



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS
CLÍNICAS DE *Cryptococcus neoformans* y
Cryptococcus gattii AISLADAS EN MÉXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

KAREN MARTÍNEZ MARTÍNEZ



TUTORA:

M. en MED. TROP. LAURA ROCÍO CASTAÑÓN OLIVARES

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Martínez Martínez Karen 54 40 78 81 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 097145338</p>
<p>2. Datos de tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor M en Med Trop Laura Rocío Castañón Olivares</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Rubén Arturo López Martínez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dra Hermelinda Margarita Villegas Ríos</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 M en C María Cristina Julia Pérez Reyes</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 Biól Elva Bazán Mora</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Título Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito Identificación molecular de cepas clínicas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> aisladas en México 95 p 2008</p>

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le doy gracias a Dios por permitirme tener vida y darme fuerza para concluir este gran sueño.

Estos agradecimientos son para todas las personas e Instituciones que formaron parte de este proyecto directa e indirectamente.

Quiero dar un agradecimiento a mi directora de tesis M. en Med. Trop. Laura Rocío Castañón Olivares, por guiarme, por enseñarme lo fascinante que pueden ser los hongos y por ser una gran amiga y la voz de mi conciencia.

Al Dr. Rubén López Martínez, quiero darle las gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme parte de su gran familia. También por formar parte del jurado y darme sus comentarios en favor de la tesis.

Un enorme agradecimiento a todos los integrantes del Laboratorio de Micología Médica, a la Q.F.B. Érica Córdova, Dra. Francisca Hernández, Biol. Elva Bazán Mora y Dra. Patricia Manzano, por brindarme su amistad, por ser un enorme apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por compartirme su conocimiento y amor a los hongos.

Un enorme agradecimiento a la Biol. Elva Bazán Mora, por su amistad, por apoyarme con sus excelentes comentarios, por brindarme su ayuda cuando más lo necesitaba y por ser parte del jurado.

Agradezco al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Infectología del Instituto de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”, Secretaria de Salud, por brindarme asilo durante la realización de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a la Q. Pilar Ramos y M en C. Violeta Ibarra (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, SS) por su invaluable amistad y su gran apoyo, orientándome no solo en cuestiones moleculares de mi tesis, si no también como amigas.

Agradezco a M. en C. Cristina Pérez, por enseñarme el mundo de los hongos y gracias a ella fue como me decidí a seguir por la rama de la micología médica. También por ser parte del jurado y brindarme sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Gracias a la Dra. Margarita Villegas por formar parte del jurado y por brindarme sus comentarios y compartir su conocimiento, con lo que fue posible enriquecer la tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a mis padres Luis y Georgina, por darme siempre su amor y su apoyo, por ser mi gran ejemplo y enseñarme que siempre hay que luchar por lo que uno quiere y que los obstáculos son pequeños si uno se lo propone, nunca olviden que los amo y que esto no hubiera sido posible sin su ayuda.

A mi hermana Marisol, que siempre esta ahí sin importar nuestras diferencias, porque sabes que no solo eres mi hermana sino mi mejor amiga, te amo hermanita.

A mi esposo Antínoo, que ha estado conmigo en las buenas y en las malas, que gracias a su amor y apoyo, este sueño ha culminado. Sabes que te amo muchísimo y que eres una parte indispensable en mi vida.

A mi hija Sahra, sabes que te amo con todo mi corazón, que has sido el motor y la fuerza más importante que me impulso a terminar esto aún cuando lo veía muy lejos. Que llegaste a iluminar mi vida con tu sonrisa y que tú eres lo que siempre le pedí a Dios.

A mis abuelos Luis, Constantino, Carmen y Josefina, gracias por darme su amor y su tiempo, por enseñarme que hay que luchar por nuestros sueños y que no hay que rendirse, por hacerme muy feliz y sentirme orgullosa de ser su nieta. Aunque dos ya no están presentes físicamente para ver el término de esta gran parte de mi vida, siempre los llevo en mi corazón.

A mis suegros Pedro y Lupita, gracias por hacerme parte de su familia, por brindarme su apoyo, por darme la gran oportunidad de terminar mi sueño y por regalarme muchas enseñanzas que siempre llevare conmigo ya que me han mostrado como ser una mejor persona.

A mi cuñada Luary, le doy gracias por regalarme su amistad y ser como mi hermana mayor guiándome y aconsejándome, además de ser un gran ejemplo a seguir.

A mi amiga Vero, le doy gracias porque siempre ha estado conmigo y que desde la preparatoria, por cierto la "mejor", me ha escuchado y ha estado presente en los eventos más importantes de mi vida y espero llegar siempre a contar con su amistad y le reitero que puede contar conmigo en todo momento.

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Género *Cryptococcus* (Reseña histórica)
- 1.2. *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.
- 1.3. *Filobasidiella neoformans* y *Fillobasidiella bacillispora*
- 1.4. Epidemiología
- 1.5. Criptococosis
 - 1.5.1. Patogenia y formas clínicas de la criptococosis
 - 1.5.2. Factores de virulencia
- 1.6. Diagnóstico de Laboratorio
 - 1.6.1. Examen directo
 - 1.6.2. Aislamiento
 - 1.6.3. Serología
 - 1.6.4. Técnicas moleculares
 - 1.6.5. Análisis de datos

2. JUSTIFICACIÓN

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.1. Procedencia de las cepas
- 4.2. Datos demográficos
- 4.3. Identificación bioquímica
- 4.4. Extracción de ADN
- 4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting
- 4.6. Análisis de datos

5. RESULTADOS

- 5.1. Características morfológicas
- 5.2. Datos demográficos
- 5.3. Características bioquímicas
- 5.4. Extracción de ADN
- 5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting
- 5.6. Análisis de datos

6. DISCUSIÓN

- 6.1. Características morfológicas
- 6.2. Datos demográficos
- 6.3. Características bioquímicas
- 6.4. Extracción de ADN
- 6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting
- 6.6. Análisis de datos

7. CONCLUSIONES

8. APÉNDICE

9. LITERATURA CITADA

RESUMEN

Cryptococcus neoformans y *Cryptococcus gattii* son importantes levaduras encapsuladas que causan criptococosis en humanos, afectando principalmente a pacientes con SIDA. En el presente estudio se trabajó con un total de 95 cepas, 75 mexicanas y 20 extranjeras, las cuáles se analizaron y tipificaron con pruebas morfológicas y bioquímicas y con la reacción en cadena de la polimerasa PCR fingerprinting y el minisatélite “core M13” como único cebador. Esta técnica separó a todos los aislados en los ocho grandes grupos previamente establecidos como genotipos. La mayoría de los aislados (n=63) fueron VNI, seguida por un menor número de VNII (n=7); VNIII (n=4); VNIV (n=3); VGI (n=5); VGII (n=6); VGIII (n=4) y VGIV (n=3). Dicho trabajo demostró que la técnica molecular usada es útil y sencilla pues permite la discriminación de las dos especies, lo cual facilita su estudio desde un punto de vista molecular, aportando nueva información epidemiológica de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en México.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Cryptococcus* (Reseña histórica)

En el año de 1833 fue caracterizado el género *Cryptococcus* por Kützing (Sánchez-Paredes, 2001), el cuál se encuentra constituido por levaduras no fermentativas, productoras de ureasas, que asimilan inositol y no reducen nitratos (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002). Este género se encuentra conformado aproximadamente por 38 especies, las cuáles han sido localizadas en todo el mundo y en distintos tipos de ambientes, encontrándolas en lugares tan inhóspitos que sorprende su adaptación, tales como el frío extremo de la Antártica, grandes elevaciones en el Himalaya o en agua salina (Vadkertiova y Stavikova, 1996; Emmons, 1951; McGinnis *et al.*, 1975, Casadevall y Perfect, 1998).

En el año de 1894 en Italia, Sanfelice aisló una levadura encapsulada del jugo de durazno y descubrió que causaba lesiones tumorales en cobayos inoculados por este hongo, por ello lo nombró *Saccharomyces neoformans*. En ese mismo año en Alemania, Busse y Buschke aislaron el mismo hongo de la tibia de una mujer de 31 años y lo llamaron *Saccharomyces hominis*. En 1895, Curtis aisló una levadura de lesiones lumbares e inguinocrurales en un joven, nombrándola *Saccharomyces tumefaciens* (Drouhet, 1997; Casadevall y Perfect, 1998).

En 1901, Vuillemin estudió las características y morfología de las cepas reportadas por Sanfelice, Busse-Buschke y Curtis, de las cuales comprobó que no producían ascosporas, característica de *Saccharomyces*, por lo que las transfirió al género *Cryptococcus*, nombrándolas *C. hominis* (Drouhet, 1997; Casadevall y Perfect, 1998)

Pero no es hasta el año de 1950 en que Benham da el nombre de *Cryptococcus neoformans* en base a que Vuillemin nombra al género

Cryptococcus y Sanfelice propone *neoformans* (Benham, 1956; Casadevall y Perfect, 1998).

En 1970 Vanbreuseghem y Takashio estudiaron una cepa atípica de *C. neoformans* que producía células baciliformes, por lo que ellos proponen la existencia de una variedad *gattii*. Sin embargo, esta variedad no fue aceptada sino hasta que Kwon-Chung (1975, 1976) descubrió dos tipos de factor de compatibilidad fértiles α y α que producen basidiosporas bajo ciertas condiciones, con ello son aceptadas las dos variedades *neoformans* y *gattii*. Posteriormente surgió una tercera variedad, *C. neoformans var. grubii*, esta fue propuesta por Franzot *et al.* (1999), la cuál es separada de la var. *neoformans*, basándose en estudios fenotípicos, como la asimilación de tiamina, también se encontraron diferencias epidemiológicas, donde presentaban diferente distribución geográfica.

Debido a diferencias morfológicas, epidemiológicas, bioquímicas y serológicas (Kwon-Chung *et al.* 2002), en el año 2002 se separó a *C. neoformans var. gattii* de *C. neoformans var. neoformans*, en distintas especies, nombrándolas hasta el momento como *C. neoformans* (compuesta por la var. *neoformans* y la var. *grubii*) y *C. gattii*.

1.2. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (Bovers, 2008) y *Cryptococcus gattii* (Vanbreuseghem y Takashio) Kwon-Chung *et al.* (2002).

C. neoformans y *C. gattii* son la fase anamorfa, siendo a nivel clínico los responsables de infecciones en humanos y animales mamíferos como gatos, perros, vacas, caballos y primates (Casadevall y Perfect, 1998).

Observamos que ambas especies presentan características similares en el medio de cultivo, ya que en agar dextrosa Sabouraud crecen colonias de aspecto mucoide, liso, brillante, con abundante crecimiento en el medio y color crema, después de un tiempo prolongado pueden virar a anaranjado oscuro o café y presentan una apariencia mucoide, áspera y lisa, estos cambios están

relacionados con la adquisición de cápsulas más gruesas o a que forman pseudomicelio (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

Microscópicamente se observan levaduras que pueden variar de tamaño, midiendo de 4 a 10 μm . Usualmente las formas que presentan son ovaladas o redondas (Casadevall y Perfect, 1998). En esta fase el hongo se reproduce asexualmente por gemación multipolar (blastoconidios multipolares y simpodiales).

Presentan cápsulas, cuyo tamaño depende del tipo de cepa o aislado y de las condiciones del medio con 15 a 20 μm de diámetro, compuesta por dos polisacáridos, glucoronoxilomananos (GXM) y galactoxilomananos, los cuáles equivalen entre el 90 y 70% de la masa capsular aproximadamente (Steenbergen *et al.*, 2001; Del Poeta, 2004) y debido a variaciones estructurales en estos polisacáridos, se presentan diferentes antígenos en la cápsula lo que permite identificar a las cepas en cuatro grandes serotipos, conocidos como A, B, C y D (Evans y Kessel, 1951), el serotipo A, comprende a *C. neoformans* var. *grubii*; el serotipo D pertenece a *C. neoformans* var. *neoformans* mientras que los serotipos B y C corresponden a *C. gattii*. Un quinto serotipo descrito como AD (Ikeda *et al.*, 1985) se presenta en cepas que comparten los mismos determinantes antigénicos encontrados en los serotipos A y en los D (Kwon-Chung *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 2002).

1.3. *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung, 1975) y *Filobasidiella bacillispora* (Kwon-Chung, 1976).

El estado sexual del hongo, llamado teleomórfico está caracterizado por la producción de basidioesporas. Algunas especies del género *Cryptococcus* tienen la habilidad de reproducirse sexualmente, como *C. neoformans* y *C. gattii*. El teleomorfo fue descrito por Kwon-Chung, nombrando a estos hongos durante esta fase como *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans* var. *grubii* y *C. neoformans*

var. *neoformans*) y *Filobasidiella bacillispora* (*C. gattii*) (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976; Kwon-Chung *et al.*, 1982; Kwon-Chung *et al.*, 2002). En cuanto a su micro morfología, *Filobasidiella neoformans* y *F. bacillispora* presentan un micelio hialino, conformado por hifas heterocarióticas con fíbulas y un basidio lateral o terminal, unicelular, alargado, no septado que produce cuatro basidioesporas con cadenas basípetas de 20 esporas por cada una (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002; Kwon-Chung, 1976; Mitchell, 1992). Ambas especies son idénticas, diferenciándose únicamente en las características presentadas en las esporas, siendo en *F. neoformans* esféricas a elípticas y su pared con una textura rugosa, con tamaño de 1.8 – 3 µm de diámetro. *F. bacillispora* presenta esporas de forma bacilar, con pared lisa y su tamaño es de 3 – 8 x 1 - 1.8 µm (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002; Mitchell, 1992).

No se ha podido aislar a *F. neoformans* y *F. bacillispora* de sustratos naturales y pacientes, solo se ha podido obtener en laboratorio, por lo que no se conoce si el teleomorfo esta involucrado en la patogénesis.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de

***Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*.**

Reino: Fungi
Phylum: Basidiomycota
Orden: *Filobasidiales* (*Tremellales*)*
Familia: *Filobasidiaceae*
Género: *Filobasidiella*
Especies: *neoformans*...*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*
 *C.neoformans* var. *neoformans*

bacillispora....*Cryptococcus gattii*

*Datos moleculares

Basado en Casadevall y Perfect

(1998)

Se distinguieron dos factores de compatibilidad dentro de las especies de *C. neoformans* y *C. gattii* α y α , que bajo condiciones de temperatura, respuestas a feromonas y en ciertos casos limitantes en nutrientes, llevan a cabo una reproducción sexual, ésta puede tomar tres vías posibles. La primera se lleva a cabo a una temperatura de 25°C inicia cuando dos células haploides de distinto factor de compatibilidad llevan a cabo plasmogamia dando lugar a una hifa heterocariótica con fibulas, el cuál se diferencia a una forma especializada llamada

basidio. Dentro de esta estructura ambos núcleos llevan a cabo cariogamia y posteriormente meiosis, produciendo 2 basidiosporas de tipo α y 2 de tipo **a**, las cuáles producen largas cadenas de esporas por mitosis. La segunda es conocida como filamentación haploide, en esta vía, células haploides de distinto factor de compatibilidad realizan plasmogamia a 37°C sufriendo cariogamia y dan lugar a una célula diploide estable (forma de levadura) la cuál a 25°C se diferencia a una hifa monocariótica con fíbulas no funcionales y al final se forma un basidio donde ocurre meiosis, que da lugar a cuatro basidiosporas haploides, 2 **a** y 2 α , que mediante mitosis cada basidiospora produce largas cadenas de esporas ; la tercera ruta se le conoce como fructificación haploide y ocurre cuando células haploides α crecen bajo limitaciones nutricionales y condiciones de desecación formando una hifa monocariótica con fíbulas no funcionales, luego un basidio donde únicamente hay mitosis para dar esporas haploides α . (Hull y Heitman, 2002) (Figura 1, obtenida de Casadevall y Perfect, 1998).

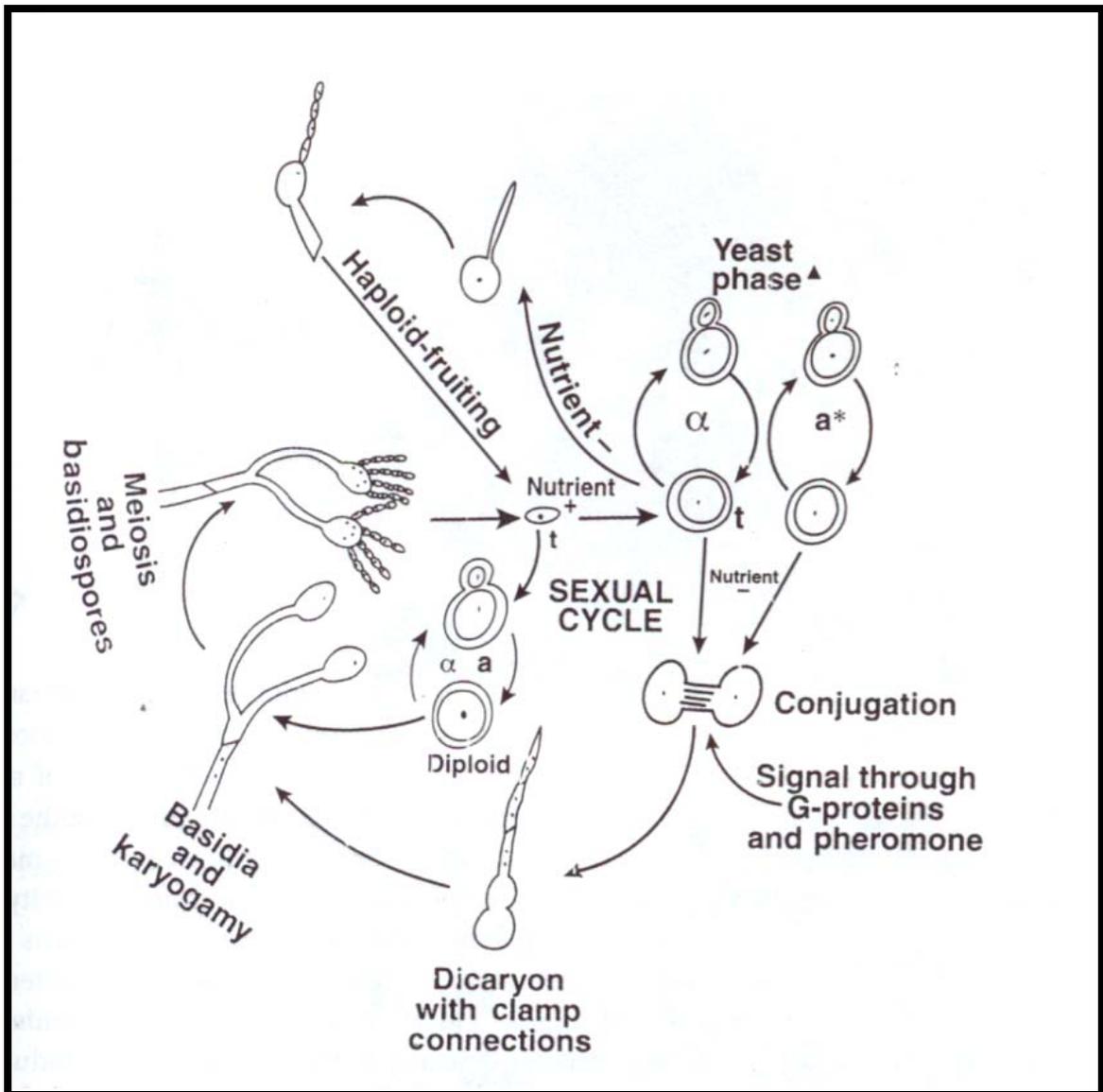


Fig. 1. El ciclo de vida de *Filobasidiella* (Casadevall y Perfect, 1998).

