diferentes latitudes y altitudes. Son capaces de desarrollarse bajo condiciones mínimas de nutrición, pH extremo y crecer como saprobios, simbiontes<sup>89</sup> y parásitos<sup>56</sup>.

Estructuras vegetales como, madera -con oquedades naturales o lesiones provocadas por diversos factores-, hojas, flores (incluyendo el polen y néctar) y frutas, han sido consideradas como el hábitat ideal de las levaduras, debido a su contenido de carbohidratos y humedad principalmente. Por lo anterior, se piensa que las levaduras pueden ser distribuidas entre diferentes plantas durante la polinización y posiblemente participan en la maduración y senescencia del fruto<sup>16,91</sup>.

La mayoría de los hongos de importancia médica para el hombre, son saprobios de plantas, aire y suelo. Por lo que, los micólogos han tenido interés en buscar los reservorios naturales de esos hongos como *Aspergillus* spp, *Absidia* spp y *Rhizopus* spp, que han sido comúnmente aislados del ambiente<sup>1</sup>.

Las enfermedades que pueden ocasionar los hongos a los humanos y otros animales, son conocidas como micosis y son provocadas por especies de micromicetos cuya habilidad de causar daño parece ser un fenómeno circunstancial, ya que si las defensas del huésped no son adecuadas para contra-atacar al microorganismo, lo cual es raro, la infección se establece y progresa<sup>100</sup>.

De acuerdo al grado de profundidad anatómica de las micosis, éstas se clasifican en superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas<sup>14</sup>.

La micosis subcutánea de mayor importancia en nuestro país es la esporotricosis, cuyo agente causal es *Sporothrix schenckii*, el cual ha sido aislado principalmente a partir de material vegetal como paja, zacate, madera, hojas, ramas, espinas, *detritus* y también del suelo<sup>14,40</sup>. Siguiendo con las micosis subcutáneas, el hongo *Fonsecaea pedrosoi* principal agente etilógico de la cromoblastomicosis vive naturalmente, en suelo, vegetales y sobre todo se ha aislado de la madera.

Dentro de los hongos causantes de micosis profundas, se encuentra *Coccidioides immitis*, causante de la coccidiomicosis y asociado con *Larrea-tridentata*, arbusto conocido como la "gobernadora" y propuesto como un reservorio indirecto del agente causal. En el caso de *Histoplasma capsulatum* causante de la histoplasmosis, se ha establecido que las heces de quirópteros y de aves tanto domésticas como migratorias, son su hábitat principal aunque también se ha recuperado de suelo y *detritus* vegetales<sup>14, 100</sup>.

En cuanto a las micosis oportunistas, para adquirirlas, el huésped generalmente debe cursar con un problema de inmunocompromiso, que facilite la entrada y establecimiento del microorganismo, por lo que, la mayoría de los agentes causales no se consideran patógenos primarios, aunque en este tipo de individuos su comportamiento llega a ser bastante agresivo. Entre los factores predisponentes, asociados a la adquisición de una micosis oportunista, podemos citar la *diabetes mellitus*, sobre todo en estadios no controlados o cetoacidóticos, enfermedades hematológicas, neoplasias y SIDA<sup>72, 100</sup>.

La mayoría de los micromicetos causantes de micosis oportunistas son ubicuos y se aíslan con frecuencia de suelo, materia orgánica en descomposición, aire, plantas y son considerados como hongos contaminantes, tal es el caso del género *Aspergillus* spp causante de la aspergilosis, de *Mucor* spp y *Rhizopus* spp que provocan la mucormicosis<sup>56</sup>.

Dentro de este grupo de micosis se encuentra también la criptococosis cuyo principal agente causal es *Cryptococcus neoformans* y en mucho menor frecuencia *C. albidus* y *C. laurentii*. Las especies pertenecientes al género *Cryptococcus* presentan una virulencia inherente muy baja y la gravedad de la enfermedad es inversamente proporcional a la disminución de la inmunidad del huésped<sup>100</sup>. La criptococosis es la cuarta enfermedad más frecuentemente observada en pacientes con SIDA<sup>18, 61</sup>; sin embargo, aún cuando en diversos trabajos se muestran resultados con relación a la clínica, pocos son los estudios enfocados a la epidemiología y por lo tanto a la ecología. Dentro de este último rubro, se ha postulado a una angiosperma como posible nicho ecológico de *C. neoformans* var. *gattii*, aunque por otro lado, no se ha establecido de manera concreta, el hábitat natural y la fuente de contagio del resto de las especies potencialmente patógenas pertenecientes al género *Cryptococcus*.

### **1.1. Género *Cryptococcus* (Reseña Histórica)**

El estado anamórfico del género *Cryptococcus* es unicelular, su reproducción asexual se caracteriza por la producción de blastoconidios simpodiales<sup>35, 59</sup>. En 1833 fue caracterizado el género

*Cryptococcus* por Kützing<sup>52</sup>. En 1894 Sanfelice, aisló una levadura encapsulada de jugo de durazno, la cual inoculó experimentalmente en cobayos y provocándoles lesiones, él nombró a esta levadura *Saccharomyces neoformans*. Al mismo tiempo en Alemania, Busse y Buschke, aislaron al mismo hongo de una lesión en la tibia de una mujer adulta y llamaron al organismo *Saccharomyces* y por lo tanto a la enfermedad *Sacharomycosis hominis*<sup>31</sup>.

En 1895, Curtis aisló una levadura encapsulada, de lesiones lumbares e inguinocrurales en un joven nombrándola *Megalococcus myxoides*. En 1901 Vullemin, estudió la morfología y características de las cepas de Curtis, Busse-Buschke y Sanfelice y comprobó que no tenían la capacidad de formar ascosporas, característica intrínseca del género *Saccharomyces*; por lo que las transfirió al género *Cryptococcus*, dando el nombre de *C. hominis* al aislamiento de Busse-Buschke y Curtis y *C. neoformans* al aislamiento de Sanfelice. Von Hansemann en 1905, fue aparentemente el primero en observar a *C. neoformans* en un caso de meningitis <sup>31</sup>.

Ascher (1945), Mager y Ascher (1947) estudiaron la producción de compuestos amiloides extracelulares o almidón por levaduras capsuladas entre ellas las del género *Cryptococcus* y encontraron que varias cepas de este género elaboran polisacáridos extracelulares<sup>90</sup>.

Skinner en 1950 propuso que la habilidad de fermentación era un criterio taxonómico, en el que las especies fermentativas serían acomodadas en *Torulopsis* y las no-fermentativas en *Cryptococcus*<sup>90</sup>.

Lodder y Kreger-Van Rij (1952) proponen la combinación de la no-fermentación con la habilidad de formar cápsulas y compuestos almidonados para las especies de *Cryptococcus* además ellos aseveran en su diagnóstico de este género, que el pseudomicelio está ausente o es rudimentario, la reproducción es por gemación multipolar, el crecimiento en medio sólido tiene una apariencia viscosa y no existe presencia de pigmentos rojos o amarillos<sup>90</sup>.

*Cryptococcus* y *Rhodotorula* son muy similares en morfología y fisiología, poseen cápsulas y pueden producir pigmento amarillo, rojo o ser hialinas en primoaislamientos de fuentes naturales, tienen forma globosa u ovoide y son afermentativas, por lo que Phaff y Spencer (1969) propusieron incluir en el género *Cryptococcus*, las especies que pueden asimilar inositol como única fuente de carbono y en *Rhodotorula* las que no tienen ésta habilidad<sup>81,90</sup>.

Otra levadura que podría confundirse con *Cryptococcus* es *Lipomyces*, porque presenta cápsula polisacárida, crece a 37°C, pero su carácter distintivo es, que desarrolla ascas<sup>75, 81</sup>. (Cuadro 1).

El género *Cryptococcus* junto con los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*, constituyen la familia Cryptococaceae, del orden Cryptococales, clase Blastomycetes<sup>56</sup>. El género

Cuadro 1. Características diferenciales de algunos géneros de Cryptococcales<sup>81,90,100</sup>.

ESPECIE	PRESENCIA DE MICELIO	PRESENCIA DE CAPSULA	HIDRÓLISIS DE UREA	SENSIBILIDAD A LA CICLOHEXIMIDA	PRESENCIA DE COMPUESTOS CAROTENOIDES		ASIMILACIÓN DE INOSITOL
					UREA	CICLOHEXIMIDA	
<i>Cryptococcus</i> sp	-	+	+	+	+/-	+	+
<i>Rhodotorula</i> sp	-	+/-	+	+/-	+	-	-
<i>Torulopsis glabrata</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-

+ = positivo  
 +/- = variable  
 - = negativo

*Cryptococcus* incluye 17 especies en 6 variedades. Rodríguez de Miranda (1984) acepta 19 especies, con respecto a la asimilación de inositol como una característica estricta del género<sup>101</sup>. Actualmente alrededor de 28 especies están incluidas en el género *Cryptococcus*<sup>45, 52</sup>. Las especies más comunes son: *C. neoformans* (la especie más importante clínicamente), *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. terreus* y *C. uniguttulatus*<sup>52,72,90,100</sup>.

*Cryptococcus neoformans* se ha dividido en dos variedades y cinco serotipos con base a reacciones de aglutinación y precipitación: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D y AD) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C)<sup>35, 41, 66, 67</sup>. Debido a la importancia epidemiológica de *C. neoformans*, Fell (1989) propuso a la cepa de Sanfelice como neotipo del género y especie de esta levadura, que se encuentra depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, con el número CBS 132<sup>52</sup>.

## 1.2. Géneros *Filobasidiella* y *Filobasidium* (Fase Teleomórfica)

El estado sexual del hongo, llamado teleomórfico está caracterizado por la producción de basidiosporas (propágulos sexuales)<sup>59,65,66</sup>.

Algunas especies del género *Cryptococcus* tienen la habilidad de reproducirse sexualmente. En estos se incluyen *C. neoformans* (*Filobasidiella neoformans*); *C. albidus* (*Filobasidium floriforme*), *C. uniguttulatus* (*Filobasidium uniguttulatum*) y *C. infirmo-miniatus* (*Rhodosporidium infirmo-miniatum*) entre otros<sup>45,52, 86</sup>.

La familia Filobasidiaceae, fue originalmente clasificada en el orden de los Ustilaginales<sup>56,72,81</sup>, pero el tipo de esporulación y la morfología del basidio difieren de los miembros incluidos en este orden, por lo que algunos taxónomos han clasificado a Filobasidiaceae en el orden Aphylliphorales, clase Holobasidiomycetes por su basidio no-septado, pero según Kwon-Chung (1992), la familia Filobasidiaceae no puede pertenecer a los Aphylliphorales porque carece de un basidio bien desarrollado y de parentosoma alrededor del septo doliporo, además de que su fase haploide es levaduriforme por lo que se sigue considerando dentro del orden Ustilaginales<sup>59,72</sup>.

El género *Filobasidiella*, tiene una sola especie con dos variedades: var. *neoformans* y var. *bacllisporea*<sup>68</sup>. *F. neoformans* var. *neoformans* presenta micelio hialino que consiste en hifas dicarióticas con conexiones en "grapa" y un basidio unicelular alargado que origina basidiosporas en cadena de 4 puntos del basidio (gemación basípeta), son ligeramente rugosas, de 1.8 a 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro; son uninucleadas, de formas ovales, elípticas, cilíndricas o globosas<sup>59</sup>. Las basidiosporas

son secas y no-cápsuladas pero en medios de cultivo adecuados ellas pueden convertirse en levaduras con cápsulas en pocas horas<sup>119</sup>, mientras que *F. neoformans* var. *bacillispora* produce basidiosporas lisas, angostas, de 1 a 1.5 x 3 a 8  $\mu\text{m}$  en forma de bastón o sin curvatura<sup>59,66,67</sup>.

Para el apareamiento de aislamientos haploides existen dos tipos de compatibilidad de cepas,  $\alpha$  y  $a$ , cuando los dos tipos compatibles se siembran en agar-jugo V8 o en agar-infusión de heno y se incuban entre 25 y 37°C ocurre la plasmogamia, se forman hifas dicarióticas que producen basidios terminales con forma subglobosa<sup>119</sup>. Estudios genéticos y citológicos indican que los cuatro núcleos de la primera división meiótica permanecen en el basidio y cada núcleo se divide mitóticamente; el núcleo hijo migra hacia el interior de las basidiosporas mientras que el núcleo madre se divide repetidamente durante la formación basípeta y forma de 20 o más basidiosporas uninucleadas por cadena<sup>72</sup>.

Los aislamientos clínicos y ambientales de *Cryptococcus*, han sido de la fase anamórfica (haploides y heterotálicas)<sup>17,20,26,36,72</sup>, hasta el momento no se ha descrito apareamiento entre las levaduras en las heces de palomas (fuente natural de *C. neoformans* var. *neoformans*), con lo que se excluye la formación de basidiosporas<sup>109</sup>. (Cuadro 2).

*Filobasidium* es un género que se caracteriza por la formación de escasos basidios unicelulares no-septados, con basidiosporas terminales sésiles originadas directamente del epibasidio, en forma de espiral petaloide, se pueden formar blastosporas en las hifas<sup>86</sup>.

Se han descrito apareamientos entre cepas de *C. laurentii*, las cuales después de la fusión producen un micelio dicariótico con conexiones en pinza y septos doliporos, pero sin esporas sexuales<sup>64</sup>.

### 1.3. Descripción del género *Cryptococcus* (Fase Anamórfica)

El género *Cryptococcus* presenta células globosas, esféricas u ovoides ocasionalmente alargadas, ameboides o pleomórficas. Se reproducen por gemación multipolar (blastoconidios multipolares y simpodiales)<sup>59,90</sup>, no producen ascosporas, teliosporas o baliosporas, tampoco producen micelio o pseudomicelio en los medios habituales de laboratorio<sup>90,100</sup>. No obstante, algunas especies en medios especiales y bajo ciertas condiciones son capaces de formar pseudomicelio y en determinados casos producir micelio para dar paso a la fase teleomórfica<sup>119</sup>.

Todas las especies presentan cápsula polisacárida que llega a medir de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. La encapsulación varía con la cepa y dependiendo del medio que se utiliza, en algunas ocasiones es

mayor que la célula y en algunos cultivos puede estar ausente<sup>54,74,90</sup>; la cápsula químicamente está compuesta por  $\alpha$ -glucoroxilomanana unida a manosa y con menos de 0.2% de proteína<sup>9, 57,62</sup>.

En medios sólidos las colonias pueden presentar una apariencia lisa o rugosa, mucosa o compacta, limitada o escurrente y brillante. Crecen en cultivos habituales como: agar dextrosa de Sabouraud (ADS), agar infusión cerebro-corazón (ABHI) y agar extracto de malta (AEM) a temperatura de 25° a 39.8°C<sup>81</sup>.

El género *Cryptococcus* presenta sensibilidad a la cicloheximida, antibiótico que tiene un espectro de acción limitado a un cierto número de hongos incluyendo la mayoría de los saprobios. *C. neoformans* muere a una concentración de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de este antibiótico<sup>103</sup>.

La prueba de asimilación de inositol es un criterio importante para caracterizar a *Cryptococcus* spp. ya que todas las especies asimilan esta fuente de carbono<sup>81,96</sup>.

El nitrógeno lo obtienen de peptonas, urea y algunas especies como *C. albidus* y *C. terreus* a partir de nitratos<sup>90,100</sup>.

La síntesis de compuestos carotenoides es variable dependiendo de las especies y de las condiciones de crecimiento<sup>52</sup>. Algunas especies tienen la habilidad de hidrolizar proteínas como la gelatina<sup>102</sup>. (Cuadro 3).

#### 1.4. Características Fisiológicas y Bioquímicas

En medios de cultivo como el agar niger que contiene compuestos bifenolados (ácido cafeínico), *C. neoformans* es capaz de degradar este sustrato, produciendo un pigmento marrón que no se difunde al medio, por lo que las colonias se tornan marrón de 2 a 5 días<sup>74,75,112</sup>.

*C. neoformans* var. *neoformans* crece a una temperatura máxima de 39.8°C; a 37°C se obtiene un crecimiento abundante<sup>90</sup>. *C. neoformans* var. *gattii* tiene un buen crecimiento a una temperatura de 32°C; sin embargo a 37°C los aislamientos crecen lentamente<sup>72,79</sup>.

Ambas variedades utilizan creatinina como una fuente de nitrógeno<sup>38,72</sup>. *C. neoformans* var. *gattii* la utiliza de forma más eficiente, además de que asimila glicina como única fuente de carbono y es resistente a la canavanina, características que se pueden poner de manifiesto inoculando la levadura en el medio de agar -canavanina- glicina azul de bromotimol (CGB) <sup>67, 68</sup>. Otra prueba utilizada para diferenciar a las variedades es la asimilación de D-prolina, por parte de *C. neoformans* var. *gattii* <sup>33</sup>.

