



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Biotipificación de aislados ambientales y clínicos del
complejo de especies de levaduras *Cryptococcus*
*neoformans/C. gattii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KARLA ROXANA CERVANTES GALICIA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES
2017**

Ciudad Universitaria, CD. MX.



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.

1. Datos del alumno

Cervantes

Galicia

Karla Roxana

56 30 80 14

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306202218

2. Datos del Tutor

Dra. Laura Rosio Castañón Olivares

3. Datos sinodal 1

Dra. Francisca Hernández Hernández

4. Datos sinodal 2

Dr. Arturo Rubén López Martínez

6. Datos sinodal 3

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona

7. Datos sinodal 4

Biól. Elva Bazán Mora

8. Datos del trabajo escrito

Biotipificación de aislados ambientales y clínicos del complejo de especies de levaduras

Cryptococcus neoformans/C. gattii

72 p

2017

Agradecimientos

Durante la realización del presente trabajo la participación de muchas personas e instituciones fue fundamental para lograr los objetivos planteados. Agradezco a cada uno de ellos por su gran apoyo en este proceso.

En primer lugar, quiero agradecer al grupo de trabajo de la Unidad de Micología Médica del de la Facultad de Medicina, UNAM, por su tiempo y cooperación en el desarrollo experimental de este trabajo, específicamente por los conocimientos técnicos y literarios que aportaron en el transcurso de este estudio. Asimismo, expreso la enorme gratitud que tengo y de debo a la Doctora Laura Castañón Olivares por su confianza, dedicación y paciencia para conmigo, por todos los conocimientos compartidos a partir de los cuales se estructuró la base de este proyecto.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) porque a través del proyecto titulado “Panorama epidemiológico de la criptococosis en México: prevalencia, incidencia, fuentes naturales y microbiología” se obtuvieron los recursos necesarios para desarrollar y concluir esta investigación. Asimismo, agradezco a las instituciones hospitalarias y a los médicos responsables que nos proporcionaron los datos clínicos aquí mencionados.

Por otro lado, aprecio y valoro las lecciones de todos los profesores y académicos que me formaron durante la licenciatura y que me sirvieron para analizar y comprender los procesos biológicos, especialmente los de los hongos. Maestra Lupita Vidal muchísimas gracias por su apoyo. De la misma manera agradezco al médico especialista Raúl Ponce Rosas por su asesoraamiento en el manejo y análisis estadístico de los datos procesados.

Finalmente, pero no menos sustancial, quiero condecorar a la gran familia que me ha dado la vida: papás, hermanos, abuelos, tíos, primos, amigos, compañeros, colegas y conocidos cada integrante ha colaborado en la construcción de mi persona y me ha dado la fuerza física y emocional necesaria para culminar un ciclo más en mi formación profesional, ¡gracias!.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 El género <i>Cryptococcus</i>	2
1.1.1 Ciclo de vida	4
1.1.2 Ecología	5
1.1.3 Fisiología y virulencia	6
1.1.4 Estudios bioquímicos y moleculares	8
1.2 El genoma del complejo de especies <i>C. neoformans/C. gattii</i>	10
1.3 Criptococosis	11
1.3.1 Diagnóstico	12
1.3.2 Tratamiento	13
1.3.3 Epidemiología	13
2. Antecedentes	15
3. Planteamiento del problema	17
4. Justificación	18
5. Objetivos	19
6. Hipótesis	20
7. Materiales y Métodos	21
7.1 Muestras ambientales	21
7.1.1 Variables climatológicas: temperatura y humedad	23
7.2 Cultivos de procedencia clínica	24
7.2.1 Datos clínicos de los pacientes	24
7.2.2 Incidencia puntual de la criptococosis en la Ciudad de México	24
7.3 Identificación fenotípica	25
7.4 Identificación genotípica	25
7.5 Identificación molecular de los factores de compatibilidad (<i>Mating Type</i>)	27
8. Resultados	30
8.1 Biotipos de los aislados ambientales	30
8.1.1 Comportamiento e influencia de la temperatura y la humedad en la recuperación de <i>C. neoformans</i> del ambiente	36

8.1.2 Variación de la temperatura en el periodo 2010-2015	36
8.1.3 Variación de la humedad en el periodo 2010-2015	39
8.2 Biotipos de los cultivos clínicos	41
8.2.1 Estudio de serie de casos clínicos	46
8.2.2 Incidencia puntual (IP) de la criptococosis	49
9. Discusión	51
10. Conclusión	55
11. Bibliografía	57
12. Anexo	69

1. Introducción

Las levaduras del complejo de especies *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin¹⁰¹ y *Cryptococcus gattii* (Vanbreuseghem y Takashio) Kwon-Chung y Boekhout^{71,111} son hongos oportunistas causantes de micosis sistémicas en humanos y otros mamíferos. Desde el siglo XVIII se describieron como agentes etiológicos de torulopsis, blastomicosis o enfermedad de Busse-Buschke,^{15,14,120} nombres que recibía este padecimiento y que actualmente se conoce como criptococosis.

En un inicio los agentes causantes de criptococosis se agrupaban en una sola especie; sin embargo, en la década de 1950 Evans⁴⁰ y colaboradores, al estudiar las reacciones de aglutinación en sueros biológicos descubrieron que existían variaciones serológicas entre los aislamientos reportados con anterioridad. Con base en estos resultados se caracterizaron tres serotipos: A, B y C. Una década después se reportaría un cuarto serotipo D con los trabajos de Wilson y colaboradores.¹¹⁹

Por otra parte, Vanbreuseghem y Takashio (1970) observaron una morfología atípica en un aislamiento realizado por Gatti y Eeckels; al presentar levaduras elípticas propusieron nombrar a éste variedad *gattii* diferente a las levaduras de morfología tradicional, redondas y esféricas, denominadas también variedad *neoformans*.¹¹¹

Las diferencias entre ambas variedades se evidenciaron aún más cuando se descubrió que éstas tenían la capacidad de reproducirse por mecanismos de tipo sexual. La compatibilidad sexual entre los serotipos identificados, así como la morfología de las estructuras reproductivas marcaron la línea para separarlas y re clasificarlas en dos especies distintas; *C. neoformans* con los serotipos A y D y *C. gattii* serotipos B y C.^{64,65}

Estudios posteriores determinaron otras discordancias entre ambas especies; por ejemplo, el nicho ecológico, la patogenicidad, bioquímica y biología molecular son las principales ramas en la biotipificación de *C. neoformans* y *C. gattii*.^{37,59,67,70,117} Asimismo, los análisis filogenéticos son herramientas utilizadas en la clasificación de ambas especies, las cuales se ha propuesto considerar como un complejo de especies por su diversidad genética y fenotípica.

1.1 El género *Cryptococcus*

Actualmente, el género *Cryptococcus* incluye más de 100 especies de hongos en estado asexual.⁴⁰ Sólo dos, *C. neoformans* y *C. gattii*, se han reportado como principales patógenos del humano causantes de infecciones sistémicas de tipo oportunista.

En el cuadro 1 se mencionan las principales características morfológicas del género *Cryptococcus* que los diferencian de otras levaduras de interés médico.

Cuadro 1. Aspectos morfológicos que diferencian a los <i>Cryptococcus</i> de otras levaduras patógenas				
	<i>Cryptococcus</i>	<i>Candida</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Trichosporon</i>
Cápsula	+	-	-	-
Pseudohifas	*	+	-	+
Artrosporas	-	-	-	+
Ascosporas	-	+	+	-
Basidiosporas	+	-	-	+
* En bajo porcentaje. Tomado y modificado de A. Bonifaz, 2010. ⁹				

Los criptococos son caracterizados morfológicamente por presentar un talo levaduriforme, ocasionalmente formador de pseudomicelio, con células redondas u ovals rodeadas de una cápsula con la cual llegan a medir 20 µm de diámetro, mientras que las células sin la cápsula miden de 3 a 8 µm.¹¹³ Estas pueden visualizarse en un microscopio óptico con una preparación instantánea de tinta china (Figura 1.c). La cápsula está compuesta principalmente de polisacáridos glucoronoxylomananos (xilosa, manosa y ácido glucurónico) que, de acuerdo con la distribución y proporción de los componentes, le confiere identidad estereoquímica a cada uno de los cinco serotipos principales del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* (Cuadro 4).¹¹⁹

La morfología macroscópica es muy parecida a la de otras levaduras: en agar dextrosa Sabouraud sin antibióticos se observan colonias circulares de márgenes enteros, color blanco amarillento y de aspecto seco (Figura 1.a) o consistencia mucoide, parecido a la leche condensada.⁹ En medios con sustratos fenólicos como los que se encuentran en la

semilla de niger (*Guizotia abyssinica*) las colonias de *C. neoformans* y *C. gattii* desarrollan una pigmentación color marrón (Figura 1.b),¹⁰⁶ lo cual representa una característica importante de estos microorganismos útil para diferenciarlos de otras especies de *Cryptococcus*.

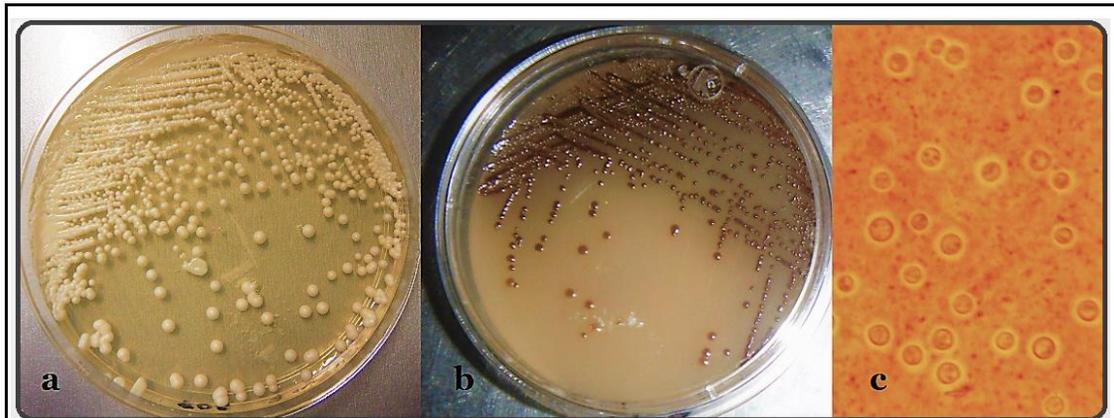


Figura 1. Características morfológicas del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*; a) Morfología macroscópica de las colonias en agar Sabouraud; b) Colonias color marrón en agar semilla de niger (*Guizotia abyssinica*); c) Morfología microscópica de las levaduras capsuladas en una preparación fresca con tinta china.

En sus primeras observaciones, estas levaduras se habían clasificado dentro del género *Saccharomyces*; sin embargo, Jean Paul Vuillemin en 1901, al examinar algunos aislados y no encontrar ascosporas ni fermentación de carbohidratos, las clasificó dentro el género *Cryptococcus*.¹¹¹ En el cuadro 2 se muestra la clasificación taxonómica actual de este género.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género <i>Cryptococcus</i>	
Reino:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Orden:	Tremellales
Familia:	Tremellaceae
Género:	<i>Filobasidiella (Cryptococcus anamorfo)</i>
Tomado del Sistema de Información de Biodiversidad. ¹	

1.1.1 Ciclo de vida

Los criptococos generalmente se reproducen de manera clonal por gemación simple o múltiple, a este estado se le denomina anamorfo o fase asexual de su ciclo de vida.¹⁰⁹

Por mucho tiempo se creía que *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* solamente se reproducían de manera asexual; sin embargo, en la década de 1970, Kwon-Chung y colaboradores reportaron el estado teleomorfo, o sexual, generado *in vitro* bajo condiciones de estrés desfavorables para el crecimiento óptimo del hongo como: la escasez de nutrientes, el estrés osmótico y oxidativo y los cambios drásticos de temperatura.

El descubrimiento de la fase sexual provocó la reorganización del complejo de especies *Cryptococcus neoformans/C. gattii* dentro el género *Filobasidiella* del grupo de los Basidiomycetes (*F. neoformans* y *F. bacillispora* respectivamente).⁶⁶

En estudios posteriores se demostró que el proceso de apareamiento sexual entre dos células fértiles inicia con la producción de feromonas, proceso dirigido por un solo locus con dos alelos: el **a** y el **α** .^{65, 66} Las células, al reconocerse, se fusionan (plasmogamia) para formar hifas dicarióticas (n+n) con conexiones entre sí en forma de gancho (fíbulas). A través de éstas, los núcleos se multiplican y migran hasta el ápice de las hifas en donde se desarrollarán los conidios o basidios (2n). Finalmente, los núcleos se recombinan (cariogamia) y producen cuatro hileras de basidiosporas (n) que pueden iniciar un nuevo ciclo sexual o asexual (figura 2).⁵⁷ Al ser dispersadas, las esporas pueden sintetizar material polisacárido y producir células encapsuladas, o bien, pueden reducir su tamaño a causa de la desecación y permanecer en un estado de latencia como propágulos infecciosos que, por su tamaño, se les facilita ingresar a los alvéolos pulmonares y capilares del hospedero.

Por otro lado, además de un apareamiento típico **a- α** se ha encontrado que células del mismo tipo sexual, principalmente **α** , pueden formar hifas diploides (n+n) por mecanismos de endoreplicación o por la fusión al azar de dos células con el mismo factor de compatibilidad. El proceso también culmina con la formación de basidiosporas recombinantes atípicas lo cual es conocido como fructificación monocarionte (haploide) o reproducción unisexual (figura 2).¹¹⁸

Al tener la capacidad de reproducirse mediante diferentes mecanismos que generan variabilidad biológica, *C. neoformans* y *C. gattii* presentan una alta complejidad feno y

genotípica que les permite una mayor adaptación y la generación de propágulos infecciosos.⁵⁹

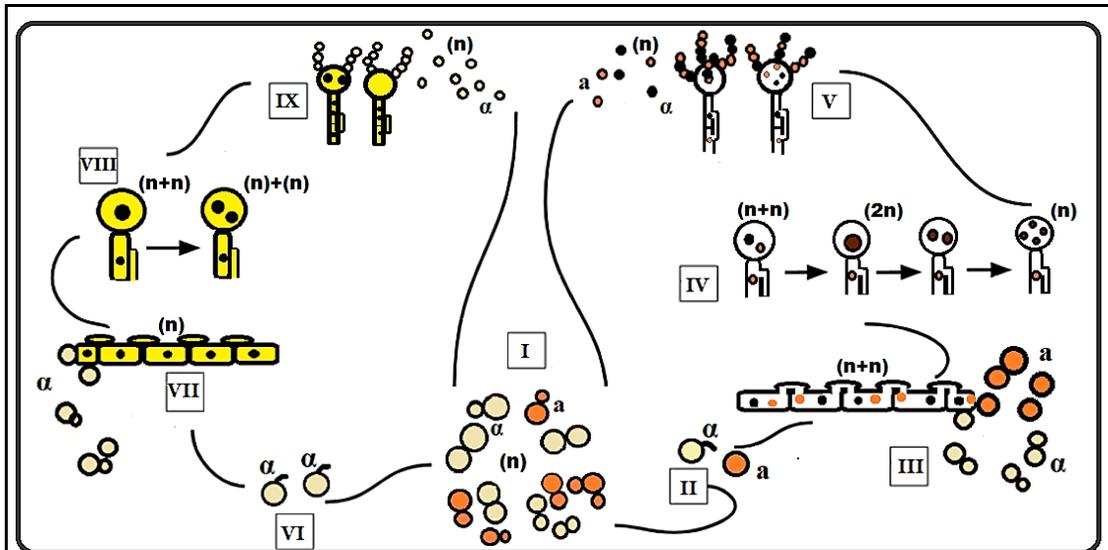


Figura 2. Ciclo de vida de *Cryptococcus neoformans/C. gattii*; I) Reproducción clonal de basidiosporas y levaduras; II) Apareamiento entre células a-α; III) Micelio dicariótico con clamidias a y α; IV) Cariogamia y subsecuente meiosis en el basidio; V) Fructificación dicariótica con la producción de basidiosporas α y a haploides; VI) Apareamiento entre células α-α; VII) Micelio monocariótico con clamidias haploides (n); VIII) Recombinación anormal postmitótica; IX) Fructificación monocariótica con producción de basidiosporas α.