Ambas especies requieren pocos nutrientes para poder crecer, lo que las hace unas levaduras muy fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio, ya que solo necesitan una fuente de carbono, oxígeno, y amoníaco, a partir de este

último pueden sintetizar todos los aminoácidos que requieren (Casadevall y Perfect, 1998).

La temperatura óptima de crecimiento para *C. neoformans* y *C. gattii* es de 25 °C, aunque pueden crecer a 37°C en periodos cortos de incubación, incluso de hasta 40 o 42°C se mantienen en buena condición, pero a mayores temperaturas su crecimiento puede ser inhibido o matarlas (Casadevall y Perfect, 1998).

Toleran un pH entre 4 y 7.5, teniendo su mejor crecimiento con un medio ligeramente ácido con pH 6.5, pero a pHs muy ácidos o muy básicos son significativamente inhibidos (Casadevall y Perfect, 1998; Bulmer y Felton, 1967).

1.4. Epidemiología

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* son los hongos causantes de criptococosis, reportados con una distribución mundial amplia. Son organismos de vida libre (Casadevall y Perfect, 1998; Speed y Dunt, 1995; López- Martínez *et al.*, 1995).

Cryptococcus gattii

Esta especie por lo general es encontrada en regiones tropicales y subtropicales. Tiene una alta frecuencia en Australia, Papua Nueva Guinea, Hawaii y el centro de África (Zaire, Kenia, Camerún) (Kwon-Chung, 1984; Ellis, 1987).

En el sur de Asia presenta la misma frecuencia que *C. neoformans*, sin embargo en Japón, Europa, el Norte y Sur de América, su incidencia es muy baja; aunque Brasil, Argentina, Paraguay y México presenta una gran prevalencia de esta especie. Recientemente se ha aislado este hongo en regiones con clima frío como en la isla de Vancouver y Columbia Británica en Canadá, observando un

nuevo tipo de hábitat para esta levadura (Kwon-Chung, 1984; MacDougall y Fyfe, 2006; Duncan *et al.*, 2006).

C. gattii ha sido aislado de sustratos naturales en diferentes países como en Australia de eucaliptos, guano de murciélago en Brasil, de panal de abeja en Uruguay y *E. camaldulensis* en San Francisco en Estados Unidos de América, de almendros en Colombia. Esta especie se ha asociado principalmente con *Eucalyptus camaldulensis* y con *E. tereticornis*. También se ha aislado de los árboles de *Moquilea tomentosa*, *Ficus microcapra*, *Terminalia catappa* y *Guettarda*. Así mismo en otros sustratos de origen animal y de plantas (Ellis y Pfeiffer, 1990; Kwon-Chung *et al.*, 1992; Kwon-Chung *et al.*, 1982; Lazera, *et al.*, 1993; Gezuele *et al.*, 1993; Licea, *et al.* 1996; Pfeiffer y Ellis, 1992; Boekhout *et al.*, 2001; Kwon-Chung *et al.*, 2002, Meyer 2003).

Se sugiere que hay más reservorios naturales para *C. gattii*, debido a varios trabajos que soportan esta idea, como es el caso presentado en Nueva Guinea, donde hay una gran incidencia de *C. gattii* pero no hay *E. camaldulensis* (Currie *et al.*, 1990). En estudios con cariotipos, los aislamientos ambientales difieren de los clínicos (Kwon-Chung, 1982). Y en estudios de tipificación con ADN han identificado un tipo de cepa que no es encontrada en los eucaliptos (Sorrell, *et al.*, 1996).

Cryptococcus neoformans

Tiene una distribución mundial amplia, localizada en diferentes lugares, predominando en lugares con clima templado, el serotipo A sobre todo en E.U.A. y Japón; el serotipo D en Europa (Castañón-Olivares, 2002). Ha sido aislado del ambiente a este hongo en Sudamérica y el Caribe (Ruiz *et al.*, 1989), diversas islas en el Pacífico (Kwon-Chung, 1984), Europa (Mishra *et al.*, 1981, Radhawa y Paliwal, 1977; Pernice *et al.*, 1998), África (Refal *et al.*, 1983), Australia (Ellis, 1987) y Asia (Ansheng *et al.*, 1983; Imwidthaya, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995). Así mismo, ha sido aislado invariablemente de suelo y de excretas de ave, donde los aislamientos clínicos han sido reportados en todo el mundo. También se han

hecho aislamientos ocasionales de *C. neoformans* en eucaliptos. Ha sido aislado de madera (Lazera, 1993), murciélagos (Croese *et al.*, 1967), guano de murciélagos (Lazera, 1993), del aire, polvo y muebles de las habitaciones de enfermos con criptococosis y VIH (Swinne *et al.*, 1986, Varma *et al.*, 1995) y de insectos (Swinne *et al.*, 1986). Hay una asociación de *C. neoformans* con aves como canarios (Griseo *et al.*, 1995), pericos (López-Martínez *et al.*, 1995), gallinas (Swinne *et al.*, 1986) entre otras aves, pero en especial se ha relacionado con excretas de la paloma *Columba livia* (Kielstein *et al.*, 2000).

1.5. Criptococosis

Se han reportado casos muy raros de especies como *C. laurentii* y *C. albidus* causantes de infecciones en humanos (Gluck *et al.*, 1987; Lynch *et al.*, 1981); sin embargo, las únicas especies de este género que son consideradas causantes de criptococosis son *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

La mayoría de los casos ocurren en hospederos con el sistema inmune suprimido, teniendo reportes de pacientes con criptococosis asociada principalmente a enfermos de SIDA. Ocasionalmente se han reportado casos de infección en pacientes sanos aislando principalmente a *C. gattii*. Aunque este supuesto se debe de tomar con reserva ya que puede estar existiendo algún factor que pueda estar suprimiendo el sistema inmunológico y sea un paciente aparentemente sano (Casadevall y Perfect, 1998).

En los primeros años del siglo XX, la criptococosis era muy rara, pero con el correr del tiempo, ha aumentado dramáticamente, la causa principal es la presencia del VIH. Hay otros factores que también han favorecido pero en menor proporción como son la terapia con esteroides, terapia antineoplásica, diálisis renal y terapia para transplante de órganos (Casadevall y Perfect, 1998).

Debido a que ambas especies están distribuidas mundialmente, el humano esta expuesto cotidianamente. Por diversos estudios realizados en biología molecular en cepas aisladas de pacientes y de sustratos naturales se ha evidenciado que nuestro entorno es el medio más usual en donde el hombre adquiere al hongo. Los casos de infecciones transmitidas de humano a humano son muy raras y solo se han reportado en transplantes de órganos infectados (Beyt y Walkman, 1978) y en la donación de sangre contaminada (Glaser y Garden, 1985). No se han reportado casos de transmisión de animal a humano (Howard, 1973).

La infección es adquirida por la inhalación de células disecadas, levaduras con cápsula pequeña ó esporas. Inicialmente se da en pulmón y en individuos inmunosuprimidos hay predisposición para que se desarrolle una criptococosis diseminada, siendo usualmente sintomática y se dirige principalmente al sistema nervioso central (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

Se ha sugerido que la vía pulmonar no es la única entrada, ya que también se han descrito casos de pacientes con criptococosis gastrointestinal (Bonacini *et al.*, 1990; Daly *et al.*, 1990). Se ha aislado al hongo de alimentos como frutas, vegetales y leche (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002), proponiendo esta ruta como portal de entrada para *C. neoformans* y *C. gattii*.

La piel, puede ser la otra vía (Iarobellis *et al.*, 1984; Sussman, 1984), siendo inoculada la levadura con algún instrumento contaminado. Esta ruta es muy rara, ya que la criptococosis cutánea es más bien consecuencia de la diseminación de la infección.

Numerosos estudios han reportado que la criptococosis se asocia en mayor proporción con pacientes masculinos, sin importar la edad, habiendo una mayor preponderancia entre los 20 y 50 años. En cuanto a las condiciones raciales no se ha encontrado alguna relación (Casali *et al.*, 2003).

El desarrollo de la criptococosis en humanos ya que dependiendo de donde este localizada la infección varían los signos y síntomas. Se ha encontrado que la levadura es capaz de infectar a la mayoría de los órganos del cuerpo, siendo los de mayor frecuencia cerebro, pulmón, piel, ojos y próstata, aunque también es encontrada en riñón, hígado, corazón, huesos, músculos y nódulos linfáticos (Casadevall y Perfect, 1998).

1.5.1. Patogenia y formas clínicas de la criptococosis.

Las formas clínicas de la criptococosis humana pueden ser muy variadas debido a varios signos y síntomas, dependiendo de donde este localizada la infección.

Sistema Nervioso Central

La criptococosis meningoencefálica se presenta con mucha frecuencia, siendo la principal causa de muerte en la mayoría de casos. Los síntomas que se presentan son: cefalea (la más frecuente), fiebre, náusea, vómito, pérdida de memoria, rigidez de la nuca, visión borrosa y/o coma, pudiendo aparecer dentro de las 2 a 4 semanas; este tiempo puede variar dependiendo de la persona. Más del 90 % de los pacientes presentan alteraciones en el líquido cefalorraquídeo como son presión alta, elevación de proteínas, linfocitosis y baja concentración de glucosa. En enfermos con SIDA, las infecciones son agudas desde el inicio, con pocos síntomas y signos meníngeos y con alto índice de mortalidad (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

Pulmonar

En la criptococosis pulmonar puede o no haber síntomas. En caso de ser sintomática se presentan: tos, dolor torácico, esputo, fiebre, pérdida de peso, hemoptisis, disnea y pérdida del sueño. Se han reportado casos muy raros donde

la infección puede causar alergia caracterizándose por la presencia de urticaria, hipotensión y disnea (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

En pacientes inmunocomprometidos, el curso de la infección es más rápido y tiende a diseminarse. Presenta cambios radiológicos muy variables como lesiones de aspecto tumoral con infiltrados peribronquiales, cavitación, efusión pleural, fibrosis y calcificaciones (Castañón-Olivares, 2002).

Cutánea

La piel ocupa el tercer lugar con presencia de casos después de cerebro y pulmón (Casadevall y Perfect, 1998). Aproximadamente entre el 10 y 15 % de los pacientes con criptococosis diseminada presentan lesiones en piel (Castañón-Olivares, 2002). Las lesiones encontradas son nodulares solitarias o múltiples, con úlcera o con absceso. Las lesiones se pueden presentar en todo el cuerpo, pero frecuentemente se localizan en cabeza. En pacientes con VIH, se han descrito lesiones donde se combina con otros hongos como los dermatofitos (Pierard *et al*, 1990). En casos muy esporádicos, donde la piel es la primera vía de entrada, en la zona donde se inoculó *C. neoformans* se produce una pápula con o sin reacción inmune local, tal como linfadenopatía regional (Casadevall y Perfect, 1998).

Ocular

Dentro de la criptococosis diseminada se encuentra la ocular. Los síntomas encontrados son ceguera, parálisis ocular, coriorretinitis, disminución de la visión, fotofobia, papiloedema y lesiones en retina con hemorragia (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

Urogenital

Otro sitio muy común que es infectado es la próstata, en donde causa síntomas como prostatitis. Han sido reportados casos en pacientes con SIDA tanto hombres como mujeres que tienen lesiones genitales causadas por este hongo,

aunque hay reportes muy raros en donde se tiene criptococosis vulvar en pacientes con o sin VHI (Casadevall y Perfect, 1998).

Gastrointestinal

Puede causar infecciones en el tracto digestivo, teniendo reportes de infecciones desde el esófago, hasta el recto, en hígado, páncreas y a lo largo de todo el intestino. Los síntomas que se presentan son diarrea, dolor abdominal, fiebre, náusea y/o fluido grisáceo, en el caso del hígado se presenta hepatitis y cirrosis (Casadevall y Perfect, 1998; Bonacini *et al*, 1990).

Músculo-esquelético

Dentro de la criptococosis diseminada, del 5 al 10 % las lesiones se localizan en huesos largos, costillas, cráneo, espina dorsal, pelvis entre otros (Castañón-Olivares, 2002), aunque este sitio de infección es más común en pacientes aparentemente normales (Casadevall y Perfect, 1998). Los huesos vertebrales son el sitio más común en pacientes con infección diseminada, aunque no es frecuente en paciente con SIDA (Castañón-Olivares, 2002). Los síntomas que se presentan son sensibilidad elevada al dolor, fiebre, inflamación y fragilidad ósea. En pruebas radiológicas se presentan lesiones circulares osteolíticas bien delimitadas sin esclerosis con abscesos conteniendo sustancia mucoide, gelatinosa y pus (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002). En músculo se encuentra muy rara vez al hongo, encontrando uno o varios músculos con inflamación y sensibilidad elevada. (Casadevall y Perfect, 1998).

1.5.2. Factores de virulencia

Una forma de poder describir lo que es patógeno es el factor de virulencia, es decir, que tan hábil es un organismo para defenderse del medio en el que se encuentra. Los factores de virulencia, son características que porta el individuo, las cuáles son dadas por la codificación de ciertos genes especializados.

C. neoformans y *C. gattii* son hongos patógenos causantes de infecciones en dos tipos de hospedero, los considerados individuos sanos y los inmunosuprimidos, en ambos casos encontramos características fenotípicas que son consideradas como factores de virulencia, como son la producción de una gran cápsula de polisacáridos, la habilidad para crecer a 37°C y la producción de melanina (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

Cápsula

Es el mayor factor de virulencia que tiene, ya que le ayuda a destruir y a evadir a los macrófagos. Otra ventaja que ofrece la cápsula a la levadura es la protección, la desecación del ambiente y la habilidad para sobrevivir a grandes temperaturas con un rango de 0° a 40°C, además hay una hipótesis la cuál consiste en que *C. neoformans* ha desarrollado la habilidad para causar infección en el humano debido a un mecanismo de defensa que diseño para protegerse de predadores del ambiente tal como amebas (Casadevall y Perfect, 1998; Steenbergen *et al.*, 2001; Del Poeta, 2004).

Melanina

Dentro del género *Cryptococcus*, las especies de *C. neoformans* y *C. gattii* son las únicas que tienen un sistema de enzimas que permiten metabolizar una variedad de compuestos dihidroxifenólicos ó poliaminobencenos (la dopa, dopamina, norepinefrina y epinefrina). Poseen enzimas simples de fenoxidasas (laccasa) que convierte compuestos difenólicos a través de una serie de reacciones oxidantes para tener como producto final la melanina (Casadevall y Perfect, 1998). La producción de melanina está relacionada con su patogénesis ya que en el cerebro se encuentran grandes cantidades de catecolaminas que pueden ser oxidadas por las laccasas. Una serie de estudios propone que la melanina juega un papel muy importante para la levadura ya que la protege del daño causado por el oxígeno y el nitrógeno producido por los neutrófilos del hospedero (Jacobson y Tinnell, 1993).

Crecimiento a 37°C

El otro factor de virulencia es la resistencia a altas temperaturas de 37 °C, permitiéndole habitar dentro de los mamíferos y tener un crecimiento favorable, provocando infección en estos (Castañón-Olivares, 2002). En el caso de las palomas (*Columba livia*) no son infectadas debido a su temperatura corporal de 42°C, el cuál funciona como factor fungistático, impidiendo la reproducción de la levadura. Aunque se han registrado casos de criptococosis ocular en palomas, debido a que en esta zona la temperatura es de 40 °C, donde puede crecer el hongo (Sánchez-Paredes, 2001).

Manitol

Se tiene la hipótesis de que el manitol le ayuda a la levadura a protegerse contra el estrés oxidativo y la osmosis intracelular, permitiendo que sobreviva en este medio. También le sirve como reservorio nutricional (Casadevall y Perfect, 1998; Nieahus y Flynn, 1994).

Inositol

El inositol está relacionado con el crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* ya que es esencial en la formación de lípidos en la membrana celular y en los mecanismos de señales de transducción (Casadevall y Perfect, 1998).

Factores de compatibilidad sexual

El factor α esta relacionado directamente con la virulencia de ambas especies, encontrándose que su presencia permite la producción de micelio con fructificación monocariótica haploide y pueden producir basidiosporas en sustratos con poco nitrógeno (Casadevall y Perfect, 1998).

Genes

Se ha encontrado que el gen URA5 que codifica para la orotidina monofosfato pirofosforilasa, esta relacionado con la virulencia, ya que se ha comprobado que levaduras mutantes en este gen son menos virulentas que las

cepas silvestres. Otro gen que está relacionado con la virulencia es el ADE2 codificando para la fosforibosilaminoimidazole decarboxilasa, esencial para el establecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* en sistema nervioso central en conejos (Casadevall y Perfect, 1998).

Proteinasas

Se han encontrado proteinasas extracelulares con actividad proteolítica en estas levaduras, que están involucradas en la degradación de células y destrucción de proteínas del hospedero, causando ocasionalmente necrosis de tejidos y destrucción de matriz extracelular. Diversas enzimas producidas por estos hongos como esterasas, β -glucosidasas, fosfohidrolasas y ácido fosfatasa, contribuyen también en su virulencia (Casadevall y Perfect, 1998).

Ureasa

La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de urea a amonio y carbamate. Esta reacción incrementa el pH en el medio; la importancia de la enzima radica en que gracias a ella la levadura puede convertir urea en nitrógeno en un medio con una baja cantidad ó que carece de este. Esta habilidad le confiere dentro del hospedero la capacidad de actuar como un factor de virulencia, ya que puede cambiar el pH cuando se encuentra dentro de un fagolisosoma y evitar la lisis intracelular (Casadevall y Perfect, 1998; Cox *et al.*, 2001).

Fosfolipasas

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* producen fosfolipasas extracelulares y se ha observado que estas enzimas constituyen un factor potencial *in vivo*. La hipótesis es que la fosfolipasa degrada las membranas de los fagolisosomas y tejidos, permitiendo la invasión inicial en pulmón. Este supuesto está basado, en las grandes concentraciones de estas enzimas encontradas en pulmón (Casadevall y Perfect, 1998; Casali *et al.*, 2003; Pierard *et al.*, 1990).

1.6. Diagnóstico de Laboratorio

1.6.1 Examen directo

Se puede hacer la identificación de las levaduras a partir de material biológico como líquido cefalorraquídeo, sangre, orina y esputo. Debido a que la cápsula que no fácilmente es visualizada cuando se encuentra en suspensión acuosa, se utiliza una tinción que permita evidenciar la cápsula y la levadura, esta tinción se puede hacer con tinta china, nigrosina, cromo de mercurio o una suspensión proteica de plata (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002), es una técnica fácil que permite un diagnóstico rápido, encontrando positivos un 80% de pacientes con SIDA y un 30 a 50% en pacientes VIH negativos (Casadevall y Perfect, 1998). Pueden existir falsos positivos debido a que en ocasiones las levaduras tienen una cápsula muy pequeña y pueden ser confundidas con leucocitos, glóbulos de mielina, células de tejido o gotas de grasa.