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la fase fase teleomórfica del género *Filobasidiella* y *Filobasidium*.**

<b>FASE TELEOMÓRFICA (Fase sexual)</b>	
<b>Subdivisión:</b>	Basidiomycotina
<b>Clase:</b>	Heterobasidiomycetes
<b>Orden:</b>	Ustilaginales
<b>Familia:</b>	Filobasidiaceae
<b>Géneros:</b>	<i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i>
<b>Especies de <i>Filobasidiella</i>:</b>	<i>neoformans</i>
<b>Variedades:</b>	<i>neoformans</i> <i>bacillispora</i>
<b>Especies de <i>Filobasidium</i>:</b>	<i>floriforme</i> <i>uniguttulatum</i> <i>capsuligenum</i>
Basado de Herrera y Ulloa (1990) <sup>56</sup>	

**Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la fase anamórfica del género *Cryptococcus***

<b>FASE ANAMÓRFICA (Fase asexual)</b>	
<b>Superreino:</b>	Eucariota
<b>Reino:</b>	Fungi
<b>División:</b>	Eumycota
<b>Subdivisión:</b>	Deuteromycotina
<b>Clase:</b>	Blastomycetes
<b>Orden:</b>	Cryptococcales
<b>Familia:</b>	Cryptococcaceae
<b>Género:</b>	<i>Cryptococcus</i>
<b>Especies:</b>	<i>neoformans</i> <i>albidus</i> <i>laurentii</i> <i>uniguttulatus</i> <i>luteolus</i> <i>lactativorus</i> <i>terreus</i> <i>hempflingii</i> <i>curvatus</i> <i>asgardensis</i> <i>himalayensis</i> entre otras.
Basado de Herrera y Ulloa (1990) <sup>56</sup> Güeho (1996) <sup>52</sup>	



los pacientes adquirieron la enfermedad en otro lugar o posiblemente pudiera existir otro hospedero natural para *C. neoformans* var. *gattii*. Además los autores, observaron que *C. neoformans* var. *gattii* ha sido recuperado principalmente de eucaliptos ubicados en zonas no perturbadas que de árboles que se encuentran en zonas urbanas<sup>108</sup>.

El hallazgo de la fuente natural de la var. *gattii*, junto con el postulado propuesto por Ellis y Pfeiffer, tuvo una gran importancia ecológica por lo que en diversos países se trató de aislar a la levadura de su supuesto hospedero específico. Desafortunadamente los resultados de esos estudios no fueron los esperados y actualmente la asociación árbol-levadura es incierta<sup>12,26,32,113</sup>.

Los aislamientos de fuentes naturales de *C. neoformans* var. *gattii* han sido la mayoría del serotipo B, el serotipo C se ha aislado únicamente de *detritus* vegetales pertenecientes al árbol *Terminalia catappa* en Cúcuta, Colombia<sup>16,17,94</sup>.

Otras especies de *Cryptococcus* de importancia médica como *C. laurentii* y *C. albidus*, se han recuperado a partir de materia fecal y de tracto digestivo de psitaciformes clínicamente sanos<sup>6,53</sup>.

En 1973, Staib *et al.*, realizaron en Berlín un estudio para la búsqueda de *Cryptococcus* spp en todas las semillas de las plantas del Jardín Botánico y en 1975 muestrearon panales de avispas, encontrando que *C. albidus* y *C. laurentii* fueron recuperados de ambas fuentes naturales<sup>112</sup>.

En 1997 en la ciudad de Alicante, España, se muestrearon eucaliptos identificados como *E. camaldulensis*, y lograron aislar un total de 92 cepas pertenecientes al género *Cryptococcus*, de las cuales 73 correspondieron a *C. neoformans* var. *neoformans* y 19 cepas a *C. laurentii*<sup>26</sup>.

Gallo (1989) en Turín, recuperó una gran cantidad de colonias de *C. albidus* y *C. laurentii* a partir de materia fecal de palomas semidomesticadas<sup>47</sup>.

*Filobasidium floriforme* uno de los hongos más cercanamente relacionado con *Filobasidiella*, ha sido encontrado en flores marchitas del pasto plumoso *Erianthus giganteus*<sup>86</sup>.

Buhagiar y Barnett (1971) realizaron un estudio en fresas sanas y encontraron cerca de 10<sup>5</sup> cel/g viables de *C. albidus* y *C. laurentii*. Los autores atribuyen la fuente de estas especies al suelo o a las flores de las fresas, en donde estas especies son comunes<sup>91</sup>.

*C. albidus*, *C. laurentii*, ocasionalmente *C. macerans* y *C. infirmu-miniatus* se han recuperado de diversas flores de Canadá y en el estado de California, EUA<sup>91</sup>.

En otro estudio se aislaron levaduras del género *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Cryptococcus* de plantas utilizadas como pastura en Nueva Zelanda, encontrando que el número de organismos en la superficie de las hojas de pastos, se incrementó de aproximadamente 10<sup>5</sup> en invierno

y primavera temprana a  $10^7$  g en verano por peso húmedo de follaje, además observaron que las levaduras que viven en el suelo, sólo un 8% se encuentran en las hojas, por el contrario las levaduras que habitan en las hojas como *C. laurentii* y *Rhodotorula* spp no se encuentran en las capas superiores del suelo, esto podría atribuirse al gran número de antibióticos producidos por las bacterias del suelo<sup>91</sup>.

## 2.2. Criptococosis

La criptococosis es una micosis de curso subagudo o crónico, pulmonar, meníngea o generalizada. Como ya ha sido mencionado, la mayoría de los casos son provocados por *Cryptococcus neoformans* y en algunas ocasiones se ha reportado que *C. albidus*<sup>51,63,82</sup> y *C. laurentii*<sup>107</sup> también pueden causar la enfermedad. En la mayoría de los casos la infección es pulmonar primaria, debido a la inhalación de las partículas infectantes (levaduras acapsuladas y/o basidiosporas) y se disemina por vía hematogena principalmente hacia el sistema nervioso central (SNC). En pocos casos se describen infecciones cutáneas primarias<sup>100</sup>.

Existen 2 tipos de enfermedad criptococócica.

- 1) En el caso del paciente aparentemente sano o inmunocompetente, la infección que sigue a la inhalación del microorganismo se resuelve en forma rápida con síntomas mínimos.
- 2) El segundo está relacionada con factores de oportunidad tales como enfermedades crónicas graves y tratamientos con corticosteroides a dosis suprafisiológicas. En estos casos la enfermedad se extiende rápidamente y afecta a casi todos los órganos, en especial al SNC. Es posible, que el microorganismo entre a través de la piel<sup>14,58</sup> o de la mucosa nasofaríngea, aunque es raro<sup>100,105</sup>.

Entre 5 y 10% de todos los pacientes con SIDA desarrollan criptococosis, en ellos la meningoencefalitis o meningitis es la manifestación más frecuente<sup>39,61</sup>. Este tipo de enfermedad es considerada como una señal importante de estados avanzados de infección por VIH, que ocurre cuando la concentración de linfocitos CD4 está por debajo de  $50/\mu\text{L}^3$ .

La criptococosis del SNC (meningitis criptococócica) es la forma diagnosticada con mayor frecuencia, se cree que *Cryptococcus* spp prefiere el SNC, debido a que en este sitio encuentra menor respuesta celular (fagocítica), hay baja concentración de anticuerpos y ausencia de factores inhibidores y por otro lado, las catecolaminas presentes en el fluido espinal pueden participar como fuente de  $\text{N}_2$  sirviendo como factores nutricionales para el hongo<sup>100</sup>.

Por último, la criptococosis diseminada se presenta en pacientes severamente inmunosuprimidos o en estadios *pre-mortem*; *C. neoformans* puede invadir a todos los órganos de la economía, en especial a corazón, testículos, próstata<sup>115</sup>, ojos, músculos<sup>58</sup>, riñón<sup>3,97</sup> e hígado<sup>95</sup>, mientras que bazo y ganglios linfáticos, en general están exentos<sup>72,100</sup>.

### 2.3. Epidemiología

El mayor número de casos de criptococosis son descritos en el sexo masculino en una relación 2:1. En cuanto a la edad se han presentado casos en recién nacidos así como en ancianos<sup>14,100</sup>.

No existe una relación entre la incidencia de la criptococosis y la raza, ni predisposición ocupacional.

La distribución geográfica de la enfermedad causada por *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii* es de gran interés, especialmente debido a que diversos estudios muestran que probablemente la virulencia asociada a *C. neoformans* difiere entre sus dos variedades<sup>10,25,69,71</sup>.

La frecuencia epidemiológica de la criptococosis se incrementó en la década de los 80s con el advenimiento del SIDA, a partir de entonces *C. neoformans* var. *neoformans* es la especie y variedad que se ha aislado con mayor frecuencia de casos clínicos en todo el mundo<sup>118</sup>, el primer caso de criptococosis provocado por *C. neoformans* se remonta a 1894 cuando Busse y Buschke aislaron a la levadura a partir de la tibia de una mujer<sup>31</sup>. Con la epidemia de SIDA la var. *neoformans* es el principal agente etiológico de la criptococosis en este tipo de pacientes, debido a que las fuentes naturales de esta variedad se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo y los pacientes tienen un mayor riesgo de inhalación de las partículas infectantes (levaduras y/o basidiosporas) del hongo<sup>10,14,22,23,39,48,61,71</sup>.

*C. neoformans* var. *gattii*, tiende a causar enfermedad en pacientes aparentemente sanos<sup>71,28,34</sup>. Los casos de meningitis por *C. neoformans* var. *gattii*, son publicados desde 1970 por Gattii y Eeckels<sup>49</sup>, quienes fueron los primeros en aislar al hongo de una niña africana, sin factores de inmunocompromiso aparentes; a partir de ese año los casos de meningitis producidos por esta variedad fueron reportados con mayor frecuencia, incluso en personas con SIDA<sup>8,10,12,21,24,87,106,116</sup>. En Africa existía una alta prevalencia de la var. *gattii* (92%) durante el periodo de 1951 a 1969, pero en el periodo de 1970 a 1985 todos los aislamientos correspondieron a *C. neoformans* var. *neoformans*<sup>70,118</sup>. Los aislamientos de la var. *gattii* en el sur de California obtenidos antes de 1980 fueron del serotipo B y C, mientras que los obtenidos después de 1980 corresponden únicamente al serotipo B<sup>16,118</sup>. Entre los serotipos de *C.*

*neoformans* var. *gattii*, el serotipo B fue 4.5 veces más frecuente que el serotipo C y la mayoría del serotipo C es del sur de California (15.1%)<sup>69</sup>.

Con respecto a la distribución geográfica de los serotipos de *C. neoformans* var. *neoformans*, el serotipo A ha sido el más común con 50% al 94% de frecuencia dependiendo de la región geográfica, el serotipo D es el más común en Dinamarca, Italia y Suiza, siendo menos frecuente en Alemania (29%), Bélgica (7.1%) y Francia (7.4%). A pesar de la gran prevalencia de la enfermedad en países tropicales, el primer caso de criptococosis por *C. neoformans* var. *gattii* en Europa se describió en Francia (1985) en un hombre de 40 años que trabajaba en un aserradero con árboles de origen tropical<sup>60</sup>. En 1992 fue publicado otro caso francés de criptococosis producido por *C. neoformans* var. *gattii* en una persona de origen asiático sano, quien desarrolló meningitis y después del tratamiento con Anfotericina B y 5-fluorocitosina intravenosa desapareció la infección<sup>30</sup>. En Italia, Montagna (1997) describió el primer caso autóctono de *C. neoformans* var. *gattii* en una mujer con factores predisponentes de drogadicción y seropositiva para VIH, que vivía en una zona muy cercana a un zoológico de donde los autores tomaron diversas muestras en las que aislaron ambas variedades de *C. neoformans* tanto de animales como de eucaliptos, relacionando finalmente la infección con estos aislamientos<sup>83</sup>.

Es de llamar la atención que en los casos europeos considerados fuera de las regiones endémicas, la fuente de infección se relaciona con sustratos originarios de zonas tropicales. Los casos registrados en Europa, Canadá y Argentina no corresponden a la distribución tropical de *C. neoformans* var. *gattii*, lo que demuestra que la distribución geográfica de ésta variedad no se limita a regiones tropicales y subtropicales.

En México, existe poca información acerca de la frecuencia de la criptococosis, así como la distribución de las variedades. En 1955 González-Ochoa presentó dos casos de criptococosis meníngea y en 1959 Amado-González y Pérez-Tamayo presentaron un tercer caso de criptococosis generalizada diagnosticada por necropsia<sup>2</sup>. Hernández-Gómez (1988) realizó un estudio con 28 cepas de *C. neoformans* obtenidas de casos clínicos de las cuales 25 (89.2%) correspondieron a la variedad *gattii* y 3 (10.7%) a la variedad *neoformans*<sup>55</sup>. En 1989 Cano-Domínguez relaciona el establecimiento de criptococosis como manifestación inicial de SIDA<sup>18</sup>. Garza (1991), hizo un análisis de 31 cepas aisladas de pacientes con SIDA, en donde observó 26 (83.8%) cepas de la var. *neoformans* y 5 (16.1%) cepas de la var. *gattii*<sup>48</sup>. Cervantes (1994), presentó datos de 38 cepas de *C. neoformans* que provenían de

varios hospitales y laboratorios de diagnóstico de México, 27 (71%) de estas cepas fueron var. *gattii*, 14 de las cuales correspondieron a pacientes con SIDA<sup>23</sup>.

Castañón-Olivares *et al.* (1997) describieron el primer caso mexicano de *C. neoformans* var. *gattii* en una paciente con SIDA que radicaba en una zona con extensas plantaciones de eucaliptos<sup>21</sup> y en el 2000 efectuó un estudio epidemiológico de tipo retrospectivo (1989-1998) sobre la frecuencia de especies y variedades de *Cryptococcus*, como agentes causales de criptococosis en México, en el que *C. neoformans* var. *neoformans* fue aislado en el 86.73% de pacientes y *C. neoformans* var. *gattii* en 10.42% de pacientes, con respecto a otras especies *C. albidus* fue recuperado en el 0.94% y *C. uniguttulatus* en el 0.50% de un total de 211 pacientes<sup>22</sup>. (Fig. 2).

Con respecto a la epidemiología de *C. albidus*<sup>51,63,82</sup>, *C. laurentii*<sup>107</sup> y *C. uniguttulatus*<sup>22</sup>, no ha sido definida, debido a los casos aislados que se han presentado, la criptococosis provocada por estas especies es en pacientes severamente inmunocomprometidos y es importante señalar que el curso clínico del padecimiento es muy similar al desarrollado por *C. neoformans* con sus dos variedades, no obstante, es importante realizar más estudios epidemiológicos y de virulencia sobre estas especies que si bien son consideradas más bien inocuas, su frecuencia se ha incrementado en personas con factores de inmunocompromiso y en donde potencialmente pueden convertirse en patógenas.