1.1.2 Ecología

Cada una de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* ha sido aislada a partir de sustratos naturales diversos. Los árboles y otros sustratos orgánicos como frutas y detritos vegetales, son los principales materiales donde se puede encontrar a estas levaduras en su forma saprobia.^{61,72,95,101} La especie *C. neoformans* se ha aislado, además, de materia fecal y cloacas de palomas (*Columbia livia*) y otras aves pequeñas, mismas que pueden estar relacionadas directamente con la dispersión y distribución de este hongo.^{38,79,97,104} La especie *C. gattii* inicialmente se asoció a zonas de clima y vegetación restringida, especialmente con árboles de eucaliptos en áreas tropicales y subtropicales;^{26,36} sin embargo, en las últimas décadas se ha comprobado que su distribución geográfica es mucho

más amplia de lo que se pensaba. Australia, Colombia, México, Canadá y Estados Unidos son algunos de los países que han reportado aislamientos virulentos de *C. gattii*.^{13,93,108}

Dado que ninguna de las dos especies se asocia con vegetales específicos, se postula que *C. neoformans* y *C. gattii* pueden ser levaduras endo epífitas que han desarrollado una asociación biotrófica con la planta huésped. Ésta al florecer, promueve la germinación de los basidios con la producción de largas cadenas de basidiosporas que, al ser dispersadas, se convierten en propágulos infecciosos para el humano y otros mamíferos, aunque también pueden permanecer en el tejido meristemático de la planta y desarrollar nuevamente la fase filamentosa iniciando así otro ciclo micelial.^{20,47}

Los criptococos son eliminados rápidamente a causa de factores abióticos o bióticos (condiciones ambientales extremas, competencia con bacterias y/o depredación de amebas y ácaros) pero cuando se conservan en ciertos sitios pueden permanecer metabólicamente inactivos hasta que las condiciones medioambientales son óptimas para su proliferación.^{99,100}

1.1.3 Fisiología y virulencia

La fisiología de cualquier microorganismo patógeno es de especial interés en la comprensión y estudio de su virulencia. Específicamente, los hongos se caracterizan metabólicamente por secretar enzimas al medio que degradar sustratos para su nutrición. Muchas de estas enzimas son ampliamente estudiadas en el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* y su influencia en la virulencia se ha comprobado en modelos murinos. Algunas de estas enzimas asociadas a la virulencia se muestran en el cuadro 3.^{29,49,55,87,102}

La síntesis de un pigmento melánico, generado por la actividad catalítica de la lacasa frente a sustratos difenólicos como la 3,4-dihydroxilfenilalanina o L-dopamina, es un factor que influye en la virulencia de estos hongos.^{28,107,116} La actividad de la lacasa es más eficiente en las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* y la composición estructural del pigmento melánico varía dependiendo del sustrato utilizado.⁶⁰ Este pigmento es insoluble en agua y tiene la propiedad de ser indetectable para el sistema inmunitario del hospedero. Además, les confiere resistencia a ciertos antifúngicos como la caspofungina y la

anfotericina B; en el ambiente, la melanina protege a las células de la radiación solar la desecación y de las temperaturas extremas.^{18,98,104}

La cápsula de polisacáridos (glucoronoxylomamanos y galactoxylomananos en mayor proporción),^{31,92} además de ser un carácter serológico diferencial, es otro factor que se ha asociado fuertemente a la virulencia de *C. neoformans/gattii*.²⁷ El tamaño de la cápsula varía dependiendo de las condiciones medioambientales y, dentro del hospedero, les confiere mayor resistencia fagocítica ante los macrófagos.⁶² Asimismo, *C. neoformans/gattii* excretan componentes capsulares que actúan directamente sobre el hospedero provocando la disfuncionalidad de los macrófagos y lisis celular de los mismos.^{41,110}

La capacidad de crecimiento a 37°C es esencial para que los criptococos se desarrollen dentro del cuerpo humano. *C. neoformans* es inactivo a temperaturas mayores a 40 °C, como la temperatura fisiológica de las palomas y otras aves, pues ésta funciona como un fungistático que no le permite crecer ni colonizar los órganos del hospedero.⁵⁵ En general, las especies del género *Cryptococcus* pueden crecer bien a temperatura ambiental (25 °C).

En el cuadro 3 se mencionan algunos factores fisiológicos que influyen en la virulencia del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, en comparación con otras especies del mismo género.

Cuadro 3. Principales factores de virulencia del complejo de especies <i>C. neoformans/C. gattii</i>					
Característica	Propiedad	<i>C. neoformans/C. gattii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. podzolicus</i>
Proteinasas	Desintegran colágeno, elastina y fibrinógeno.	+	+	+	+
Fosfolipasas	Degradación de la membrana y lisis celular de macrófagos.	+	+	+	+
Ureasas	Facilitan la diseminación hematológica y la inclusión al SNC.	+	+	+	+
Lacasas	Permiten la evasión del sistema inmune y confiere resistencia antifúngica.	+	-	-	+
Cápsula	Resistencia a macrófagos	+	+	+	+
Crecimiento a más de 37 °C	Les permite sobrevivir dentro el cuerpo humano.	+	-	-	-

1.1.4 Estudios bioquímicos y moleculares

Los métodos bioquímicos y moleculares son los más utilizados en el estudio genético y fenotípico del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*. Para diferenciarlos de otras levaduras patógenas, la producción de ureasas en agar urea es una prueba bioquímica que permite la identificación de estos hongos *in vitro* (Figura 3.a).

Un carácter fenotípico que permite diferenciar específicamente a *C. neoformans* de *C. gattii* fue descrito por Kwon-Chung y colaboradores cuando probaron L-canavanina y glicina como fuente de carbono y nitrógeno en el crecimiento de estas levaduras. Al agregar azul de bromotimol (indicador de pH) en el medio de cultivo agar canavanina-glicina (CGB) descubrieron que *C. gattii* asimila a la glicina y muestra resistencia a la canavanina, lo cual queda demostrado por un cambio de color en el medio de cultivo, de amarillo a azul-cobalto (Figura 3.b), como resultado de un aumento en la escala de pH (de 5.8 a 7.0 aproximadamente) generado por los metabolitos del hongo que, por el contrario, los aislados de *C. neoformans* no generan, a excepción de un porcentaje bajo de aislados (~3%) que asimilan la glicina y viran el color del medio CGB a un amarillo-verdoso.^{59,67}

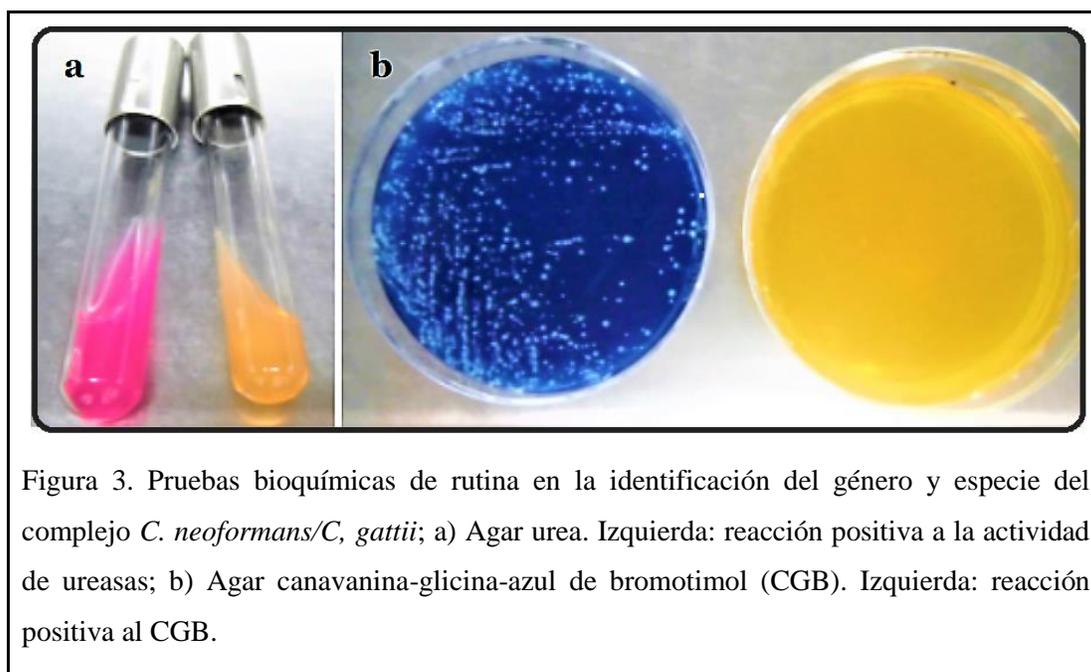


Figura 3. Pruebas bioquímicas de rutina en la identificación del género y especie del complejo *C. neoformans/C. gattii*; a) Agar urea. Izquierda: reacción positiva a la actividad de ureasas; b) Agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Izquierda: reacción positiva al CGB.

La inducción de la fase filamentosa (*Filobasidiella* sp.) es un proceso que se ha observado *in vitro* bajo condiciones de cultivo desfavorables para el hongo como la inanición de nutrientes, presencia de inositol y cobre, bajas concentraciones de CO₂ y periodos prolongados de oscuridad.^{65,66,89} La capacidad de apareamiento de los aislados está determinada por la activación de un grupo de genes localizados en la región MAT del genoma fúngico, incluidos los genes que participan en la producción y detección de feromonas, mismos que dan identidad sexual a cada una de las células (*a* o *α*).^{46,75}

Existen otras diferencias a nivel genético entre *C. neoformans* y *C. gattii* que han influido en la subclasificación dos variedades, un híbrido y siete genotipos principales (Cuadro 3). Las técnicas moleculares más utilizadas en el estudio genotípico del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* son: la huella digital o PCR-FP (*fingerprinting*) que usa como oligonucleótido el minisatélite específico ‘core’ M13 para amplificar fragmentos de ADN polimórfico al azar, la amplificación por PCR- RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) con enzimas de restricción específicas para los genes *URA5*, *CAP59*, *GEF1* y *PLB1*, la PCR- AFLP (amplificación de fragmentos de longitud polimórficos), los cariotipos y espectrometría de masa MALDI-TOF.^{35,42,51,52,84}

Cuadro 4. Clasificación de biotipos del complejo de especies <i>C. neoformans/C. gattii</i>		
Especie/variedad	Serotipo*	Genotipo molecular**
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	VNI, VNII
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	VNIV
<i>C. neoformans</i> híbrido	AD	VNIII
<i>C. gattii</i>	B B B o C B o C	VGI VGII VGIII VGIV
Modificado de *Bovers <i>et al</i> , 2006 ¹² y **Meyer <i>et al</i> , 2003 ⁸⁴		

1.2 El genoma del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*

Las comparaciones entre el genoma de *C. neoformans* y *C. gattii* permiten el estudio de los microarreglos involucrados en la expresión de ciertas características que, combinado con el mapeo y la secuenciación, son una herramienta determinante en la caracterización de cepas virulentas existentes o emergentes.⁵⁸ Asimismo, el análisis de su genoma puede aportar información sobre los mecanismos de microevolución presentes en estos organismos patógenos.⁵⁵

La secuenciación del genoma de *C. neoformans* y *C. gattii* ha puesto en evidencia la diversidad intraespecífica de estas especies.⁸¹ En su genoma existen regiones ricas en

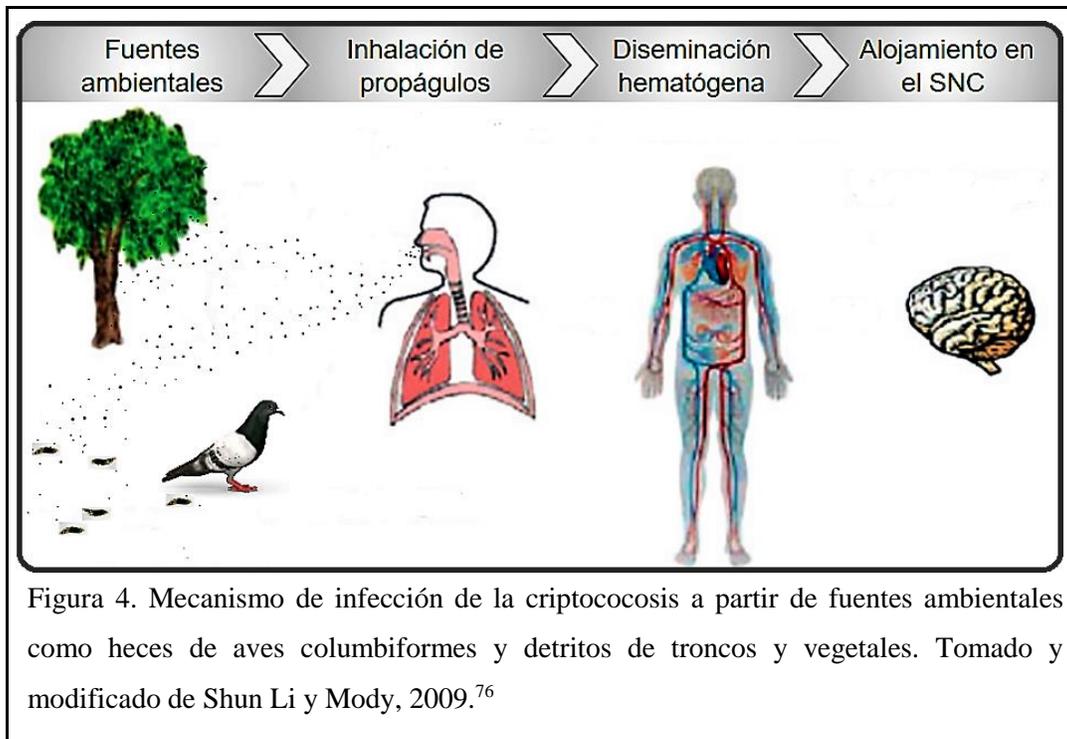
transposones que les confiere plasticidad genética a ambas especies. Como resultado, los transposones pueden ser los responsables de la inestabilidad del cariotipo y de la variabilidad fenotípica de *C. neoformans* y *C. gattii*.⁸¹

Algunos autores proponen que los genotipos VN y VG, de *C. neoformans* y *C. gattii* respectivamente, representan siete taxones distintos y cuatro genotipos híbridos clasificados con base en el análisis filogenético de 11 genes (*CAP59*, *GPD1*, *IGS*, *ITS*, *LAC1*, *PLB1*, *RPB1*, *RPB2*, *SOD1*, *TEF1* y *URA5*) (Hagen, Khayhan, Theelen, et al, 2015).⁵²

1.3 Criptococosis

La criptococosis es una enfermedad de curso agudo, subagudo o crónico provocada por las levaduras y basidiosporas del complejo de especies *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, ocasionalmente están involucradas otras especies como *C. uniguttulatus*, *C. laurentii* y *C. aureus*. Por su habilidad de crecimiento a 37°C, *C. neoformans* y *C. gattii* se desarrolla bien en el cuerpo humano y en otros mamíferos (caballos, cabras, perros, gatos, hurones, koalas y ratones) mientras que las aves, portadoras de *C. neoformans*, no pueden adquirir la infección debido a que su temperatura corporal es de 40 a 42°C.