1.6.2. Aislamiento.

C. neoformans y *C. gattii* pueden vivir en situaciones estables creadas en el laboratorio, creciendo bien en un medio ácido de 5 a 7 pH, no tolerando el medio alcalino de 7.6. El hongo no puede desarrollarse en condiciones anaerobias, solamente en presencia de oxígeno. Su temperatura óptima de crecimiento es de 24°C aunque es recomendado incub ar las cepas clínicas de 30 a 35°C. Se puede visualizar a la levadura en el medio de 48 a 72 h después de su incubación, en el caso de *C. gattii* algunas cepas pueden requerir de 5 a 7 días. En el medio de Agar dextrosa Sabouraud, crece muy bien, pero es inhibido cuando se le añade antibiótico (cicloheximida) (Castañón-Olivares, 2002).

En Agar Níger simplificado, de semilla *Guizotia abyssinica* (semilla níger), solo *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* producen fenoloxidasas en este medio, resultando la producción de melanina y desarrolla colonias de color café oscuro a negro. Las colonias de otras levaduras van de color crema a beige, lo que hace a este medio diferencial con otras especies de levaduras, incluyendo las del mismo género (Casadevall y Perfect, 1998).

Un medio utilizado para distinguir a *C. neoformans* de *C. gattii* es el agar de canavanina -glicina con azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung *et al*, 1982), donde únicamente la segunda especie crece sobre el medio ya que puede utilizar la glicina como fuente de carbono y nitrógeno y es resistente a la canavanina. Otra manera de distinguirlas, es en un medio con D-prolina, siendo *C. gattii* la única que la utiliza como recurso el nitrógeno (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

1.6.3. Serología

Para el diagnóstico de la criptococosis, las pruebas serológicas son un recurso muy eficaz y confiable. Como la aglutinación de látex, es rápida y útil en el diagnóstico, aún cuando la identificación de la levadura con tinta china es negativa. Esta prueba detecta el antígeno del polisacárido de la cápsula y es aproximadamente 95% sensible y específica para la identificación de criptococosis invasiva. Esta prueba puede generar falsos positivos debido a una pobre carga de organismos o posiblemente levaduras hipo o acapsuladas, aunque esta última son eventos no comunes. Se pueden demostrar anticuerpos en pacientes con lesiones localizadas y al inicio de la infección, aunque en los pacientes con criptococosis diseminada, las reacciones serológicas tienden a negativizarse debido a la anergia que presentan los pacientes (Dolan, 1972). Con esta prueba pueden existir falsos positivos, confundiendo dicha infección con la artritis

reumatoide; además pueden ser provocados por la contaminación con cantidades pequeñas de algunas sustancias del laboratorio, por ciertos desinfectantes y jabones utilizados (Blevins *et al*, 1995) y la presencia de organismos infecciosos presentes dentro de la muestra (Casadevall y Perfect, 1998).

El inmunoensayo de enzimas (EIA) ha sido desarrollado para la detección de anticuerpos, como inmunoglobulinas G (IgG) e IgA, aunque se ha encontrado que estos anticuerpos no son detectados durante la infección aguda en pacientes inmunocompetentes, si puede detectar antígenos en la parte inicial de la infección o con baja concentración del antígeno. Este ensayo es útil para estudios de seroepidemiología de la criptococosis (Casadevall y Perfect, 1998).

1.6.4. Técnicas moleculares

Un rubro importante empleado en los últimos años para la identificación y análisis de diversos organismos es la biología molecular. Con esta herramienta, se han obtenido datos genéticos (Whelan y Kwon-Chung, 1986; Kwon-Chung *et al.*, 1992), epidemiológicos (Casali *et al.*, 2003) y filogenéticos (Xu *et al.*, 2000) de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Se han empleado diferentes técnicas en el estudio de estas levaduras, como AFLPs (fragmento polimórfico amplificado), RFLPs (fragmento polimórfico restringido), cariotipos, DNA fingerprinting (ácido deoxyribonucleico “huella digital”), RAPDs (amplificación casual de ADN polimórfico), PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), PCR fingerprinting (Reacción en cadena de la polimerasa “huella digital”), entre otras.

Boekhout *et al.* (2001), estudiaron 153 cepas de *C. neoformans* y 54 de *C. gattii* con AFLPs, utilizando los iniciadores MseI y EcoRI y EcoRI-AC FAM y MseI-G, encontrando una clara separación de los serotipo A, D, AD y B/C, formando un grupo diferente para los serotipos de *C. neoformans*. Con respecto a *C. gattii* se formaron dos grupos del serotipo B y un tercero mezclado con los serotipo B y C.

En Estados Unidos de América se estudiaron 136 cepas clínicas (serotipos A, D y A/D) y 762 ambientales, con AFLPs y dos iniciadores selectivos para PCR, (EcoI-AC-FAM y MseI-G) y (EcoR-TG-FAM y MseI-G) marcados en el extremo 5' con 6-carboxifluoreceína (FAM), donde obtuvieron bandas de un mismo tamaño presentes solo en algunos aislados. Donde encontraron 64 bandas polimórficas que distinguen A, D, A/D; 2 bandas que determinan 8 distintos genotipos que difieren por 2 o mas bandas para el serotipo A; 13 bandas para 5 genotipos para D y 13 bandas con 6 genotipos para A/D (Litvintseva *et al.*, 2005).

Franzot *et al.* (1998), estudiaron 12 cepas de *C. neoformans*, seis con serotipo A y seis con serotipo D. Emplearon la técnica de RFLP, donde usaron

SacI para digerir el ADN (ácido desoxirribonucleico) y se tipificaron las cepas por Southern blot con CNRE-1. Ambos serotipos se separaron en dos grupos. El serotipo A genero patrones complejos de bandas de 11 a 16 fragmentos de restricción; en todas las cepas con este serotipo se presentó una banda de 3.5 kb. Para el serotipo D se produjeron menos bandas y de menor intensidad. El número de bandas de restricción fueron entre 5 a 11.

Un análisis de 9 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* con RFLPs examinadas por Southern blot con CNRE-1, mostró que no había variación alguna entre las cepas, soportando que todas correspondían a la misma variedad. En este mismo proyecto se estudió el cariotipo mediante electrofóresis de campo pulsado, donde todos los aislamientos tenían el mismo número de cromosomas con similar peso molecular (Franzot *et al.*, 1998).

En el trabajo de Latouche *et al.* (2003), se analizó el gen fosfolipasa B (PLB1) de 73 cepas para diferenciar a *C. neoformans* de *C. gattii* donde se utilizó RFLP y los iniciadores IDPLB1 y IDPLB1, encontrando un fragmento de 1,970 pb, el cuál fue digerido con Aval, permitiendo la identificación de ocho tipos moleculares. El mismo fragmento digerido con HindIII distinguió únicamente a los serotipos A, D, AD y B/C.

Dentro del estudio del cariotipo, García-Bermejo *et al.* (2001), trabajaron con 33 cepas de *C. neoformans* y 13 de *C. gattii*. Para poder obtener el ADN intacto, se liso a la célula con enzimas de *Trichoderma harzianum*. Encontraron que *C. neoformans* presentaba entre 9 a 13 cromosomas de 17 Mb (14.2- 20.9 Mb) y el cromosoma más pequeño encontrado en esta especie fue de 650 kpb; en *C. gattii* encontraron de 7 a 12 cromosomas de 10 Mb (7.9 -16.8 Mb) y los cromosomas más pequeños tenían un peso de 420 y 580 kpb, encontrando más variabilidad en *C. neoformans* que en *C. gattii*.

Boekhout y van Belkum (1977), observaron que había una variación del cariotipo de *C. neoformans* y *C. gattii* bajo ciertas condiciones, por lo que estudiaron un total de 38 cepas de ambas especies. Fueron estudiados los cariotipo y patrones de RAPD de tres grupos: 1) mutantes capsulares y filamentosos; 2) estado heterotálico y 3) cepas en esporulación con descendencia. Los cromosomas se analizaron con electrofóresis de campo pulsado. Encontrando que el cariotipo de la levadura variaba bajo las tres condiciones antes mencionadas pero en los RAPDs no mostraban cambio alguno; únicamente se mostró una ligera variación en el patrón de RAPD de los aislados en la descendencia (F_1) de las cepas, después de una recombinación o tratamientos mutagénicos demostrando que el cambio presentado por el cariotipo es neutral y no confiere algún beneficio al fenotipo en estos tres casos.

También se ha estudiado el origen y evolución de cepas de *C. neoformans*, para ello Xu *et al.* (2002), trabajó 14 aislados clínicos provenientes de E.U.A., todas con serotipo A/D. Estudiaron una porción del gen difenol oxidasa (laccasa o LAC). El fragmento 537 pb se secuenció y amplificó con PCR y 5'-GGC GAT ACT ATT ATC GTA-3' con su reversa 5'-TTC TGG AGT GGC TAG AGC-3'. Se encontraron dos alelos en todas las cepas y 28 secuencias. Con ello demostraron que han ocurrido múltiples eventos de hibridación entre los serotipo A y D, siendo responsables de la ocurrida distribución de A/D y que muchas cepas de este serotipo se han originado recientemente por lo que existe una dinámica evolutiva de *Cryptococcus neoformans*.

Varma *et al.* (1995), analizaron un total de 156 cepas, 126 de *C. neoformans* y 30 *C. gattii*, las cepas clínicas provenían de pacientes con SIDA y VIH negativos. Utilizaron la prueba de ADN UT-4p para examinar la diversidad de patrones de ADN en estas dos especies que se aislaron en distintas partes del mundo. El plasmido lineal fue extraído de una cepa transformante de URA5. Encontraron que todas las cepas provenientes de pacientes con VIH, excepto una era serotipo A, de las 30 cepas de *C. gattii*, 23 fueron aisladas de pacientes VIH

negativos, solamente un paciente presentaba SIDA, del cuál se aisló una cepa con serotipo B y las otras 6 se obtuvieron de árboles de *Eucalyptus*. Con esta prueba fueron diferenciados nueve patrones distintos de ADN (I-IX) en los aislados clínicos y ambientales de *C. neoformans*; para *C. gattii* se describieron 12 patrones diferentes (a- l). De esta manera, demostraron que esta técnica es una buena herramienta para estudios epidemiológicos que diferencia a los serotipos, no obstante sugieren el uso de otras pruebas que permitan ser más sensibles.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* que permite la amplificación de una región específica del ácido deoxyribonucléico (ADN). Es un método altamente sensible, muy específico, de bajo costo y es adaptable a diferentes requerimientos. Fue introducida en el año de 1985 (Newton y Graham, 1997) y desde entonces se ha ido perfeccionando. Se han desarrollado diferentes condiciones de PCR con el fin de identificar a *C. neoformans* y *C. gattii* tanto a nivel de especie, variedades (Aoki *et al.*, 1999) o como prueba para el diagnóstico en humanos (Paschoal *et al.*, 2004). Se demostró la utilidad de la PCR en la identificación de *C. neoformans* y *C. gattii*, siendo altamente sensible y específica sin falsos positivos, como ocurre con el medio de cultivo y la tinción con tinta china.

En un estudio con 72 cepas aisladas de pacientes con y sin VIH, fueron claramente diferenciadas como *C. neoformans* y *C. gattii* utilizando los cebadores CN-5 y CN-4 (Paschoal *et al.*, 2004).

Aoki *et al.* (1999) usaron RAPDs y tres oligos, R-1), R-2 y R-3, para identificar fragmentos específicos de 31 cepas del serotipo A (con una banda de 695 pb) y 2 cepas del serotipo B (con una banda de 448 pb). En base a esta información se sintetizaron cebadores específicos, el par de cebadores (CNa-70-A y CNa-70-A) y (CNa-29-S y CNa-29-A) para el serotipo A, (CNb-49-S y CNb-49-A) para el serotipo B, los cuáles utilizándose con PCR, identificaron al 100% ambos serotipos.

Los iniciadores son secuencias que se pegan a una zona específica de la cadena de ADN y a partir de esta se inicia la síntesis de dicha zona. Deben ser cortos de 10 a 20 nucleótidos, diseñados arbitrariamente y que se alinean a secuencias del ADN bajo condiciones muy tolerantes. En esta técnica se puede hacer uso de iniciadores universales, que proporcionan sitios con información de alta calidad, siendo útiles cuando el genoma está degenerado (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Mullis y Ferré, 1994).

Dentro de este tipo de iniciadores tenemos a los microsatélites: oligonucleótidos sintéticos, cortos con un tamaño de 1 a 5 pares de bases (pb) y los minisatélites: oligonucleótidos sintéticos o fragmentos de ADN de secuencia corta, tienen un tamaño de entre 10 a 60 pb y son clonados de diversos organismos (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Ledwith *et al.*, 1990). Dentro de las unidades de minisatélites, se encuentran segmentos cortos llamados "core", esta secuencia es la más conservada de la familia de minisatélites (Ledwith *et al.*, 1990).

Vassart *et al.* (1987) obtuvieron una secuencia, "core" M13, el cuál fue trazado de dos fragmentos de 15 pb localizados dentro de la proteína III gen del bacteriófago M13, enriquecida en secuencias correspondientes a las regiones situadas entre 1013 y 2528pb del mapa y que corresponden a los aminoácidos (Glu,Gly,Gly,Gly,Ser)_n. Se ha demostrado que el uso de este iniciador permite la detección de distintos minisatélites en el ADN de humanos (Vassart *et al.*, 1987; Brocas *et al.*, 1987; Medeiros *et al.*, 1989; Barysheva *et al.*, 1989; Barysheva *et al.*, 1991; Khusnutdinova *et al.*, 1994; Kondrashov *et al.*, 1990); así como en peces (Vassart *et al.*, 1987). Se han hecho pruebas de paternidad, análisis de marcadores genéticos e identificación de animales domésticos (George *et al.*, 1990). Se han estudiado parásitos humanos, como *Giardia intestinales* (Upcroft, 1991).

Lograron separar diferentes grupos taxonómicos incluyendo animales (vertebrados e invertebrados), plantas y microorganismos (bacterias y levaduras) mediante el uso del iniciador M13, ya que identificó patrones polimórficos en cada grupo lo que hizo una clara separación entre ellos (Ryskov, *et al.*, 1988).

Las técnicas de AP-PCR iniciador arbitrario PCR (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Mullis y Ferré, 1994; Ruma *et al.*, 1996) y RAPD amplificación casual de ADN polimórfico (Aoki *et al.*, 1999; Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Mullis y Ferré, 1994) son métodos versátiles que generan datos que caracterizan a cada individuo, usando oligonucleótidos arbitrarios, aún sin la necesidad de conocer la secuencia del ADN del organismo. Estos ensayos son frecuentemente empleados para encontrar polimorfismos, como marcadores taxonómicos aplicados en la identificación de genotipos, relación filogenética, clínica epidemiológica y ecología (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Mullis y Ferré, 1994).

Con el uso de RAPD y los oligonucleótidos CN1, MYCI, 5SOR, FPK1-01, FPK1-07, FPK1-08, FPK1-13 y FPK1-20. Se estudiaron cepas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, separando claramente los serotipos A, D, y A/D (*C. neoformans*) de los serotipos B y C (*C. gattii*). Con los iniciadores 5SOR/CNI se obtuvo una banda característica de 0.12 kpb, en las cuatro cepas de *C. gattii* con serotipo C, haciendo una distinción con el serotipo B (Ruma *et al.*, 1996).

Crampin *et al.* (1993) trabajaron un total de 12 cepas clínicas y ambientales, obteniendo diversos patrones de cuatro a 12 bandas, entre 100 pb y 1.5 kpb con un simple iniciador corto 5'-GCG CAC GG-3', con el que se puede distinguir a *C. neoformans* (serotipos A y D) y *C. gattii* (serotipos B y C).

Para conocer la variabilidad genética y distribución geográfica de cepas clínicas y ambientales de *C. neoformans* en Italia, Pernice *et al.* (1998) utilizaron la técnica de RAPD y los cebadores (GTG)₅, (GACA)₄, M13 y (GCGGACGG), con

la que pudieron caracterizar los aislados de *C. neoformans*, indicando la presencia de marcadores heterogenéticos.

Dentro de esta modalidad en la biología molecular, tenemos la PCR fingerprinting. Esta técnica, es derivada del RAPD, con la diferencia en la temperatura de alineamiento ya que para los RAPDs es de 36°C y para PCR-huella digital es de 50°C, esta diferencia permite que el ensayo sea más específico, debido a que a mayor temperatura evita que el iniciador se alinee a zonas inespecíficas, evitando así productos no deseados que pueden alterar los resultados (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997). Cepas aisladas de excretas de aves, fueron tipificadas con PCR fingerprinting y los iniciadores (GACA)₄ y FM1, habiendo una clara división de los serotipos A y D, encontrando que la mayoría de los aislados pertenecen al serotipo D y se puede diferenciar a *C. neoformans* de *C. albidus* (Kielstein *et al.*, 2000).

Se analizaron 110 cepas clínicas de *C. neoformans* provenientes de Alemania y África, con PCR fingerprinting y el cebador (GACA)₄, revelando diversidad genotípica en cada serotipo y mostró tres diferentes genotipos, 3 para serotipo A (VNA1-VNA3); dos para serotipo D (VND1-VND2) y tres para serotipo A/D (VNAD1-VNAD3) (Lemmer *et al.*, 2004).

El uso de la PCR fingerprinting ha sido cada vez más frecuente, que empleada junto con el iniciador M13, arroja muy buenos resultados. En el trabajo de Meyer *et al.* (1993) trabajaron con diferentes especies de cepas de hongos miceliales y levaduriformes, con las técnicas de RAPD y PCR fingerprinting y los iniciadores (CA)₈, (CT)₈, (CAC)₅, (GTG)₅, donde encontraron una clara diferenciación de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, permitiendo en este último dividirlo en serotipos para poder distinguirlo mejor.

En otro estudio, se trabajó con 36 levaduras de las cuales 10 eran de distinta especie y 2 de género diferente, las cuáles se analizaron con PCR

fingerprinting y los cebadores (GTG), (GACA)₄, M13, pudiendo hacer una identificación de cada cepa utilizados en el trabajo, obteniendo genotipos de *C. neoformans* (Liedfeldt, 1993).

De igual manera, en E.U.A., se aislaron 27 cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* de las cuales 21 de ellas fueron extraídas de pacientes con VIH y las otras seis fueron de personas aparentemente sin ningún factor inmunosupresor. La técnica a seguir fue el PCR fingerprinting con los iniciadores (CA)₈, (CT)₈, (CAC)₅, (GTG)₅, (GACA)₄, (GATA)₄ y M13. Con ellos encontraron que 21 cepas de pacientes con VIH correspondieron al genotipo A, 3 al serotipo D y 3 a los serotipo B/C. Con este proyecto demostraron que el PCR huella digital es útil para analizar aislados clínicos de *C. neoformans* y *C. gattii* (Meyer y Mitchell, 1995).

Se analizaron 61 cepas clínicas y 49 ambientales de *Cryptococcus gattii*, usaron la técnica PCR fingerprinting y M13, encontrando que en Australia el genotipo predominante es VGI seguida por VGII y VGIII; en E.U.A. el genotipo predominante fue VGIII y con menor presencia VGI (Sorrell, 1996).

En un estudio piloto para estandarizar la técnica de PCR fingerprinting con el iniciador M13, se trabajaron 356 cepas clínicas de *C. neoformans*, obtenidas en E.U.A., Australia, Sudáfrica, Italia, Argentina, Brasil, India, Nueva Zelanda, Papúa Nueva Guinea y Tailandia, propuso cuatro genotipos para esta especie: VNI y VNII corresponden al serotipo A; VNIII al serotipo A/D y VNIV al serotipo D, esta asignación fue acordada por el mayor número de bandas típicas, las cuáles fueron generadas consistente e independiente de su intensidad. Este patrón de bandeo fue reproducible y único para cada grupo (Meyer *et al.*, 1999).