**Fig. 2. Frecuencia de *Cryptococcus* spp aisladas de pacientes mexicanos con criptococosis (1989-1998) <sup>22</sup>**

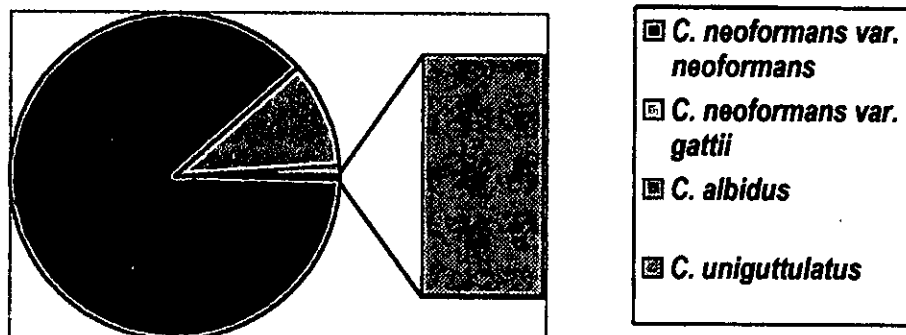
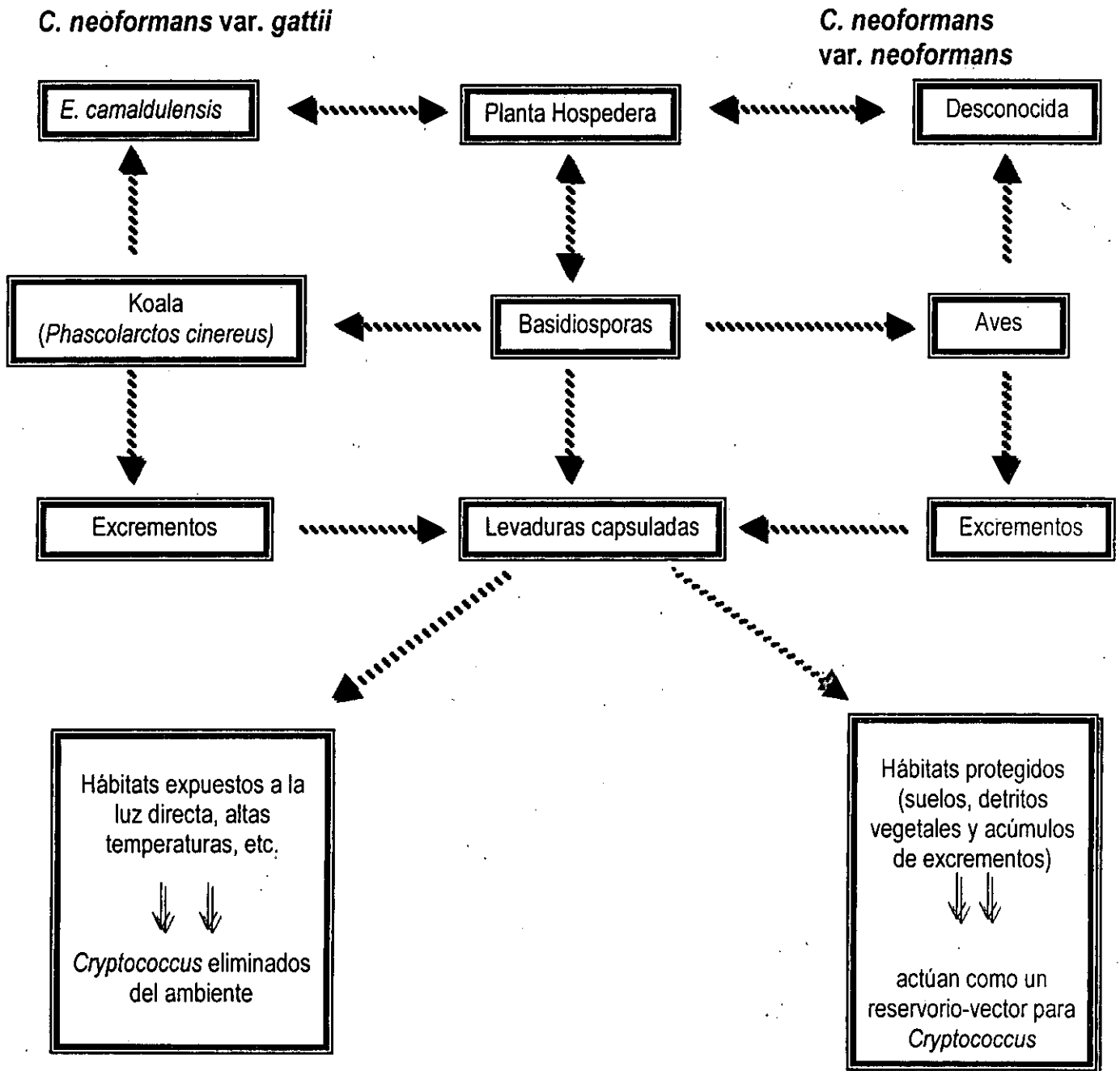


Fig. 1 POSTULADO ECOLÓGICO DE *C. neoformans*  
PROPUESTO POR ELLIS Y PFEIFFER (1990)



### III. ESTABLECIMIENTO DE HÁBITAT

El nicho de un organismo está determinado por el rango de condiciones y recursos bajo las cuales pueden sobrevivir y reproducirse<sup>120</sup>.

Por lo tanto, los factores más importantes que favorecen o controlan el crecimiento de los hongos son: La temperatura<sup>38,120</sup>, humedad<sup>11,120</sup>, aereación<sup>120</sup> y pH<sup>6,88,120</sup>; composición química del sustrato como: concentración de nitrógeno, metabolitos secundarios, proteínas, y formación de antibióticos<sup>43</sup>; asociaciones simbióticas<sup>89</sup> o semisimbióticas, parasitismo, competencia<sup>44</sup> y micofagia<sup>15</sup>, algunos de los últimos<sup>11</sup>.

**Temperatura:** Los hongos varían ampliamente en sus requerimientos de temperatura, muchos de ellos son mesófilos, teniendo un óptimo crecimiento entre los 15 y 40°C, como *C. neoformans*, *H. capsulatum*, etc., mientras que otros pueden crecer entre 0—5°C como especies de *Penicillium*. La temperatura puede también tener un efecto controlador en las poblaciones mesofílicas, si la competencia entre poblaciones está involucrada<sup>38,120</sup>.

**Disponibilidad de agua:** El desarrollo de los hongos está ligado al factor agua y en consecuencia las zonas húmedas son las más ricas en estos organismos. Sin embargo, la adaptabilidad de los hongos es tan grande, que podemos encontrar especies en zonas áridas, como es el caso de *C. immitis* que crece como saprobio de suelos áridos en América<sup>14</sup>. La periodicidad en el suministro del agua, determina el establecimiento y crecimiento de los microorganismos<sup>120</sup>.

**Aereación:** La mayoría de los hongos parecen ser estrictamente aeróbicos y su crecimiento se ve disminuido a bajas concentraciones de CO<sub>2</sub>. Esto es factible, ya que la respiración anaerobia es energéticamente menos efectiva que la respiración aerobia, ya que para que los hongos continúen con su crecimiento en condiciones pobres de CO<sub>2</sub> necesitan gran cantidad de sustratos ricos en carbonos<sup>120</sup>.

**pH:** La mayoría de los hongos tienen la habilidad de alterar el pH del ambiente durante su crecimiento, pero en el laboratorio usualmente crecen mejor en rangos de pH de 5—7<sup>120</sup>, pero también son capaces de sobrevivir en ambientes muy alcalinos como *C. albicans* en la vagina.

**Sustrato:** Las características del sustrato determinan, no sólo que géneros de hongos pueden crecer en algún sustrato particular, sino también la duración de su vida sobre dicho

sustrato. El éxito en la captura y consumo de recursos energéticos están fuertemente influenciados por el impacto de la competencia, estrés y disturbio<sup>120</sup>.

#### IV. GÉNERO *Eucalyptus*

Las especies vegetales que no corresponden a comunidades de distribución natural son llamadas invasoras, foráneas, inmigrantes, exóticas, adventicias o especies introducidas<sup>78</sup>.

El género *Eucalyptus* (familia Myrtaceae), (A.L. de Jussieu), es originario de la zona Australia-Tazmania, con más de 600 especies, de las que al menos unas 40 han sido introducidas en las regiones más diversas del mundo<sup>27</sup>.

El establecimiento y persistencia de los eucaliptos se debe a su rápido crecimiento, fuerte desarrollo radicular, alta capacidad de absorción de agua, resistencia a la sequía y al fuego, gran producción de semillas con prolongada latencia, ausencia de enemigos biológicos y producción de sustancias alelopáticas, atributos que les permiten competir por recursos y en algunos casos desplazar a otras especies<sup>85</sup>.

El género *Eucalyptus* agrupa plantas leñosas perennifolias, la mayoría de forma arbórea y algunas de tipo arbustivo. La polinización en casi todas las especies se realiza por medio de insectos, aunque las flores no están muy especializadas. Entre los insectos visitantes se encuentran varias especies de coleópteros, dípteros e himenópteros; sin embargo, debido a la falta de adherencia del polen a los polinizadores se ha sugerido que la polinización se efectúa a través del viento, como principalmente ocurre en *E. tereticornis*. En general, las semillas fértiles que libera la cápsula, si no encuentran condiciones favorables para germinar, pierden su viabilidad a los 14 meses de estar sobre el terreno<sup>104</sup>.

#### V. CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM

Los suelos del *campus* de Ciudad Universitaria de la UNAM, son principalmente de origen eólico y orgánico y en menor proporción son producto de la erosión de la lava, así como de acarreos aluviales y posiblemente humanos, son arenosos-limosos, moderadamente ácidos, con gran cantidad de materia orgánica, potasio y calcio y pobres en nitrógeno y fósforo aprovechables<sup>117</sup>.



sustrato. El éxito en la captura y consumo de recursos energéticos están fuertemente influenciados por el impacto de la competencia, estrés y disturbio<sup>120</sup>.

#### **IV. GÉNERO *Eucalyptus***

Las especies vegetales que no corresponden a comunidades de distribución natural son llamadas invasoras, foráneas, inmigrantes, exóticas, adventicias o especies introducidas<sup>78</sup>.

El género *Eucalyptus* (familia Myrtaceae), (A.L. de Jussieu), es originario de la zona Australia-Tazmania, con más de 600 especies, de las que al menos unas 40 han sido introducidas en las regiones más diversas del mundo<sup>27</sup>.

El establecimiento y persistencia de los eucaliptos se debe a su rápido crecimiento, fuerte desarrollo radicular, alta capacidad de absorción de agua, resistencia a la sequía y al fuego, gran producción de semillas con prolongada latencia, ausencia de enemigos biológicos y producción de sustancias alelopáticas, atributos que les permiten competir por recursos y en algunos casos desplazar a otras especies<sup>85</sup>.

El género *Eucalyptus* agrupa plantas leñosas perennifolias, la mayoría de forma arbórea y algunas de tipo arbustivo. La polinización en casi todas las especies se realiza por medio de insectos, aunque las flores no están muy especializadas. Entre los insectos visitantes se encuentran varias especies de coleópteros, dípteros e himenópteros; sin embargo, debido a la falta de adherencia del polen a los polinizadores se ha sugerido que la polinización se efectúa a través del viento, como principalmente ocurre en *E. tereticornis*. En general, las semillas fértiles que libera la cápsula, si no encuentran condiciones favorables para germinar, pierden su viabilidad a los 14 meses de estar sobre el terreno<sup>104</sup>.

#### **V. CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM**

Los suelos del *campus* de Ciudad Universitaria de la UNAM, son principalmente de origen eólico y orgánico y en menor proporción son producto de la erosión de la lava, así como de acarreos aluviales y posiblemente humanos, son arenosos-limosos, moderadamente ácidos, con gran cantidad de materia orgánica, potasio y calcio y pobres en nitrógeno y fósforo aprovechables<sup>117</sup>.

Presenta un clima templado subhúmedo con régimen de lluvias en el verano, poca oscilación térmica y una marcha de temperatura tipo Ganges. La temperatura media anual es de 15.5°C; existe una estacionalidad marcada con una temporada seca de noviembre a mayo y una lluviosa de junio a octubre. Los vientos dominantes son del NNW, aunque los más fuertes provienen del NE. Por lo general, la humedad absoluta del aire es baja<sup>117</sup>.

Existe una gran riqueza florística debido a dos causas principales, la heterogeneidad de la topografía que permite albergar una gran cantidad de micro y macro ambientes, que promueve el establecimiento de una gran cantidad de especies vegetales con diferentes requerimientos ambientales que conforman una flora muy variada y por otra parte, la situación biogeográfica del Valle de México, ubicado cerca de la línea limítrofe entre las zonas biogeográficas Neártico y Neotropical, que hace de la zona meridional de la Rep. Mexicana una de las regiones más ricas del mundo en cuanto a su flora<sup>117</sup>.

En este lugar se establecieron asociaciones de pino-encino y matorrales de *Senecio praecox* (palo loco)<sup>19</sup>, esta asociación es clasificada dentro de los matorrales xerófitos, los cuales responden a condiciones de aridez. La asociación Senecionetum praecosis ha sufrido un alto grado de perturbación debido a elementos múltiples, la mayoría relacionado con el acelerado crecimiento del área metropolitana de la Ciudad de México, como son reducción del área, contaminación, introducción de nuevas especies, iluminación artificial, saqueo de plantas de ornato y medicinales, caza de animales e incendios<sup>117</sup>.

La urbanización del circuito escolar en sus inicios, trajo consigo el establecimiento de áreas verdes y jardines, donde se plantaron especies arbóreas y arbustivas de muy diversos orígenes: *Ligustrum lucidum* (trueno), originario de China; *Jacaranda mimosifolia* (jacaranda), de Sudamérica; *Schinus molle* (pirul), de Perú; *Erythrina coralloides* (colorín) y *Fraxinus uhdei* (fresno), ambos de origen mexicano, predominando *Eucalyptus* spp. procedente de Australia, que se plantaron en camellones, a lo largo de los bordes de circuitos escolares y en ambos lados de la Av. de los Insurgentes con el propósito de establecer una "barrera protectora o aislante" de los efectos causados por la circulación de los automotores<sup>114</sup>.

## VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* principalmente a partir de *Eucalyptus camaldulensis*, hace pensar que dicha angiosperma es el hospedero natural del hongo. En México existen casos de criptococosis causados por la var. *gattii*, además de que hay extensas plantaciones de eucaliptos, por lo que sería interesante investigar cual es la asociación del binomio árbol-levadura con base a la posibilidad del aislamiento del hongo a partir de *Eucalyptus* spp sanos.

*C. neoformans* var. *neoformans* ha sido aislado frecuentemente de heces de palomas, entre otros sustratos; sin embargo, se ha planteado que el nicho ecológico de esta levadura podría ser una planta hasta hoy desconocida<sup>35</sup>. Con base en lo mencionado para la var. *gattii*, es muy posible que la var. *neoformans* pueda compartir ese mismo hábitat.

Actualmente en México otras especies de *Cryptococcus*, como *C. albidus* y *C. laurentii*, se han encontrado como causantes de criptococosis; ambas especies se han aislado de fuentes vegetales como gramíneas y plantas compuestas, en otros países. El aislamiento de estas levaduras a partir de los árboles de eucalipto contribuirían al conocimiento de su posible hábitat en nuestro país.

Debido a la amplia distribución y altas densidades de los eucaliptos en C.U., y considerando los datos anteriores, se hace interesante investigar la posible asociación de las diferentes especies de *Cryptococcus*, sobre todo las causantes de criptococosis, con este tipo de árbol.

## VII. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general:

- ✂ Conocer la frecuencia de colonización de las especies de *Cryptococcus* de importancia médica sobre *Eucalyptus* y establecer la relación de esta angiosperma como un probable hospedero natural del hongo en Ciudad Universitaria, UNAM.

### 7.2. Objetivos particulares:

- \* Determinar el órgano hospedero principal de *Cryptococcus* spp en *Eucalyptus* sanos, en Ciudad Universitaria.
- \* Conocer la variación espacial y temporal de *Cryptococcus* spp. de importancia médica sobre los eucaliptos.
- \* Determinar la composición y variación temporal de micromicetos filamentosos asociados a eucaliptos sanos.

inmediatamente en el laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM. La colecta se realizó en las cuatro estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno) y se registraron los siguientes datos climatológicos: temperatura máxima y mínima y precipitación pluvial.

## **8.2. Procesamiento de las muestras**

Se separaron las hojas, yemas o flores, se pesaron 1.5 g de cada una de las muestras y colocaron en un mortero con 20 ml de agua destilada estéril, en el caso de las hojas se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se procedió a triturarlas, dejándolas reposar durante 10 minutos, después se realizó una dilución 1:100 en solución salina con penicilina y estreptomicina (SSA), posteriormente se tomó 1 ml de esta dilución y se sembró en cajas de petri con medio de agar creatinina-*Guizotia abyssinica* (medio de Níger). Anexo 1.1. Se incubaron a 26°C durante dos semanas haciendo revisiones, cada tres días para seleccionar aquellas colonias sugestivas de ser *Cryptococcus* spp<sup>35</sup>.

## **8.3. Aislamiento**

### **8.3.1. Morfología macroscópica**

#### **➤ Presencia de pigmento pardo en el medio de níger:**

Se realizó la observación macroscópica de las colonias levaduriformes, que presentaban pigmento que iban desde el pardo claro (beige) al pardo oscuro consideradas como posibles *Cryptococcus* spp. También se tomó en cuenta el aspecto de las colonias: mucoides, brillantes, lisas, rugosas, elevación y bordes etc. Las colonias con diferentes tonalidades pardo fueron resembradas en ADP para identificarlas mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas<sup>75</sup>.

### **8.3.2. Morfología microscópica**

#### **➤ Presencia de cápsula (tinción negativa con tinta china).**

Para poder discriminar a las levaduras cuyas colonias eran sospechosas de *Cryptococcus* spp, fue necesario poner en evidencia la presencia de cápsula, este parámetro se demostró mediante

la prueba micológica del examen en fresco con tinta china.

Dicho examen consistió en colocar en el portaobjetos una gota de tinta china diluida en otra gota de agua destilada en las cuales se depositó una pequeña asada de la colonia levaduriforme sospechosa y con ayuda de la punta de un cubreobjetos se homogeneizó la mezcla, para posteriormente observar al microscopio la preparación y confirmar o disprobar la presencia de levaduras con cápsula<sup>77</sup>.

#### 8.4. Purificación

Las colonias seleccionadas como posibles *Cryptococcus* spp y las de hongos filamentosos, se purificaron para su posterior identificación. La purificación consistió en inocular las colonias seleccionadas en caldo níger antibióticos, incubándolas durante 72 hrs. a 30° C en agitación constante.

Para confirmar la purificación, las colonias levaduriformes fueron resembradas por estría cruzada en agar níger y las colonias filamentosas se resembraron en agar dextrosa papa (ADP). Las resiembras fueron repetidas tantas veces como fue necesario hasta conseguir la pureza deseada<sup>77</sup>. Anexo 1.2.