Generalmente la infección se adquiere por la inhalación de propágulos infecciosos (levaduras sin cápsula o basidiosporas) que al establecerse en las vías respiratorias del huésped pueden causar una infección primaria, o bien, pueden ingresar hasta los alvéolos pulmonares y diseminarse a cualquier órgano a través del torrente sanguíneo y/o sistema linfático con especial localización en el sistema nervioso central SNC (figura 4).¹⁰



Con algunas excepciones, la mayoría de los criptococos no pueden traspasar las barreras inmunológicas de un individuo sano; sin embargo, suele expresarse de forma agresiva en las personas con algún deterioro en la función de la inmunidad celular, por ejemplo: enfermedades autoinmunes como la artritis, el lupus, el reumatismo, la diabetes mellitus, la leucemia y el cáncer, o deficiencias provocadas por terapias prolongadas con inmunosupresores como los corticosteroides y fármacos que bloquean la respuesta inmune del hospedero.^{4,105}

1.3.1 Diagnóstico

Desde sus primeras descripciones la criptocosis fue considerada una enfermedad mortal con la capacidad de manifestarse en diferentes niveles anatómicos, desde una infección cutánea hasta una meningoencefalitis criptocócica.^{86,88} De acuerdo a su forma clínica, la infección se clasifica de acuerdo al órgano blanco que invade: criptocosis pulmonar, cutánea, ósea, ocular o diseminada, aunque es evidente el tropismo que *C. neoformans* presenta por el SNC.¹⁰⁵

La mayoría de las infecciones criptocócicas se diagnostican a partir de un examen directo de líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente. También se puede hacer un diagnóstico a

partir de cualquier material biológico dependiendo del órgano afectado, por ejemplo: esputo, exudados, lavados bronquiales, orina, sangre, suero, biopsias, entre otros. La forma más sencilla de diagnosticar la criptococosis es mediante la observación de levaduras con cápsula en una preparación fresca, o un frotis, con tinta china bajo un microscopio óptico. Además, para un resultado más certero se requieren pruebas bioquímicas y fisiológicas como el cultivo en agar Sabouraud sin antibióticos, agar infusión cerebro corazón, agar semilla de niger, agar urea y pruebas inmunológicas como la determinación del antígeno criptocócico por aglutinación de partículas de látex en LCR o suero. Otros métodos para diagnosticar la infección están basados en la tecnología láser como rayos *x* y tomografías.⁹

1.3.2 Tratamiento

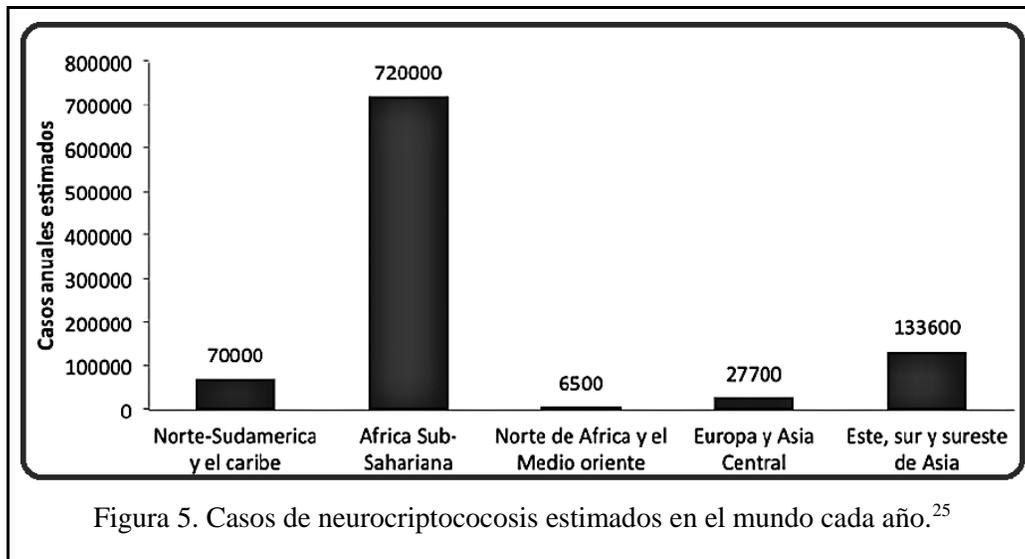
El medicamento más utilizado en el tratamiento de la criptococosis es la anfotericina B vía intravenosa, especialmente para los casos de meningitis. Dado que es un fármaco nefrotóxico, algunos autores recomiendan no prolongar su administración y mantener el tratamiento intercalado con triazoles como el itraconazol, fluconazol, voriconazol y posaconazol administrados oralmente.^{9,48,88} Los resultados de la terapia dependen del estado inmunológico del paciente ya que la infección puede persistir de forma subclínica y provocar posteriores recidivas.

1.3.3 Epidemiología

En el mundo, la criptococosis es una infección relativamente común reportada con mayor frecuencia en hombres que en mujeres y rara vez en pacientes pediátricos.^{2,8,32,90,103}

En la actualidad el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es considerado el primer factor de riesgo para adquirir una infección criptocócica,⁹⁶ micosis considerada como una de las más frecuentes dentro de ésta población junto con *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*.^{11,50,57} Tras el advenimiento de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARGA) en países desarrollados, como Estados Unidos y Francia, su incidencia comenzó a disminuir.^{34,85} En los países sin acceso a la TARGA la incidencia de criptococosis aún es alta.^{25,33} Hasta el 2011 se estimaba que a nivel mundial existían 1,000,000 de casos anuales de criptococosis meníngea con un deceso de 650,000 personas,

la mayoría provenientes de África Subsahariana.⁶³ En la figura 5 se muestra una aproximación de los casos de criptococosis por año a nivel mundial.



Mundialmente, la gran mayoría de las infecciones son provocados por *C. neoformans* var. *grubii* (genotipo VNI) en pacientes inmunocomprometidos y por *C. gattii* (genotipo VGI) en pacientes inmunocompetentes. En Europa se registra un mayor número de casos ocasionados por *C. neoformans* var. *neoformans* (genotipo VNIV),¹⁷ mientras que el genotipo híbrido VNIII se ha aislado de pacientes residentes en África y, en menor proporción, de América del Norte. En general *C. gattii* (genotipos VGII, VIII y VGIV) son cosmopolitas, aunque en la región de Iberoamérica el genotipo mayormente aislado es el VGIII.^{3,56}

2. Antecedentes

En México, la identificación de los primeros aislados recuperados a partir de las heces de palomas, frutas, árboles y detritos vegetales dejó en evidencia la amplia distribución de *Cryptococcus neoformans* en nuestro medio.^{82,94} Casi veinte años después (1999) se reportaría el aislamiento de *C. gattii* a partir de árboles de *Eucalyptus camaldulensis* localizados en zonas urbanas de la ciudad de México;⁶ sin embargo, en estudios posteriores no se ha logrado la recuperación de levaduras de esta misma especie a partir de otros eucaliptos ni de otros sustratos vegetales.²³ En otros países como Argentina, Brasil, Portugal, Australia y Bonaire (Caribe Holandés) se ha logrado el aislamiento de *C. gattii* a partir de especies de árboles diferentes a *Eucalyptus camaldulensis*: *Grevillea robusta*, *Caesalpinia coriaria* y *E. globulus*, entre otros.^{81,42}

Durante la primera década del siglo XXI se elaboró un estudio retrospectivo con el objetivo de identificar a los principales agentes etiológicos de la criptococosis dentro la población mexicana. De 211 aislados clínicos de *Cryptococcus* spp. recuperados de pacientes diagnosticados con criptococosis durante el periodo 1989-1998 en la ciudad de México, se encontró a *C. neoformans* (86.7%) y *C. gattii* (10.4%) como causantes de esta micosis en México. De estos, solo 73 aislados pudieron ser subtipificados con métodos bioquímicos de rutina, auxonograma de carbono con un sistema de Vitek™ y PCR-FP. Los resultados demostraron que el genotipo más representativo fue el VNI con 56 aislados (*C. neoformans* var. *grubii*) seguido del VNII con cinco aislados, el VNIII con tres y solo un aislado del VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*). En cuanto a los aislados de la especie *C. gattii* estuvieron presentes los cuatro genotipos principales: dos VGI, dos VGII, dos VGIII y dos VGIV. Además, se reportaron otras especies en menor proporción como causantes de criptococosis: *C. albidus* (0.9%), *C. uniguttulatus* (0.5%) y otras especies de *Cryptococcus* no identificadas (0.4%). En el mismo estudio se observó una tendencia epidemiológica; todos los *C. neoformans* se recuperaron de pacientes con SIDA en tanto que los *C. gattii* no se asociaron a pacientes con este síndrome.^{21,22}

En una investigación similar realizada al Noroeste de México en el 2012, con la misma técnica de PCR-FP, se identificaron a los ocho tipos moleculares de *C. neoformans/C. gattii* como causantes de criptococosis entre los pobladores de esa región. A partir de 166 aislados recuperados se corrobora, nuevamente, la alta frecuencia de los genotipos VNI

(75%) y VNII (9%), seguida del VNIII (5%) y VNIV (3%). En general, los genotipos VG se encontraron en menor proporción que los VN, sin embargo, todos se hicieron presentes: el VGI con un porcentaje de 4%, el VGII con 2%, mientras que el VGIII y el VGIV tuvieron 1% cada uno. La población infectada estuvo mayormente representada por hombres que por mujeres (proporción 1:3) que caían en un rango de edad de 16 a 65 años.¹⁹ Desde el año 2000, en Iberoamérica se estableció un grupo de investigadores encargados del estudio epidemiológico y molecular del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, bajo la dirección de Elizabeth Castañeda y Wieland Meyer.⁸⁴

En el 2003, con la identificación de 340 aislados clínicos y ambientales provenientes de diferentes países iberoamericanos, incluido México, se logró ampliar el panorama de la distribución de especies y genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii* en el continente americano. El genotipo VNI, correspondiente a *C. neoformans* var. *grubii*, resultó ser el más frecuente (68.2%) como en otras partes del mundo, seguido del VNII (5.6%), del VNIII (4.1%) y del VNIV (1.8%). Los genotipos de *C. gattii* más frecuentes fueron VGIII (9.1%) y el VGII (6.2%) seguidos del VGI (3.5%) y VGIV (1.5%).⁸⁴

El tipo sexual de las levaduras del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* se puede identificar por métodos de cruce *in vitro* y por métodos de biología molecular.^{39,78} Con estos métodos se ha determinado que, en una cruce regular, la producción de basidiosporas α y α es equitativa.⁶⁶ No obstante un gran número de aislados clínicos y ambientales corresponden al tipo α ; la mayoría haploides, aunque también se han reportan células diploides y aneuploides.^{53,54,68,73,83}

3. Planteamiento del problema

En México, *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* son causantes de infecciones micóticas en humanos y otros mamíferos. Los ocho genotipos (VNI, VNII, VNIII, VNIV y VGI, VGII, VGIII, VGIV) se han identificado en los aislamientos clínicos, pero no todos se han localizado en la naturaleza.

Los tipos moleculares VN correspondientes a la especie *C. neoformans* presentan una amplia distribución como saprobios en nuestro medio y como causantes de criptococosis en la población mexicana, a diferencia de los VG de la especie *C. gattii* que se encuentran en menor proporción como causantes de esta micosis y que, además, en los últimos años no se ha vuelto a reportar su recuperación del ambiente a partir de sustratos orgánicos. Por lo anterior, se considera que la distribución en la naturaleza de *C. gattii* en nuestro país aún es incierta.

La genotipificación de *C. neoformans* y *C. gattii* se realiza en los laboratorios más especializados de México; sin embargo, de ninguno de los aislamientos se ha identificado el tipo sexual de las levaduras presentes en nuestro país.

4. Justificación

La biotipificación del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* ha permitido caracterizar y ubicar a estos microorganismos de manera global en su medio natural y como agentes patógenos. Conociendo la distribución de los biotipos presentes en la naturaleza, así como los biotipos que infectan a los pacientes, se puede detectar el origen o fuente de una infección criptocócica en determinada región geográfica. Dicha información también es de utilidad en la prevención y control de este padecimiento, por lo tanto, se podrían hacer predicciones sobre posibles brotes de criptococosis bajo determinadas condiciones bióticas o abióticas. Este tipo de trabajos representan la expansión de los estudios epidemiológicos de la criptococosis, necesarios para comprender la dinámica de los criptococos patógenos dentro de una población, en este caso la población mexicana.

5. Objetivos

General

- Biotipificar aislados mexicanos del complejo de especies *Cryptococcus neoformans/C. gattii* de origen clínico y saprobio.

Particulares

- Aislar levaduras del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* a partir de heces de paloma y detritos vegetales en dos épocas del año 2015: invierno y verano.
- Asociar a la temperatura y humedad del ambiente con los resultados obtenidos en la recuperación de *C. neoformans/C. gattii* a partir de los sustratos orgánicos procesados.
- Identificar a las especies causantes de criptococosis en la Ciudad de México en el periodo 2014-2016.
- Conocer el tipo molecular y el tipo sexual de los cultivos de *C. neoformans/C. gattii* recuperados del ambiente y de procedencia clínica.
- Referir los principales signos y síntomas de la criptococosis en los pacientes diagnosticados en cinco hospitales de tercer nivel en la Ciudad de México.
- Estimar la incidencia puntual de la criptococosis en los años 2014, 2015 y 2016 con base en el registro de LCR analizados en el laboratorio de dos instituciones médicas.
- Relacionar las variables clínicas, demográficas y ambientales con los biotipos identificados en este estudio.

6. Hipótesis

La variación de la temperatura y humedad que se presenta de invierno a verano puede influir en el número de aislamientos de *C. neoformans*/*C. gattii* recuperados del ambiente.

La mayor proporción de genotipos identificados en los aislados ambientales serán los VN, correspondientes a la especie *C. neoformans*, mientras que los genotipos VG de *C. gattii* se encontrarán en menor proporción. Este resultado también se espera obtener en la genotipificación de los aislados de procedencia clínica. De igual manera, el factor de compatibilidad más representativo en ambos tipos de aislados será el α debido a su amplia distribución a nivel mundial.

En cuanto a las referencias clínicas de la criptococosis referida por el médico y los pacientes se espera que la sintomatología sea mayormente relacionada con alteraciones a nivel cerebral. Asimismo, se predice que el sector de la población más afectado sean hombres con algún grado inmunodeficiencia, principalmente los infectados con el virus de inmunodeficiencia humana.

7. Materiales y Métodos

Este estudio se basó en la comparación genotípica de diez cepas de referencia, cordialmente proporcionadas por el Dr. Wieland Meyer, con los aislados de *C. neoformans*/*C. gattii* recuperados del ambiente y de los aislados de origen clínico. En el cuadro 4 se muestra la información de cada cepa de referencia.

Cuadro 4. Cepas de referencia			
Clave	Origen	Genotipo	Especie
WM 148	Australia	VNI	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>
WM 626	Australia	VNII	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>
WM 628	Australia	VNIII	<i>Cryptococcus neoformans</i> híbrido
WM 629	Australia	VNIV	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>
WM 179	Australia	VGI	<i>Cryptococcus gattii</i>
WM 178	Australia	VGII	<i>Cryptococcus gattii</i>
WM 175	E. U. A.	VGIII	<i>Cryptococcus gattii</i>
WM 779	Sudáfrica	VGIV	<i>Cryptococcus gattii</i>
CBS 5757	Baja California Sur	MAT α	<i>Cryptococcus gattii</i>
CBS 7829	Baja California Sur	MAT a	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>

7.1 Muestras ambientales

El muestreo ambiental se realizó en la explanada delegacional de Tlalpan, al sur de la ciudad de México (mapa 1). En dos días (22 de enero y 31 de julio) de épocas distintas del año 2015 (invierno y verano), se colectaron tres tipos de sustratos en las cantidades siguientes: 25 muestras de heces de palomas columbiformes (principalmente *Columba livia*), 15 muestras de oquedades tomadas a 15 árboles y 15 muestras de detritos tomados del suelo de las jardineras que rodean al kiosco de la explanada.