Para el año 2003, el estudio de cepas clínicas y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* con PCR fingerprinting y el minisatélite M13, se lleva a cabo en países latinos como Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, México, Perú, Venezuela y España. Se estudiaron 340 cepas donde ubicó cuatro

genotipos para *C. neoformans*: VNI y VNII (var. *grubii*, serotipo A), VNIII (serotipo A/D), VNIV (var. *neoformans*, serotipo D); y cuatro para *C. gattii*: VGI, VGII, VGIII y VGIV (serotipos B y C), con una clara separación entre ellos. Dentro de las cepas estudiadas están incluidas 46 clínicas y 23 ambientales provenientes de México, en las cuales solo encontraron los genotipos VNI, VNII, VNIII, VGI, VGIII y VGIV, la mayoría de estas cepas corresponden al genotipo VNI seguida por VGIII (Meyer *et al.*, 2003).

En Brasil, (Casali, *et al.*, 2003) se tipificaron 124 aislados, de los cuales 105 eran clínicas y 19 ambientales. Encontraron que 104 correspondieron a *C. neoformans* var. *grubii*, genotipo VNI; 9 a *C. neoformans* var. *neoformans*, genotipo VNIV y 11 a *C. gattii*, genotipo VGIII. La mayoría de los pacientes con criptococosis eran del género masculino con 2.95 % más que el femenino y la incidencia en los pacientes con VIH fue 2.89 % más en hombres. El rango de edades fue de 22 a 83 años, con mayor frecuencia de los 22 a los 40 años.

En Tailandia trabajaron un total de 131 cepas de *Cryptococcus neoformans*, de las cuales 75 eran clínicas y 56 ambientales. Todos presentaban serotipo A, excepto un aislado clínico con serotipo A/D. Se analizaron con PCR fingerprinting y (GACA)₄. Se formaron dos grupos, el mayor con 75 cepas clínicas y 54 ambientales, este grupo presentaba dos bandas mayores de aproximadamente 1250 y 950 pb; el segundo grupo solo tenía dos cepas ambientales y tenían dos bandas principales de 1180 y 500 pb (Sriburee *et al.*, 2004).

Con la finalidad de conocer la diversidad de los agentes causales de la criptococosis en Brasil, nuevamente se trabajó con cepas aisladas de pacientes VIH positivos y PCR fingerprinting con M13, (GACA)₄, (GTG)₅; además emplearon la técnica de RAPD y los iniciadores 5SOR y CNI. Donde encontraron que la mayoría de los aislados pertenecen a VNI y VNII y tres a VGI y VGII. Con este proyecto proponen que la persistencia de criptococosis en estos pacientes, se

podría deber a reinfecciones, incluso no solo por una cepa, sino por más (Igreja *et al.*, 2004).

Un estudio más con *Cryptococcus neoformans*, realizado en Sao Paulo Brasil, donde trabajaron con 47 cepas provenientes de pacientes VIH positivos. Para conocer su diversidad genética se empleo la PCR fingerprinting y el iniciador (GACA)₄ y el tipo sexual con PCR. Encontrando que 45 aislados eran VNI y dos VNII y que todas las muestras fueron MAT α (Matsumoto *et al.*, 2007).

1.6.5. Análisis de datos.

Novedosos sistemas analíticos de computadoras han abierto la posibilidad de una rápida y eficaz caracterización. El Gel Comprador I versión 4.0 es un sistema computarizado capaz de realizar análisis numéricos.

El programa permite comparar y agrupar más de 2500 patrones usando las herramientas de asociación. Para el agrupamiento se presentan dos pasos: 1) el cálculo de similitud entre todos los pares posibles de muestras enlistadas y 2) análisis de la matriz de similitud. Para determinar la matriz de similitud puede ser basada en el coeficiente de correlación de Pearson o en uno de los coeficientes de similitud de bandas.

El coeficiente de correlación de Pearson calcula la congruencia entre muestrario de valores, típicamente densitométricos. Este compara curvas como un conjunto, es independiente a la definición de la banda y es ideal para convertirla en una rápida comparación de patrones sin tener que editar las bandas. Es insensible a la concentración. Pearson es utilizado por ser objetivo, ya que no sufre de criterios subjetivos como detección o selección de bandas sino compara curvas enteras o solo bandas características. Este caso es aplicado en caso de patrones de bandeado complejos, tales como los obtenidos en proteínas o resultados con un largo número de bandas. En datos obtenidos mediante un

fingerprinting requiere únicamente la comparación de la posición de las bandas, por ello, el programa Gel Compar ofrece otros coeficientes de similitud basados en la presencia o ausencia de bandas. El programa ofrece cinco coeficientes: 1) Coeficiente de Jaccard (S_j); 2) Coeficiente de Dice (S_D); 3) Coeficiente área sensitiva; 4) Coeficiente Fuzzy logic; 5) Coeficiente Jeffrey's.

- Coeficiente de Jaccard (S_j): usa la posición de la banda. Para cada par de muestras, S_j divide el número de bandas correspondientes por el número total de bandas en ambas muestras (Krebs, 1989; Ludwig y Reynolds, 1988).

$$\frac{n_{AB}}{n_A + n_B - n_{AB}}$$

- Coeficiente de Dice (S_D): es derivado y muy similar al coeficiente de Jaccard pero da más peso a las bandas seleccionadas.

$$\frac{2n_{AB}}{n_A + n_B}$$

n_{AB} es el número de bandas en común entre A y B

n_A es el número total de bandas en A

n_B es el número total de bandas en B

- Coeficiente de área sensitiva: Este es más sofisticado, toma en cuenta las bandas correspondientes expresadas como S_j tan bien como

las diferencias del área relativa debajo de cada banda correspondiente (la cuál es una indicación de la concentración de la banda correspondiente). Cuando el área de todas las bandas correspondientes de dos muestras es igual, este coeficiente es reducido al coeficiente de Jaccard.

- Coeficiente Fuzzy logic: Esta basado en el coeficiente de Jaccard pero asigna señales a bandas correspondientes proporcionales el grado de solapamiento. Si dos bandas se encuentran exactamente en la misma posición, el marcador de estas bandas será el mismo como el usado por Jaccard, y la marcación decrecerá proporcionalmente a la distancia entre las bandas y será cero cuando la distancia es tan larga que lo permita la tolerancia.
- Coeficiente Jeffrey's: este es muy similar, pero no idéntico al coeficiente Dice.

$$\frac{n_{AB} + n_{BA}}{n_A + n_B}$$

El análisis de agrupamiento es una técnica para clasificar entidades similares en grupos. Para este tipo de clasificación son utilizadas estructuras jerárquicas en forma de árbol llamadas dendogramas o fenogramas. El agrupamiento basado en similitud es uno de los métodos utilizados en este programa y presenta tres algoritmos que están disponibles para cualquier coeficiente, son UPGMA (método de valor promedio), método de Ward (agrupamiento por varianza mínima) y método Neighbour-joining (Krebs, 1989; Ludwig y Reynolds, 1988)

La manera en que el método de Ward agrupa los datos es por medio de varianza con mínimos cuadrados, minimiza todas las desviaciones del dendograma de la matriz de similitud original, por ello las agrupaciones son más chicas. El método de UPGMA es idéntico a Ward, este compara la distancia entre cada dato (Krebs, 1989; Ludwig y Reynolds, 1988).

$$S_{J(K)} = \frac{1}{t_J t_K} (\sum S_{JK})$$

- S_{J(K)}** similitud entre el grupos J y K
- t_J** número de muestras en el grupo J (≥ 1)
- t_K** número de muestras en el grupo K (≤ 2)

El método Neighbour- joining trata de minimizar el tamaño total de ramas, “la distancia total evolutiva”. Por esta razón, este tipo de árboles es frecuentemente referido como “árbol mínimo evolutivo”

También el programa da la opción de dar cierta tolerancia en la posición entre dos bandas, es un parámetro que puede ser cambiado por el usuario. Este valor es expresado como un porcentaje del tamaño del patrón, por ejemplo, si una tolerancia de 1% de un patrón de 500 puntos, significa un cambio máximo de 5 puntos que es permitido para producirse entre dos bandas. Este criterio es útil para geles que tienen errores en el espacio molecular entre cada banda.

2. JUSTIFICACIÓN

La biología molecular es una herramienta que ha sido aplicada en diferentes áreas biológicas. En medicina, se han utilizado varias técnicas moleculares enfocándolas al ámbito epidemiológico.

En muchas partes del mundo, se han realizado diferentes estudios relacionados con la genotipificación de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, lo cuál ha facilitando la identificación de estos hongos. Los resultados obtenidos de esos estudios, han proporcionado información valiosa utilizada en el esclarecimiento de la ecología, patología y genética de estas dos especies.

Desafortunadamente en nuestro país, existe escasa información de estas levaduras y debido a lo cuál se ha hecho necesario pensar en implementar técnicas básicas moleculares que complementen la información obtenida hasta el momento en México.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

Identificar aislados mexicanos de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* mediante los patrones genotípicos obtenidos por la técnica PCR fingerprinting.

Objetivos Particulares

Establecer si existen diferencias geográficas entre los patrones genotípicos de las cepas mexicanas y las de otros países.

Investigar la correlación entre los genotipos de los aislados y las características clínicas y epidemiológicas registradas de cada paciente.

Hipótesis

Si las condiciones de experimentación en México son similares a las usadas por otros autores, entonces los resultados obtenidos serán satisfactorios.

Si el PCR fingerprinting resulta de fácil ejecución y reproducibilidad, entonces representará un método adecuado para diferenciar entre los diferentes aislados mexicanos de *C. neoformans* y *C. gattii*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Procedencia de las cepas

Se observó la macro y micro morfología de la colonia de un total de 75 cepas aisladas de pacientes provenientes distintos hospitales; 61 del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social (CMN “La Raza”, IMSS); cinco del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Sector de Salubridad y Asistencia (INNN, SSA); siete del Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, Instituto Mexicano del Seguro Social (CMN “Siglo XXI”, IMSS); una del Hospital Juárez, Sector de Salubridad y Asistencia (SSA) y una del Hospital Infantil, Sector de Salubridad y Asistencia (Tabla 2). Dichas cepas se encuentran actualmente almacenadas en la colección de hongos del laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Tabla 2. Características de las cepas mexicanas.

Aislado	Sexo	Edad	Sustrato	Factor de riesgo	Especie
* 001	M	38	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 002	M	39	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 003	M	41	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 004	F	31	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 005	M	44	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 007	F	30	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 008	M	50	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 009	M	27	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 010	M	24	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 012	M	34	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 013	M	32	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 014	F	35	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 017	F	27	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 019	M	32	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>

* 020	M	36	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 021	M	29	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 022	M	38	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 023	M	30	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 025	M	32	MLC	VIH	<i>neof/grub</i>
* 026	M	26	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 027	M	27	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 028	M	35	MLC	VIH	<i>neof/grub</i>
* 029	M	25	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 030	M	48	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 032	M	19	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 035	M	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 037	M	27	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 038	M	51	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 039	M	34	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 040	M	35	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 041	F	27	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 043	M	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 044	F	SD	HMC	SD	<i>neof/grub</i>
* 045	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 046	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 047	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 048	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 050	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 051	M	SD	HMC	SD	<i>neof/grub</i>
* 052	M	46	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 053	M	SD	LCR	HSA	<i>neof/grub</i>
* 054	M	31	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 055	M	40	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 056	M	36	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 057	M	34	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 058	M	27	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 059	M	34	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 060	M	50	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 061	M	30	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 062	M	28	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 063	M	27	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 064	M	37	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 066	SD	SD	HMC	SD	<i>neof/grub</i>
* 070	M	31	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 071	M	46	LCR	TBL	<i>neof/grub</i>
* 072	M	49	LCR	VIH	<i>neof/grub</i>
* 073	SD	SD	MLC	SD	<i>neof/grub</i>
∫ 074	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
∫ 076	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>

∫ 077	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
∫ 078	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
∫ 079	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
∫ 080	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
∫ 081	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
£ 084	SD	SD	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
‡ 100	M	33	LCR	SD	<i>neof/grub</i>
* 018	M	20	LCR	NF	<i>gattii</i>
‡ 092	M	20	LCR	NF	<i>gattii</i>
‡ 093	F	34	LCR	NF	<i>gattii</i>
‡ 097	SD	SD	LCR	NF	<i>gattii</i>
+ 122	F	10	LCR	NF	<i>gattii</i>
* 200	F	23	LCR	NF	<i>gattii</i>
* 203	M	49	LCR	IHP	<i>gattii</i>
* 221	F	23	SD	SD	<i>gattii</i>
‡ 240	M	SD	LCR	SD	<i>gattii</i>

* CMN La Raza. Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS

M: masculino

‡ INNN. Instituto Nacional de Neurología, SSA

F: femenino

∫ CMN Siglo XXI. Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS

LCR: líquido cefalorraquídeo

£ Hospital Juárez, SSA

MLC: mielocultivo

+ Hospital Infantil de México, SSA

HMC: hemocultivo

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

IHP: insuficiencia hepática

HSA: probable herpes 1 ó A

SD: sin dato

TBL: probable linfopenia y tuberculosis

Se utilizaron 8 cepas de referencia provenientes de Australia y donadas gentilmente por el Dr. Wieland Meyer (Centre for Infectious Diseases and Microbiology, Molecular mycology Laboratory, The University of Sydney at Westmead Hospital, ICPMR, Westmead, Australia).

Dichas cepas han servido como estándares en diversos estudios (Meyer *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2003; Casali *et al.*, 2003) (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de cepas de referencia utilizadas en este estudio

Cepa	Origen Geográfico	Especie	Genotipo
wm 148	Australia	<i>C. neoformans</i>	VN I
wm 626	Australia	<i>C. neoformans</i>	VN II
wm 628	Australia	<i>C. neoformans</i>	VN III
wm 629	Australia	<i>C. neoformans</i>	VN IV
wm 179	Australia	<i>C. gattii</i>	VG I
wm 178	Australia	<i>C. gattii</i>	VG II
wm 175	E. U. A.	<i>C. gattii</i>	VG III
wm 779	Sudáfrica	<i>C. gattii</i>	VG IV

También fueron utilizadas en el proyecto cepas de origen extranjero y se encuentran enlistadas en la Tabla 4. Todas las extranjeras, incluyendo las de referencia, se encuentran actualmente almacenadas en la colección de hongos del laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Tabla 4. Datos de cepas extranjeras utilizadas en el proyecto

Cepa	Especie	Origen Geográfico
INS 762	<i>C. gattii</i>	Colombia •
INS 1134	<i>C.gattii</i>	Colombia •
INS 1174	<i>C.gattii</i>	Colombia •
INS 881	<i>C.gattii</i>	Colombia •
14 c	<i>C. neoformans</i>	España ++
15 c	<i>C. neoformans</i>	España ++
16 c	<i>C. neoformans</i>	España ++
17 c	<i>C. neoformans</i>	España ++
18 c	<i>C. neoformans</i>	España ++
IP 960	<i>C. neoformans</i>	Francia *
IP 1177	<i>C. neoformans</i>	Francia *
IP 1208	<i>C. gattii</i>	Francia *

• Instituto Nacional de Salud, Bogotá.

++ Instituto Municipal de Investigaciones Médicas, Barcelona.

* Unité de Mycologie. Institut Pasteur, Paris.

4.2. Datos demográficos.

Para el estudio epidemiológico, se registraron los datos de los pacientes a los que se les aisló *Cryptococcus neoformans* ó *C. gattii*, tomándose en cuenta el tipo de espécimen patológico donde se aisló a la levadura, factor inmunosupresor, sexo y edad.

Todas las cepas mexicanas fueron obtenidas en primo-aislamiento a partir del espécimen patológico mediante su siembra en agar dextrosa Sabouraud adicionado con penicilina y cloranfenicol e incubadas a 25°C. Después de una

semana de crecimiento se anotaron los datos de color, tamaño, textura y aspecto. Las colonias se examinaron al microscopio mediante la tinción negativa (examen en fresco con tinta china) para confirmar la presencia o ausencia de cápsula.

4.3. Identificación bioquímica

Se sembró una asada de cada uno de los aislados en agar urea de Christensen (López-Martínez *et al.*, 2004) este medio es usado para la diferenciación de levaduras como *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* ya que los organismos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio indicada por un color rosa-rojo; también en agar Níger simplificado (Dufait *et al.*, 1987) donde solo *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* producen fenoloxidasas en este medio, resultando en la producción de melanina y desarrolla colonias de color café oscuro a negro, las colonias de otras levaduras van de color crema a beige; y por último se sembraron en agar glicina canavanina azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung *et al.*, 1982) *C. gattii* tornan el medio de azul y *C. neoformans* da una reacción negativa, dejando el medio de color amarillo verdoso (bajo las fórmulas consideradas en el apéndice).

Una vez confirmada la identificación de cada cepa aislada como *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* / *neoformans* ó *C. gattii* mediante las pruebas bioquímicas antes mencionadas (ver apéndice), se procedió al almacenamiento de las mismas, para lo cuál se tomo una asada de cada una de las colonias de color café obtenidas en el agar Níger simplificado y se sembraron respectivamente en agar dextrosa Sabouraud por 72 hrs a 25°C, al cabo de este tiempo las levaduras fueron cosechadas en agua estéril y a la suspensión obtenida se le agregó glicerol como amortiguador en proporción 2:1. Los viales fueron almacenados a -72°C hasta su uso.

4.4. Extracción de ADN

Cada una de las cepas almacenadas por congelación fueron sembradas en agar medio definido, este medio se utiliza, porque evita que *C. neoformans* y *C. gattii* desarrollen cápsulas grandes y así se facilite la extracción de ADN (ver apéndice) e incubadas a 25°C por 72 h. Posteriormente se recuperaron del cultivo con agua desionizada y se lavaron, centrifugando a 4,000 rpm durante 5 min., descartando el agua y repitiendo el procedimiento dos veces más. En el último lavado el botón de levaduras fue pesado y ajustado a 100 mg de peso húmedo. El paquete de células se resuspendió en 100 µl de agua desionizada y se transfirió a un tubo con 100 mg de perlas de vidrio agitando los tubos en un vórtex a 6 rpm por 3 min.

Para extraer el ADN de cada una de las cepas se utilizó el protocolo DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) ® realizándose algunas modificaciones. A cada tubo, se agregaron 400 µl del buffer AP1® y 4 µl de RNasa A® (100 mg/µl) y se mezcló vigorosamente durante 5 min., después se incubó a 65°C durante 10 min. Se añadió 130 µl de buffer AP2® y se colocó en hielo por 5 min., enseguida se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se tomó únicamente el sobrenadante, eliminando los restos celulares y perlas de vidrio y se transfirió a una columna QIAshredder® y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min. Se tomó el filtrado y se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 1.5 volúmenes del buffer AP3/E® y se mezcló por pipeteo. Se tomaron únicamente 650 µl del lisado y se colocaron en una columna DNeasy® y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min. descartando el colectado. Este paso se repitió hasta agotar el lisado sobrante. A la columna se le cambió el tubo colector y se le añadió 500 µl del buffer AW® y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min. y se descartó el filtrado. Se volvió a añadir 500 µl del buffer AW® y se centrifugó a 13,000 rpm por 2.5 min. Posteriormente la columna se colocó en un nuevo tubo y se le agregó 50 µl del buffer AE® y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min. Este mismo paso se repitió y únicamente se añadieron 20 µl para obtener un volumen final de 70 µl, almacenándose a 4°C.