A partir de las colonias levaduriformes puras se realizaron las siguientes pruebas:

#### 8.5. Identificación

Todas aquellas colonias levaduriformes que en el primocultivo fueron acapsuladas y sin pigmento fueron descartadas. Los hongos filamentosos, fueron identificados con base a su morfología microscópica, por medio de exámenes directos con azul de algodón.

La identificación bioquímica y fisiológica se efectuó exclusivamente en aquellas colonias con pigmentos pardos. Para la realización de todas las pruebas bioquímicas y fisiológicas se utilizaron las siguientes cepas testigo, que sirvieron como controles tanto negativos como positivos:

*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotipo A (FM 136)

*Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo B (FM 082)

*Cryptococcus albidus* (FM 055)

*Cryptococcus laurentii* (FM 031)

*Cryptococcus uniguttulatus* (FM 279)

*Candida albicans* (FM 206)

*Rhodothorula* sp. (FM 575)

Todas estas cepas fueron procedentes de la colección de hongos del Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Tanto las cepas testigo como las experimentales se obtuvieron a partir de cultivos de 72 horas, sembradas en ADP.

## **8.6. Pruebas bioquímicas y fisiológicas.**

Todas las pruebas, fueron efectuadas por duplicado.

### **8.6.1. Producción deseudomicelio.**

Para esta prueba se utilizaron dos métodos:

1) En el medio de agar harina de maíz con tween 80, se sembraron las cepas y se incubaron durante de 72 horas a temperatura ambiente. A partir de las colonias crecidas se realizó un examen directo con azul de algodón con la finalidad de observar el desarrollo deseudomicelio y/o micelio verdadero. Anexo 1.3.

2) La Placa de Dalmau. Para efectuar esta prueba se empleó el medio de ADP en caja de petri, en el cual se realizó una pequeña incisión sin llegar al fondo de la caja, con el objetivo de que el inóculo esté en condiciones de anaerobiosis parcial; sobre dicha incisión se colocó un cubreobjetos estéril y del lado contrario a este se inoculó con un punto de la levadura el agar y sobre este punto se colocó otro cubreobjetos. Se dejó incubar a 25°C por un período de 6 días y posteriormente se observó al microscopio el cubreobjetos en el que se encuentra el inóculo para verificar la presencia deseudomicelio<sup>80</sup>.

### **8.6.2. Tubo germinal**

Se tomó una asada de la colonia a probar y se suspendió en 0.5 ml de suero humano, se incubó durante 2 horas a 37° C. Posteriormente se tomó una gota de la suspensión y se realizó un examen directo de la colonia para buscar los tubos germinales<sup>90</sup>.

### **8.6.3. Agar-chocolate.**

Las colonias a identificar se resembraron en agar-chocolate y se incubaron a 37°C durante 48 hrs., después de este período se realizó examen directo con tinta china<sup>100</sup>. Anexo 1.4.

### **8.6.4. Sensibilidad a la cicloheximida.**

A partir de las colonias a probar, se tomó una asada y se resembraron en Sabouraud antibiótico (S.A.) (Bioxon), se incubaron a 26°C durante 7 días, a partir del tercer día se realizaron revisiones de las cepas para observar si el crecimiento se presentaba o estaba ausente<sup>103</sup>.

### **8.6.5. Crecimiento a 37°C.**

De cada colonia a caracterizar, se tomó una asada que se sembró en agar dextrosa Sabouraud (ADS) (Bioxon), se incubó a temperatura de 37° C. A partir del tercer día hasta los 10 días se revisaron las colonias para observar el crecimiento de las cepas<sup>75</sup>.

### **8.6.6. Zimograma ó Prueba de fermentación (Método de Wickerham)<sup>90</sup> Anexo 1.5.**

#### **a) Preparación del inóculo.**

Se tomó una asada de cada colonia y se realizó una suspensión ajustada al tubo Núm. 2 del nefelómetro de McFarland que equivale a  $3 \times 10^6$  cels/ml en un tubo de ensaye con 1.8 ml de solución salina estéril al 0.5%.



#### **b) Siembra en tubos de Wickerham.**

De la suspensión del inóculo se tomaron 0.2 ml para cada uno de los tubos que contenían los carbohidratos.

Para confirmar la esterilidad del medio se utilizaron tubos con medio de cultivo sin inocular.

#### **c) Interpretación de los resultados.**

La prueba se consideró positiva si en los tubos de Wickerham se producían ácidos (dependiendo del sustrato utilizado), agua y/o dióxido de carbono, lo cual indicó que se llevó a cabo la fermentación.

#### **8.6.7. Pigmentación en agar extracto de malta (AEM).**

Las colonias fueron resembradas en el medio de AEM (Bioxon), con el fin de observar los patrones de pigmentación de algunas especies, sobre todo de aquellas que tuvieron escaso o nulo crecimiento a 37°C<sup>77</sup>.

#### **8.6.8. Hidrólisis de urea .**

Se tomó una asada de la colonia a identificar y se sembró en el medio de agar urea de Christensen. Se incubó durante 3 días a 25-27°C y al final de este periodo se realizó la lectura correspondiente, la prueba fue positiva si el medio viraba de un color amarillo a magenta por la presencia de ureasas<sup>77</sup>. Anexo 1.6.

#### **8.6.9. Prueba de Asimilación de fuentes de carbono.**

Para esta prueba se utilizaron 2 métodos.

##### **Método VITEK.**

#### **a) Preparación del inóculo**

A partir de un cultivo puro de 48 hrs en ADS, se tomó una pequeña asada y se realizó una suspensión equivalente al tubo Núm. 2 de McFarland en un tubo de ensaye con 1.8 ml de

solución salina estéril al 0.5 %.

**b) Siembra en la tarjeta bioquímica de levaduras (YBC).**

La YBC se marcó con el número de identificación de la muestra. En condiciones estériles, se insertó el extremo corto del tubo de transferencia en el orificio de entrada de la YBC. Manteniendo la presión de inserción se giró el tubo 180°. Se colocó la unidad "tarjeta/tubo de transferencia" en un soporte de llenado, de tal manera que el extremo largo del tubo de transferencia quedara introducido en el tubo con la muestra. Posteriormente se colocó el soporte de llenado en la gradilla y se introdujo en el módulo preparador, en el que se formó vacío y entonces la suspensión que contiene las levaduras fue absorbida y llevada a cada uno de los pocitos que contienen los reactivos. Una vez llena la tarjeta se sacó del módulo y se selló en el módulo de sellado de VITEK. La tarjeta con la colonia problema se incubó durante 48 hrs., a 30°C, después de la incubación, la tarjeta se colocó en el lector/incubador para su lectura.

**Método de Wickerham (1971)<sup>90</sup>. Anexo 1.7.**

**a) Preparación del inóculo.**

A partir de colonias a identificar se preparó una suspensión ajustada al tubo Núm. 2 del nefelómetro de McFarland en un tubo de ensaye con 1.8 ml de solución salina estéril al 0.5 %.

**b) Siembra en tubos de Wickerham.**

Se tomó 0.2 ml del inóculo y se agregó en cada uno de los tubos con el medio que contenía al carbohidrato. Para verificar la esterilidad del medio se utilizaron tubos con el carbohidrato sin inocular.

**c) Interpretación de los resultados**

La prueba se consideró positiva si se producía turbidez en los tubos de Wickerham, debido a la asimilación de los carbohidratos.

## **8.7. Producción de polisacáridos extracelulares.**

Los tubos de glucosa, maltosa y lactosa inoculados para la prueba anterior con las cepas problema, se incubaron 3 semanas más después de la lectura del auxanograma; al final de este periodo se les añadió 2 gotas de lugol a cada uno y se registró si hubo o no cambio de coloración<sup>90</sup>.

### **8.7.1. Degradación de gelatina.**

Las cepas se sembraron en el medio de gelatina al 10% y se incubaron hasta por cuatro semanas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se observó si había o no actividad proteolítica, denotándose por la hidrólisis de la gelatina que se confirmó colocando el tubo en el refrigerador durante una hora<sup>80</sup>. Anexo 1.8.

## IX. RESULTADOS:

El resultado del tamaño de la muestra de acuerdo a la fórmula descrita en la metodología de este trabajo es el siguiente:

$$n = ?$$

$$N = 1124$$

Nivel de confianza: 95 %

Por lo tanto,  $Z = 1.96$

Grado de Precisión: 4.4 %

Por lo tanto,  $d = 0.022$

$$p = 0.017$$

$$q = 0.983$$

Tasa de eliminación estimada: 12 %

Sustituyendo en la ecuación para calcular el tamaño de la muestra

$$n = \frac{1124 (1.96)^2 (0.017) (0.983)}{(0.022)^2 (1123) + (1.96)^2 (0.017) (0.983)}$$

$$n = 119$$

aplicando la tasa de eliminación estimada:  $(119) (1.15) = 133$

Por lo tanto el tamaño de muestra para el estudio fue de:  $\pm 133$  *Eucalyptus* spp

Existe en la Universidad un programa para el control del eucalipto dentro del *campus* de Ciudad Universitaria, por lo que en algunas zonas los árboles fueron derrumbados durante el estudio. En primavera se muestrearon 126 árboles, en verano 128 y en otoño así como en invierno tuvimos un total de 122 organismos.

En total se obtuvieron 904 muestras, correspondiendo 498 a hojas y 406 a flores/yemas; en el (cuadro 7) se muestra la distribución de las muestras colectadas por estación y región. El número de flores/yemas no fue igual durante todo el muestreo, debido a que no todos los árboles estuvieron en floración en las cuatro estaciones del año.

## AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN:

De las 904 muestras obtenidas a partir de *Eucalyptus* spp y sembradas en agar níger se obtuvieron 348 colonias sospechosas de ser *Cryptococcus* spp de las cuales, 247 fueron de color beige y 101 color pardo oscuro, con un aspecto cremoso, brillante, liso, bordes limitados y consistencia blanda (Cuadro 8, 8.1. y gráfica1); sin embargo, de ese total, sólo 39 colonias presentaron cápsula con la prueba de la tinta china, de las cuales 26 eran beige y 13 pardo oscuro (Cuadro 9, 9.1. y gráfica 2). El tamaño de la cápsula fue variable, pero en general en los primoaislamientos se observó una cápsula muy pequeña. Las formas de las levaduras fueron diversas, visualizándose primordialmente células redondas, aunque también se presentaron ovaladas y en algunas ocasiones ligeramente alargadas. La época en que se recuperaron el mayor número de colonias, fue en verano. Es importante señalar que las colonias beige cápsuladas y acápsuladas predominaron durante todo el muestreo.

Analizando los resultados por estación, observamos que en primavera, se obtuvieron un total de 10 cepas de las que ocho desarrollaron pigmento beige y dos pigmento pardo oscuro. Con respecto a la región vegetal de donde se recuperaron las colonias correspondieron seis a hojas y cuatro a flores/yemas; en esta temporada el mayor número de aislamientos corresponde a la zona sin riego artificial (V-I; I-C; C-B). (Cuadro 10)

En Verano, se obtuvieron un total de 25 cepas, correspondiendo 15 cepas con pigmento marrón claro (beige) y 10 con pigmentación marrón oscuro; 10 cepas provenían de hojas y 15 de flores/yemas. El mayor número de aislamientos se recuperaron de la zona sin riego artificial que comprende las regiones (V-I; I-C; C-B) y en segundo término en la región del Gimnasio de Fisicoculturismo de la cual se obtuvieron 7/25 aislamientos, esta región se encuentra dentro de la zona de riego regular. (Cuadro 10)

Con respecto a otoño, se recuperaron 2 cepas, ambas presentaron coloración marrón claro (beige), aisladas de las regiones de I-C y de C-B a partir de hojas y de flores/yemas respectivamente.

En invierno se aisló 1 cepa color beige correspondiendo a hojas y a la región del camino-verde y 1 con pigmento marrón oscuro, recuperada de la muestra de flor/yema de la región de I- C. (Cuadro 10).

De las 39 cepas pigmentadas y capsuladas, se perdieron 12 durante el proceso de purificación, por lo que las pruebas bioquímicas y fisiológicas sólo se efectuaron en 27 cepas.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS.

### ❖ Producción deseudomicelio.

- 1) *Candida albicans* fue la única cepa capaz de formar pseudomicelio en agar harina de maíz con tween 80. El resto de las cepas sembradas en este medio no desarrolló pseudomicelio.
- 2) En la placa de Dalmau, de las 27 cepas experimentales, 18 cepas no formaron pseudomicelio, pero 9 cepas fueron capaces de desarrollar estructuras compatibles con filamentos cenocíticos, pero no se observó producción de basidios y mucho menos de basidiosporas. En cuanto a las cepas control se observó que *C. neoformans var. neoformans* también presentó el tipo de estructuras que se describieron anteriormente en la placa de Dalmau para las 9 cepas positivas. Del resto de las cepas control, *Candida albicans* produjo pseudomicelio, mientras que todas las demás fueron negativas en esta prueba.

### ❖ Desarrollo de tubo germinal.

Sólo la cepa de *C. albicans* (control positivo) produjo tubos germinales en suero, en el resto de las cepas estas estructuras estuvieron ausentes.

### ❖ Desarrollo de la cápsula en agar-chocolate.

De las cepas control en *C. neoformans* con sus dos variedades, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* y *C. laurentii* se visualizó aumento en el tamaño de la cápsula, mientras que en el resto de las cepas no se observó cambio alguno.

Con respecto a las 27 cepas problema, en 21 no se apreció ningún cambio, mientras que en 6 hubo desarrollo de las cápsulas polisacáridas ya que el tamaño fue visiblemente mayor que en los primoaislamientos, además se observaron células más grandes y redondas ya que probablemente

el agar chocolate favoreció la morfología de las cepas; por otro lado desarrollaron estructuras compatibles con filamentos.

#### ❖ Sensibilidad a la cicloheximida.

De las 27 cepas problemas ninguna presentó crecimiento en el medio adicionado con cicloheximida, por lo que concluimos que las cepas fueron sensibles al antibiótico. Con respecto a los controles la única cepa resistente a este antibiótico fue *Candida albicans*. (Cuadro 11).

#### ❖ Desarrollo a 37°C.

De las 27 cepas a caracterizar, 20 con pigmento beige, presentaron crecimiento moderado. En tanto que las siete cepas con pigmento pardo oscuro, mostraron crecimiento abundante. De las cepas control *C. neoformans* con sus dos variedades y *C. albicans* tuvieron desarrollo abundante, en cuanto al resto de las cepas control en *Rhodotorula* sp, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* y *C. laurentii* el desarrollo fue moderado. (Cuadro 11).

#### ❖ Prueba de fermentación. Método de Wickerham.

De las cepas control, *C. albicans* fue la única capaz de fermentar los carbohidratos.

Las 27 cepas problemas sometidas a la prueba de fermentación de azúcares tales como: glucosa, maltosa y lactosa, no produjeron etanol y/o dióxido de carbono, por lo que la prueba resultó negativa. (Cuadro 11).

#### ❖ Pigmentación en agar malta.

En 9 cepas problema las colonias fueron hialinas y microscópicamente se observaron levaduras redondas gemando y algunas células ovales y alargadas. En el caso de las 18 cepas restantes las células se observaron alargadas y ovaladas y produjeron un pigmento rosado, que no se difundió al medio y que fue muy parecido al de la cepa control de *Rhodotorula* sp. En el resto de las cepas control no se produjo pigmento.

#### ❖ Hidrólisis de urea.

Las 27 cepas sospechosas de ser *Cryptococcus* spp fueron positivas para la hidrólisis de urea, de las cepas testigos *Candida albicans* fue negativa para esta prueba, en cambio *C. neoformans* con sus dos variedades, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus* y *Rhodotorula* sp. dieron positivas. (Cuadro 11).

#### ❖ Asimilación de fuentes de carbono VITEK.

En esta prueba llaman la atención los siguientes resultados: de las 27 cepas problema 19 fueron negativas con respecto a la reducción de nitratos, mientras que 8 resultaron nitrato positivas, lo que coincidía con una de las características bioquímicas de *C. albidus*; sin embargo, las 27 cepas no asimilaron inositol, por lo que se verificaron estos resultados con el método de Wickerham. (Cuadro 12).

#### ❖ Asimilación de fuentes de carbono. Método de Wickerham

De nuestras cepas problema, nueve fueron inositol positivas, en tanto que 18 resultaron negativas e identificadas como *Rhodotorula* spp De las 9 cepas inositol positivas todas asimilaron maltosa, glucosa, sacarosa, L-arabinosa, inulina, manitol, L-sorbosa, L-ramnosa y D-sorbitol, con lo cual pudimos caracterizarlas como *C. albidus*.

En cuanto a los resultados obtenidos para la galactosa, la cepa Núm.45 V fue la única capaz de asimilar el carbohidrato; la cepa Núm. 45 P presentó asimilación para la melobiosa en tanto que el resto de las cepas fueron negativas; el adonitol fue negativo para la cepa 33 V; estos resultados nos sugieren cierta heterogeneidad bioquímica en *Cryptococcus albidus*. (Cuadro 12).