Las heces de paloma se levantaron del suelo con la ayuda de una espátula limpia de aluminio y se colocaron en bolsas de plástico herméticas, lo mismo se hizo con las muestras de detritos tomadas del suelo de las jardineras. Las oquedades de los árboles se muestrearon con hisopos estériles humedecidos al momento con solución salina (NaCl 0.9%) y se transportaron en tubos de vidrio con 5 mL de la misma solución. Para identificar a los árboles muestreados, cada uno fue numerado del uno al 15 y etiquetado adecuadamente. Todo el material fue transportado al laboratorio para procesarlo el mismo día de la colecta. El proceso consistió en los siguientes pasos:

1. Se pesó 1 g de cada una de las muestras sólidas para suspenderlas por separado en 2 mL de solución de NaCl al 0.9 % (dilución madre). En el caso de las muestras líquidas, no se realizó este paso.
2. A partir de las diluciones madre se hicieron otras diluciones: 1:10 y 1:100. De éstas, 20 µL fueron cultivados por agotamiento en medio agar semilla de niger dentro de cajas de Petri desechables (Anexo).
3. Los cultivos permanecieron a temperatura ambiente (25 a 26 °C) durante una semana; en este tiempo, se revisaron diariamente poniendo especial atención al desarrollo de colonias levaduriformes de bordes lisos y color marrón.
4. Todas las colonias sospechosas de ser *Cryptococcus* sp. fueron revisadas mediante exámenes microscópicos en preparaciones frescas con tinta china (Anexo).
5. Los aislamientos con características morfológicas micro y macroscópicas del género *Cryptococcus* se purificaron mediante una serie de cultivos monospóricos con resiembras en agar dextrosa Sabouraud con antibiótico. Una vez puras, se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta continuar con su caracterización fenotípica y genotípica.

Mapa 1. Localidad del muestreo ambiental: explanada delegacional de Tlalpan, CD. MX.



7.1.1 Variables climatológicas: temperatura y humedad

Para conocer la influencia de la temperatura y humedad en la recuperación de *C. neoformans/C. gattii* en estado saprobio se consideraron los registros meteorológicos del Programa de Estaciones Meteorológicas del Bachillerato Universitario (PEMBU).⁹¹ Tres de sus estaciones fueron seleccionadas (mapa 1), así como también los registros de la temperatura (°C) y humedad (%) de cinco años anteriores al año del muestreo (2015). Es decir, se consideraron los registros meteorológicos del 22 de enero y 31 de julio de las bases de datos correspondientes a los años 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014. Las tres estaciones meteorológicas de la red PEMBU seleccionadas fueron las siguientes:

1. Colegio de Ciencias y Humanidades plantel sur (CCHs)
2. Escuela Nacional Preparatoria número 1 (ENP1)
3. Escuela Nacional Preparatoria número 5 (ENP5).

Los datos de las mediciones de temperatura y humedad de las tres estaciones meteorológicas se vaciaron en hojas de cálculo Microsoft Excel® para calcular los promedios de cada variable en los seis años, de 2010 a 2015. Posteriormente, los promedios

fueron analizados con el programa estadístico SPSS® v. 24 con la finalidad de conocer el comportamiento de la temperatura y humedad en estos años, tomando como referencia el año que se realizó el muestreo.

7.2 Cultivos de procedencia clínica

Los cultivos de *Cryptococcus* sp. de origen clínico fueron solicitados a los responsables del laboratorio de cinco instituciones de salud en la ciudad de México:

1. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).
2. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)
3. Centro Médico La Raza (CMLR).
4. Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI (HECMN SXXI)
5. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Los cultivos fueron registrados en la base de datos del Laboratorio de Micología Médica y fueron almacenados a 4 °C hasta su biotipificación.

7.2.1 Datos clínicos de los pacientes

Los datos clínicos de los pacientes se obtuvieron a través de la revisión de expedientes médicos en las instituciones antes mencionadas. El uso de esta información estuvo regido por la bioética referida en las Normas Oficiales Mexicanas emitidas por la Secretaría de Salud y fue registrada en hojas de cálculo Microsoft Excel® para, posteriormente, analizarla con el programa SPSS® v. 24 con lo cual se desarrolló un estudio de casos.

7.2.2 Incidencia puntual (IP) de la criptococosis

Se solicitaron a los responsables del laboratorio de análisis de muestras los registros del número de LCR tomados a los pacientes con algún tipo neuropatía y que ingresaron al hospital durante el 2014, 2015 y 2016. Con estos datos, se calculó la IP de la criptococosis con base en el número de aislamientos positivos a *Cryptococcus* sp. en cada hospital que proporcionó dicha información.

7.3 Identificación fenotípica

Los aislados ambientales y clínicos fueron identificados fenotípicamente de la siguiente manera:

1. Producción de pigmentos melánicos: cada uno de los aislados se resembró con un asa bacteriológica en agar semilla de niger (Anexo). Éstas se dejaron a temperatura ambiente (25-26°C) registrando el resultado después de 48 a 72 horas.
2. Presencia de cápsula: los cultivos que resultaron positivos a la prueba anterior se revisaron microscópicamente por medio de una preparación con tinta china, asimismo se resembraron por duplicado en agar dextrosa Sabouraud (ADS). Sólo una de estas resiembras fue utilizada en las siguientes pruebas bioquímicas.
3. Producción de ureasas: en tubos de vidrio con agar urea de Christensen® (Anexo) fueron resembrados cada uno de los aislados para comprobar su actividad catalítica frente a la urea. El resultado se determinó después de un periodo de incubación a 37°C durante 72 horas.
4. Metabolismo de la glicina y resistencia a la canavanina: se sembró por estría masiva cada aislado en agar CGB (Anexo). El resultado positivo de esta prueba se determinó cuando el medio de cultivo viro de amarillo a color azul-cobalto.

La resiembra en ADS que se conservó en el paso dos fue utilizada para comprobar la pureza del aislado mediante una tinción de Gram (Anexo). Posteriormente, se prepararon para su conservación en el cepario con una solución de glicerol y agua 2:1 en tubos Eppendorf de 2 mL, manteniéndolos a - 4°C.

7.4 Identificación genotípica

La identificación genotípica de los aislados se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Extracción de ADN de con el *kit* DNeasy® Plant (Anexo); el producto de la extracción se cuantificó (ng/μL) en un espectrofotómetro Epoch BioTek® y se comprobó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y buffer Tris-Borato-EDTA 8 pH al 0.5% (TBE).
2. Amplificación del gen *URA5* con el par de cebadores *URA5/SJ01* (cuadro 10); los reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción se describen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Mezcla de reacción de la PCR- <i>URA5</i>	
Reactivo	Concentración final (50 μ L)
DNA	10ng/ μ L
Buffer 10X Invitrogen®	1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl)
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	0.2 mM
DNA Taq polimerasa	2.5 U
Cebador <i>URA5</i>	0.2 μ M
Cebador SJ01	0.2 μ M

La PCR se realizó con 35 ciclos en un termociclador Labnet® con las condiciones de temperatura y tiempo que se especifican en el cuadro 6.

Cuadro 6. Condiciones para la PCR del gen <i>URA5</i>			
Etapas		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización		94	3 min
Ciclos	Desnaturalización	94	45 seg
	Alineamiento	63	1 min
	Extensión	72	1 min
Extensión final		72	7 min

Los productos de amplificación, con un peso esperado de 779 pares de bases (pb), se visualizaron a través una electroforesis en gel de agarosa al 1.4% y TBE al 1%, la cual se dejó correr a 90 voltios (V) durante una hora.

3. Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) con doble digestión por las enzimas *Sau96I* y *HhaI*; los componentes de la mezcla de reacción se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Mezcla de reacción del RFLP	
Reactivos	Volumen final 30 μ L
Buffer NEB 10X	3 μ L
Albúmina Sérica Bovina (BSA) 10 mg/mL	0.3 μ L
Enzima HhaI (20 000 U/mL)	0.3 μ L
Enzima Sau961 (5 000 U/mL)	0.6 μ L
Producto de PCR-URA5	25.8 μ L

La mezcla se realizó en tubos Eppendorf de 600 μ L para, en seguida, dejarlos incubar en un termobloque a 37°C durante un periodo de 2.5 horas (\pm 15 min).

Los productos de digestión fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 3% y TBE al 1 % con un voltaje de 100 V (10 V por cada centímetro del gel) durante 1.5 horas. Los patrones de bandeos obtenidos nos permitieron identificar los genotipos de cada uno de los aislados.

7.5 Identificación molecular de los factores de compatibilidad (*Mating-type*)

Se realizó una PCR del gen que codifica para feromonas (gen *MF*) con cebadores específicos del tipo sexual *MF α* y *MF β* (cuadro 8). Los reactivos para la PCR-*MF* se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Mezcla de reacción para la PCR- <i>MF</i>	
Reactivo	Concentración final (50 μ L)
DNA	10 ng/ μ L
Buffer 10X Thermo Scientific	1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl)
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	0.2 mM
DNA Taq polimerasa	2.5 U
*Cebador MF α U	0.2 μ M
MF α L	0.2 μ M
*Cebador JHOE9787	0.2 μ M
JHOE9788	0.2 μ M
*Cada par de cebadores tuvo su propia mezcla de reacción.	

Las condiciones de la PCR fueron programadas para 30 ciclos en un termociclador Labnet®, éstas se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Condiciones para la PCR del gen <i>MF</i>		
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	94	5 min
Ciclos	Desnaturalización	1 min
	Alineamiento	51/53/54/56
	Extensión	1 min
Extensión final	72	7 min

Los productos de amplificación del gen *MF α* y *MF α* , con un tamaño de 219 y 109 pb respectivamente, se visualizaron en un gel de agarosa al 2% y TBE al 1% dejándolos correr a 100 V durante una hora (10 V por cada centímetro del gel).

Cuadro 10. Oligos utilizados en la genotipificación y peso molecular en pares de bases (pb) de los amplicones generados			
Oligo	Referencia	Secuencia	Tamaño de fragmento (pb)
URA5 SJ01	Meyer ⁸⁴	5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3' 5'TTAGACCTCTGAACACCGTACTC-3'	779
MF α U MF α L	Holliday ⁵⁴	5'TTCACTGCCATCTTCACCACC-3' 5'TCTAGGCGATGACACAAAGGG-3'	109
JOHE9787 JOHE9788	Fraser ⁴⁵	5'ACACCGCCTGTTACAATGGAC-3' 5'CAGCGTTTGAAGATGGACTTT-3'	219

8. Resultados

Las cepas de referencia proporcionadas por el Dr. Wieland Meyer, miembro de la Asociación Internacional de Micología (IMA por sus siglas en inglés), fueron cultivadas en agar Sabouraud a partir de las diluciones acuosas en que éstas se encontraban. Asimismo, se prepararon para su mantenimiento en el cepario del laboratorio de la Unidad de Micología Médica, UNAM.

Con el procedimiento correspondiente se corroboró el fenotipo y genotipo de cada una de las cepas de referencia para compararlas con los aislamientos recuperados en este estudio. A continuación, se describen a los biotipos identificados, así como los resultados obtenidos a partir del análisis de la información tomada de la base de datos del PEMBU y de los expedientes clínicos de los pacientes.

8.1 Biotipos de los aislados ambientales

De un total de 110 muestras colectadas (50 de heces de palomas, 30 hisopados de oquedades arbóreas y 30 muestras de detritos), sólo de ocho se logró la recuperación de las levaduras de interés para este estudio (Cuadro 11). En total, se obtuvieron 11 aislamientos identificados como *C. neoformans* (Cuadro 12) de los cuales se observaron cuatro colonias con una morfología y fisiología atípica; células de forma elíptica u ovalada (Figura 6) cuyas colonias presentan lento desarrollo de pigmento melánico y de un tono menos intenso que el producido por otros aislados de origen clínico (Figura 7), en agar urea de Christensen® las tonalidades producidas en el medio fueron de un color anaranjado muy tenue, a excepción del aislado 470 (Figura 8).

Cuadro 11. Muestras a partir de las cuales se aisló a <i>C. neoformans</i>			
Sustrato	22 enero	31 julio	Total
Heces	5	1	6
Oquedades	1	1	2
Detritos	0	0	0
Total	6	2	8

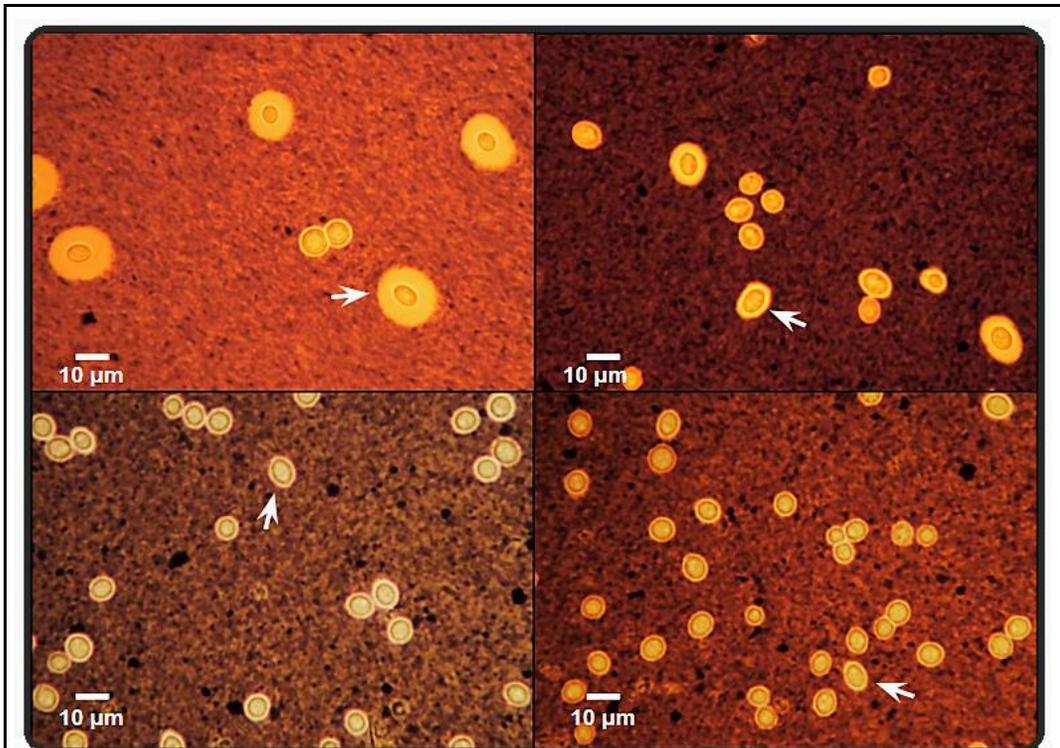


Figura 6. Morfología microscópica de los cuatro aislados ambientales de *C. neoformans* genotipo VNIII. Se observan y señalan células elipsoides con diferentes tamaños y grosores de cápsula.