Para conocer la concentración del ADN, se tomó 1µl del ADN y se visualizó en un gel de agarosa al 1% en Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5X, teñido con bromuro de etidio. En todos los casos el ADN fue ajustado a una concentración de 25 ng, como marcador de peso, se utilizó el fago λ con una concentración de 25 nanogramos (ng).

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting

La reacción de la PCR fingerprinting se realizó en un volumen de 50 µl, conteniendo buffer de corrida 1X®, 3 mM de cloruro de magnesio®, 2.5 mM de acetato de magnesio®, 200 µM de cada nucleótido trifosfatado®, 30 ng de cebador "core" M13 (5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'), 2.5 unidades de Taq polimerasa® y 25 ng de ADN genómico.

La reacción se efectuó en 36 ciclos con una desnaturalización por 20s a 94°C, alineación 1 min. a 50°C, extensión por 20 s a 72°C y una extensión final por 6 min. a 72°C, en un termociclador PTC-100®.

Terminada la PCR se tomaron 5 µl del producto obtenido y fue visualizado en un gel de agarosa al 1% en Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5X, teñido con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de peso molecular XIV® (100 pb).

Este proyecto se realizó siguiendo la técnica empleada por el Dr. Wieland Meyer (Meyer *et al.*, 2003), con algunas modificaciones ya que no había una amplificación adecuada del patrón de bandeo, esto se especificó con una foto de las cepas de referencia otorgada por el Dr. Meyer. Las modificaciones fueron: acetato de magnesio de una concentración de 3 mM a 2.5 mM; MgCl₂ de una concentración de 1.5 mM a 3 mM. En la reacción de la PCR se aumentó un ciclo más (de 35 a 36 ciclos) y en electroforesis la concentración del gel de agarosa cambio de 1.4% a 1%.

Para poder validar los resultados obtenidos fue necesario hacer por triplicado el ensayo en cada una de las cepas, de esta forma se escogió el patrón de bandeo que se repitiera por lo menos en dos de ellos.

Para introducir el patrón de bandeo de cada una de las cepas en el programa Gel Compar I, se visualizaron personalmente, haciendo una selección de bandas representativas para cada uno de los genotipos, ya que se obtenía un gran número de estas y su aparición no era constante en todos los aislados.

Las bandas asignadas para el genotipo **VNI** son: 600 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1900 pb, 2000 pb; para **VNII** son: 600 pb, 1400 pb, 1900 pb; para **VNIII**: 600 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1900 pb; para **VNIV**: 600 pb, 1050 pb, 1200 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1900 pb, 2050 pb; para **VGI**: 700 pb, 800 pb, 1050 pb, 1150 pb, 1350 pb, 1400 pb, 1800 pb; para **VGII**: 800 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1350 pb, 1800 pb; para **VGIII**: 700 pb, 800 pb, 1200 pb, 1350 pb, 1800 pb; para **VGIV**: 650 pb, 750 pb, 800 pb, 1000 pb, 1100 pb, 1150 pb, 1250pb, 1350 pb, 1800 pb.

4.6. Análisis de datos

Se usó el programa de computadora Gel Compar I, versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), usando el coeficiente de similitud Jaccard (1.0 % de tolerancia) y para la construcción del dendograma fue utilizado el algoritmo UPGMA como método de agrupamiento a partir de la base de datos.

5. RESULTADOS

Fueron investigadas un total de 95 cepas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, de las cuales 75 son mexicanas y 20 extranjeras.

5.1. Características morfológicas

En la morfología macroscópica se observó que la mayoría de las cepas obtenidas presentaban aspecto mucoso, liso, brillante y con abundante crecimiento en agar dextrosa Sabouraud.

Microscópicamente, las levaduras presentaron una cápsula de tamaño variable, desde poco visible hasta 18 μm de diámetro.

5.2. Datos demográficos

Las 75 cepas mexicanas se obtuvieron de diferentes productos biológicos de pacientes, 68 fueron de líquido cefalorraquídeo (LCR), 3 de mielocultivo (MLC), 3 de hemocultivo (HMC) y una sin dato (Tabla 2).

Donde 49 cepas fueron de pacientes masculinos, 10 femeninos y 16 sin dato. El rango de edades es de 10 a 51 años, cayendo la mayoría de los casos entre los 21 a 50 años. De 75 pacientes registrados 39 eran VIH positivos, uno con probable herpes 1 ó A (HSA), uno con probable tuberculosis y linfopenia (TBL), uno con insuficiencia hepática (IHP), 6 pacientes inmunocompetentes y 27 sin datos (Tabla 2).

5.3. Características bioquímicas

Todas las cepas resultaron positivas en agar urea de Christensen y en el agar Níger, confirmando la presencia de *C. neoformans* ó *C. gattii*.

Para diferenciar a las dos especies se utilizó el agar CGB, donde 66 cepas mexicanas fueron *C. neoformans* y nueve *C. gattii*.

Dentro de nuestra muestra, la cepa 055 se comportó bioquímicamente como *C. gattii* ya que da positiva en el agar CGB. Debido a que en el laboratorio no se realizan pruebas de serotipificación, no se cuenta con los datos del serotipo de las cepas y únicamente se serotipificó la 055 en el Instituto Pasteur, Francia, presentando serotipo **D**. Y su patrón genotipo pertenece a VNIV, lo que indica que en realidad es una cepa de *C. neoformans* var. *neoformans*.

5.4. Extracción de ADN

Con el método de extracción, se obtuvo un ADN de buena calidad, limpio y con buena concentración. Aproximadamente las muestras tienen un volumen de 70 µl con una concentración de 50 ng (Figura 2).

Fago λ

25 ng

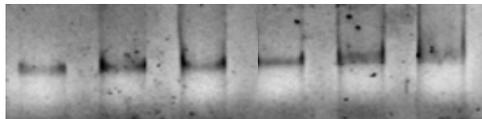


Fig. 2. Imagen del ADN extraído de cepas mexicanas de *C. neoformans* con el protocolo DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)[®]

5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting

En la Figura 3 se muestran los perfiles de las cepas de referencia y en las Figuras 4 al 16 se muestran los perfiles obtenidos de amplificados de cepas mexicanas.

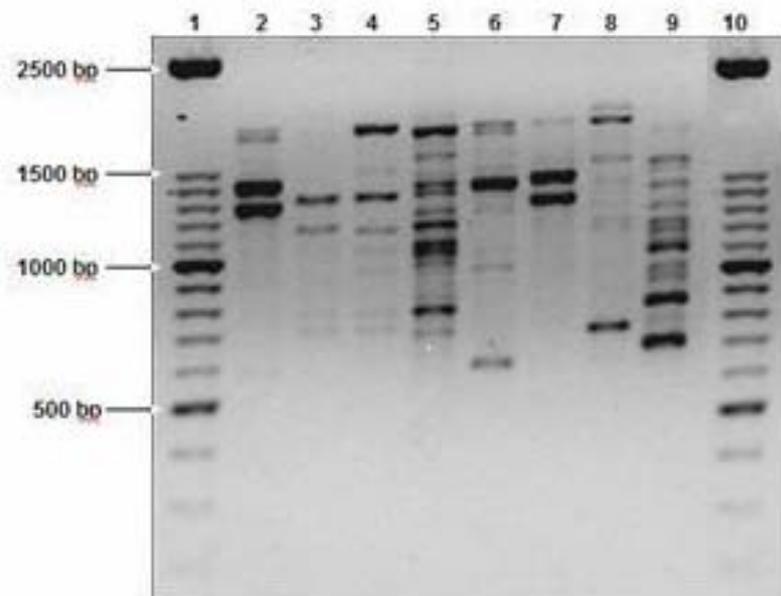


Fig. 3. Patrones de referencia (Dr. Wieland Meyer) por PCR fingerprinting con el iniciador M13: carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI (wm 148); carril 3) genotipo VGIII (wm175) ; carril 4) genotipo VGII (wm 178); carril 5) genotipo VGI (wm 179); carril 6) genotipo VNII (wm 626); carril 7) genotipoVNIII (wm 628); carril 8) genotipo VNIV (wm 629); carril 9) genotipo VGIV (wm 779); carril 10) marcador de peso molecular (100 pb).

En las variedades de *Cryptococcus neoformans* se obtuvieron patrones de bandeo pequeños y presentan ciertas bandas que los caracterizan y distinguen,

como las bandas de 600 pb y 1400 pb, las cuales aparecen en todos los genotipos VN y no se presenta en los genotipos VG. Los tipos VNI, VNII y VNIII presentan un patrón de bandeo muy similar, únicamente diferenciándose con algunas bandas; VNI y VNIII comparten la banda de 1300 pb, mientras que VNII no la presenta. La banda de 2000 pb se encuentra únicamente en VNI, diferenciando a este genotipo de VNIII (Figuras 4 - 16 genotipo VNI, Fig. 4, 5, 7, 8, 10 y 14, genotipo VNII y Fig. 6 y 16 genotipo VNIII).

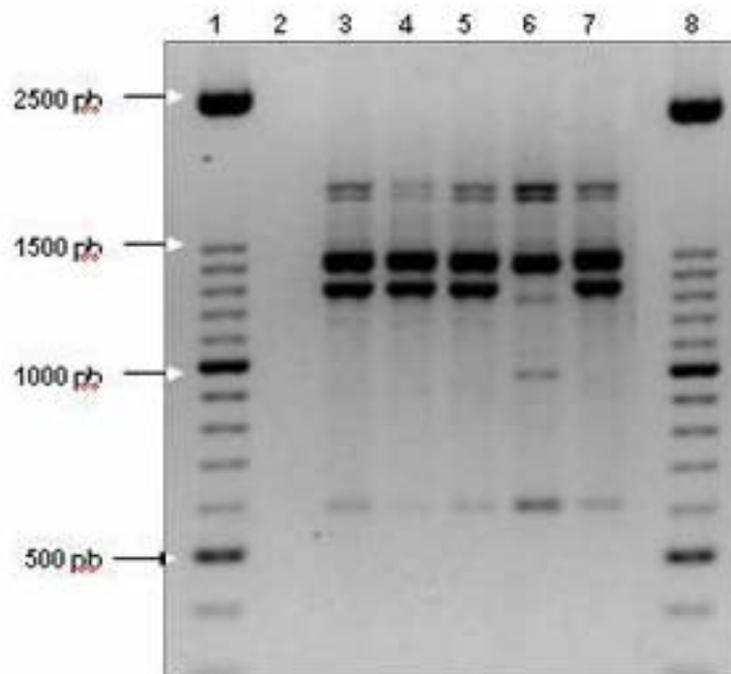


Fig. 4. Patrón genotípico de *Cryptococcus neoformans*, con representantes de VNI y VNII. Carril 1) marcador de peso molecular (100pb); carriles 3, 4, 5, 7) genotipo VNI; carril 6) genotipo VNII; carril 8) marcador de peso molecular (100 pb).

En cuanto al patrón de bandeo presentado por VNIV es diferente a los tres primeros, debido a que se tienen un mayor número de bandas pareciéndose más a los genotipos VG (Figuras 5, 6, y 8).

El patrón de bandeo encontrado en *Cryptococcus gattii* es muy diverso y muy amplio, ya que se presentan muchas bandas con distintos pesos y únicamente coinciden los cuatro genotipos con las bandas de 800 pb y 1800 pb (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13).

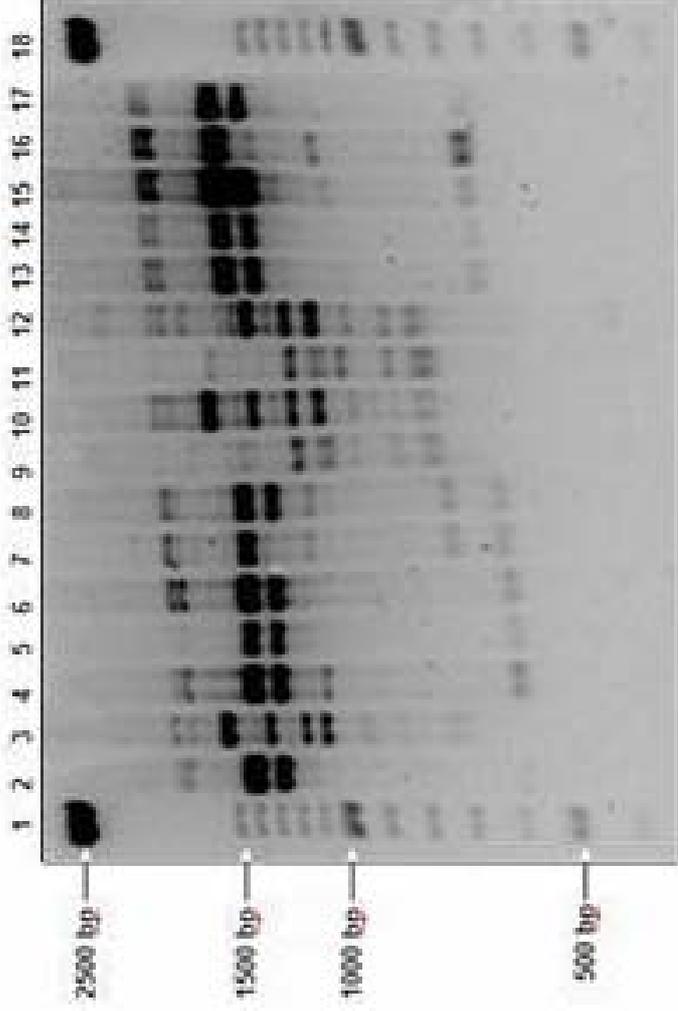


Fig. 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting con el iniciador minisatélite M13 de cepas mexicanas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. - carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNIV; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) VNI; carril 7) VNII; carril 8) VNI; carril 9) VGI; carril 10) VGIV; carril 11) VGIII; carril 12) VGII; carril 13) VNI; carril 14) VNI; carril 15) VNI; carril 16) VNII; carril 17) VNI; carril 18) marcador de peso molecular (100 pb)

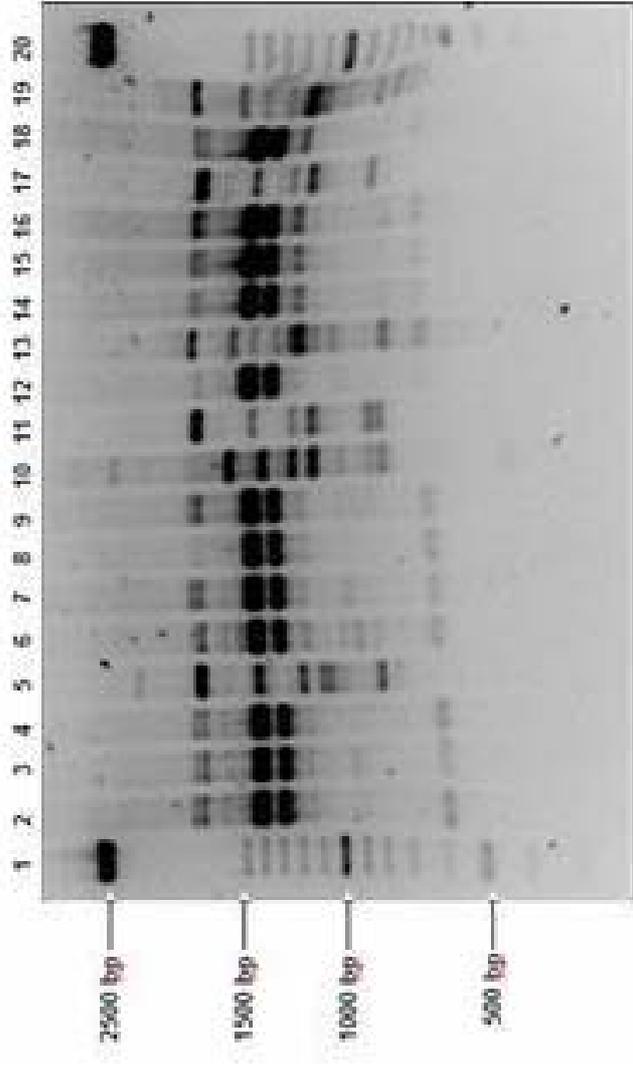


Fig.6. PCR fingerprinting de cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNI; carril 5) VGI; carril 6) VNI; carril 7) VNI; carril 8) VNI; carril 9) VNI; carril 10) VGIV; carril 11) VGI; carril 12) VNI; carril 13) VNIV; carril 14) VNIII; carril 15) VNI; carril 16) VNI; carril 17) VGI; carril 18) VNI; carril 19) VGI; carril 20) marcador de peso molecular (100 pb).

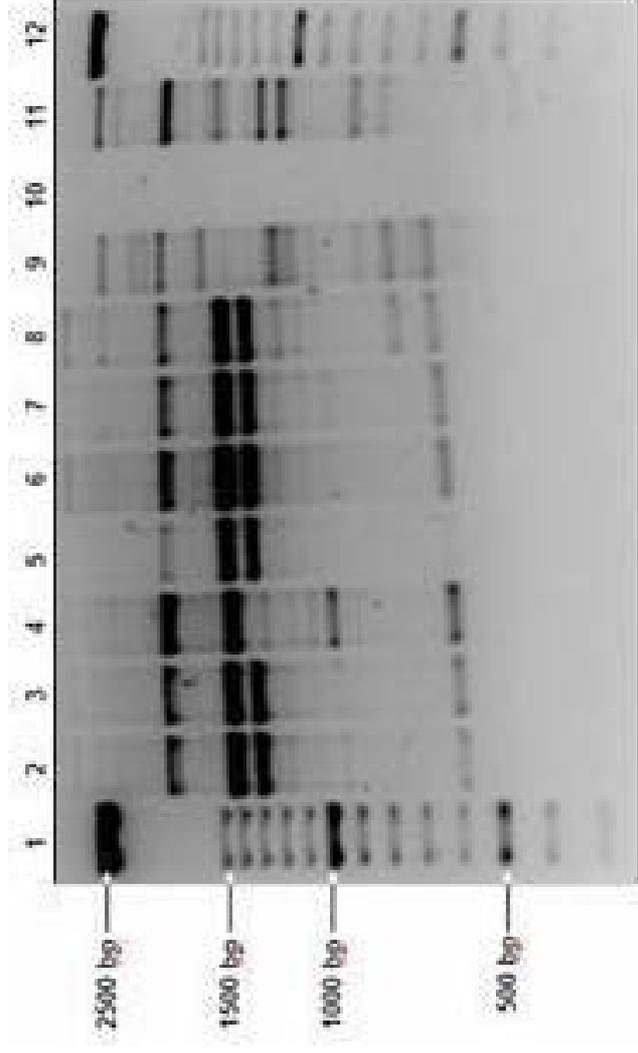


Fig.7. PCR fingerprinting de cepas de *C. neoformans* y *Cryptococcus gattii*: carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNII; carril 5) VNI; carril 6) VNI; carril 7) VNI; carril 8) VNIII; carril 9) VGI; carril 10) --; carril 11) VGI; carril 12) marcador de peso molecular (100pb).