#### ❖ Producción de polisacáridos extracelulares.

Las 9 cepas caracterizadas como *Cryptococcus albidus* resultaron positivas para la producción de almidón en los tubos que contenían maltosa, lactosa y glucosa. (Cuadro 11).



#### ❖ Degradación de gelatina.

Ninguna de las cepas estudiadas presentaron la habilidad de hidrolizar la gelatina, con esto se descartó que alguna de nuestras cepas problema se tratara de *C. macerans*, la única especie que posee una pronunciada habilidad de hidrolizar este tipo de producto. (Cuadro 11).

#### ❖ Origen de las cepas de *C. albidus*.

Con respecto a las nueve cepas caracterizadas como *Cryptococcus albidus*, en la época de primavera y verano se recuperaron ocho cepas. En primavera dos aisladas del Camino-verde y de hojas. Otra fue de flor/yema de la región de Veterinaria-Ingeniería y otra del Estadio de pumitas de hojas. En verano dos muestras se obtuvieron de hojas, aunque de regiones distintas, una del Estadio de pumitas y la segunda del Camino-Verde. Con respecto a las dos cepas restantes, ambas se recuperaron de flor/yema y las regiones fueron el Gimnasio de Fisicoculturismo y la que comprende Veterinaria-Ingeniería respectivamente. Finalmente en invierno se aisló una cepa de la región de Ingeniería-Contaduría, procedente de flor/yema. (Cuadro 13).

#### ❖ Hongos filamentosos.

La distribución de los hongos filamentosos aislados a partir de las 904 muestras obtenidas del material vegetal de *Eucalyptus* spp, se muestra en el cuadro 14 y en la gráfica 3.

Los géneros que con mayor frecuencia se aislaron durante el año fueron: *Penicillium* 35.17%, *Alternaria* 25.66% y *Aspergillus* 21.12%; sin embargo, *Tricladium* predominó en otoño con un 69.13%.

Con respecto a las familias de micromicetos, la que presentó una frecuencia relativa más alta fue *Moniliaceae* 57.96% durante todo el muestreo; en cambio el *Mycelia sterilia* perteneciente a la familia *Agonomycetaceae* fue la que presentó la frecuencia de aislamiento más baja durante el año. Las frecuencias de aislamientos de las demás familias se presenta en el cuadro 15.

**Cuadro 7 Distribución de las muestras (hojas y flores/yemas), con respecto a la zona y estación del año.**

REGIÓN	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	TOTAL
(AG) H	7	7	7	7	28
(AG) FY	3	7	5	3	18
(MU) H	4	4	4	4	16
(MU) FY	4	3	2	2	11
(EO) H	18	20	18	18	74
(EO) FY	16	20	17	17	70
(EP) H	5	5	5	5	20
(EP) FY	5	5	3	4	17
(GF) H	7	7	4	4	22
(GF) FY	7	7	3	4	21
(CV) H	17	17	17	17	68
(CV) FY	16	16	11	11	54
(EB) H	8	8	7	7	30
(EB) FY	8	8	7	7	30
(V-I) H	20	20	20	20	80
(V-I) FY	20	14	12	17	63
(I-C) H	20	20	20	20	80
(I-C) FY	20	15	11	19	65
(C-B) H	20	20	20	20	80
(C-B) FY	20	11	11	15	847
<b>TOTAL</b>	<b>245</b>	<b>234</b>	<b>204</b>	<b>221</b>	<b>904</b>

\*;AG: Archivo general; MU: Museo Universum; EO: Estadio Olímpico 68; EP: Estadio Pumitas GF: Gimnasio Fisicoculturismo; CV: Camino-verde; ;EB: Estadio de Beisball;; V-I: Veterinaria-Ingeniería; I-C: ingeniería-Contaduría; C-B: Contaduría- Biología.

\* H: hojas; FY: flores/yemas.

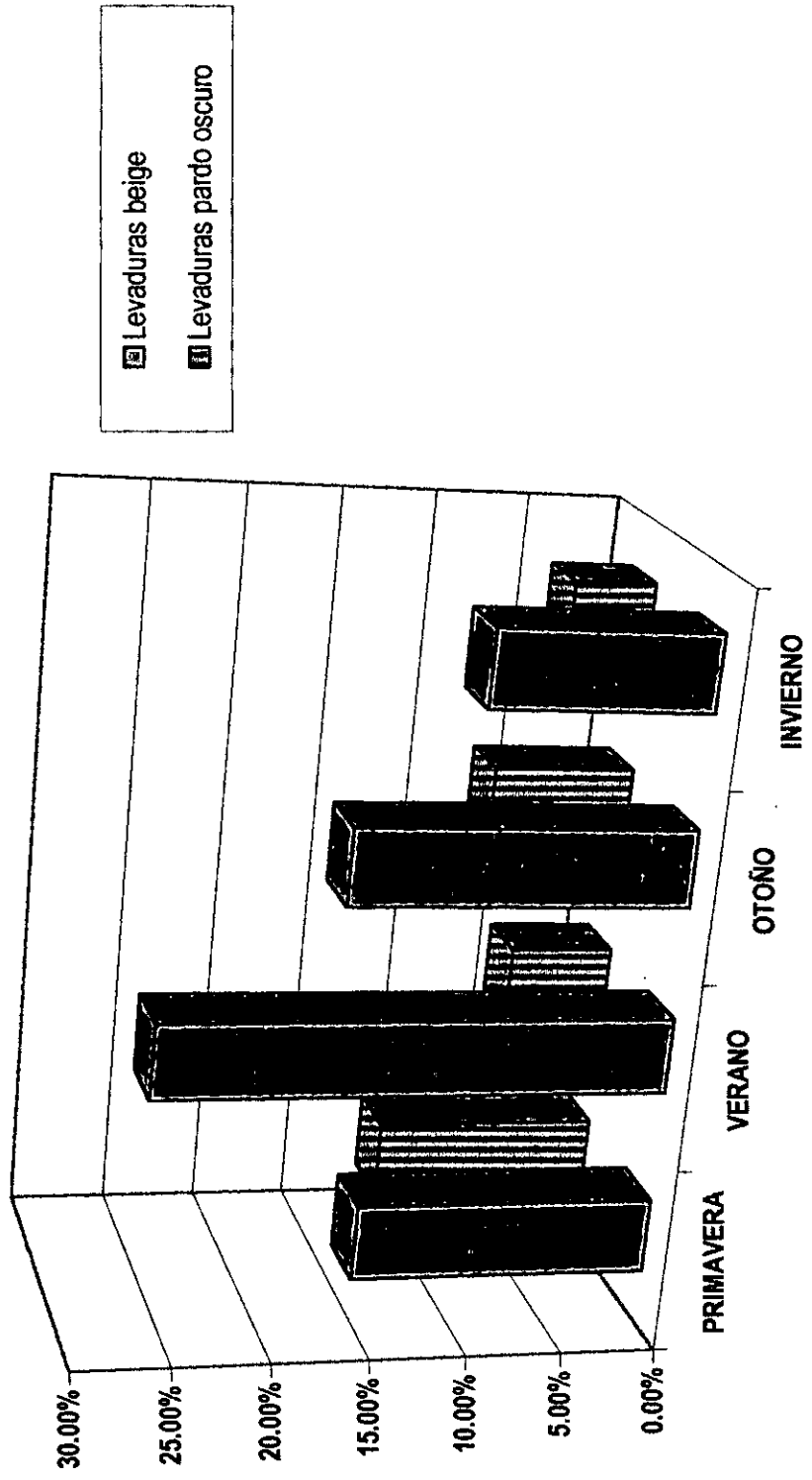
**Cuadro 8. Núm. de colonias con pigmento pardo, sugestivas de ser *Cryptococcus* spp obtenidas durante las cuatro estaciones del año (1998) en Ciudad Universitaria, UNAM.**

COLONIA	ESTACIÓN				TOTAL
	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	
Levaduras beige	54	92	61	40	247
Levaduras pardas oscuras	41	19	26	15	101
<b>TOTAL</b>	<b>95</b>	<b>111</b>	<b>87</b>	<b>55</b>	<b>348</b>

**Cuadro 8.1. Pruebas de *chi* cuadrada para determinar la variación estacional durante 1998, de las colonias con pigmento pardo, sugestivas de ser *Cryptococcus* spp, asociadas a los eucaliptos de Ciudad Universitaria, UNAM.**

Estaciones				$\chi^2$	<i>P</i>
Primavera vs.	Verano vs.	Otoño vs.	Invierno	16.92	0.001

Gráfica 1. Frecuencia relativa de las colonias pigmentadas sugestivas de ser *Cryptococcus* spp.



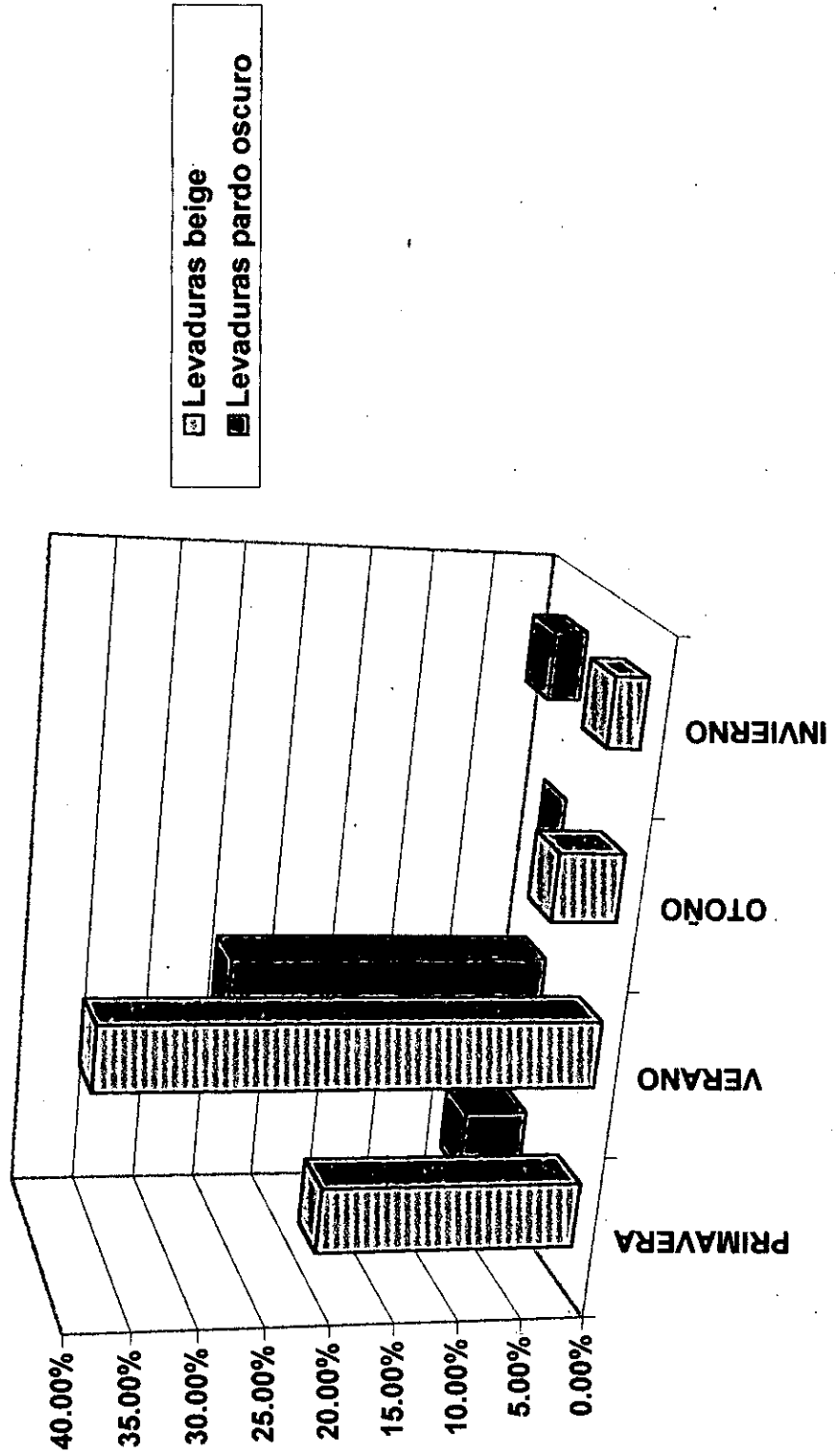
**Cuadro 9. Núm. de colonias levaduriformes pardas y cápsuladas obtenidas durante las cuatro estaciones del año 1998.**

COLONIA	ESTACIÓN				TOTAL
	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	
Levaduras beige	8	15	2	1	26
Levaduras pardas oscuras	2	10	0	1	13
<b>TOTAL</b>	10	25	2	2	39

**Cuadro 9.1. Prueba de *chi* cuadrada para determinar la variación estacional durante 1998, de las colonias con pigmento pardo y cápsuladas, sugestivas de ser *Cryptococcus* spp, asociadas a *Eucalyptus* de Ciudad Universitaria UNAM .**

Estaciones				$\chi^2$	<i>P</i>
Primavera vs.	Verano vs.	Otoño vs.	Invierno	1.535	ns

Gráfica 2. Frecuencia relativa de las colonias levaduriformes capsuladas y pigmentadas.



**Cuadro 10. Origen de las cepas pigmentadas y cápsuladas durante las cuatro estaciones del año.**

ESTACIÓN	Lev. pardo claro (beige)		Lev. pardo-oscuro		TOTAL
	Hoja	flor/yema	Hoja	flor/yema	
PRIMAVERA	4	4	2	0	10
VERANO	5	10	5	5	25
OTOÑO	1	1	0	0	2
INVIERNO	1	0	0	1	2
<b>TOTAL</b>					<b>39</b>

**Cuadro 11 . Características morfológicas y fisiológicas de las cepas de *Cryptococcus* obtenidas en este estudio.**

PRUEBAS	No. 33 P	No. 33 V	No. 89 P	No. 89 V	No. 59 P	No. 45 P	No. 45 V	No. 42 V	No. 99 I
Pigmento en agar niger	beige	beige	beige	beige	Pardo oscuro	Pardo oscuro	Pardo oscuro	Pardo oscuro	Pardo oscuro
Cápsula	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensibilidad a la Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desarrollo a 37°C	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	++
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+Positivo presencia.

- Negativo o ausencia.

+ escaso; ++ moderado; +++ abundante.

\* P= primavera; V= verano; I= invierno.



Cuadro 12. Asimilación de fuentes de carbono (Métodos de Wickerham y Vitek)

CARBOHIDRATOS	No. 42 V	No. 45 P	No. 45 V	No. 59 P	No.99 I	No. 33 P y 33 V	No. 89 P y 89 V
Galactosa	-	-	+	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+
Xilitol	-	+	+	-	+	-	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-
2-Ceto-D-Gluconato	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Melobiosa	-	+	+	-	-	-	-
Urea	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+	+
Trealosa	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Melezitosa	+	+	+	+	-	-	+
Palatinosa	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	-	+
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+
Metil-D-Glucósido	+	+	+	+	+	-	+
N-Acetil-D-Glucosamina	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	-	+	+
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	+	-	+
L-sorbosa	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnosa	+	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+

P= primavera; V= verano; I= invierno.  
Asimilación= += positiva; - = negativa

Cuadro 13. Origen de las cepas clasificadas como *Cryptococcus albidus*.

ESTACIÓN	REGIÓN	úm. ÁRBOL	SUSTRATO	PIGMENTACIÓN*
PRIMAVERA	CV	45	HOJA	PARDO OSCURO
PRIMAVERA	CV	59	HOJA	PARDO OSCURO
PRIMAVERA	V-I	89	FLOR/YEMA	BEIGE
PRIMAVERA	EP	33	HOJA	BEIGE
VERANO	EP	33	HOJA	BEIGE
VERANO	CV	45	HOJA	PARDO OSCURO
VERANO	V-I	89	FLOR/YEMA	BEIGE
VERANO	GF	42	FLOR/YEMA	PARDO OSCURO
INVIERNO	I-C	99	FLOR/YEMA	PARDO OSCURO

\*Pigmentación que se presentó en el primoaislamiento.

\*CV: Camino-verde; V-I: Veterinaria-Ingeniería; EP: Estadio Pumitas; GF: Gimnasio Fisicoculturismo;  
I-C.: Ingeniería- Contaduría.