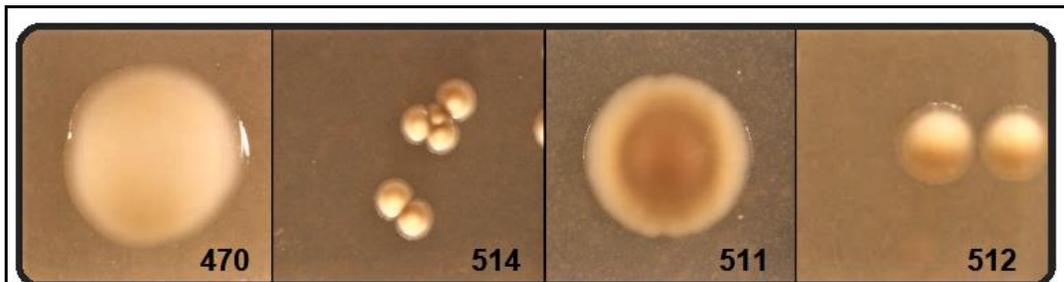


Figura 7. Morfología macroscópica de las colonias de *C. neoformans* híbridas aisladas de heces de palomas (470 y 514) y de las oquedades del tronco de una palmera *Phoenix* sp. (511 y 512).

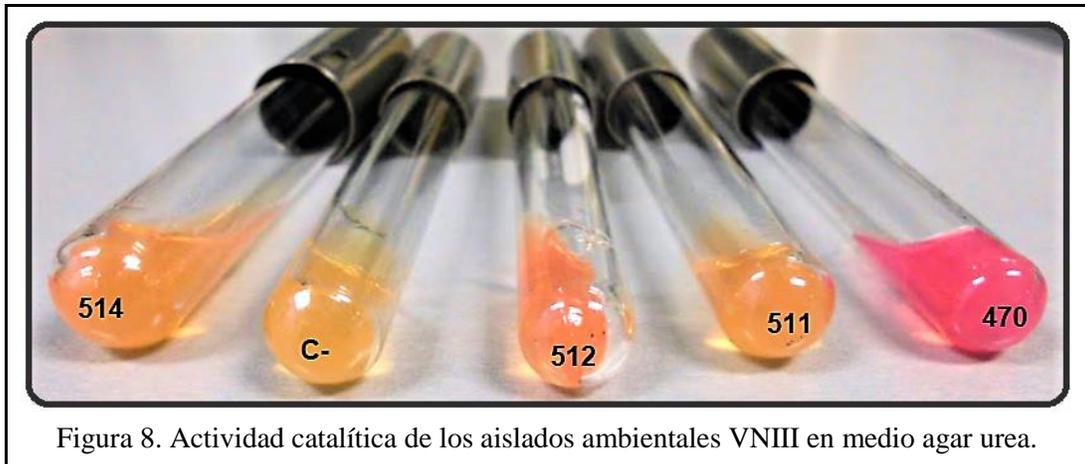


Figura 8. Actividad catalítica de los aislados ambientales VNIH en medio agar urea.

El mayor número de colonias positivas recuperadas se consiguió a partir de las heces de palomas, mientras que en los detritos no se identificaron levaduras pertenecientes al complejo de especies de interés para este estudio. De los 15 árboles muestreados sólo a partir de uno se aisló a *C. neoformans*. Dicho árbol pertenece al género *Phoenix* de las palmeras arbóreas de ornato introducidas en México (Figura 9).

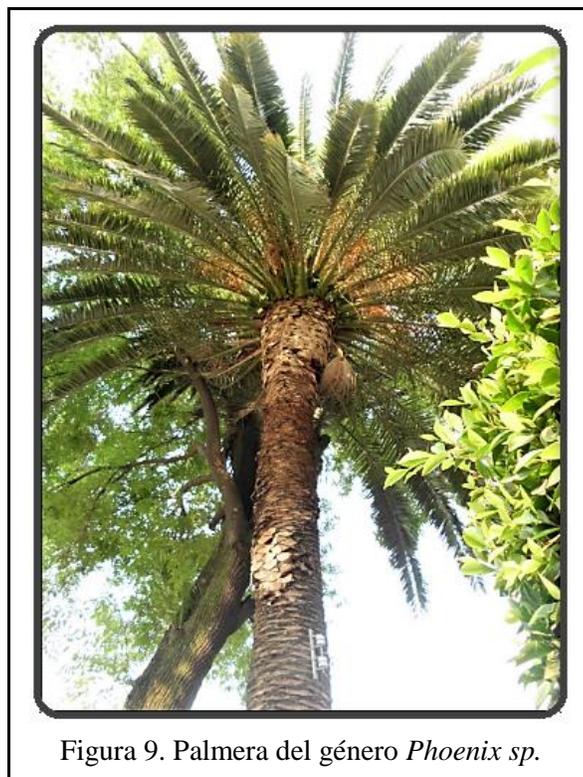


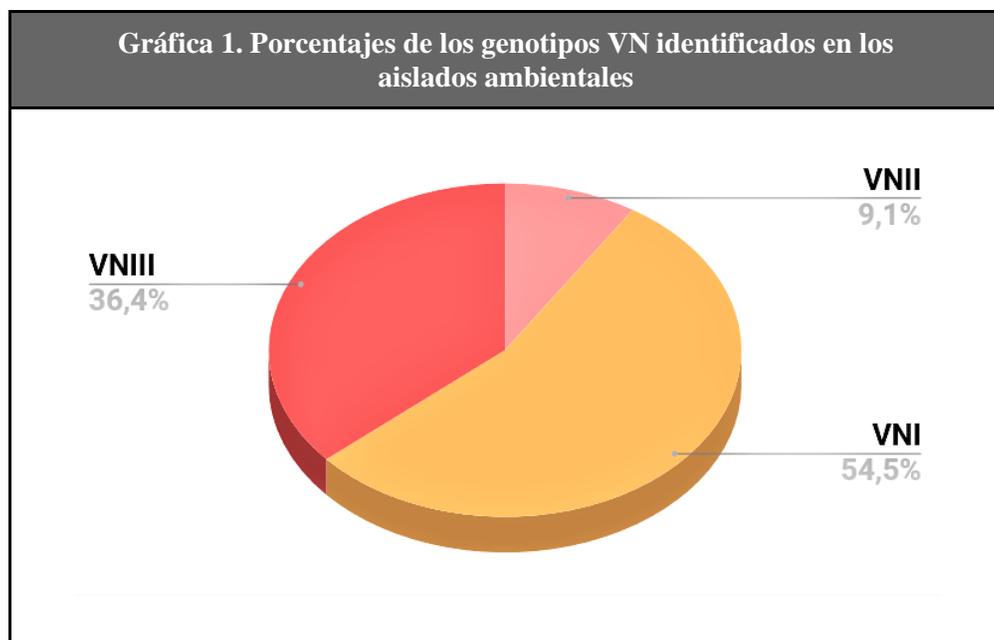
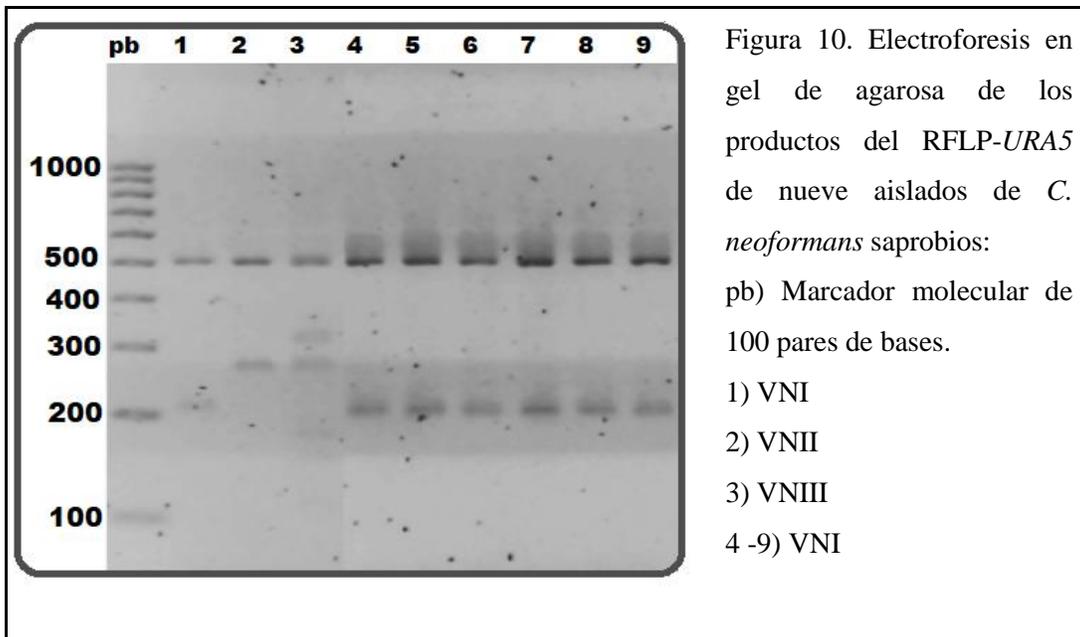
Figura 9. Palmera del género *Phoenix* sp.

A partir de las oquedades del tronco de esta palmera, se logró el aislamiento de *C. neoformans* var. *grubii* (VNI y VNII) y de *C. neoformans* híbrido (VNIII) (Cuadro 12).

Con base en la electroforesis de los fragmentos de restricción (Figura 10) se observó que el genotipo mejor representado en el ambiente es el VNI (54.54%), seguido del VNIII (36.4%) y una menor proporción del VNII (9.10%). En la gráfica 1 se representan las frecuencias y porcentajes de los genotipos identificados en el muestreo ambiental.

Cuadro 12. Distribución de los genotipos VN hallados en los diferentes sustratos			
Sustrato	Genotipo	MF	Especie
Oquedad	VNII	-	<i>C. neoformans</i> var. <i>neof.</i>
Oquedad	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Heces	VNIII	-	<i>C. neoformans</i> . híbrido
Heces	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Heces	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Heces	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Heces	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Heces	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Heces	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
Oquedad	VNIII	-	<i>C. neoformans</i> híbrido
Oquedad	VNIII	-	<i>C. neoformans</i> híbrido
Heces	VNIII	-	<i>C. neoformans</i> híbrido

La línea punteada divide a los aislamientos recuperados el 22 de enero (arriba) de los recuperados el 31 de julio (abajo), ambos del año 2015.

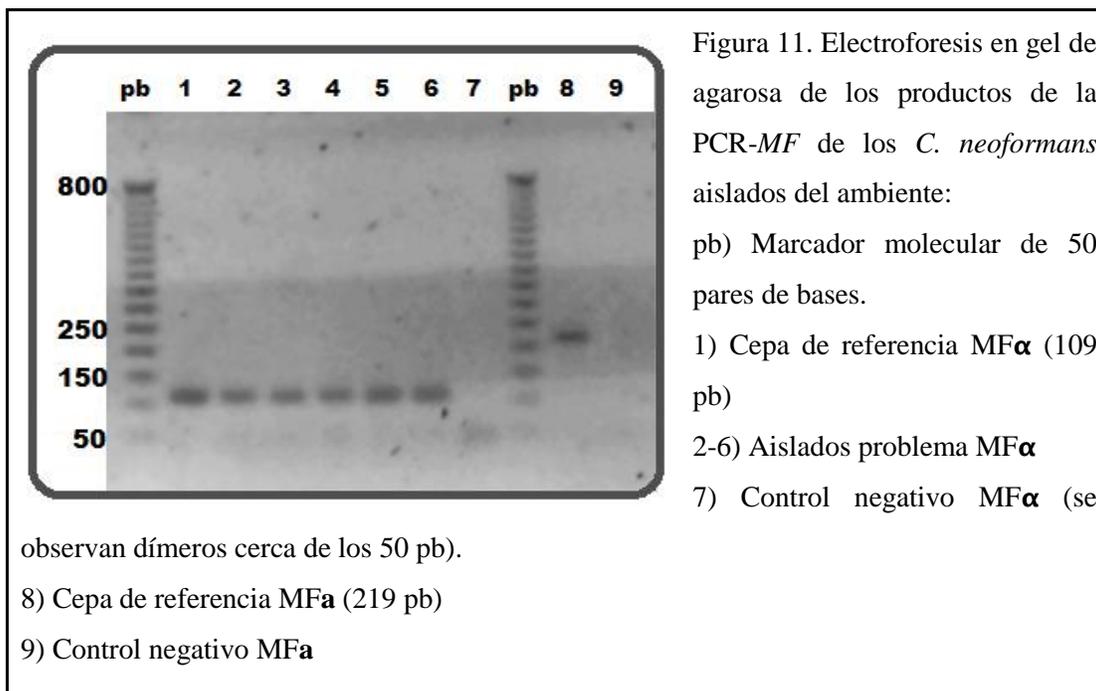


El primer muestreo se caracterizó por presentar el mayor número de colonias de *C. neoformans* aisladas (cuadro 13), ocho contra tres respecto al segundo muestreo; sin embargo, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa con un valor calculado de $\chi^2 = 1.53$ y una $p = 0.216$.

Cuadro 13. Genotipos de <i>C. neoformans</i> identificados en ambas colectas				
Especie	Genotipo	22 enero	31 julio	Total
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI	6	-	6
	VNII	1	-	1
<i>C. neoformans</i> híbrido	VNIII	1	3	4
	Total	8	3	11

De una muestra de detritos colectados del suelo se aisló a una colonia de *C. laurentii* identificada por auxonograma Vitek®. Además, con el mismo sistema se identificó una colonia de *C. terreus* en una muestra de heces de paloma, la cual coexistía con otros criptococos: *C. neoformans* var. *grubii* (VNI) y el híbrido de *C. neoformans* (VNIII).

La amplificación del gen *MF* sólo se logró en seis cepas, todas corresponden al tipo *MF α* (Figura 11).



8.1.1 Comportamiento e influencia de la temperatura y humedad en la presencia de *C. neoformans* en el ambiente

La prueba estadística de *Kolmogorov-Smirnov* fue utilizada para corroborar la normalidad de los datos. Los datos de la temperatura provienen de una distribución normal ($p=0.200>0.05$), mientras que los de la humedad no se comportaron de la misma manera ($p=0.006<0.05$); por ello, el análisis de la variación de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en el periodo 2010-2015 se realizó con pruebas paramétricas, a diferencia de la variación de humedad (%) que se realizó con pruebas no-paramétricas.

8.1.2 Variación de la temperatura en el periodo 2010-2015

La prueba paramétrica utilizada para el análisis de la variación de la temperatura fue el estadístico de *Levene* (L) para la homogeneidad de varianzas, la cual calcula el valor de L y su significancia (valor p); la hipótesis nula (H_0) indica una homogeneidad en las varianzas ($p>0.05$), mientras que la hipótesis alternativa (H_a) indica una heterogeneidad en las varianzas ($p<0.05$).

Para las varianzas de la temperatura del 22 de enero en el periodo 2010- 2015 se calculó un valor L de 5.388 con una $p =0.008$, por tanto, se rechaza la H_0 ; las varianzas son heterogéneas. Con esta información se seleccionó la siguiente prueba estadística, *Games-Howell* para varianzas heterogéneas, la cual nos permitió identificar a los grupos de datos que difieren significativamente con los datos de la temperatura del año 2015 (Cuadro 14).

La dinámica de la temperatura del 22 de enero en el periodo 2010-2015 se muestra en la gráfica 2, asimismo se señalan los dos años que presentaron diferencias significativas respecto al año 2015.