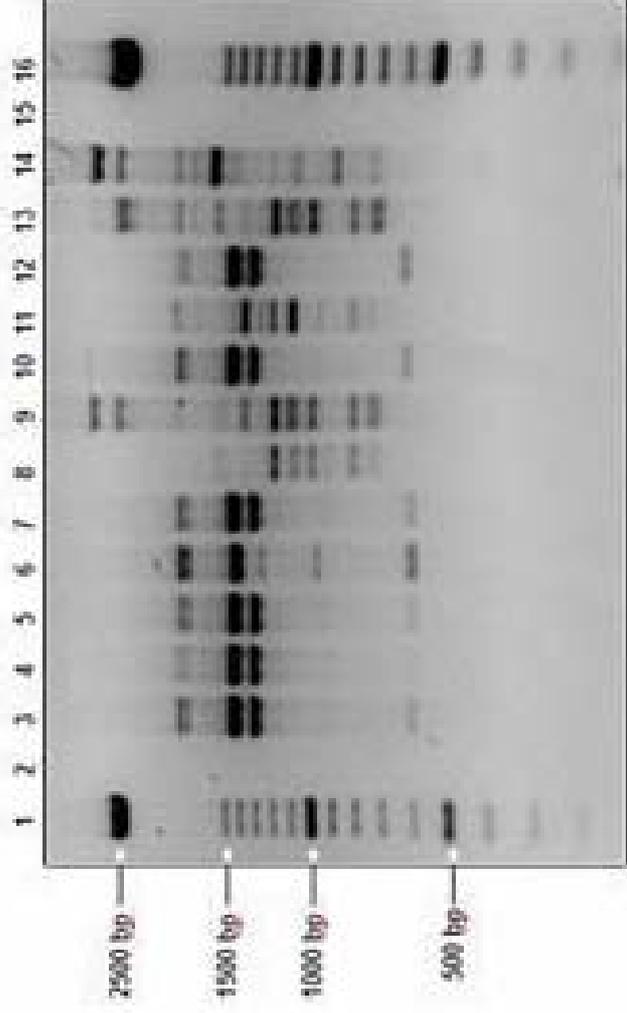


Fig.8. Patrones genotípicos de *C. neoformans* y *C. gattii* obtenidos con PCR fingerprinting y M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) --; carril 3) genotipo VNI; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) VNII; carril 7) VNI; carril 8) VGII; carril 9) VGII; carril 10) VNI; carril 11) VGIII; carril 12) VNI; carril 13) VNIV; carril 14) VGIV; carril 15) --; carril 16) marcador de peso molecular (100 pb).

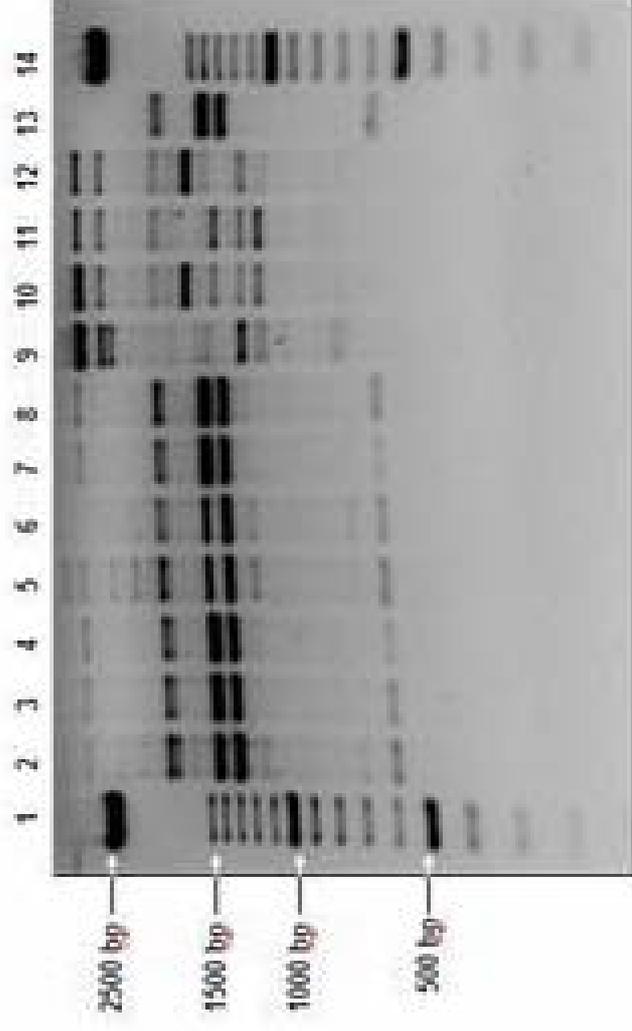


Fig.9. PCR fingerprinting de cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* con iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) VNI; carril 7) VNI; carril 8) VNI; carril 9) VGI; carril 10) VGIV; carril 11) VGIII; carril 12) VGIV; carril 13) VNI; carril 14) marcador de peso molecular (100 pb).

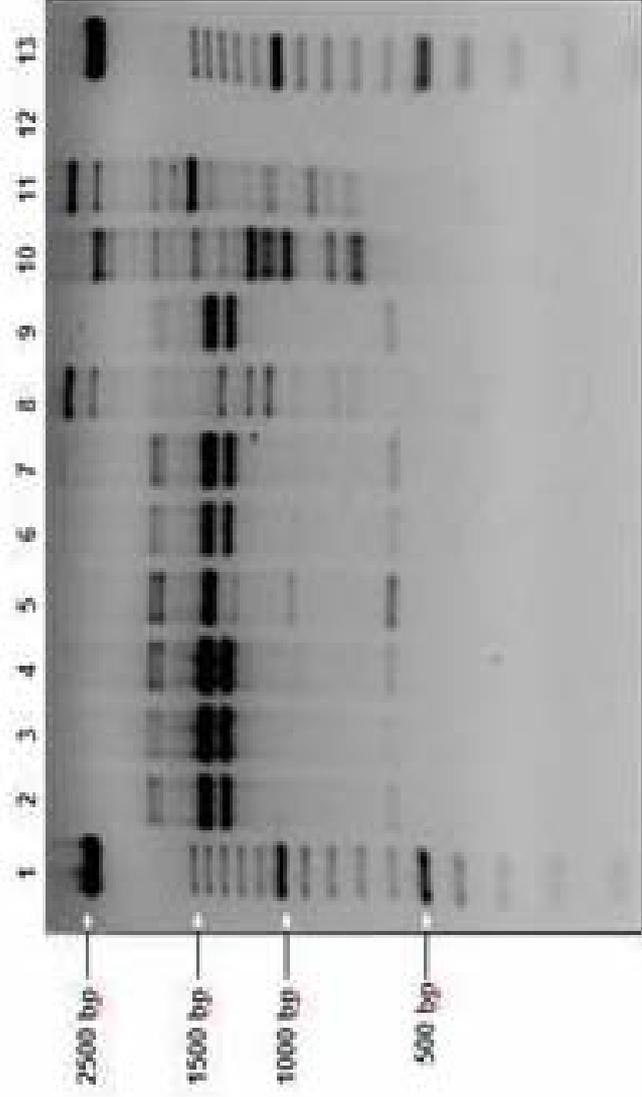


Fig.10. Patrones genotípicos de cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* con PCR fingerprinting y el iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) VNI; carril 7) VNI; carril 8) VGII; carril 9) VNI; carril 10) VNIV; carril 11) VGIV; carril 12) --; carril 13) marcador de peso molecular (100 pb).

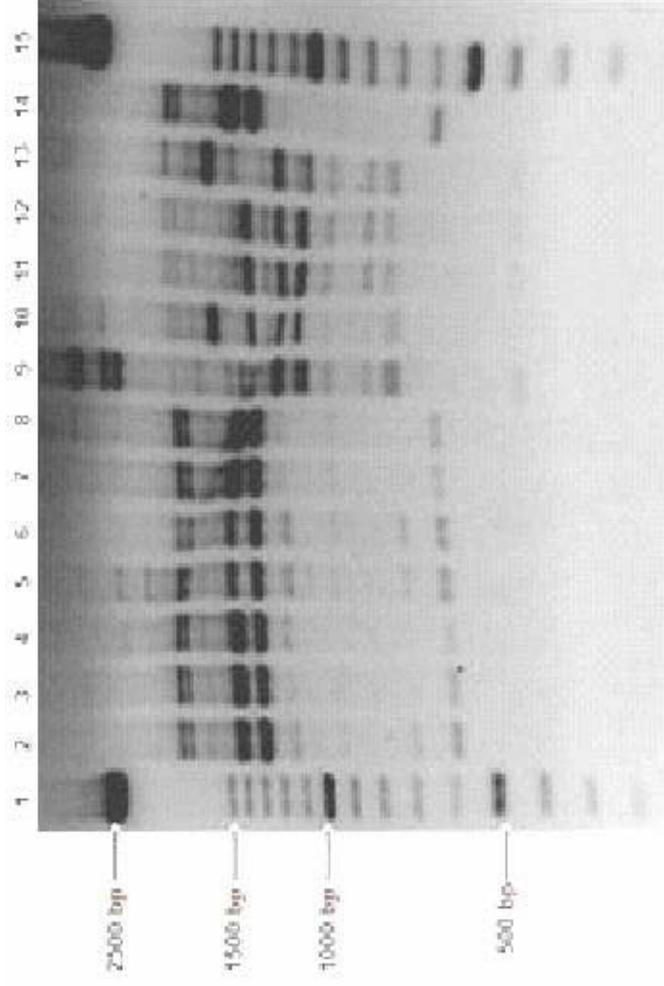


Fig.11. PCR fingerprinting de cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*. 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) VNI; carril 7) VNI; carril 8) VNI; carril 9) VGI; carril 10) VGI; carril 11) VGIII; carril 12) VGIII; carril 13) VGIV; carril 14) VNI; carril 15) marcador de peso molecular (100 pb).

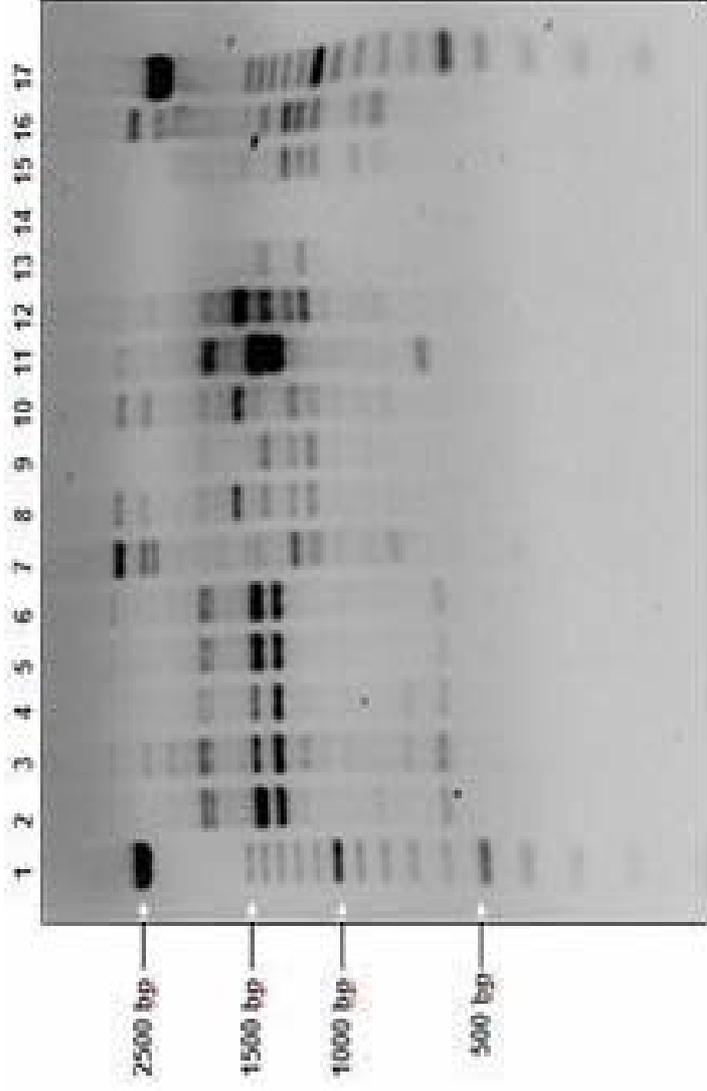


Fig.12. Patrones genotípicos de *C. neoformans* y *C. gattii* con PCR fingerprinting y el iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) VNI; carril 7) VGI; carril 8) VGIV; carril 9) VGIII; carril 10); carril 11) VNIII; carril 12) VGIV; carril 13) --; carril 14) --; carril 15); carril 16) --; carril 17) marcador de peso molecular (100pb).



Fig.13. Patrones genotípicos de cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* con PCR fingerprinting y el iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) --; carril 7) VNI; carril 8) VNI; carril 9) VNI; carril 10) --; carril 11) --; carril 12) VNI; carril 13) VNI; carril 14) --; carril 15) VNI; carril 16) VNI; carril 17) marcador de peso molecular (100 pb).

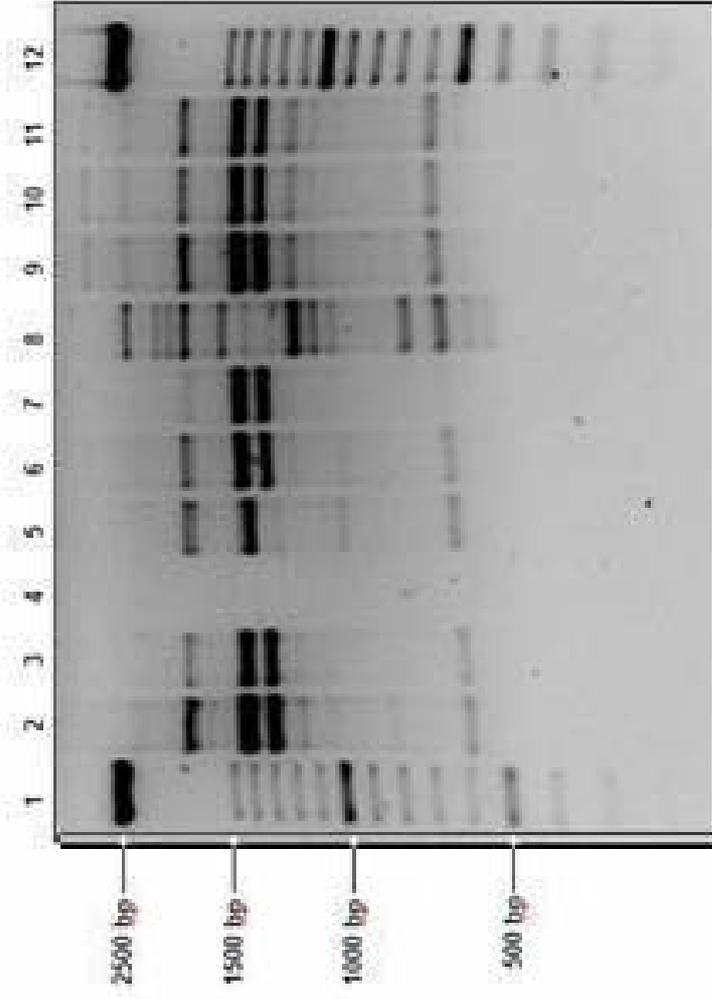


Fig.14. Patrones genotípicos de *C. neoformans* y *C. gattii* con PCR fingerprinting y el iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) VNI ; carril 4) --; carril 5) VNII; carril 6) VNI; carril 7) VNI; carril 8) ; carril 9) VNI; carril 10) VNIII; carril 11) VNIII; carril 12) marcador de peso molecular (100 pb).

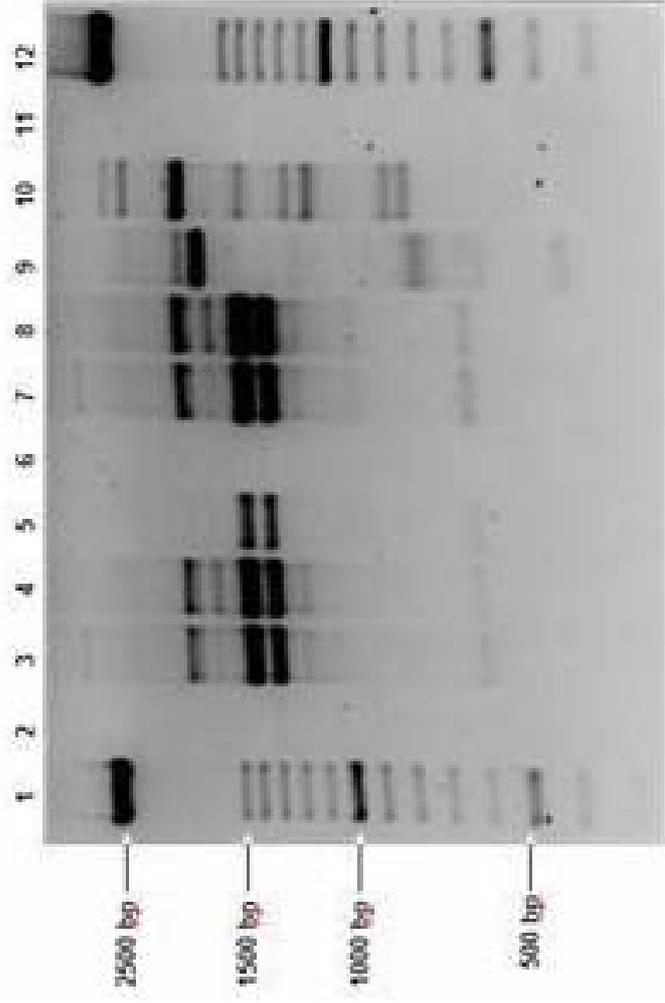


Fig.15. Patrones genotípicos de *C. neoformans* y *C. gattii* con PCR fingerprinting y el iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) --; carril 3) genotipo VNI; carril 4) VNI; carril 5) --; carril 6) --; carril 7) VNI; carril 8) VNI; carril 9) --; carril 10) --; carril 11) --; carril 12) marcador de peso molecular (100 pb).