**Cuadro 14. Micromicetos aislados a partir de las 904 muestras de hojas y flores/yemas de *Eucalyptus* spp.**

FAMILIA	GÉNERO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	TOTAL
<i>Monilaceae</i>	<i>Penicillium</i>	102	54	68	94	318
	<i>Aspergillus</i>	60	71	44	16	191
	<i>Monilia</i>	0	3	12	0	15
<i>Dematiaceae</i>	<i>Alternaria</i>	36	83	67	46	232
	<i>Cladosporium</i>	3	34	33	6	76
<i>Tuberculariaceae</i>	<i>Tricladium</i>	5	15	25	65	110
	<i>Zygosporium</i>	0	53	9	17	79
	<i>Fusarium</i>	2	1	7	0	10
<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor</i>	18	45	43	15	121
<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Rhodotorula</i>	12	21	50	37	120
<i>Agonomycetaceae</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	13	1	16	4	34

**Cuadro 14.1. Prueba de *chi* cuadrada para comparar la composición de micromicetos aislados a partir de las 904 muestras de hojas y flores/yemas de *Eucalyptus*, durante las cuatro estaciones del año (1998).**

Estaciones				X <sup>2</sup>	P
Primavera vs.	Verano vs.	Otoño vs.	Invierno	349.15	0.00001

**Cuadro 15. Frecuencia relativa de las familias aisladas de *Eucalyptus* spp**

<b>FAMILIA</b>	<b>Núm. de colonias</b>	<b>Frec. Relativa %</b>
<i>Moniliaceae</i>	524	57,96
<i>Dematiaceae</i>	308	34,07
<i>Tuberculariaceae</i>	199	22,01
<i>Mucoraceae</i>	121	13,38
<i>Cryptococcaceae</i>	120	13,27
<i>Agonomycetaceae</i>	34	3,76

## X. DISCUSIÓN

Para definir el hábitat natural del género *Cryptococcus*, se han realizado diversos estudios en distintas fuentes naturales<sup>76, 88, 15, 84</sup>, es posible que en algunos de éstos sustratos, la presencia de la levadura haya sido circunstancial, ya que la frecuencia de aislamientos fue baja y además, no se observó que la levadura estuviera provocando algún daño o cambio en esos sustratos.

Los estudios realizados para el aislamiento de las especies de importancia médica, en particular de la especie *neoformans* a partir de heces de aves<sup>6, 7, 98, 99</sup>, principalmente de palomas<sup>38, 47</sup>, ha conducido a pensar que dicho sustrato, podría ser el hábitat natural del hongo, sin embargo, debido a que en las heces no se ha descrito el apareamiento de la levadura, algunos autores han considerado a este sustrato como un reservorio para *C. neoformans*<sup>35</sup>.

Por otro lado también existen estudios, en los que se ha descrito la recuperación de especies de *Cryptococcus* de importancia médica a partir de diversas angiospermas, por lo que se ha sugerido que este tipo de plantas también podrían ser su fuente natural<sup>4, 16, 92, 93, 109</sup>. Es muy probable que las angiospermas (por ejemplo los eucaliptos), en sus flores y hojas, ofrezcan las condiciones nutricionales(carbohidratos, nitrógeno, proteínas, etc) y ambientales (temperatura<sup>33,120</sup>, pH<sup>6,88</sup>, aereación<sup>120</sup>, etc.) para el establecimiento y desarrollo de micromicetos tanto levaduriformes como filamentosos, además estas plantas tienen una distribución geográfica amplia, por lo que podemos encontrarlas casi en cualquier parte del mundo al igual que los hongos.

### ***Cryptococcus albidus***

- **Preferencias de organo hospedero (flores/yemas y hojas)**

En el presente estudio se informa del aislamiento de *Cryptococcus albidus*, especie considerada de importancia médica, a partir de *Eucalyptus* spp. En total se recuperaron nueve cepas, cinco aislamientos a partir de hojas y cuatro de flores/yemas. Estos aislamientos concuerdan con los datos publicados por otros autores<sup>91</sup>, quienes han indicado que *C. albidus* es frecuentemente aislado de flores y hojas y que su teleomorfo, *Filobasidium floriforme*, se ha aislado del pasto *Erianthus giganteus*<sup>86</sup>.

Los aislados a partir de flores pueden explicarse a que las flores son un microhábitat caracterizado por un alto contenido de carbohidratos y por sus condiciones de humedad, lo que puede favorecer el crecimiento de la levadura. La frecuencia de aislamientos en las hojas podría atribuirse a la amplia superficie del filopiano, en donde se puede encontrar mayor número de colonias levaduriformes, es importante señalar que no se observó ningún daño foliar (zonas de tejido necrosado, decoloramiento de las hojas, etc), por lo que suponemos que *C. albidus* no desempeña una función de parásito en este sustrato.

- **Variación temporal (estaciones del año)**

Con respecto a la temporada, la tabla de contingencia de *chi* nos muestra diferencias significativas en la variación estacional entre las levaduras pigmentadas en agar níger, asociadas a los eucaliptos (cuadro 8.1.), por lo que es importante señalar que durante la estación de verano, que corresponde a la temporada de lluvias existe un incremento en el aislamiento de las levaduras (Rose, 1987); esto puede deberse a que la humedad del ambiente es mayor en esta temporada y por lo tanto también se modifica el crecimiento de la vegetación, con lo que aumentan los nutrientes en ella, por ejemplo las hojas van a tener mayor concentración de agua, nitrógeno, menor cantidad de metabolitos secundarios, menor dureza, mayor cantidad de proteínas, etc. (Whipps, 1993), condiciones que son propicias para el desarrollo y establecimiento de los micromicetos. En esta temporada, la humedad atmosférica (0.4 – 6.6 mm) y la temperatura ( $\pm 28.0^\circ\text{C}$  y  $\pm 12.0^\circ\text{C}$ ) en el *campus* de C.U. fueron las más altas durante todo el muestreo (Anexo 2) lo que pudo favorecer las condiciones para el desarrollo de *C. albidus*, además coincide con la época de florecimiento y como ya se mencionó las flores ofrecen condiciones favorables para el establecimiento de las colonias fúngicas.

Durante las estaciones de otoño e invierno (temporada de sequía) las condiciones ambientales prevalentes como: temperaturas extremas, disminución de la humedad y los cambios químicos del sustrato en general, influyen directamente en la vegetación, tan es así que las hojas en esa temporada son más gruesas y son más ricas en sustancias alelopáticas (principalmente en hojas perennifolias<sup>17</sup>), lo que probablemente afecte el establecimiento de las levaduras en este sustrato, debido a que necesitarían de las enzimas necesarias para aprovechar los componentes disponibles en el sustrato, además debido a la disminución de recursos los microorganismos podrían estar sometidos a condiciones de estrés, lo que se vería reflejado en los impactos de la competencia<sup>44</sup> y micofagia<sup>15,120</sup>.

- **Variación espacial (zonas de riego)**

Con respecto a las zonas de donde provienen nuestros aislamientos, seis cepas se caracterizaron por ser de zonas con riego regular, el resto, que corresponde a tres cepas, fueron aisladas de la zona sin riego, ambos sitios son lugares sombreados. La localidad o zona en donde se encuentre la especie vegetal que servirá de hábitat a los micromicetos, juega un papel muy importante ya que afecta las propiedades físicas (dureza de las hojas, cantidad de nutrientes, etc.) y químicas (pH, concentración de nitrógeno, etc) de la especie vegetal a la que estén asociados, en este caso de los eucaliptos y a su vez también determinan las condiciones microclimáticas de los tejidos vegetales hospederos.

En las zonas con riego constante y abiertas, no se recuperó ninguna cepa de *Cryptococcus albidus* y el aislamiento de otras levaduras fue escaso, estas zonas se caracterizan por tener una menor densidad de eucaliptos, por lo que cada árbol se encuentra muy alejado de otro y entonces más expuestos a los vientos, desecación y a mayor radiación, además el riego que es con aguas tratadas pueden estar influyendo en que los hongos no se establezcan en esos árboles.

Es interesante recalcar que tres cepas (33, 45 y 89) fueron recuperadas del mismo sitio, individuo y sustrato durante la época de primavera y verano consecutivamente, lo que podría sugerir que los eucaliptos fueran una de varias fuentes naturales de *Cryptococcus albidus*.

- **Factor humedad y tamaño de la cápsula**

En general la humedad, temperatura, luz y composición química del sustrato son factores determinantes para el establecimiento y desarrollo de los hongos y en el caso de las especies de *Cryptococcus*, se requiere de ambientes altamente húmedos; ya que no sobreviven en zonas en donde estén expuestos a la luz directa y por lo tanto a altas temperaturas <sup>35, 79</sup>.

Por otro lado, la humedad está estrechamente relacionada con el tamaño y presencia de la cápsula <sup>9, 54</sup>. *Cryptococcus* presenta cápsulas de gran tamaño cuando las levaduras son aisladas de zonas caracterizadas por alta humedad, en cambio en hábitats secos, la cápsula no existe o es escasa lo

cual hace que la levadura esté más expuesta a sus depredadores (por ejemplo, amibas), lo que nos haría pensar que en las estaciones de otoño e invierno, las levaduras se encuentren acapsuladas y por lo tanto susceptibles a la depredación.

Nosotros observamos en el examen microscópico con tinción de tinta china levaduras cápsuladas; sin embargo, en general la cápsula se visualizó pequeña (aprox. 1-4  $\mu\text{m}$ ), pero cuando se resembraron en agar-chocolate y se incubaron a 37°C, las cápsulas fueron mayormente visibles (aprox. 4-8  $\mu\text{m}$ ), lo cual hace pensar que el tamaño de la cápsula depende, además de la humedad, de los nutrientes y de la temperatura existentes en el medio de cultivo como lo describe Rippon (1988) <sup>100</sup>.

- **Crecimiento a 37°C, producción de pseudomicelio y asimilación de fuentes de carbono.**

El medio de níger no es selectivo para *Cryptococcus neoformans* <sup>75,77</sup>, ya que en el presente trabajo las cepas caracterizadas como *C. albidus* y *Rhodotorula* spp, fueron capaces de desarrollar pigmento beige e incluso con el tiempo algunas cepas de *Cryptococcus albidus* produjeron pigmento pardo oscuro y aunque el medio contiene antibióticos, que disminuyen el crecimiento de bacterias y hongos filamentosos, la purificación de las cepas fue complicada por la abundancia de contaminantes, lo cual nos limitó en la recuperación de numerosas colonias levaduriformes.

Muchas de las levaduras que no produjeron pigmento y eran acapsuladas se descartaron, por la experiencia obtenida en este estudio, sugerimos el uso de otros medios de cultivo como el agar dextrosa Sabouraud (ADS), medio en el cual tanto los hongos levaduriformes como los filamentosos se desarrollan muy bien y entonces se tomarían en cuenta todas aquellas colonias levaduriformes presentes en el medio, ya que *Cryptococcus* no siempre presenta cápsula, lo cual está muy relacionado con la humedad del ambiente en donde se recupere.

El crecimiento a 37°C de ciertas especies del género *Cryptococcus* está estrechamente ligado a la patogenicidad de la cepa <sup>54</sup>. En las nueve cepas de *C. albidus* aisladas, observamos crecimiento, aunque variable a esa temperatura; cuatro tuvieron desarrollo moderado y cinco crecimiento abundante; lo que nos llevaría a pensar que potencialmente son patógenas pudiendo infectar a huéspedes con severos problemas de inmunocompromiso.



Las estructuras compatibles con filamentos que se observaron en la placa de Dalmau y en el agar-chocolate nos lleva a plantearnos la posibilidad de la transición a la fase teleomórfica de *C. albidus*, por lo que en trabajos futuros resultaría interesante el uso de medios de cultivo enriquecidos y con condiciones ambientales óptimas para lograr la reproducción sexual en este tipo de cepas.

La asimilación por el método del VITEK presentó algunos errores como en la asimilación de inositol en el que todas las cepas resultaban negativas, además de diferir en el resultado de otros carbohidratos, esto puede ser por el origen de las cepas, ya que el VITEK es utilizado esencialmente para aislamientos clínicos, por otro lado, la base de datos de este sistema no reconoce patrones bioquímicos que no coincidan con los que tiene establecidos o bien no identifica correctamente cuando se trata de especies raras como lo han observado otros autores <sup>5,29,42</sup>; sin embargo, la asimilación de fuentes de carbono fue útil para la diferenciación de las cepas que presentaban cápsula, positivas a la urea y desarrollo a 37°C. De acuerdo a Güeho <sup>52</sup> y Fonseca <sup>45</sup>, *C. albidus* es una especie muy heterogénea con respecto a sus patrones bioquímicos y fisiológicos; sin embargo, en el método de Wickerham observamos un comportamiento homogéneo en nuestras cepas, ya que la mayoría de los resultados obtenidos coincidieron con los patrones bioquímicos descritos para *C. albidus* <sup>81, 90, 100</sup>.

Los aislamientos de *Cryptococcus albidus* en este trabajo resultan epidemiológicamente interesantes, ya que existen numerosos casos publicados de criptococosis causadas por esta especie en pacientes con SIDA y hasta hace poco tiempo no era considerado patógeno para el hombre <sup>51, 63, 82</sup>.

Es interesante señalar que levaduras diferentes al género *Cryptococcus* como *Rhodotorula* spp y colonias levaduriformes no identificadas, también fueron recuperadas en este estudio, el género *Rhodotorula* también pertenece a la familia Cryptococaceae, orden Cryptococales, clase Blastomycetes <sup>56</sup>, y es posible que las otras levaduras no identificadas pudieran pertenecer a los géneros *Candida* y *Trichosporon*, que son aislados frecuentemente de hojas y flores de diversas plantas, por lo que no es raro que en los eucaliptos se encuentren coexistiendo ya que es probable que compartan requerimientos ambientales y nutricionales similares, no obstante sería interesante

conocer si entre ellas se establece algún tipo de competencia como podría ser por el espacio, nutrientes, etc., lo que tal vez este determinando la frecuencia de algunas especies en esos hábitats.

### **Micromicetos filamentosos**

- **Variación temporal (estaciones del año)**

En cuanto a la composición de otros micromicetos aislados durante el muestreo y asociados a los eucaliptos, observamos de acuerdo al resultado de la tabla de contingencia de *chi* ( cuadro 14.1) que existen diferencias significativas entre la temporada y la composición de los hongos, es decir, que dependiendo de la estación, la composición fúngica en los eucaliptos es distinta. Es probable que la composición de los micromicetos cambie espacialmente porque los recursos y condiciones en las hojas y flores/yemas se van a modificar de acuerdo a las características climáticas de cada temporada, así como de los procesos ecológicos como factores de depredación, competencia, disturbio, estrés, micogafia, etc.

La composición de hongos varió entre estaciones, siendo la estación de verano, al igual que en el caso de las levaduras pigmentadas, en la que se recuperó el mayor número de hongos. La variación estacional también se ve reflejada en la estructura de las comunidades de micromicetos, en donde ocurrieron cambios en los grupos dominantes entre las temporadas. El género fúngico dominante en primavera fue *Penicillium*, en cambio en verano fue *Alternaria*, *Tricladium* en otoño y finalmente en invierno nuevamente *Penicillium*. Estas diferencias pueden estar determinadas por los cambios estacionales que provocan modificaciones en el ambiente, como serían cambios climáticos con relación a la temperatura, humedad, luz, viento, disponibilidad de nutrientes y que están estrechamente relacionadas con la adaptabilidad de cada género fúngico y en consecuencia con el éxito de su establecimiento.

La presencia de hongos filamentosos podría explicarse a que aunque aparentemente la mayoría de este tipo de micromicetos se encuentran como saprobios y/o parásitos de sustratos vegetales y nuestras muestras fueron hojas y flores sanas y jóvenes, es posible que su aparición se deba a la dispersión de sus esporas por medio del viento o de algunos otros vectores como insectos y/o aves. Es necesario realizar más estudios que puedan esclarecer la dinámica entre las comunidades fúngicas y por consiguiente poder establecer su relación con el sustrato en donde habitan.

## Aislamiento de otras especies de *Cryptococcus* de importancia médica

Las otras especies de importancia médica como son *C. laurentii* y *C. neoformans* con sus dos variedades aunque han sido aisladas de eucaliptos <sup>26</sup>, en nuestro estudio no se lograron recuperar, nosotros lo atribuimos a que las condiciones ambientales en nuestro lugar de muestreo difieren de las que existen en las zonas en donde se ha aislado al hongo, además los aislamientos realizados han sido esporádicos, lo que nos indica que talvez se trate de contaminaciones por el viento o por los animales que visiten ese tipo de flora (insectos, aves y/o mamíferos).

Es importante no descartar la posibilidad de que existan otras fuentes naturales para las especies de *Cryptococcus* de importancia médica, sobre todo tomando en cuenta que estas especies han sido aisladas de diversos substratos, lo que nos indica que la distribución de *Cryptococcus* spp no está restringida a un solo nicho ecológico, esto concuerda con lo establecido por Ellis y Pheiffer <sup>36</sup> quienes proponen el postulado de que el nicho ecológico del hongo se trate de una planta, es muy factible esto, puesto que de algún sitio las aves y/o mamíferos deben de ingerir a las levaduras o basidiosporas, por lo que sólo actuarían como un vector indirecto del hongo.