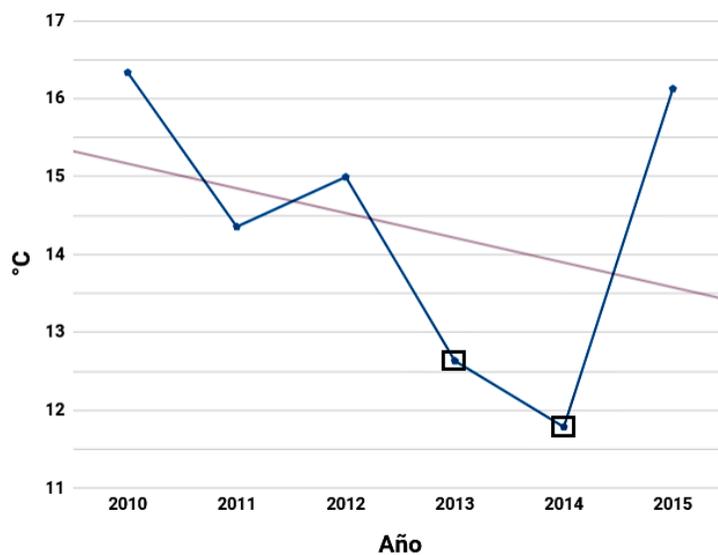
Para las varianzas de la temperatura del 31 de julio en el periodo 2010-2015 el estadístico de *Levene* calculó varianzas homogéneas ($L=0.265$ con una $p=0.924$). Posteriormente, se eligió el estadístico de *Scheffe-Tukey* para varianzas homogéneas el cual identificó un sólo grupo de datos que difería significativamente con los datos del año 2015 (cuadro 15).

Cuadro 14. Games-Howell para las varianzas heterogéneas de la temperatura del 22 de enero

				95% de intervalo de confianza		
Año		Diferencia de medias	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
2015	2010	-.21000	1.08745	1.000	-8.1372	7.7172
	2011	1.77333	.27980	.057	-.1121	3.6588
	2012	1.13000	1.02366	.852	-6.2189	8.4789
	2013	3.49333*	.47563	*.016	1.0581	5.9286
	2014	4.34000*	.47422	*.008	1.9156	6.7644

Se resaltan en el rectángulo negro los valores p calculados y se señalan con un asterisco (*) los grupos que tuvieron diferencias significativas respecto al año 2015; la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) del 22 de enero del año 2015 tuvo variaciones estadísticamente significativas respecto a los años 2014 y 2013, con un valor $p < 0.05$.

Gráfica 2. Variación de la temperatura del 22 de enero en el periodo de 2010- 2015

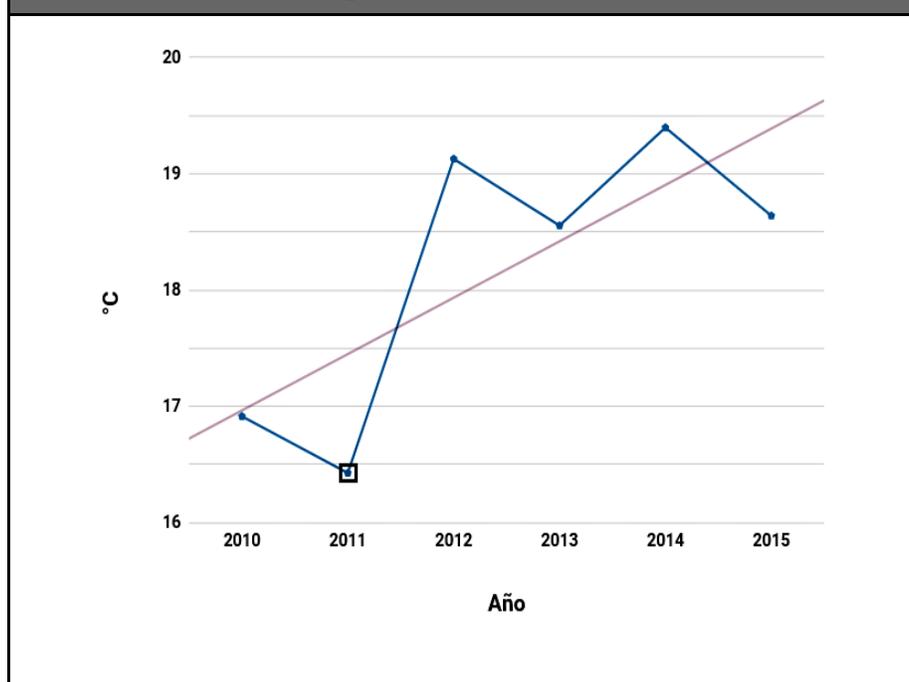


Cuadro 15. Scheffe-Tukey para varianzas homogéneas de la temperatura del 31 de julio

				95% de intervalo de confianza		
Año	Diferencia de medias	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior	
2015	2010	1.72333	.64299	.151	- .4364	3.8831
	2011	2.21000 ^a	.64299	* .044	.0502	4.3698
	2012	-.48667	.64299	.970	-2.6464	1.6731
	2013	.08667	.64299	1.000	-2.0731	2.2464
	2014	-.75333	.64299	.842	-2.9131	1.4064

Se resaltan en el rectángulo negro los valores p calculados y se señala con un asterisco (*) el grupo que tuvo diferencias significativas respecto al año 2015; la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) del 31 de julio del año 2015 tuvo variaciones estadísticamente significativas respecto al año 2011, con un valor $p < 0.05$.

Gráfica 3. Variación de la temperatura del 31 de julio durante el periodo 2010 -2015



La dinámica de la temperatura del 31 de julio en el periodo 2010-2015 se muestra en la gráfica 3, asimismo se señala el año que presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto al año 2015.

8.1.3 Variación de la humedad en el periodo 2010-2015

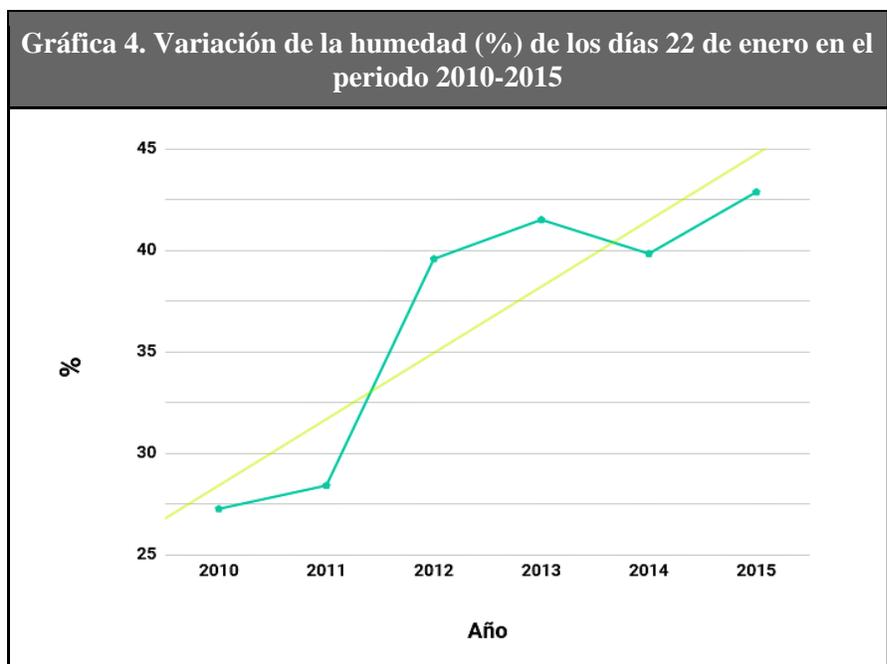
La prueba no-paramétrica utilizada para analizar las varianzas de la humedad fue la de *Kruskal-Wallis*, la cual agrupó a las varianzas en seis rangos. A partir de estos valores se realizó una χ^2 para calcular la significancia estadística de la variación de la humedad del 22 de enero del año 2010 al 2015 (cuadro 16). La gráfica 4 muestra el comportamiento de la humedad (%) en el periodo 2010-2015.

Cuadro 16. *Kruskal-Wallis* de la varianza de la humedad del 22 de enero

	Año	N	Rango promedio	Porcentaje de Humedad	
Porcentaje de Humedad	2010	3	3.00	Chi-cuadrado	13.608
	2011	3	4.00		
	2012	3	9.33	gl	5
	2013	3	14.67		
	2014	3	11.33	Sig. asintótica	.018
	2015	3	14.67		
	Total	18			

a. Prueba de Kruskal Wallis
b. Variable de agrupación: Año

El óvalo negro encierra el valor de p que indica una diferencia significativa para las variaciones de humedad del 22 de enero de los años 2010 al 2015.

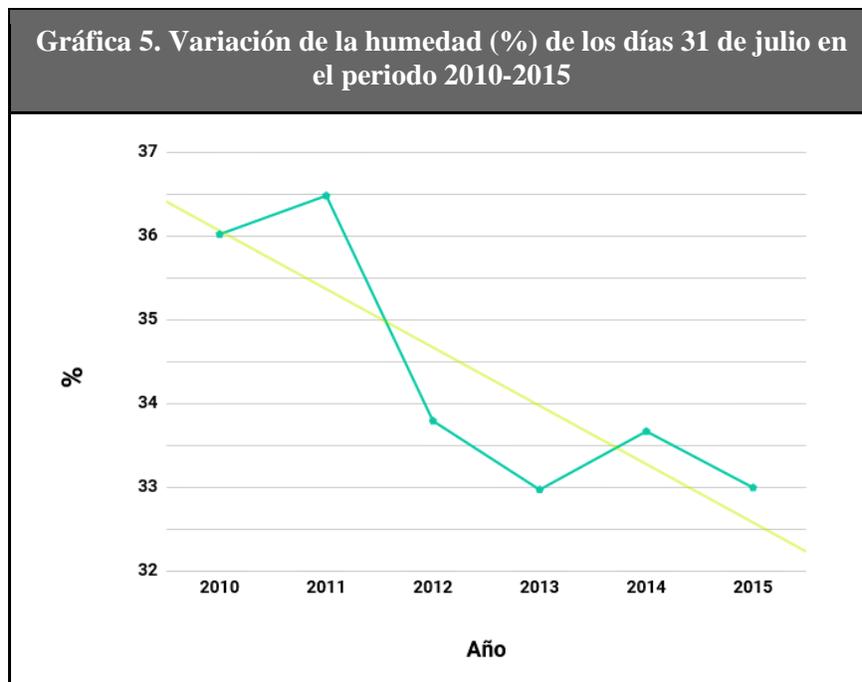


Por otro lado, los valores de χ^2 y p calculados para el 31 de julio no indicaron una diferencia significativa en la variación de la humedad durante el periodo 2010-2015 (Cuadro 17). El comportamiento de la humedad (%) en estos años se representa en la gráfica 5.

Cuadro 17. *Kruskal-Wallis* de la variación de la humedad del 31 de julio

	Año	N	Rango promedio	Porcentaje de Humedad	
Porcentaje de Humedad	2010	3	14.83	Chi-cuadrado	10.982
	2011	3	15.83		
	2012	3	7.33	gl	5
	2013	3	6.33	Sig. asintótica	.052
	2014	3	7.00		
	2015	3	5.67		
	Total	18			

El óvalo negro encierra el valor de p que indica que no hay diferencia significativa para las variaciones de humedad del 31 de julio de los años 2010 al 2015 ($p > 0.05$).



En conjunto, estos resultados demostraron que las variaciones de temperatura y humedad en los días de enero, del 2010 al 2015, fueron más fluctuantes en comparación con los días de julio donde ambas variables son estadísticamente más estables.

8.2 Biotipos de los cultivos clínicos

En el transcurso de este estudio se diagnosticaron 73 casos de criptococosis en cinco instituciones de salud en la Ciudad de México (Cuadro 18); 10 casos se registraron entre los meses de agosto a diciembre del año 2014 (14.9%), 48 en todo el año 2015 (64.9%) y 15 en el primer trimestre del año 2016 (20.2%).

Cuadro 18. Registros clínicos de los casos de criptococosis en la ciudad de México		
Institución	Casos	Porcentaje (%)
CMLR	34	46.6
INN	24	32.9
INER	12	16.4
HECMNSXXI	2	2.7
INCMNSZ	1	1.4
Total	73	100

De los 73 casos sólo se recuperaron 54 cultivos de *C. neoformans/C. gattii*, los cuales presentan una morfología muy similar; en agar dextrosa Sabouraud se observan colonias de color blanco-amarillo con márgenes enteros y apariencia seca y/o mucoide, mientras que en agar semilla de niger todas presentaron la capacidad de producir pigmentos melánicos color marrón. Las levaduras midieron de 5 a 10 µm de diámetro sin la cápsula, misma que variaba de grosor en cada aislado.

Los 54 aislados se caracterizaron molecularmente por RFLP del gen *URA5* (Figura 12 y 13). Los resultados de los patrones de bandeo molecular generados por la digestión de las enzimas demostraron el predominio del genotipo VNI (87.04%) correspondiente a *C. neoformans* var. *grubii* con 47 aislados. En seguida se colocó el genotipo VNIII con cuatro aislados (7.41%), mientras que los genotipos VNII, VGI y VGIII estuvieron representados con un solo aislado (1.85% cada uno) (Gráfica 6).

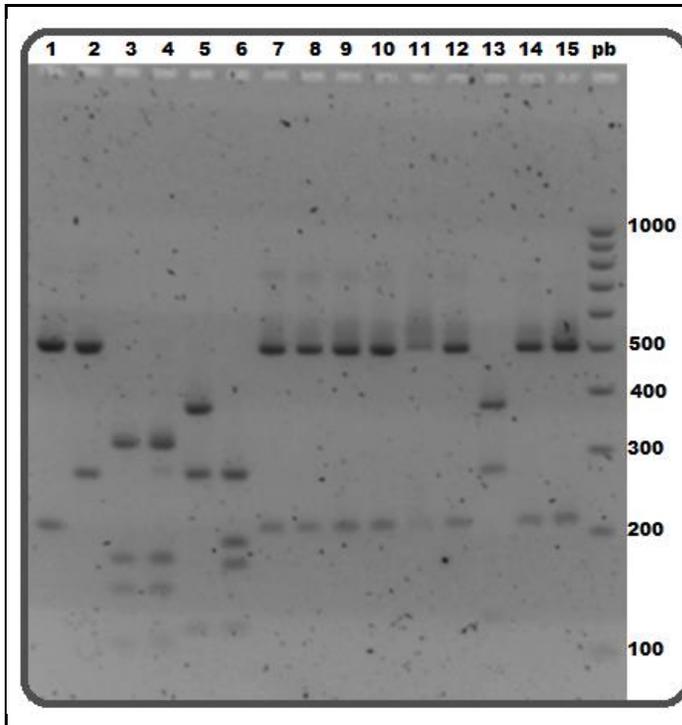


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del RFLP de los aislados clínicos (pozo 7 al 15):

pb) Marcador molecular de 100 pares de bases.

1-6) Cepas de referencia: VNI, VNII, VNIV, VGII, VGIII y VGIV.

7-12) VNI

13) VGIII

14-15) VNI

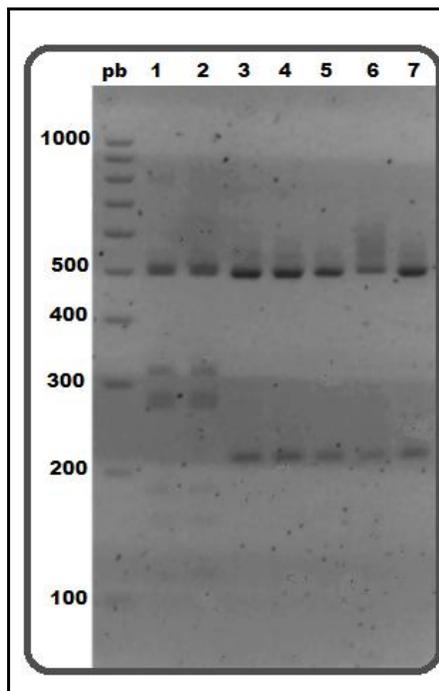


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del RFLP de seis aislados clínicos:

pb) Marcador molecular de 100 pares de bases.