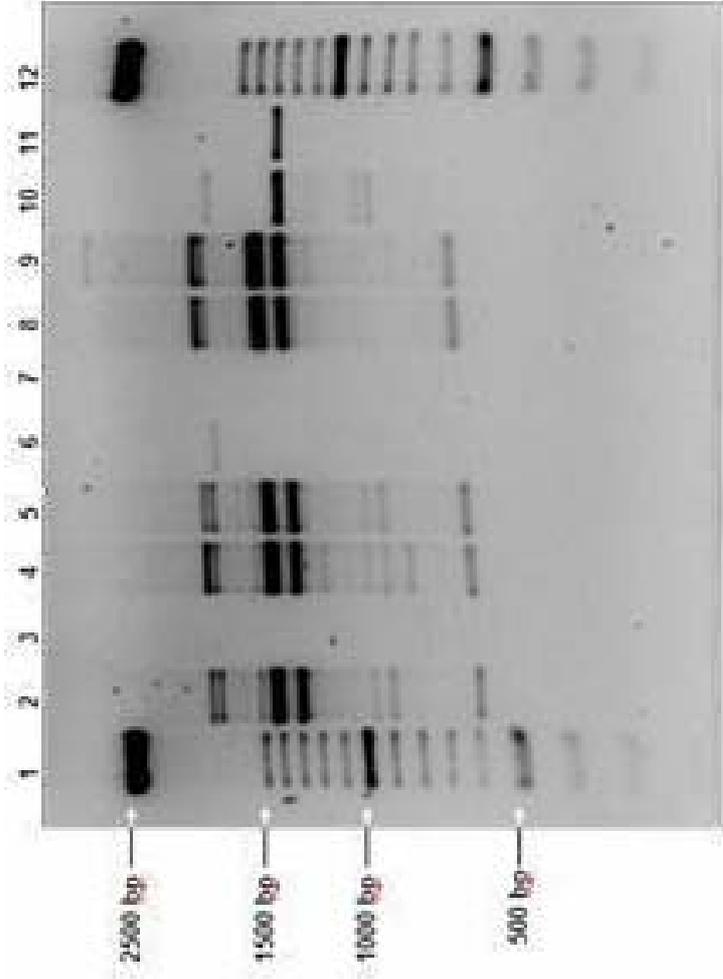
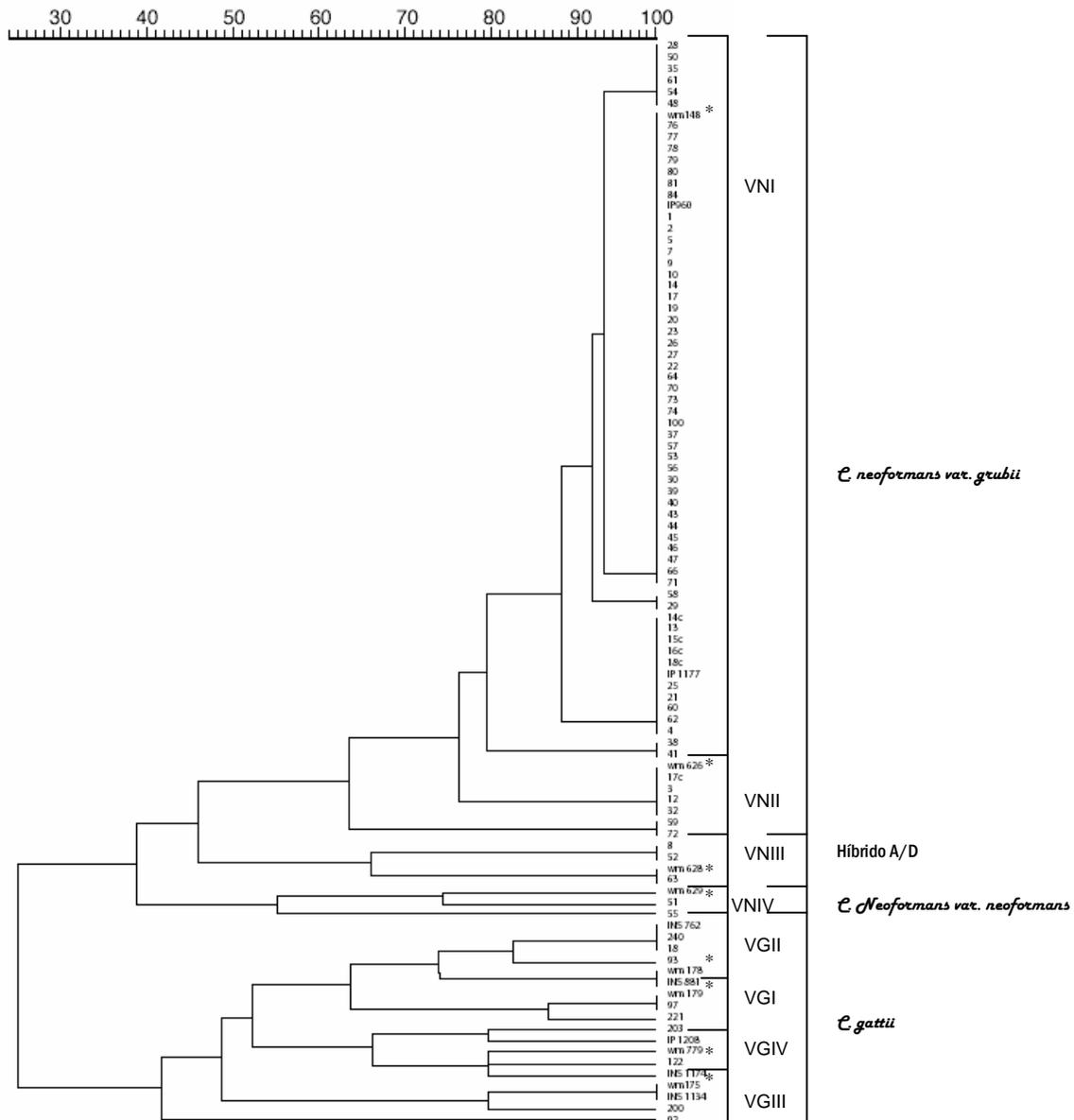


Fig.16. PCR fingerprinting de cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* con el iniciador M13. carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); carril 2) genotipo VNI; carril 3) --; carril 4) VNI; carril 5) VNI; carril 6) --; carril 7) --; carril 8) VNI; carril 9) VNI; carril 10) --; carril 11) --; carril 12) marcador de peso molecular (100 pb).

5.6. Análisis de datos

En el programa Gel Comproar I, los patrones de bandeo de las cepas fueron definidos manualmente con una tolerancia en la posición de la banda de 1.0%. El coeficiente de similitud utilizado fue Jaccard y para la agrupación de los datos se uso el algoritmo UPGMA, obteniendo un dendograma de las cepas mexicanas y extranjeras (Figura 17) donde se distribuyeron en ocho grupos, cada uno de ellos representado por los diferentes genotipos (cepas de referencia). Los genotipos de las cepas extranjeras se encuentran en listadas en la Tabla 5.



* señala la posición de la cepa referencia para cada diferente genotipo.

Fig. 17. Dendrograma de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting obtenida con el iniciador M13 de las cepas mexicanas y extranjeras. Se generaron ocho grupos representados por los diferentes genotipos, el mayor corresponde a VNI (*C. neoformans var. grubii*), VNII (*Cryptococcus neoformans var. grubii*), VNII (Híbrido A/D), VNIV (*C. neoformans var. neoformans*) y los grupos con los genotipos VGI, VGII, VGIII y VGIV (*C. gattii*).

Tabla 5. Distribución de los patrones genotípicos de las cepas de referencia, extranjeras y mexicanas de *C. neoformans* y *C. gattii*.

Genotipo	Especie	Número de cepas referencia	Número de cepas extranjeras	Número de cepas mexicanas
VNI	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1	6	56
VNII	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1	1	5
VNIII	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> / <i>neoformans</i>	1	0	3
VNIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	1	0	2
VGI	<i>C. gattii</i>	1	0	3
VGII	<i>C. gattii</i>	1	2	3
VGIII	<i>C. gattii</i>	1	2	1
VGIV	<i>C. gattii</i>	1	1	2
TOTAL		8	12	75

De las 75 cepas mexicanas, 56 pertenecen al grupo de VNI (*C. neoformans* var. *grubii*); cinco a VNII (*C. neoformans* var. *grubii*); tres a VNIII (*C. neoformans* var. *grubii/neoformans*); dos a VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*); tres al grupo VGI; tres en VGII; una en VGIII y dos en el grupo VGIV (Tabla 5).

De los 75 pacientes analizados, 39 tenían VIH, de los cuales 30 cepas corresponden al genotipo VNI, cuatro al genotipo VNII, tres a VNIII y una a VNIV.

Los genotipos de las cepas extranjeras provenientes de Colombia son *C. gattii* (VGII, VGIII y VGIV), las de España son *C. neoformans* var. *grubii* (VNI y VNII) y las de Francia a *C. neoformans* var. *grubii* y *C. gattii* (VNI y VGIV) (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de los patrones genotípicos de las cepas extranjeras.

Lugar de procedencia	Genotipo
Colombia	VGII 2
	VGIII 2
España	VNI 4
	VNII 1
Francia	VNI 2
Francia	VGIV 1

Haciendo la comparación de las cepas obtenidas por el Dr. Meyer (Meyer *et al.*, 2003) y las cepas obtenidas en México esta representada en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación de número de cepas obtenidas en el trabajo deL Dr. Meyer (2003) y las obtenidas en este proyecto.

Especies	Genotipos	Meyer <i>et al.</i> , 2003	Presente estudio
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNI	25	56
	VNII	1	5
	VNIII	1	3
	VNIV	0	2
<i>Cryptococcus gattii</i>	VGI	3	3
	VGII	0	3
	VGIII	13	1
	VGIV	3	2
	Total	46	75

6. DISCUSIÓN

6.1. Características morfológicas

Se observó una correlación entre el tamaño de la cápsula y el aspecto morfológico de la colonia; en cepas mucoides, la cápsula de las levaduras era de 6 μm o mayor, mientras que las de aspecto mate se mostraron menores a los 6 μm . Estos datos concuerdan con lo reportado por Bottone *et al.* (1986), donde 13

cepas extraídas de pacientes, 10 colonias crecieron con aspecto no mucoides y poco húmedas después de 48 horas de incubación a 37°. Al hacer un examen directo con tinta china, mostraron una marcada reducción de la cápsula, con un diámetro entre 2.5 a 7.5 μm (talla intermedia 4.9 μm). En contraste, tres cepas formaron colonias mucoides y cápsulas grandes. Con esto se observa, que la presencia de la cápsula influye en el aspecto morfológico de la colonia, teniendo que, cepas mucoides presentan levaduras con cápsula grande. En esta correlación no interviene que sea *C. neoformans* o *C. gattii*, ya que es similar para ambas especies.

6.2. Datos demográficos

Analizando los datos demográficos obtenidos de las cepas aisladas en México, encontramos que *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* fueron aisladas en su mayoría de casos clínicos de meningoencefalitis, predominando sobre los demás, demostrando que el sistema nervioso central sigue siendo el más afectado con respecto a otras formas clínicas mencionadas en la literatura (Casadevall y Perfect, 1998; Castañón-Olivares, 2002).

Se encontró que el sexo masculino es el más afectado, siendo poco frecuente la criptococosis en mujeres, estos resultados concuerdan con el reporte de Casali *et al.* (2003) en Brasil, con una frecuencia de 2.95 más casos en hombres. Meyer *et al.* (2003) también encontraron que la criptococosis fue más frecuente en hombres que en mujeres, con una frecuencia de 5.1 más en el sexo masculino que el femenino. En Australia Speed y Dunt (1995) encontraron que *C. neoformans* y *C. gattii* afecta 2.6 veces más a hombres que a mujeres. Al igual que el resto del mundo, en México el sexo masculino es más vulnerable a la criptococosis que el sexo femenino, posiblemente se relacione con la resistencia a ciertas infecciones por parte de las mujeres conferida por la presencia de factores genéticos y hormonales, los cuales juegan un papel importante, como el caso de *Paracoccidioides brasiliensis*, donde la presencia de estrógenos, la

transformación de micelio a levadura es inhibida, confiriendo una resistencia a las mujeres ante la paracoccidioidomicosis (Restrepo *et al.*, 1984).

La edad en la que se presenta la criptococosis es muy amplia, siendo afectados pacientes muy jóvenes hasta muy viejos, la mayoría cayendo en un rango de los 20 a 50 años. Esto concuerda con datos obtenidos por Speed y Dunt (1995) donde reportan un rango de 15 a 86 años de edad en personas afectadas por esta infección. En otro trabajo (Casali *et al.*, 2003) las edades de pacientes con criptococosis se encuentran entre los 22 a 83 años, teniendo la mayoría de los casos entre los 22 a 40 años. Así mismo, en paciente Iberoamericanos la criptococosis se presenta de los 4 a 73 años de edad, con mayoría entre los 21 a 40 años (Meyer *et al.*, 2003). Con estos datos, podemos observar que la mayoría de los pacientes que se infectan con *Cryptococcus neoformans* ó *C. gattii*, se encuentran entre la 3ª y 4ª década de vida, siendo estas edades las más vulnerables, ya que este grupo de personas son las más susceptibles a contraer este hongo por exponerse con mayor frecuencia a las fuentes de infección.

Se han reportado casos muy raros de infección por *Cryptococcus neoformans* en infantes. Se registró una niña de 10 años cuya criptococosis fue causada por *C. gattii* y se consideró inmunocompetente (Casadevall y Perfect, 1998). Con este caso se puede observar que esta especie llega a afectar, pacientes sin alguna enfermedad base.

La presencia de VIH es la causa principal que está predisponiendo a los pacientes para adquirir criptococosis (Speed y Dunt, 1995; Casali *et al.*, 2003; Liedfeldt, 1993; Meyer *et al.*, 1999) en los que podemos apreciar que la mayoría de casos reportados con criptococosis, son personas con SIDA.

No se encontró relación alguna entre los genotipos obtenidos de las cepas mexicanas con el sitio corporal de donde se aisló a las levaduras, esto mismo ya se había reportado (Sorrell *et al.*, 1996). En cuanto a su origen geográfico, no hubo separación de las cepas bajo esta condición, únicamente se dividieron de acuerdo a su tipo molecular.

6.3. Características bioquímicas

La identificación de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* mediante las pruebas bioquímicas es eficaz; sin embargo en ocasiones este tipo de exámenes es ineficiente ya que puede dar falsos positivos o se puede tratar de organismos que se comportan de diferente manera a lo habitual, como la cepa identificada como *C. gattii* al resultar positiva en agar CGB. El serotipo que presenta esta cepa es D y su genotipo VNIV, es decir que es una cepa de *C. neoformans* var. *neoformans*, pero que se comporta bioquímicamente como *C. gattii*. En este caso podemos ver que la sensibilidad de este prueba bioquímicas ya que no pudo diferenciar a esta cepa como *C. neoformans* y que en México hay genotipo VNIV.

6.4. Extracción de ADN

La obtención de ADN mediante esta técnica es muy sencilla, rápida y se obtiene un producto de buena calidad que permite trabajar bien con PCR fingerprinting (Figura 2).

6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fingerprinting

Debido a que en México no se obtuvieron el mismo número de bandas que los mostrados en Australia, esta diferencia puede deberse a que el tipo de extracción del ADN de las cepas es diferente en ambos proyectos, además de que los reactivos y el equipo de PCR no es el mismo. Estas diferencias no significan que los patrones genotípicos estén mal o que no se obtuvieran, ya que las principales bandas representativas para cada tipo molecular si se obtuvieron,

esto de acuerdo a las establecidas por el Dr. W. Meyer en sus previos trabajos (Meyer *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2003).

6.6. Análisis de datos

Con el dendograma de todas las cepas, no se pudo establecer diferencia o semejanza geográfica entre los aislados de nuestro país con los extranjeros. Pero si se pudo encontrar una clara separación de los ocho genotipos, observando la mayoría de las cepas como genotipo VNI (*C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A) y en menor número los restantes grupos moleculares (Fig. 17 y Tabla 5). Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados alrededor del mundo, donde VNI se aísla con mayor frecuencia en pacientes, como lo reportan diversos trabajos (Meyer *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2003; Igreja, 2004; Casali *et al.*, 2003), mostrando a la mayoría de las cepas de origen clínico con genotipo VNI, seguida por el genotipo VNII (*C. neoformans* var. *grubii*).

En cuanto a *C. gattii*, su presencia en las cepas mexicanas es muy reducido, donde VGI y VGII son los genotipos más representativos, cada uno con tres cepas, este resultado concuerda con el reporte por Igreja *et al.* (2004) en Río de Janeiro, Brasil, donde obtienen tres cepas de *C. gattii* con genotipo VGI y VGII. De igual manera, en Australia se encontró que la mayoría de los aislados clínicos pertenecieron al genotipo VGI y VGII (Sorrell, 1996), aunque cabe mencionar que en E.U.A el predominante es VGIII. El Dr. Wieland Meyer *et al.* (2003) en su proyecto incluyó cepas provenientes de países latinos. Observó que alrededor del mundo el genotipo más frecuente es VGI y que VGIII solo se encontró en Argentina, Colombia, Guatemala y México, teniendo a este tipo molecular como el mayor representante de *C. gattii* en estos países. Sus resultados son diferentes a los reportados en el presente trabajo, esto se puede deber a la selección de cepas es al azar, además que el número de aislados es diferente, el Dr. Meyer trabajó con un total de 46 cepas clínicas y en éste se manejaron 75 (Tabla 7).

Se encontró que en México hay cepas con genotipo VGIV, lo que concuerda con el reporte del Dr. Meyer, donde afirma que este genotipo solo se ha encontrado en la India, Sudáfrica, Colombia y México (Meyer et al., 2003) (Tabla 7).

Los genotipos de las cepas de Colombia corresponden a VGII y VGIII; las de España a VNI y VNII y Francia a VNI y VGIV. Los datos obtenidos de las cepas de Colombia y España concuerdan con los datos publicados por Meyer *et al.* (2003) en donde menciona la existencia de los genotipos VGII y VGIII para Colombia y VNI para España, aunque el genotipo VNII no lo menciona en su trabajo Meyer, en este proyecto pudimos obtener este genotipo proveniente de aquel país, en Francia se han encontrado cepas con genotipo VNIV (Meyer *et al.*, 1999).

Haciendo una relación de los genotipos obtenidos de las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* con una enfermedad base, encontramos que la mayoría eran pacientes con SIDA y únicamente cuatro presentaban otro tipo de padecimiento, por eso nos enfocamos a analizar la relación de los genotipos con la presencia de este virus. Encontramos que todas las cepas aisladas de pacientes con SIDA corresponden a *C. neoformans*, de 38 pacientes, 31 cepas correspondieron a VNI. Estos datos concuerdan con lo reportado en otros países, como en Brasil (Casali *et al.*, 2003) y en países Iberoamericanos (Meyer *et al.*, 2003).

7. CONCLUSIONES

- Con este trabajo concluimos que la técnica de PCR fingerprinting es un método fácil, sencillo, sensible y reproducible, siendo confiable para poder identificar a *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* evitando falsos positivos como ocurre con otras técnicas (examen directo, pruebas bioquímicas, serotipificación). También puede usarse para clasificar certeramente a las variedades.
- Al igual que en otros países, en México el genotipo predominante es el VNI seguida por VNII correspondiendo a *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A).
- Se encontraron genotipos VNIV y VGII, los cuáles no habían sido reportados por otros autores en este país, lo que indica que en México contamos con los ocho tipos moleculares de *C. neoformans* y *C. gattii*.

8. APÉNDICE

❖ Agar dextrosa Sabouraud

Dextrosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	17 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	6.9

Para prepararse, tienen que disolver todos los ingredientes por calentamiento, posteriormente es vertido el medio en tubos de ensaye y se esteriliza a 120°C por 15 min.

Los tubos se inclinan y se dejan enfriar.

En caso de ser cajas de Petri, primero se esteriliza el medio en el autoclave y las cajas por separado durante 15 min a 120 °C, u na vez esterilizadas ambas cosas, se deja enfriar un poco y en un ambiente estéril se vacía el medio en las cajas y se deja enfriar.

❖ Agar medio definido

MgSO ₄	10 mM	(2.5g/ 1000 ml)
KH ₂ PO ₄	29.4 mM	(4.0 g)
Glicina	13.0 mM	(0.98g)
Tiamina	3 µM	(0.0010 g)
Glucosa	100 mM	(18.02 g)
Agar		(20 g / 1000 ml)
Agua destilada		(1000 ml)

Se mezclan todos los ingredientes, se ajusta el pH a 5.0 y se esteriliza a 120°C por 15 min. Enfriar el medio de cultivo y agregar los antibióticos.