Con lo que respecta a *C. neoformans* var. *gattii* no se aisló de ninguno de los eucaliptos muestreados, sin embargo no hay que descartar que también se ha recuperado a la levadura de otras especies de eucaliptos, por lo que nosotros sugerimos para estudios posteriores que se muestreen aquellas especies que existen en nuestro país y en donde se ha confirmado la presencia de *C. neoformans* var. *gattii*, por otro lado es importante tener en cuenta que las condiciones climáticas de México y Australia son muy distintas y no hay que olvidar que en nuestro país el eucalipto es una especie introducida y por lo tanto el desarrollo de esta planta y de los hongos asociados a ellos en ambos países van a variar de acuerdo a los factores ambientales a que estén sometidos en cada región.

Sin embargo, a pesar de que existen publicaciones sobre el aislamiento de esta variedad en este tipo de planta, nuestros resultados también refuerzan aún más la posibilidad de la existencia de otras fuentes naturales, ya que en países como Colombia, Ruanda, Canadá, Argentina, Brasil, Paraguay, Zaire, entre otros, así como México en donde existen casos publicados de criptococosis

por la var. *gattii* y presencia de extensas plantaciones de eucaliptos, se han llevado a cabo estudios sobre el aislamiento de la levadura a partir de esta angiosperma y no se ha logrado recuperar a la levadura<sup>8,32,113</sup>. Otro detalle importante que hace dudar sobre la asociación específica ecológica de la var. *gattii* con *Eucalyptus* spp. es que existen países en donde hay casos humanos de criptococosis por esta variedad y no existen plantaciones de eucaliptos o son escasas, lo cual sugiere que en estos lugares podrían existir otras fuentes de infección aún no descubiertas.

Con los antecedentes anteriores y aunado a que en algunos países europeos se han descrito casos clínicos por la var. *gattii*<sup>46, 60, 84, 116</sup>, se refuerza la propuesta de que *C. neoformans* var *gattii* tiene una distribución geográfica mucho más amplia y que por lo tanto no está restringida a regiones tropicales y subtropicales y a la presencia de los eucaliptos como lo habían propuesto algunos autores.

Nosotros proponemos que en estudios posteriores se muestreen también árboles enfermos o material vegetal en degradación, que son lugares en donde es posible que de acuerdo a las características ambientales y nutricionales innatas de esos sitios, como podría ser la presencia de compuestos bifenolados, además de condiciones de poca luz y por lo tanto con mayor humedad pudieran favorecer la presencia de *C. neoformans* o de sus teleomorfos.

En México, existen casos de criptococosis por *C. neoformans* var. *gattii*, y los provocados por *C. neoformans* var. *neoformans* son aún más numerosos, además de que existen casos provocados por especies diferentes a *neoformans* como *C. albidus* y *C. laurentii*<sup>22</sup>, por lo que es importante realizar estudios en los que se pueda esclarecer las condiciones y circunstancias bajo las cuales estas especies y variedades, son capaces de transformarse en patógenos.

Queda mucho por conocer sobre la ecología y epidemiología de las especies de *Cryptococcus* y de muchos de los micromicetos filamentosos y levaduriformes aislados en este trabajo y que son causantes de micosis o alergias en el hombre y animales, así como seguir con la búsqueda de otras fuentes naturales para determinar el hábitat de *Cryptococcus* spp. de importancia médica en México.

## XI. CONCLUSIONES

1. Por la frecuencia obtenida en este trabajo concluimos que las hojas y las flores de *Eucalyptus* spp. constituyen una fuente natural importante para el establecimiento y aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes, particularmente de *Cryptococcus albidus*.
2. Las condiciones ambientales de las estaciones del año determinan la presencia o ausencia de los micromicetos en los eucaliptos, siendo para las levaduras incluyendo a *C. albidus* y para los micromicetos filamentosos aquí descritos, la temporada de verano la propicia para el óptimo aislamiento y desarrollo de ellas.
3. Los eucaliptos pueden constituir una fuente de infección importante para la adquisición de la criptococosis particularmente en pacientes inmunosuprimidos, asociado con la capacidad que presentaron las cepas de *C. albidus* de crecer a 37°C, lo que podría ser considerado como probable factor de patogenicidad de nuestras cepas.
4. Por los diversos aislamientos publicados de *Cryptococcus* spp. a partir de diversas fuentes naturales y los obtenidos en este trabajo, concluimos que la distribución ecológica de estas especies no se restringe a un solo hábitat y a determinadas condiciones ambientales, lo que las convierte al parecer en especies ubicuas.
5. El papel ecológico de los árboles de eucalipto como hospedero específico para *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, es discutible, por lo que es necesario realizar más estudios para la identificación de la(s) fuentes naturales de esta variedad.

## XII. LITERATURA CITADA

1. Ajello, L. 1956. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science* 123: 876-879.
2. Almazán-Vélez, R. 1963. Consideraciones generales de la *Torulopsis cerebral*. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Medicina Rural. I.P.N., México, D.F.
3. Arasteh, K., M. L'Age, U. Futh, G. Grosse y F. Staib. 1995. CD4 lymphocyte count in HIV-positive persons exposed to *Cryptococcus neoformans*. *Zbl. Bakt.* 283: 127-135.
4. Argüero, L. B., D. G. Garza y M. Z. Torres. 1996. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev. Iber. Micol.* 13: 27-28.
5. Balows, A., N. G. Warren y H. J. Shadomy. 1991. Yeast of medical importance. Pp. 617- 629. En: A. Balows, W. Hausler, K. Herrmann, H. Isenberg y H. Shadomy (eds). *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Bangert, R. L., B. R. Cho, P. R. Widders, E. H. Stauber y A.C. Ward. 1988. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. *Avian Dis.* 32: 46-52.
7. Bauwens, L., D. Swinnw, Ch. De Vroey y W. De Meurichy. 1986. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological gardens. *Mykosen* 29: 291-294.
8. Bava, A. J. y R. Negroni. 1992. The epidemiological characteristics of 105 cases of cryptococcosis diagnosed in the Republic of Argentina between 1981-1990. *Rev. Inst. Med. Top. Sao Paulo.* 34: 335-340.
9. Bhattacharjee, A. K., J. E. Bennett y C. P. Glaudemans. 1984. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* 6: 619-624.
10. Bennett, J. E., K. J. Kwon-Chung y D. H. Howard. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 105: 582-586.

11. Blakeman, P.J. 1992. Fungal Interaction on Plant Surfaces. Pp. 853-867. En: C. G., Carroll y T. D. Wicklow (eds) *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, Inc. New York.
12. Bogaerts, J., H. Taelman, J. Batungwanayo, P. Van de Perre y D. Swinne. 1993. Two cases of HIV-associated cryptococcosis due to the variety *gattii* in Rwanda. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 63-64.
13. Bollinger, A. y E. S. Finckh. 1962. The prevalence of cryptococcosis in the koala (*Phasco larctus cinereus*). *Med. J. Aust.* 1: 545-546.
14. Bonifaz, A. 1990. *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez Cervantes, México, D.F.
15. Bunting, L. A. 1979. *Cryptococcus neoformans*: a gastronomic delight of a soil ameba. *Sabouraudia* 17: 225-232.
16. Cabral-Passoni, L. F. 1999. Wood, animals and human being as a reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Rev. Iberoam. Micol.* 16: 77-81.
17. Callejas, A., N. Ordoñez, M.C. Rodríguez y E. Castañeda. 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C, from the environment in Colombia. *Med. Mycol.* 36: 341-344.
18. Cano-Domínguez, C., C. Villareal-Urenda., J. L. Estrada-Aguilar., G. Gómez-Campos y F. Ramírez-Cruz. 1989. Infección por *Cryptococcus neoformans* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Aspectos clínicos, paraclínicos y terapéuticos. *Rev. Med. IMSS (Méx)*. 27:175-179.
19. Carabias, J. y J. Meave. 1987. "La Reserva Ecológica de El Pedregal de San Angel". *Inf. Cientif. y Tecnol.* 9: 16-19.
20. Castañón-Olivares, L. R. y R. López-Martínez. 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings: in México City. *Mycoses* 37: 325-327.

21. Castañón-Olivares L. R. , R. López-Martínez, G. Barriga-Angulo y C. Río-Rósas. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in México. J. Med. Vet. Mycol. 35: 57-59.
22. Castañón-Olivares, L. R., R. Arreguín-Espinosa, G. Ruíz-Palacios y R. López-Martínez. 2000. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American Countries. Rev. Lat-amer. Micol. 42: 35-40
23. Cervantes, R. A., C. Segundo y E. Salas. 1994. The varieties of *Cryptococcus neoformans* isolated from cases of meningitis in Mexico City: their relation with HIV. En: *Program and Abstracts of XII Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. Adelaide, South Australia Resumen P01.110:D80.
24. Clancy, M. N. y J. Fleischmann. 1990. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient with AIDS in Southern California. J. Infect. Dis. 161: 809.
25. Cohen, J. 1982. The pathogenesis of cryptococcosis. J. Infect. 5: 109-116.
26. Colom, V. F., M. Alberdi., I. Meseguer y J. Torres-Rodríguez. 1997. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. Rev. Iberoam. Micol. 14: 63-64.
27. Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. University Press, Columbia.
28. Currie, B., T. Vigus, G. Leach y B. Dwyer. 1990. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Lancet 336: 1442.
29. Dooley, P. D., L. M. Beckius y S. B. Jeffrey. 1994. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. J. Clin. Microbiol. 32: 2889-2892.



30. Dromer, F., O. Ronin y B. Dupont. 1992. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 395-397.
31. Drouhet, E. 1997. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. *J. Mycol. Med.* 17: 10-27.
32. Duarte, A., N. Ordoñez y E. Castañeda. 1994. Association of yeast of the *Cryptococcus* genus with *Eucalyptus* species in Santafé de Bogotá. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 36: 125-130.
33. Dufait, R., R. Velho y C. De Vroey. 1987. Rapid identification of two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mycosen* 30: 483.
34. Ellis, D. H. 1987. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 25: 430-431.
35. Ellis, D. H. y T. J. Pfeiffer. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 7: 1642-1644.
36. Ellis, D. H. y T. J. Pfeiffer. 1990. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 336: 923-925.
37. Ellis, D. H. y T. J. Pfeiffer. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 8: 321-325.
38. Emmons, C. 1995. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62: 227-232.
39. Eng, R. H. K., E. Bishburg y S.M. Smith. 1986. Cryptococcal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. J. Med.* 81: 19-23.
40. Espinosa, T. 1993. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos y patogénicos de *Sporothrix schenckii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.N.A.M. México, D.F.

41. Evans, E. E. 1950. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular agglutinations. *J. Immunol.* 64: 423-430.
42. Fenn, P. J., H. Segal, B. Barland, D. Denton, J. Whisenant, H. Chun, K. Christofferson, L. Hamilton y K. Carroll. 1994. Comparison of updated vitek Yeast Biochemical Card and API 20C Yest Identification Systems. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1184-1187.
43. Fokkema, N. J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiol. Pl. Pathol.* 3: 195-205.
44. Fokkema, N. J., J. G. DenHouter, Y. J. Kosterman y A. L. Nelis. 1979. Manipulation of yeast on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72: 19-29.
45. Fonseca, A., G. Scorzetti y J. W., Fell. 2000. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Can. J. Microbiol.* 46: 7-27.
46. Fromtling, R. A., S. Shadomy, J. Shadomy y W. E. Dismukes. 1982. Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in non-endemic areas. *J. Clin. Microbiol.* 16: 408-410.
47. Gallo, M. G., P. Cabeli y V. Vidotto. 1989. Presence of pathogenic yeast in the feces of the semi-domesticated pigeon (*Columba livia*, Gmelin 1789, urban type) from the city of Turin. *Parassitologia.* 31: 207-212.
48. Garza, G. D., J. U. Buendía, E. Martínez y B. Argüero. 1995. Caracterización de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 37: 273-279
49. Gatti, F. y R. Eeckels. 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Part. 1. Description of the disease and of the strain. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* 50: 689-694.

50. Gezuele, E., L. Calegari, D. Sanabria, G. Davel y E. Civila. 1993. Isolation in Uruguay. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. Rev. Iberoam. Micol. 10: 5-6..
51. Gluck, J. L., J. P. Myers y L. M. Pass. 1987. Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus*. S. Med. J. 80: 511-513.
52. Güého, E., L. Improvisi, R. Christen & G.S. de Hoog. 1993. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeast determined from partial large subunit rRNA sequences. Antonie van Leeuwenhoek. 63: 175-189.
53. Guiguen, C., M. T. Boisseau-Lebrueil y B. Couprie. 1986. Flore fungique du tube digestif isolé de pigeons de ville à Boordeaux. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. 1: 151-154.
54. Hamilton, J. Y J., Goodley. 1996. Virulence factors of *Cyprococcus neoformans*. Curr. Top. Med. Mycol. 7: 19-42.
55. Hernández-Gómez, M. R. 1988. Biotipificación de cepas de *Filobasidiella* (*Cryptococcus neoformans* y *gattii* aislados a partir de casos clínicos humanos. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, U.N.A.M. México, D.F.
56. Herrera, T y M. Ulloa. 1990. Distribución, hábitat e importancia de los hongos. Generalidades sobre morfología y reproducción. Pp. 25-66. En: *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. Ed. Fondo de cultura económica, México.
57. Ikeda, R. A. Nishikawa, T. Shidona y Y. Fukasawa. 1985. Chemical characterization capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype AD. Microbiol. Inmunolo. 29: 981-991.
58. Jiménez-Lucho, V. E., R. Busto y E. J. Fisher. 1985. Disseminated cryptococcosis with muscular involvement. J. Infect. Dis. 151: 567.
59. Kendrick, B. 1992. Yeast: Polyphyletic Fungi. Pp. 108-113. En: *The Fifth Kingdom. Focus Texts*. Notario.

60. Kohl, K. H., H. H. Schrettenbronner y K. J. Kwon-Chung. 1985. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Europe. The Lancet. 29: 1515.
61. Kovacs, J. A. 1985. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern. Med. 103: 533-538.
62. Kozel, T. R. 1977. Non-encapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. II. Surface receptors for cryptococcal polysaccharide and their role in inhibition of phagocytosis by polysaccharide. Infect. Immun. 19: 99-106.
63. Krumholz, R. A. 1972. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus*. Am. Rev. Res. Dis. 105: 421-424.
64. Kurtzman, C.P. 1973. Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. Mycologia. 65: 388-395.
65. Kwon-Chung, K.J. 1975. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia. 67: 1197-1200.
66. Kwon-Chung, K. J. 1976. A new species of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*: B and C serotypes. Mycologia. 68: 942-946.
67. Kwon-Chung, K. J., J. E. Bennett y T. S. Theodore. 1978. *Cryptococcus bacillisporus* sp. Nov. Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. Int. J. Sist. Bacterio. 28: 616-620.
68. Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck y J. E. Bennett. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). J. Clin. Microbiol. 15: 535-537.
69. Kwon-Chung, K. J. y J. E. Bennett. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Ann. J. Epidemiol. 120: 123-130.
70. Kwon-Chung, K. J. & J. E. Bennett. 1984. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. Zbl. Bak. Microbiol. Hyg. 257: 213-218.

71. Kwon-Chung, K. J., A. Varma y D. H. Howard. 1990. Ecology of *Cryptococcus neoformans* and prevalence of its two varieties in AIDS and non-AIDS associated cryptococcosis. Pp. 103:113. En: H., Vanden Bossche, Mackenzie DWR, Cauwenbergh G, VanCutsem J., Drouhet E., Dupont B., (eds). *Mycoses in AIDS patients*. Plenum Press, New York.
72. Kwon-Chung, K. J. y J. E. Bennett. 1992. *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Malvern
73. Lazera, M. S., B. Wanke y M. Nishikawwa. 1993. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic source in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 449-454.
74. Loaiza-Loeza, S. 1988. Criptococosis. *Infectología*. 8: 387-395.
75. López-Martínez, R., L. J., Méndez-Tovar, F., Hernández-Hernández y L. R., Castañón-Olivares. 1995. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Trillas, México, D.F.
76. López-Martínez, R. y L. R. Castañón-Olivares. 1995. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from bird dropping, fruit and vegetables in Mexico city. *Mycopathologia*. 129: 25-28.
77. López-Martínez, R. y L. R. Castañón-Olivares. 1996. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de la criptococosis. *Rev. Mex. Patol. Clín.* 44: 177-182.
78. Mack, R. N. 1985. En: *Studies on plant demography*. Academic press.
79. Madeira-López, A., M. T. Placido y Cabeza-Silva. 1986. Comparative study of the temperature profiles of growth and death of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* and the non-pathogenic *Cryptococcus albidus*. *J. Basic. Microbiol.* 26: 43-47.
80. Martínez-Cruz, J. 1989. Técnicas de estudio, reactivos y medios de cultivo. Pp. 65-83. En: "3er Curso Internacional de Tópicos sobre taxonomía genética y conservación de las levaduras y su aplicación en Biotecnología". Cuernavaca, Morelos.
81. McGinnis, R. . 1980. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. Academic Press. New York.