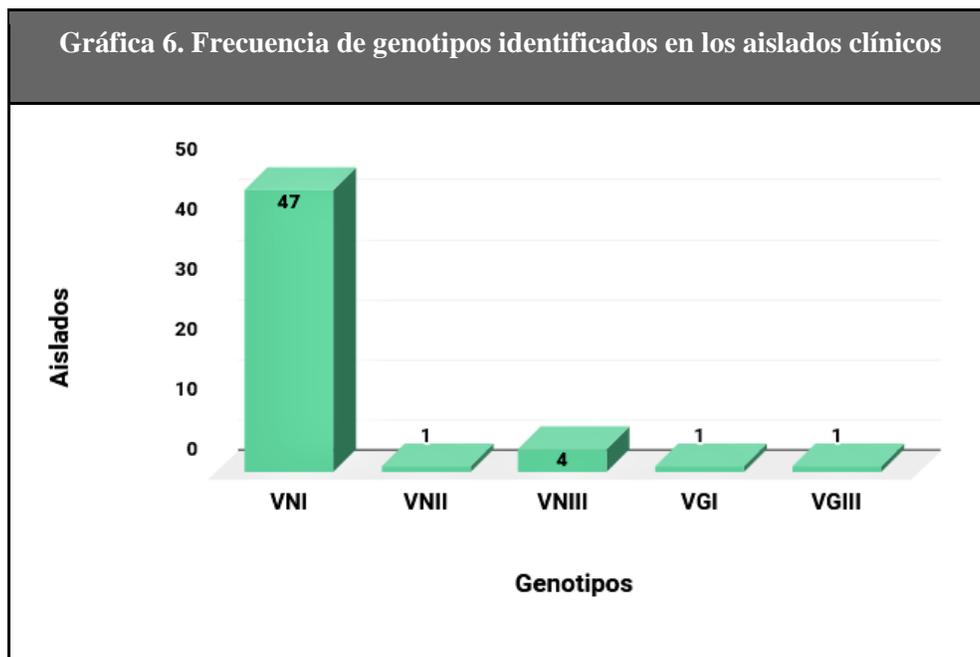
1-2) VNIII

3-7) VNI

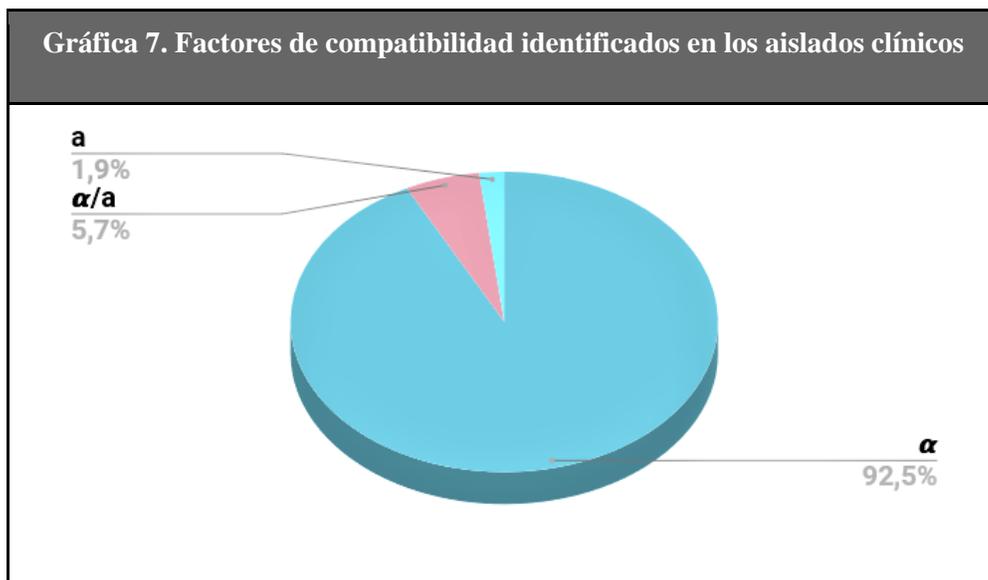
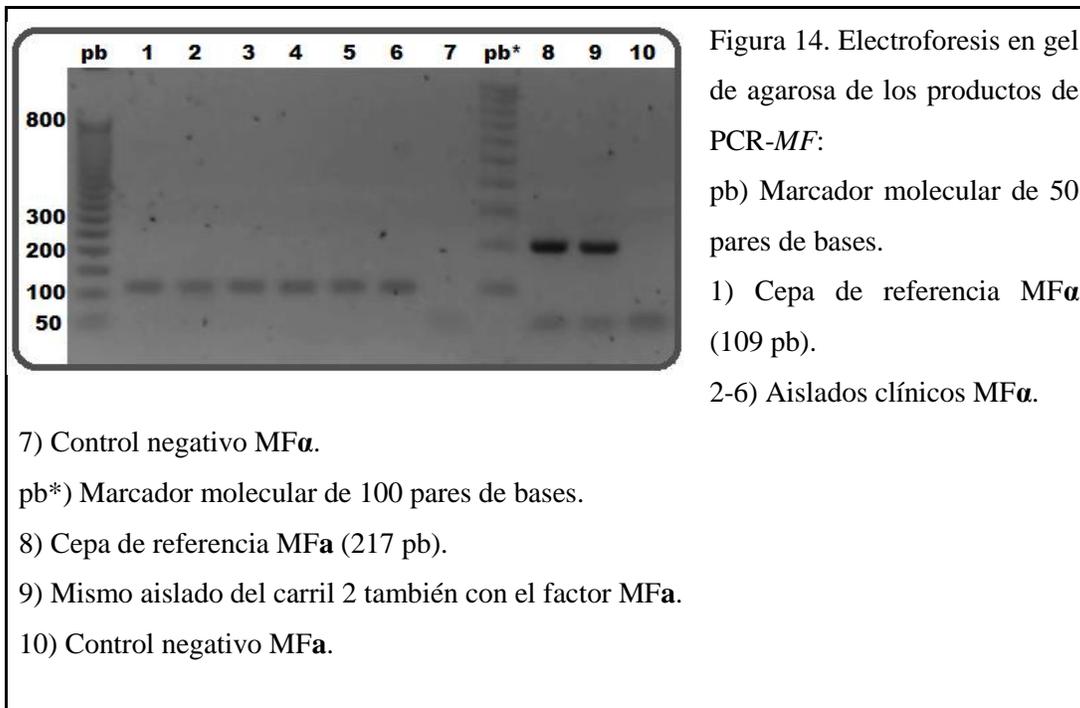
En el cuadro 19 se incluyen todos los biotipos identificados en los cultivos de origen clínico y en la gráfica 6 se presenta la frecuencia de los cinco tipos moleculares identificados en este estudio: VNI, VNII, VNIII, VGI y VGIII.

Cuadro 19. Distribución de los genotipos de origen clínico			
Producto biológico	Genotipo	MF	Especie
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VGIII	α	<i>C. gattii</i>
Sangre	VNI	α/a	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
No identificado	VNIII	-	<i>C. neoformans</i> híbrido
Médula ósea	VNIII	α/a	<i>C. neoformans</i> híbrido
Sangre	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNIII	α/a	<i>C. neoformans</i> híbrido
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>

LCR	VGI	α	<i>C. gattii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>
LCR	VNI	α	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>



Se identificó el factor de compatibilidad de 53 aislados clínicos (Figura 14). De estos, 49 aislados corresponden al tipo MF α , uno al MF α y tres más presentaron ambos tipos MF α /MF α (Gráfica 7). En un aislado no se obtuvo amplificación del gen *MF* (Cuadro 19).

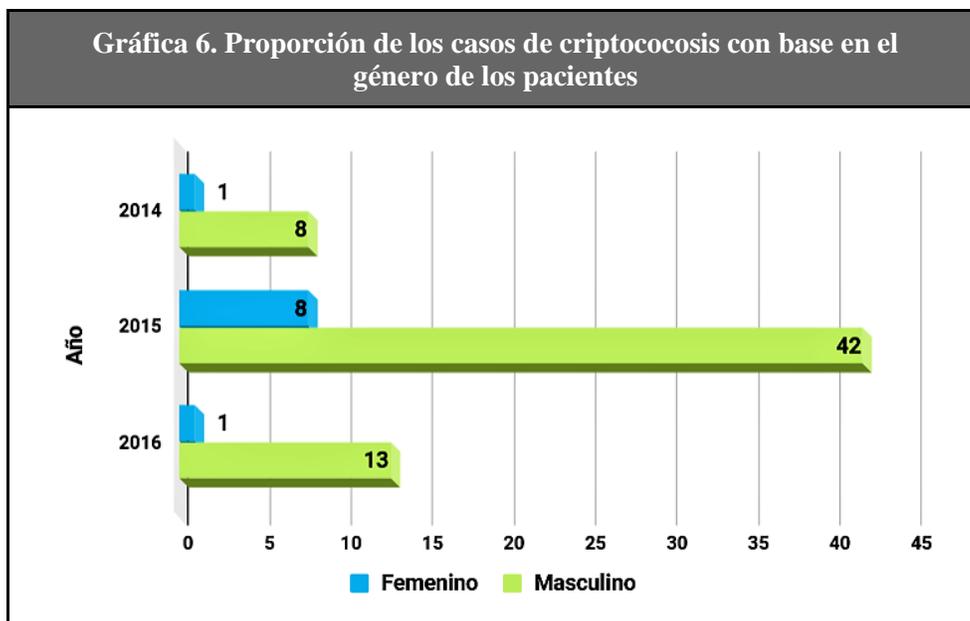


8.2.1 Estudio de serie de casos clínicos

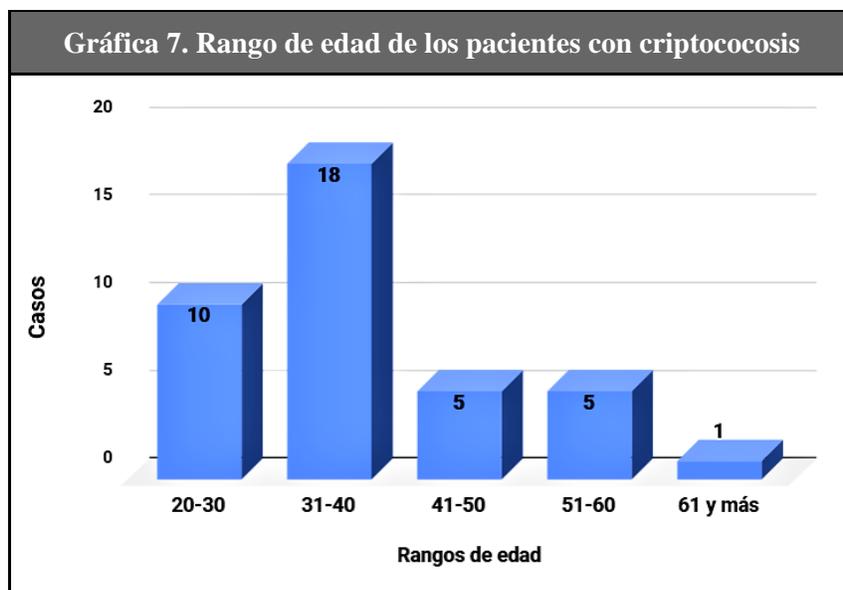
El LCR es el producto biológico del cual se diagnosticó el mayor número de casos de criptococosis (75.4%); la médula ósea y la sangre son otros productos a partir de los cuales se diagnosticaron tres de los 73 casos utilizados para este estudio. Asimismo, en el 12.3% de los casos no se pudo recuperar esta información (Cuadro 20).

Cuadro 20. Producto biológico a partir del cual se diagnosticó la criptococosis		
Fluido	Número de aislados	Porcentaje (%)
Médula ósea	1	1.4
Sangre	2	2.7
No identificados	9	12.3
LCR	61	83.6
Total	73	100

Se observó que una alta proporción (83.3%) de los casos se presentó en pacientes de género masculino respecto al género femenino, diagnosticados en el periodo de agosto del 2014 a marzo del 2016 (Gráfica 6).



En 39 de los 73 casos de criptococosis se indicó la edad de los pacientes, la cual oscilaba entre los 20 y 71 con una media de 38 años (Gráfica 7).



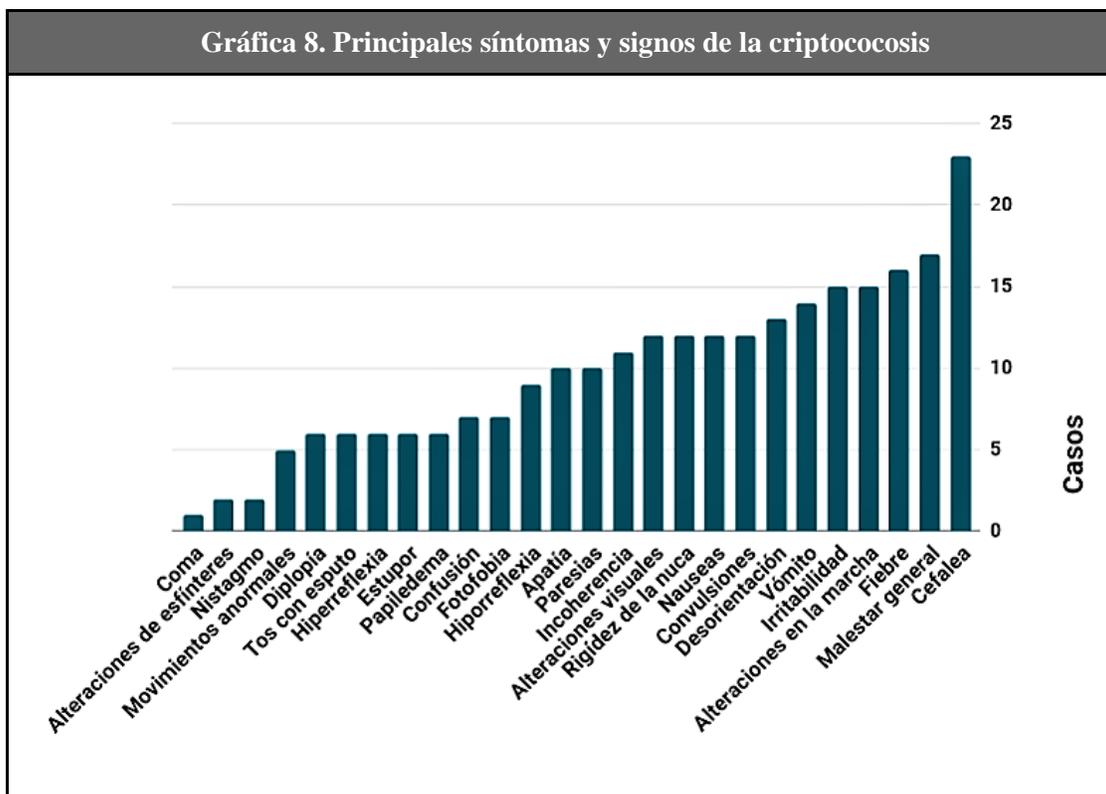
De los 73 casos, sólo se pudo consultar el expediente clínico de 25 pacientes; en ellos se indican los principales signos y síntomas que presentan los pacientes diagnosticados con criptococosis (Gráfica 8). Además, en 13 expedientes el médico indicó que el paciente se encontraba mentalmente lúcido. En 17 expedientes se registró la condición clínica que el paciente presentaba en el momento de su registro en el hospital; el SIDA fue la enfermedad referida con mayor frecuencia en estos pacientes (Cuadro 21).