Antibióticos:

Ampicilina	0.1 g	
Estreptomicina	0.1 g	Se disuelven en 5 ml de agua
Cloranfenicol	0.5 g	Se disuelve en 10 ml de metanol

❖ Agar urea de Christensen

Solución A

Agar base urea (Christensen)	29 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelve el polvo en el agua y esterilizar por filtración.

Solución B.

Agar	15 g
Agua destilada	900 ml

El agar se disuelve en el agua y se esteriliza a 120°C por 15 min. Dejar enfriar el agar aproximadamente a 50°C y se añaden los 100 ml del agar base urea estéril. Mezclar bien y repartir en un medio aséptico en tubos estériles.

❖ Agar Níger simplificado

Semilla <i>Guizotia abyssinica</i> (semilla níger)	50 g
Agua destilada	1000 ml

Se pulveriza la semilla y se añade 900 ml de agua destilada. Se calienta por 30 min. Dejar enfriar y se filtra a través de cuatro capas de gasa. Enseguida añadir agua destilada para obtener un volumen de 1000 ml.

Se añade:

KH ₂ PO ₄	1 g
Creatinina	1 g
Agar	15 g

Se mezcla bien y se esteriliza a 120°C por 15 min. El medio se vacía en un medio aséptico en cajas estériles y se dejan enfriar.

❖ Agar canavanina glicina azul de bromotimol

Solución A

Glicina	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	1 g
Tiamina-HCl	1 mg
Sulfato de L-canavanina	30 mg
Agua destilada	100 ml

Mezclar todos los ingredientes, se ajusta a un pH de 5.6 y esterilizar por filtración.

Solución B

Azul de bromotimol	0.4 gr
Agua destilada	36 ml

Para preparar un litro de medio, se mezclan 880 ml de agua destilada, 20 ml de la solución B y 20 g de agar. Se esteriliza a 121°C durante 15 min. Mientras el agar esta caliente agregar 100 ml de la solución A.

9. LITERATURA CITADA

1. Ansheng L, K. Nishimura, H. Taguchi, R. Tanaka, W. Shaoxi, M. Miyaji. 1993. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathologia*. 124:1-5
2. Aoki, F.H., T. Imai, R. Tanaka, Y. Mikami, H. Taguchi, N.F. Nishimura, K. Nishimura, M. Miyaji, A.Z. Schreiber, M.L. Moretti-Branchini. 1999. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Polymorphic DNA Fingerprint pattern analyses. *J. Clin. Microbiol.* 37:315-320
3. Barysheva E.V., Prosniak M.I., Vlasov M.S., Golubtsov V.I., Revazov A.A., Limborskaia S.A., Ginter E.K. 1989. The use of DNA from phage M13 for the analysis of interindividual polymorphism of human DNA as demonstrated by a population study in Krasnodar city. *Genetika*. 25:2079-82
4. Barysheva E.V., Bukina A.M., Petrova N.V., Limborskaia S.A., Ginter E.K. 1991. Use of DNA polymorphism detected by M13 phage DNA in population studies. *Genetika*. 27:399-403
5. Benham, RW. 1956. The genus *Cryptococcus*. *Bacteriol. Rev.* 20:189-201
6. Beyt, B.E., S.R. Walkman. 1978. Cryptococcal endophthalmitis after corneal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 298:825-825
7. Blevins, L.B., J. Fenn, H. Segal, P. Newcomb-Gayman, K.C. Carroll. 1995. False positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. *J. Clin. Microbiol.* 33:1674-1675
8. Boekhout T., A. van Belkum. 1997. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strain of *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Genet.* 32: 203-208

9. Boekhout T., B. Theelen, M. Diaz, J.W. Fell, W.C.J. Hop, E.C.A. Abeln, F. Dromer, W. Meyer. 2001. Hybrid genotype in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.* 147: 891-907
10. Bonacini, M., J. Nussbaum, C. Ahluwalia. 1990. Gastrointestinal, hepatic and pancreatic involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. *J. Clin Gastroenterol.* 12:296-297
11. Bottone, E.J., M. Toma, B.E. Johansson, G.P. Wormser. 1986. Poorly encapsulated *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS. I. Preliminary observations. *AIDS Res.* 2:211-219
12. Bovers M., Hagen F., Boekhout T. 2008. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:S4-S12
13. Brocas H., Georges M., Christophe D., Monsieur R., Lequarre A.S., Vassart G. 1987. A family of hypervariable minisatellites detected by means of a sequence derived from phage M 13. *C R Acad Sci III.* 304:67-69
14. Bulmer, G.S., F.G. Felton. 1967. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *J. Leukocyte Biol.* 46:621-628
15. Caetano-Anollés Gustavo, Gresshoff P.M. DNA Markers. Protocols, Applications and Overviews. 1997. Editorial. WILEY-VCH. New York. ISBN 0-471-16067-9
16. Casadevall, A., J.R. Perfect. *Cryptococcus neoformans*. 1998. Edit. American Society Microbiology. Washington D.C. ISBN: 1555811078 American Society Microbiology 1ashingD.C. ISBN: 1555811078
17. Casali, A.K., L. Goulart, L. K. Rosa e Silva, A.Medeiros-Ribeiro, A. Almeida-Amaral, S. Hartz-Alves, A. Schrank, W. Meyer, M. Henning-Vainstein. 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research.* 3:405-415

18. Castañón-Olivares, L.R. *Cryptococcus neoformans* y criptococcosis. En Actualidades de Micología Médica. IV Diplomado en Micología Médica. 2002. UNAM, México, D.F. Edit. Facultad de Medicina, 2002. 325- 339
19. Cox, G.M., H.C. Macdade, S.C.H. Chen, S.C. Tucker, M. Gottfredsson, L.C. Wright, T.C. Sorrell, S.D. Leidich, A. Casadevall, M.A. Ghannoum, J.R. Perfect. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. Mol. Microbiol. 39:166-175
20. Crampin, A.C., R.C. Matthews, D. Hall, E.G.V. Evans. 1993. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. J. Med. Vet. Mycol. 31:463-465
21. Crose, E., C.J. Marinkelle, C. Striegel. 1967. The use of tissue cultures in the identification of *Cryptococcus neoformans* isolated from Colombian bats. Sabouraudia. 6:127-132
22. Currie, B.P., L. Vigus, G. Leach, B. Dwyer. 1990. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Lancet. 336:1442
23. Daly, J.S., K.A. Porter, F.K. Chong, R.J. Robillard. 1990. Disseminated, nonmeningeal gastrointestinal cryptococcal infection in an HIV-negative patient. Am. J. Gastroenterol. 85:1421-1424
24. Del poeta, M. 2004. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Eucaryotic Cell. 3:1067-1075
25. Dolan, C.T. 1972. Specificity of the latex cryptococcal antigen test. Am. J. Clin. Pathol. 58:358
26. Drouhet, E. 1997. Milestones in the history of *Cryptococcus* and criptococcosis. J. Mycol. Med. 17:10-27
27. Duncan C., C. Stephen, J. Campbell. 2006. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. C.V.J. 47: 993-996
28. Ellis, D.H. 1987. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. J. Clin. Microbiol. 25:430-431
29. Ellis, D.H., T.J. Pfeiffer. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J. Clin. Microbiol. 28:1642-1644

30. Emmons, C.W. 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J. Bacteriol. 62:685-690
31. Evans. E.D., J.F. Kessel. 1951. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. J. Immunol.67:109-114
32. Franzot S.P., B.C. Fries, W. Cleare, A. Casadevall. 1998. Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strain of serotypes A and D. J.Clin. Microbiol. 36: 2200-2204
33. Franzot S.P., J. Mukherjee, R. Cherniak, L.C. Chen, J.S. Hamdam, A. Casadevall. 1998. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in difference in virulence and other phenotypes. Infect. Inmu. 66: 89-97
34. García-Bermejo M.J., J. Antón, C. Ferrer, I. Messenger, J.L. Abad, M.F. Colom. 2001. Chromosome length polymorphism in *Cryptococcus neoformans* clinical and environmental isolates. Rev. Iberoamericam. Micol. 18: 174-179
35. George M., Lathrop M., Hilbert P., Marcotte A., Schwers A., Swillens S., Vassart G., Hanset R. 1990. On the use of DNA fingerprints for linkage studies in cattle. Genomics. 6: 461-74.
36. Gezuele, E., L. Calegari, D. Sanabria, G. Davel, E. Civila. 1993. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. Rev. Iber. Micol. 10:5-6
37. Glaser, J.B., A. Garden. 1985. Inoculation of cryptococcosis without transmission of the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 313:266
38. Gluck, J.L., J.P. Myers, L.M. Pass.1987. Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus*. South. Med J. 80:511-513
39. Griseo, G., M.S. Bolignano, F. De Leo, F. Satín. 1995. Evidence of canary droppings as an important reservoir of *Cryptococcus neoformans*. Zentralbl. Bakteriologie.282:244-254
40. Howard, D.H. 1973. The commensalisms of *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia. 11:171-174

41. Hull, C.M., J. Heitman. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. Annu. Rev. Genet. 36:558-575
42. Iarobellis, F.W., M.I. Jacobs, R.P. Cohen. 1984. Primary cutaneous cryptococcosis. Arch. Dermatol. 23:673-675
43. Igreja, R.P., M.S. Lazera, B. Wanke, M.C. Gallardo, S.E. Kidd, W. Meyer. 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. Med. Mycol. 42:229-238
44. Ikeda, R., A. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Shinoda, Y. Fukazawa. 1985. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. Microbiol. Immunol. 29:981-991
45. Imwidthaya, P. 1994. One year's experience with in Thailand. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88:208
46. Jacobson, E.S., S.B. Tinnell. 1993. Antioxidant functions of fungal melanin. J. Bacteriol. 175: 7102-7104
47. Khusnutdinova E.K., Khidiatova I.M., Prosniak M.I., Rafikov Kh.S., Limborskaia S.A. 1994. Analysis of DNA polymorphism detected by genomic fingerprinting based on phage M13 DNA, in populations of Bashkir and Komi. Genetika. 30:1621-5
48. Kielstein, P., H. Hotzel, A. Schmalreck, D. Khaschabi, W. Glawischnig. 2000. Occurrence of *Cryptococcus spp.* in excreta of pigeons and pet birds. Mycoses.43:7-15
49. Kondrashov A.S., Beridze T.G., Chiaureli N.B. 1990. Two regions of M13 phage genome hybridizing with human DNA are similar to several keratin genes. Biochimie. 72(12):867-71
50. Krebs Ch.J. Ecological methodology. 1989. Harper y Row publisher. Nueva York. ISBN 0-06-043784-7
51. Kwon-Chung, K.J.1975. A new genus. *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia.67:1197-1200
52. Kwon-Chung, K.J. 1976. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia. 67:821-833

53. Kwon-Chung, K.J. 1976. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*. 68:942-946
54. Kwon-Chung, K.J., I. Polacheck, J.E. Bennett. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15:535-537
55. Kwon-Chung, K.J., J.E. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 120:123-130
56. Kwon-Chung, K.J., B.L. Wickes, L. Stockman, G.D. Roberts, D. Ellis, D.H. Howard. 1992. Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect. Imm.* 60:1869-1874
57. Kwon-Chung, K.J., A. Varma, J.C. Edman, J.E. Bennett. 1992. Selection of *ura5* and *ura3* from the two varieties of *Cryptococcus neoformans* on 5-fluororotic acid medium. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:61-69
58. Kwon-Chung K.J., T. Boekhout, J.W. Fell, M. Diaz. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon.* 51:804-806
59. Latouche G.N., M. Huynh, T.C. Sorrell, W. Meyer. 2003. PCR- Restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 69:2080-2086
60. Lazera, M.S.B., B. Wanke, M.M. Nishikawa. 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
61. Ledwith B.J., Manam S., Nichols W.W., Bradley M.O. 1990. Preparation of synthetic tandem repetitive probes for DNA fingerprinting. *Bio techniques.* 9:149-152
62. Lemmer, K., D. Naumann, B. Raddatz, K. Tintelnot. 2004. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* by PCR fingerprinting in comparison

- with serotyping and Fourier transform infrared spectroscopy based phenotyping. *Med. Mycol.* 42:135-147
63. Licea, B.A., D.G. Garza, M.T. Zuniga. 1996. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev. Iber. Micol.* 13:27-28
 64. Lieckfeldt E., Meyer W., Borner T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol.* 33:413-2
 65. Litvintseva A.P., L. Kestenbaum, R. Vilgalys, T.G. Mitchell. 2005. Comparative analysis of environmental and clinical population of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 43:556-564
 66. López-Martínez, R., L.R. Castañón-Olivares. 1995. Isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in México City. *Mycopathologia.* 129:25-28
 67. López-Martínez, R, Méndez-Tovar L.J., Hernández-Hernández F., Castañón-Olivares L.R. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.* 2004. Edit. Trillas. México, D.F.
 68. Ludwig J.A., J.F. Reynolds. *Statistical ecology a primer on methods and computing.* 1988. Wiley-Interscience publication. Nueva York. ISBN 0-471-83235-9
 69. Lynch, J.P., D.R. Schaberg, D.G. Kissner, C.A. Kauffman. 1981. *Cryptococcus laurentii* lung abscess. *Am.Rev.Respir.Dis.*123:135-138
 70. MacDougall L., M. Fyfe. 2006. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1851-1852
 71. Matsumoto M.T., A.M. Fusco-Almeida, L.C. Baeza, Mde S. Melhem, M.j. Medes-Giannini. 2007. Genotyping, serotyping and determination of mating type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Sao Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 49:41-47

72. McGinnis, M.R., M.G. Rinaldi, C. Halde, E. Hilger. 1975. Micotic flora of the interdigital spaces of the human foot: a preliminary investigation. *Mycopathologia* 55:47-52
73. Medeiros A.C., Macedo A.M., Pena S.D. 1989. M13 Bioprints: non-isotopic detection of individual-specific human DNA fingerprints with biotinylated M 13 bacteriophage. *Forensic Sci Int.* 43:275-280
74. Meyer W., Lieckfeldt E., Kuhls K., Freedman E.Z., Borner T., Mitchell T.G. 1993. DNA and PCR-fingerprinting in fungi. *EXS*.67:311-20
75. Meyer, W., T.G. Mitchell. 1995. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequence: Strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis*. 16:1648-1656
76. Meyer, W., K. Marszewska, M. Amirmostofian, R.P. Igreja, C. Hardtke, M.A. Viviani, A. Chindamporn, S. Sukroongreung, M.A. John, D. H. Ellis, T.C. Sorrell. 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA- a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 20:1790-1799
77. Meyer, W., A. Castañeda, S. Jackson, M. Huynh, E. Castañeda. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerg. Infec. Dis.* 9:189-195
78. Mishra, S.K., F.Staib, U. Folkens, R.A. Fromtling. 1981. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 14:106-107
79. Mitchell, T.G., T.J. White, J.W. Taylor. 1992. Comparison of 5.8S ribosomal DNA sequences among the basidiomycetous yeast genera *Cystofilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. *J. Med Vet. Mycol.* 30:207-218
80. Mullis, K.B., F. Ferré, R.A. Gibbs. The polymerase chain reaction. 1994. Editorial Birkhäuser. E.U.A. ISBN 0-8176-3607-2

81. Newton C.R., G.A. Graham. PCR. 2° edición. 1997. Editorial. BIOS Scientific Publishers. New York. ISBN 0-387-91506-0
82. Niehaus, W.G., T. Flynn. 1994. Regulation of mannitol biosynthesis and degradation by *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 176:651-655
83. Paschoal, R.C., M.H. Hirata, R.C. Hirata, M.S.C. Melhem, A.L.T. Dias, C.R. Paula. 2004. Neurocryptococcosis: Diagnosis by PCR method. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 46:203-207
84. Pernice, I., C. Lo Paso, G. Criseo, A. Pernice, F. Todazo-Luck. 1998. Molecular subtyping of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype A isolated from southern Italy. Mycoses. 41:117-124
85. Pfeiffer, T.J., D.H. Ellis. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. J. Med. Vet. Mycol. 30:407-408
86. Pierard, G., C. Pierard-Franchimont, J.A. Estrada, A. Rurangirwa, F.L. Dosal. 1990. Cutaneous mixed infections in AIDS. Am. J. Dermatopathol. 12:63-66
87. Refal, M., M. Taha, A. Selim, F. Elshabourii, H.H. Yousseff. 1983. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. Sabouraudia. 21:163-165
88. Randhawa, H.S., D.K. Paliwal. 1977. Occurrence and significance of *Cryptococcus neoformans* in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. J. Clin. Microbiol. 6:325-327
89. Restrepo, A.M., M.E. Salazar, L.E. Cano, E.P. Stover, D. Feldman, D.A. Stevens. 1984. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect. Immun. 46:346-353
90. Ruiz, A., D. Velez, R.A. Fromtling. 1989. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. Mycopathologia. 106:167-170

91. Ruma, P., S.C.A. Chen, T.C. Sorrell, A.G. Brownlee. 1996. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random amplification. *Letter Appl Microbiol.* 23:312-316
92. Ryskov A.P., Jincharadze A.G., Prosnjak M.I., Ivanov P.L., Limborska S.A. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganism. *Science.* 233:388-392
93. Sánchez-Paredes, E. 2001. Aislamiento de *Cryptococcus* spp de importancia médica asociados a *Eucalyptus* spp sanos, en Ciudad Universitaria, UNAM. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México
94. Sorrell, T.C., S.C. Chen, P. Ruma, W. Meyer, T.J. Pfeiffer, D.H. Ellis, 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
95. Speed, B.,D. Dunt. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.* 21:28-34
96. Sribiree P., S. Khayhan, C. Khamwan, S. Panjaisee, P. Tharavichitlaul. 2004. Serotype and PCR fingerprinting of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia.* 158:25-31
97. Steenbergen, J.N., H.A. Shuman, A. Casadevall. 2001. *Cryptococcus neoformans* interaction with amoebae suggests an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Steenbergen et al.* 98:15245-15250
98. Sussman, E.J., F. MacMahon, D. Wright, H.M. Friedman. 1984. Cutaneous cryptococcosis without evidence of systemic involvement. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11:371-374

99. Swinne, D., K. Kayembe, M. Niyimi. 1986. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Kinsasha, Zaire. Ann. Soc. Bel. Med. Trop. 66:57-61
100. Upcroft P. 1991. DNA fingerprinting of the human intestinal parasite *Giardia intestinalis* with hypervariable minisatellite sequences. EXS.58:70-84
101. Vadkertiova, R., E. Slavikova. 1996. Killer activity of yeasts isolated from the water environment. Can. J. Microbiol. 41:759-766
102. Varma A., D. Swinne, F. Staib, J.E. Bennett, K.J. Kwon-Chung. 1995. Diversity of DNA fingerprintings in *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 33:1807-1814
103. Vassart G., Georges M., Monsieur R., Brocas H., Lequarre A.S., Christophe D. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in Human and animal DNA. Science. 235:683-4.
104. Whelan, W., K.J. Kwon-Chung. 1986. Genetic complementation in *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 166:924-929
105. Xu, J., R. Vilgalys, T.G. Mitchell. 2000. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Mol. Ecol. 9:1471-1481
106. Xu J., G. Luo, R.J. Vilgalys, M.E. Brandt, T.G. Mitchell. 2002. Multiple origins of hybrids strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. Microbiol. 148: 203-212
107. Yamamoto, Y., S. Kohno, H. Koga, H. Kakeya, K. Tomono, M. Kaku, T. Yamasaki, M. Arisawa, K. Hara. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. J. Clin. Microbiol. 33:3328-3332