82. Melo, J. C., S. Srinivasan, M. L. Scott y M. J. Raff. 1980. *Cryptococcus albidus* meningitis. J. Infect. 2: 79-82.
83. Montagna, M. T., A. M. Tortorano, L. Fiore, A. M. Inglettii y S. Barbuti. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italie. Note I. Premier cas autochtone de Méningite á sérotype B chez un sujet VIH positif. J. Mycol. Méd. 7: 90-92.
84. Montagna, M. T., M. A. Viviani, A. Pulito, C. Arala, A. M. Tortorano, L. Fiore y S. Barbuti. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italie. Note II. Environmental investigation related to an autochthonous clinical case in Apulia. J. Mycol. Méd. 7: 93-96.
85. Morrow, P. A. 1978. Tree ring evidence for chronic insect suppression of productivity in subalpine *Eucalyptus*. Science. 201: 1244-1246.
86. Olive, L. S. 1968. An unusual new heterobasidiomycete with Tilletia-like basidia. J. Elisha Mitchell. Sci. Soc. 84: 261-266.
87. Padhye, A. A., A. Chakrabarti, J. Chander y L. Kaufman. 1993. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in India. J. Med. Vet. Mycol. 31: 165-168.
88. Pal, M. y B. S. Mehrotra. 1984. Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruit and vegetables. Mycoses. 28: 200-205.
89. Parker, A. y J. P. Blakeman. 1984. Stimulation of *Uromyces viciae-fabae* in vitro and in vivo by the phylloplane yeast *Cryptococcus*. Physiol. Pl. Pathol. 24: 119-128.
90. Phaff, H. J. y Fell W. J. 1971. *Cryptococcus*. Pp. 1088-1166. En: Lodder J (ed) *The Yeast. A taxonomic study*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
91. Phaff, H. J. y W. T. Starmer. 1987. Yeast associated with plants, insects and soil. Pp. 123-180. En: Rose A. H. y J. S. Harrison (eds). *"The Yeast". Biology of Yeast*. Academic Press; London. Vol I.

92. Pfeiffer, T. J. y D. H. Ellis. 1990. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J. Infect. Dis.* 163: 929-930.
93. Pfeiffer, T. J. y D. H. Ellis. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 407-408.
94. Pfeiffer, T. J. y D. H. Ellis. 1993. Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 401-404.
95. Procknow, J. J. y J. R. Benfield. 1965. Cryptococcal hepatitis presenting as a surgical emergency. *J. Am. Med. Assoc.* 191: 269-278.
96. Queiroz, L. A., A. Purchio, C. R. Paul y W. Gambale. 1978. Assimilation of carbon sources by *Cryptococcus neoformans*. Pp. 237-245 *En: Proceeding of the IV International Conference on the Mycoses.* PAHO. Scientific Publication. Washington, D.C.
97. Randall, R. E., W. K. Stacy y E. C. Toone. 1968. Cryptococcal pyelonephritis. *N. Engl. J. Med.* 279: 66.
98. Refal, M., S. A. Selim, F. Elshabourii y H. H. Youssef. 1983. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeast from pigeon droppings in Egypt. *Sabouraudia.* 21: 163-165.
99. Rios-Rosas, C. 1992. Aislamiento e identificación de especies de *Cryptococcus* en materia fecal de aves de zoológico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
100. Rippon, J. W. 1988. *Medical Mycology.* W.B. Sanders, Philadelphia.
101. Rodrigues de Miranda, L., y R. J., Bandoni. 1984. Systematic discussion of the yeast phase of the species of the Sirubusidiaceae and Tremellaceae. Pp 546-555. *En: Kreger-van Rij N. J. W. (eds) The yeast. A taxonomic study.* Elsevier, Amsterdam.
102. Rose, A. H. 1987. Responses to the Chemical Environment. Pp. 5-40. *En: Rose, A. H. y J. S. Harrison (eds) "The Yeast". Biology of Yeast.* Academic Press, London. Vol. II.

103. Segretain, G., E. Drouhet y F. Mariat. 1966. *Diagnóstico de laboratorio en micología*. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
104. Segura, S. 1995. Estudio poblacional de *Eucalyptus resinifera*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.
105. Scholer, H. J. 1985. Diagnosis of Cryptococcosis and Monitoring of Chemotherapy. *Mykosen*. 28: 5-16.
106. Severo, L. C., F. De Mattus Oliveira y A. T. Londero. 1999. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. *Rev. Iberoam. Micol.* 16: 152-154.
107. Sinnott, J. T., J. Rodnite, P. J. Emmanuel y A. Campos. 1989. *Cryptococcus laurentii* infection complicating peritoneal dialysis. *Pediatric. Infect. Dis. J.* 8: 830-835.
108. Sorrell, C. T., C. A. Chen, P. Ruma, W. Meyer, T. J. Pfeiffer, D. H. Ellis y A.G. Brownlee. 1996. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by Random Amplification of Polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1253-1260.
109. Sorrell, C. T. y D. H. Ellis. 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 42-43.
110. Staib, F. 1971. Pflanzen als Nahsubstrat for *Cryptococcus neoformans*. *Zentralbl. Bakteriol.* 218: 486.
111. Staib, F., Ch. Thielke, H. S. Randhawa, M. Senska y G. Kulins. 1972. Colonization of dead plants by *Cryptococcus neoformans*. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig (A)*. 222: 115-125.
112. Staib, F. 1994. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. *J. Mycol. Med.* 4: 56-60.
113. Swinne, D., H. Taelman, J. Batungwanayo, A. Bigirankana y J. Bogaerts. 1994. Contribution a l'étude de l'écologie de *Cryptococcus neoformans* en Afrique Centrale. *Méd. Trop.* 54: 53-55.



114. Terrazas, T., E. Cortés, S. Segura, B. Torres, I. Olalde, L. Villasana y V. Tapia. 1995. *La vegetación urbana del campus universitario y la polémica del eucalipto*. UNAM, México, D.F.
115. Tilloston, J. R. y A. M. Lerner. 1965. Prostatism in an 18 year-old boy due to infection with *Cryptococcus neoformans*. N. Engl. J. Med. 273: 1150-1152.
116. Torres-Rodríguez, J., T. Baró, M. Hermoso de Mendoza, Y. Morera y C. Alía. 1997. Primeros aislamientos autóctonos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en España. Rev. Iberoam. Micol. 14: 42-43.
117. Tovar, E. y C. Méndoza. 1996. Ecología de forrajeo de *Sphenarium purpurascens* en la Reserva del Pedregal de San Angel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM.
118. Vandepitte, J. 1990. Clinical aspects of cryptococcosis in patient with AIDS. Pp. 103-113. En: Vanden Bussche H., Mackenzie D.W.R., Cauwenbergh G., Van Cutsem J., Drouhet E., Dupont B., (eds) *Mycoses in AIDS patients*. Plenum Press, New York.
119. Wickes, B. L., M. E. Mayorga, U. Edman y J. Edman. 1996. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the  $\alpha$ -mating type. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7327-7331.
120. Whipps J. M. y R. C. Cooke. 1993. *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

### XIII. ANEXOS

#### Anexo.1.1

##### ❖ AGAR- NÍGER (*GUIZOTIA ABYSSINICA*)

Semilla de Níger ( <i>Guizotia abyssinica</i> )	50 g
Dextrosa	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Creatinina	1 g
Agar (Bioxon)	15 g
Sulfato de penicilina	20U/ml
Estreptomicina	40 µg/ml
Agua destilada	1000 ml

- ✖ Pulverizar la semilla, agregar agua destilada y ebulir durante 25 a 30 min. Filtrar con gasa.
- ✖ Agregar el resto de los ingredientes.
- ✖ Aforar a 1000 ml.
- ✖ Calentar, agitando vigorosamente el medio y hervir para que se disuelvan los solutos.
- ✖ Esterilizar a 121°C durante 15 min.
- ✖ Enfriar a 50°C y agregar el sulfato de penicilina y la estreptomicina.
- ✖ Distribuir en cajas de petri en condiciones estériles.
- ✖ pH final 6.5

#### Anexo 1.2.

##### ❖ AGAR- DEXTROSA PAPA- (ADP)

Papa	200 g
Dextrosa	10 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

- ✖ Pelar la papa y cortarla finamente.
- ✖ Poner en ebullición durante 30 min.
- ✖ Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior.
- ✖ Añadir agar y dextrosa.
- ✖ Disolver por calentamiento.
- ✖ Esterilizar a 121°C durante 20 min.
- ✖ Distribuir en cajas de petri en condiciones estériles.

#### Anexo 1.3.

##### ❖ AGAR- HARINA DE MAÍZ ADICIONADO CON TWEEN 80

Agar-harina de maíz (Difco)	17 g
Agua destilada	1000 ml
Tween 80	10 ml

- ✖ Suspender el agar harina de maíz en el agua destilada y mezclar.
- ✖ Calentar y hervir con agitación frecuente hasta disolver completamente.
- ✖ Retirar y adicionar el tween 80 y mezclar.
- ✖ Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- ✖ Dispensar en cajas de petri bajo condiciones asépticas.
- ✖ Solidificar a temperatura ambiente.
- ✖ pH final 6.

#### Anexo 1.4.

##### ❖ AGAR- CHOCOLATE

Base de agar-sangre (Bioxon)	40 g
------------------------------	------

Agua destilada	1000 ml
Sangre de carnero	50 ml

- ✘ Mezclar perfectamente la base de agar-sangre con el agua destilada.
- ✘ Calentar con agitación frecuente.
- ✘ Hervir durante 1 minuto.
- ✘ Esterilizar a 121°C.
- ✘ Agregar la sangre de carnero y calentar hasta que tome una coloración café oscuro.
- ✘ Distribuir en cajas de petri en condiciones asépticas.

#### Anexo 1.5.

##### ✦ PRUEBA DE FERMENTACIÓN (MÉTODO DE WICKERHAM)

###### Solución A. Medio base:

Extracto de levadura	4.5 g
Peptona	7.5 g
Agua destilada	1000 ml

###### Solución B. Azul de bromotimol:

Azul de bromotimol	0.04 g
Etanol 95%	3 ml

###### Solución C. Solución de carbohidratos:

Carbohidratos (glucosa, maltosa y lactosa)	6 g
Agua destilada	100 ml

###### Medio base con azul de bromotimol:

- ✘ Disolver el azul de bromotimol en 3 ml de etanol al 95%.
- ✘ Se mezclan todos los componentes de la solución A y solución B y se hierven para que se disuelvan completamente.
- ✘ Distribuir en alícuotas de 2 ml en tubos con tapón de rosca.
- ✘ Colocar el tubo de Durham (boca abajo) en cada tubo de medio base.
- ✘ Se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

###### Carbohidratos:

- ✘ Cada uno de los azúcares (4 g) se disuelven en 100 ml de agua destilada estéril.
- ✘ Filtrarlos por millipore con una membrana de 0.22µm.

###### Mezclar medio base con la solución de carbohidratos:

- ✘ Adicionar 1 ml de cada solución de carbohidrato por separado en los tubos de medio base.

#### Anexo 1.6.

##### ✦ AGAR UREA DE CHRISTENSEN

###### Solución A:

Base de urea (Difco)	29 gr
Agua destilada	100 ml

- ✘ Disolver la base de urea en 100 ml agua destilada y mezclar perfectamente
- ✘ Esterilizar por filtración milipore con membranas de 0.45 µm.

###### Solución B:

Agar-agar (Bioxon)	15 gr
Agua destilada	900 ml

- ✖ Suspender el agar en agua destilada, hervir hasta disolver.
- ✖ Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- ✖ Enfriar a 50°C

**Combinar asépticamente ambas soluciones:**

- ✖ Distribuir en tubos estériles 2 ml.
- ✖ Enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada.

**Anexo 1.7.**

❖ **AUXANOGRAMA. MÉTODO DE WICKERHAM.**

Yeast Nitrogen base (DIFCO)	0.67 g
Agua desionizada	100 ml
Carbohidrato (glucosa, sacarosa, maltosa, eritritol, lactosa, inositol, melibiosa, galactitol, L-arabinosa, inulina, manitol, adonitol, L-sorbosa, L-ramnosa y D-sorbitol).	0.50 g

**Solución A. Preparación de la base nitrogenada:**

- ✖ Suspender el extracto de levadura en 80 ml de agua desionizada. Mezclar y disolver completamente.
- ✖ Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- ✖ Enfriar a temperatura ambiente.

**Solución B. Preparación de la solución del carbohidrato:**

- ✖ Suspender el carbohidrato de elección en 20 ml de agua desionizada (en el caso de la rafinosa se pesa el doble).
- ✖ Esterilizar por filtración milipore con membranas de 0.45 µm.

**Combinar la solución del carbohidrato elegido con la base nitrogenada:**

- ✖ Se mezclan ambas soluciones en condiciones asépticas quedando un volumen final de 100 ml.
- ✖ Dispersar alícuotas de 2 ml en tubos estériles bajo condiciones asépticas.
- ✖ Concentración final del carbohidrato: 0.5 %
- ✖ Concentración final del extracto de levadura: 0.67%
- ✖ pH final 5.6

**Anexo 1.8.**

❖ **GELATINA.**

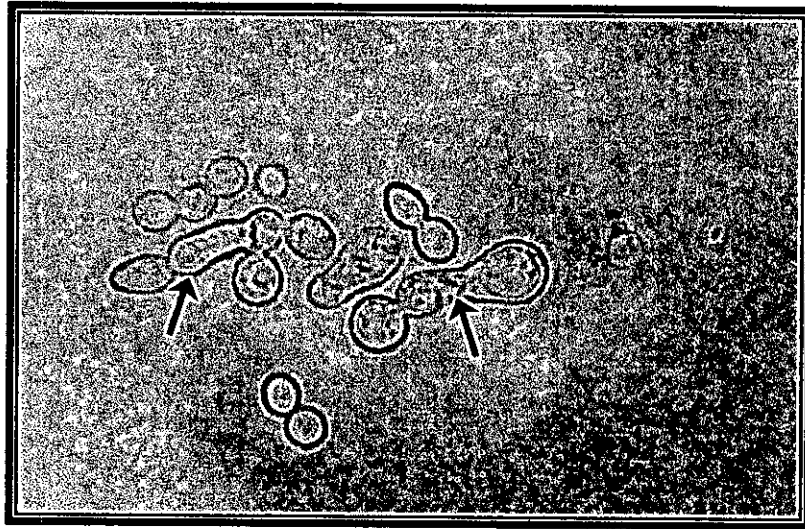
Infusión cerebro-corazón (Bioxon)	25 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

- ✖ Disolver completamente calentando.
- ✖ Ajustar el pH 7.4-7.6
- ✖ Distribuir 5-8 ml en tubos de 16 x 125 mm
- ✖ Esterilizar a 15 lbs de presión por 15 min.
- ✖ Inocular en la superficie y debajo de la gelatina.
- ✖ Incubar por cuatro semanas a temperatura ambiente.

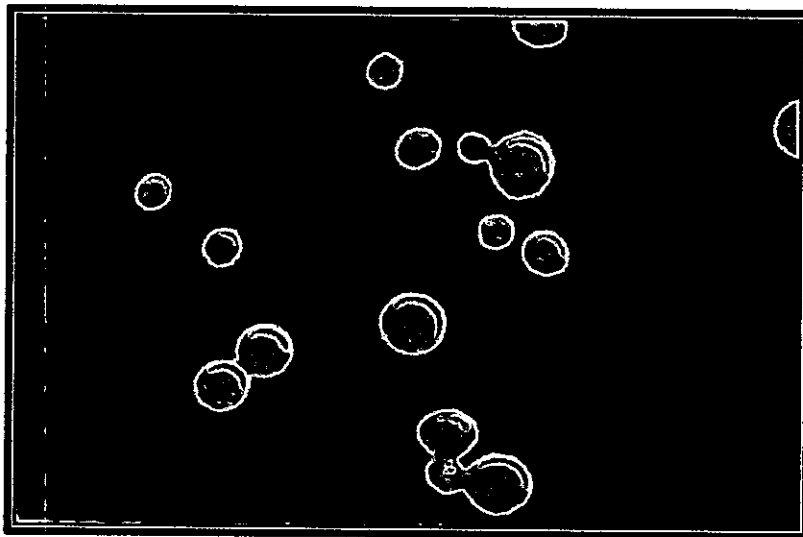
**ANEXO 2. DATOS PROMEDIO DE ALGUNOS FACTORES AMBIENTALES PREVALENTES DURANTE ESTE ESTUDIO.**

<b>Estación</b>	<b>Temperatura máxima</b>	<b>Temperatura mínima</b>	<b>Precipitación pluvial</b>
<b>PRIMAVERA</b>	28.0°C	12.5°C	0.4 mm
<b>VERANO</b>	28.6°C	11.9°C	6.6 mm
<b>OTOÑO</b>	22.9°C	7.1°C	0.03 mm
<b>INVIERNO</b>	24.4°C	2.8°C	0 mm

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Estructuras compatibles con seudomicelios (flechas),  
desarrollados por *Cryptococcus albidus* en agar chocolate a 37 °C.



*Cryptococcus albidus*. Tinción con tinta china.