Cuadro 21. Condiciones predisponentes indicadas en los expedientes

Enfermedad	Observados	Porcentaje (%)
VIH-SIDA	9	52.9
Neumonía	2	11.8
Hipertensión arterial sistémica	2	11.8
Ninguno	2	11.8
Diabetes mellitus	1	5.9
Trombocitopenia	1	5.9
Total	17	100

La cefalea fue el síntoma más significativo en el diagnóstico de la criptococosis y poco más del 50% de los expedientes clínicos reportaron el malestar general como un síntoma

recurrente. Los signos más representativos fueron: la fiebre, alteraciones en la marcha, irritabilidad, vómito y desorientación (Gráfica 8).



8.2.2 Incidencia puntual (IP) de la criptococosis

Se estimó la IP en dos de los cinco hospitales referidos en este estudio: INNN y CMLR. En el cuadro 22 se muestra la IP de la criptococosis calculada para el año 2014, 2015 y 2016 en cada institución mencionada.

Cuadro 22. Incidencia puntual de la criptococosis en México

Año	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)			Centro Médico La Raza (CMLR)		
	LCR	LCR+	IP (x1000)	LCR	LCR+	IP (x1000)
2014	2024	5	2	200	0	0
2015	1814	12	6	225	33	146
2016	1828	6	3	264	2	7

LCR: total de líquidos cefalorraquídeos extraídos por año. LCR+: líquidos cefalorraquídeos positivos a criptococos. IP: incidencia puntual por cada 1000 pacientes susceptibles al año.

9. Discusión

Los resultados de los análisis estadísticos proponen que la temperatura y la humedad son factores dinámicos que no influyen negativamente en el desarrollo de *Cryptococcus neoformans* en la naturaleza; no obstante, en las muestras de la primera colecta (22 de enero) se identificó una mayor diversidad de genotipos VN que en las de la segunda colecta (31 de julio). Con base en estos resultados se podría advertir que las condiciones ambientales de los días de invierno favorecen el desarrollo de casi todos los genotipos VN mientras que, por el contrario, las condiciones ambientales de los días de verano no lo permiten.

Por otra parte, la palmera a partir de la cual se recuperaron cuatro aislamientos de *C. neoformans* se propone como un reservorio importante de esta especie y de, por lo menos, tres de sus cuatro genotipos. Sin embargo, para comprender mejor la dinámica de las poblaciones de criptococos presentes en nuestro país se necesitan otro tipo de herramientas y metodologías que nos permitan estudiar a los individuos del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* desde su genética, ecología y evolución, pues los factores que actúan sobre la dinámica de una población son muy diversos.

La especie mayormente aislada a partir de los sustratos ambientales es *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (genotipos VNI y VNII) mientras que el híbrido de *C. neoformans* (VNIII) fue el segundo biotipo más frecuente entre las levaduras saprobias recuperadas en este estudio. El mismo patrón se observó en la frecuencia de los biotipos causantes de criptococosis en México, aunque en la última década se había reportado un mayor número de *C. neoformans* var. *grubii*, correspondientes al genotipo VNII, que del híbrido VNIII.^{19,21} En este estudio la presencia del genotipo VNII fue más escasa en ambos tipos de aislamientos, por lo que se plantea que la población de este tipo molecular está decreciendo, o bien, que la población de los *C. neoformans* híbridos (VNIII) está en aumento. Pese a que no podemos correlacionar directamente a los aislados ambientales con los clínicos, se podría decir que la diversidad intraespecífica de la población de *C. neoformans* en la naturaleza se ve reflejada en la frecuencia de los biotipos causantes de criptococosis en nuestro país.

Por otro lado, *C. gattii* no pudo ser recuperado del ambiente y solo dos genotipos (VGI y VIII) se presentaron como causantes de criptococosis en el transcurso de este estudio. Se ha observado que los genotipos VGI y VGIII son más frecuentes que los VGII y VGIV en

países iberoamericanos,⁸⁴ no obstante, en México ya se habían reportado a estos cuatro tipos moleculares como causantes de criptococosis. Con todo, se plantea la posibilidad de que la diversidad de climas y otros factores ambientales presentes en nuestro país son poco favorables para el desarrollo de *C. gattii* en la naturaleza, como consecuencia las infecciones provocadas por esta especie han disminuido en los últimos años. Sin embargo, a pesar de las hipótesis que se puedan sugerir a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, hasta el momento no existe un patrón característico que permita ubicar a los genotipos VG en nuestro país. Para el seguimiento de los *C. gattii* en vida saprobia sería fundamental investigar algunos aspectos personales de los pacientes infectados con este hongo, por ejemplo: el lugar de residencia, ocupación y actividades cotidianas, si realizó algún viaje y/o lugares que frecuentó antes de su diagnóstico, entre otros.

La morfología y fisiología de los cultivos de procedencia clínica fue muy similar, pero, aunque en los aislados patógenos no se detectaron diferencias importantes entre especies, entre los aislados ambientales se caracterizaron cuatro cultivos con baja actividad de ureasas y producción retardada de compuestos melánicos, las cuales son características que se han asociado con cepas poco virulentas.⁴³

La amplificación del gen *MF* demostró una vasta existencia de levaduras MF α en los aislados clínicos, de igual manera, fue el único tipo sexual identificado en los aislados ambientales entre los cuales también se encontraron levaduras asexuales. La abundancia de levaduras α podría ser una de las razones por las que se considera que el tipo sexual α es más virulento que el tipo **a**. Sin embargo, la virulencia de las cepas **a** se ha reportado en otros estudios misma que se reafirma en este trabajo al haber identificado un aislado clínico genotipo VNIII**a**.⁷ Asimismo, la ausencia del gen *MF* en un aislado clínico no pareció haber modificado su virulencia al ser el responsable de causar una infección micótica en un paciente tratado por neumonía. Las levaduras asexuales también se identificaron en los aislamientos ambientales, aunque, por ciertas características fisiológicas previamente mencionadas, estas levaduras podrían ser poco virulentas.

La baja frecuencia de levaduras MF**a** en nuestro medio puede ser evidencia de que un entrecruzamiento regular α **a** es poco frecuente en la naturaleza; sin embargo, este factor de compatibilidad también se identificó en tres aislados bisexuales, es decir, con ambos factores de compatibilidad (α /**a**). En otros países se han reportado cepas α AD**a** y **a**AD α de

origen ambiental, correspondientes al híbrido VNIII de *C. neoformans*, lo cual indica que una cruce biparental *axa* es posible en la naturaleza.^{74,77,121} Además, se considera que estas cepas bisexuales, al poseer dos copias de un mismo gen tienen más oportunidades de sobrevivir bajo las presiones selectivas del medio ambiente.^{12,80} Si bien, en este estudio no se aislaron del ambiente levaduras bisexuales, no se descarta la posibilidad de que los aislados VNII α /a y VNIII α /a de procedencia clínica puedan existir en la naturaleza; se sugiere que la producción de propágulos infecciosos en nuestro medio se inicie a partir de una cruce biparental *axa* entre los biotipos de *C. neoformans*.

En el estudio de casos clínicos se observó que un gran número de casos se diagnosticaron a partir de LCR. El estudio de este líquido es importante en la detección de infecciones meníngeas y del SNC; sin embargo, también es un indicativo de la capacidad y afinidad que *C. neoformans*/*C. gattii* presentan por el SNC.

Los pacientes varones entre la tercera y cuarta década de edad son las personas más susceptibles de contraer una infección criptocócica, resultado que no parece haber variado respecto los reportes previos en México y el mundo, los cuales indican una predilección de la criptococosis por adultos del género masculino.^{30,50}

Los datos obtenidos a partir de la revisión de los expedientes clínicos fue limitada; no obstante, se observaron patrones demográficos y clínicos reportados con anterioridad.^{2,16,24,112,113,122} La infección generalmente se manifiesta con un malestar general, cefalea, fiebre, vómito e irritabilidad, incluso el paciente puede mantenerse mentalmente lúcido; aun así, estas manifestaciones clínicas son inespecíficas por lo que se considera que la combinación de varios signos y síntomas podrían ser de utilidad para diagnosticar y tratar oportunamente una infección criptocócica.

El SIDA es el factor de riesgo mayormente mencionado en los expedientes clínicos, por lo que se plantea que los casos de criptococosis pueden ser más frecuentes en los estados con mayor incidencia del VIH/SIDA, como en la Ciudad y el Estado de México.¹¹⁵ La vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA, así como la localización ambiental de las levaduras con características virulentas son procedimientos clave que pueden utilizarse para prevenir y controlar a las infecciones criptocócicas en nuestro país.

Los casos de criptococosis provocados por *C. gattii* se diagnosticaron a partir del LCR de dos pacientes: un hombre de 55 años con hipertensión arterial y otro de 32 años sin ninguna

enfermedad predisponente. Asimismo, a partir del LCR de una mujer de 71 años con artritis e hipertensión arterial y el de un hombre de 60 años con ninguna enfermedad de base se diagnosticaron dos casos más provocados por *C. neoformans*; por ello, se plantea que las dos especies pueden causar infecciones a nivel de SNC en personas inmunodeprimidas e inmunocompetentes.

Finalmente, la IP calculada en este estudio es una estimación inexacta pues no se logró determinar si todos los LCR+ corresponden a eventos nuevos o son recidivas de los pacientes diagnosticados con criptococosis en otros años. Además, es posible que no exista una correspondencia 1:1 de los LCR+ con los 58 casos diagnosticados a partir del análisis de este fluido ya que, por lo general, se toma más una muestra de LCR a cada uno de los pacientes.

10. Conclusión

- La biotipificación de 65 cultivos del complejo de especies *Cryptococcus neoformans/C. gattii* fue realizada: 63 *C. neoformans* y dos *C. gattii*. Con este trabajo se reafirma la amplia distribución *C. neoformans* en nuestro medio.
- *C. neoformans*, *C. laurentii* y *C. terreus* fueron las únicas especies saprobias de criptococos recuperadas de los sustratos orgánicos procesados. Ningún genotipo de *C. gattii* se recuperó del ambiente.
- La diferencia del número de aislamientos de *C. neoformans* obtenidos en enero y julio no fue estadísticamente significativa, por lo que se sugiere que esta especie puede desarrollarse óptimamente durante el invierno y el verano. Sin embargo, los factores climáticos como la temperatura y la humedad, entre otros no identificados en este estudio, pueden influir sobre la expresión de los diferentes genotipos de *C. neoformans* en la naturaleza.
- *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (VNI) es el principal agente causal de la criptococosis en la población del centro de México, a pesar de ello ambas especies son capaces de infectar a personas inmunodeficientes e inmunocompetentes.
- En ambos tipos de levaduras (saprobias y patógenas) se observó, después del genotipo VNI, un mayor número de aislados VNIII (*C. neoformans* híbrido) lo cual sugiere un posible crecimiento en la población de *C. neoformans* híbridos. Asimismo, el factor de compatibilidad más representativo en estas levaduras fue el MF α , aunque también se identificó cierta diversidad sexual entre los biotipos de *C. neoformans*, principalmente en los aislados VNIII de procedencia clínica.
- El LCR es el principal producto biológico a partir del cual se diagnostica el mayor número de los casos de criptococosis. Por su distribución en el sistema del hospedero, se sugiere que *C. neoformans/C. gattii* presentan una fuerte afinidad y capacidad para alojarse en el SNC. Si bien, los signos y síntomas de los pacientes son inespecíficos de la infección, los varones de 30 a 40 años con VIH/SIDA u otra enfermedad autoinmune tienen mayor probabilidad de ser infectados por *C. neoformans/C. gattii*.
- La incidencia puntual es un índice dinámico que requiere de otros protocolos de estudio que permitan obtener otros para estimar certeramente la incidencia de la

criptococosis en México.

- Por la diversidad de genotipos VN identificados en un día de la temporada invernal se sugiere que en esta época podría haber mayor riesgo de contagio por *C. neoformans*, principalmente en hombres de edad adulta con VIH/SIDA.

11. Bibliografía

1. Administración de parques nacionales. Sistema de Información de Biodiversidad: www.sib.gov.ar
2. Alvarez LI, Velásquez AC, Ponce BJ, Gaya JA. Criptococosis infantil. Presentación de 3 casos. Rev cubana Pediatr 2001; 73; 54-9.
3. Ames A, Cryptococcosis. Microbiology 2017.
4. Arastéh K, Staib F, Futh G, L'Age M. Cryptococcosis in HIV infection of man: an epidemiological and immunological indicator? Zentralbl Bakteriologie 1996; 284; 153-163.
5. Arenas R, Micología Médica Ilustrada. 4ª edición. Mc Graw Hill editorial 2011; 351-364.
6. Argüero LB, Garza-Garza D, Flores-UV, Cervantes-Olivares RA. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. Revista Iberoamericana de Micología 1999; 16; 40-42.
7. Barchiesi F, Cogliati M, Esposto MC, Spreghini E, Schimizzi AM, Wickes BL, Scalise G, Vivian MA. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. Journal of Infection 2005; 51; 10-16.
8. Baró T, Torres-Rodríguez JM, Morena Y, Alia C, López O, Méndez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J Clin Microbiol 1999; 37; 1170-2.
9. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 3a ed. Mc Graw Hill 2010; 303-315.
10. Botts MR, Hull CM. Dueling in the lung: How *Cryptococcus* spores race the host for survival. PMC 2011.
11. Boulware DR, Meya DB, Muzoora C, Rolfes MA, Huppler-Hullsiek K, Musubire A, Taseer K, Nabeta HW, Schutz C, Williams DA, Rajasingham R, Rhein J, Thienemann F, Lo MW, Nielsen K, Bergemann TL, Kambugu A, Manabe YC, Janoff EN, Bohjanen PR, Meintjes G. Timing of antiretroviral therapy after diagnosis of cryptococcal meningitis. The New England Journal of Medicine 2014; 370; 2487-2498.
12. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Díaz MR, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld HL,

- Boekhout T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. FEMS 2006; 6; 599-607.
13. Brito-Santos F, Gonçalves-Barbosa G, Trilles L, Martins-Nishikawa M, Wanke B, Meyer W, Carvalho-Costa FA, Lazéra M. Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin. PLoS ONE 2015; 10; e0115866.
 14. Buschke. Über eine durch coccidien hervorgerufene Krankheit des Menschen. Dtsch Arztebl Int 1895.
 15. Busse. Über *Saccharomyces hominis*. Virchows Arch 1895.
 16. Cameron ML, Bartlett JA, Gallis HA, Waskin HA. Manifestations of pulmonary cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Rev Infect Dis 1991; 13; 64-67.
 17. Carrada-Bravo T. Criptococosis en la era del sida. Revista Mexicana de Patología Clínica 2003; 50; 33-40.
 18. Casadevall A, Rosas A, Nosanchuk J. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Current Opinion in Microbiology 2000; 3; 354-358.
 19. Casillas-Vega NG. Fenotipificación y Genotipificación del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* en aislamientos clínicos en el noreste de México. Tesis de Maestría en Ciencias Microbiológicas. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey 2012.
 20. Castañón-Olivares L. R. Criptococosis. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de medicina, UNAM. 2017.
 21. Castañón-Olivares LR. Estudio de la diversidad del complejo de especies *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México 2009.
 22. Castañón-Olivares LR, Arreguín-Espinosa R, Ruíz-Palacios G, López-Martínez AR. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. Revista Latinoamericana de Microbiología 2000; 42; 35-40.
 23. Castañón Olivares LR, Sánchez-Paredes E, Arreguín-Espinosa RA, Ruíz-Palacios

- G, Carmona A, López Martínez AR. Aislamiento de *Cryptococcus albidus* en árboles de eucalipto. *Revista Mexicana de Micología* 2007; 25; 12-25.
24. Celis-Aguilar E., Macias-Valle L, Coutinho-De Toledo H. Auditory neuropathy secondary to cryptococcal central nervous system infection in 2 immunocompromised Patients. *American Academy of Otolaryngology* 2012; 147; 597–598.
 25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preventing Deaths Due to *Cryptococcus* with Targeted Screening.
 26. Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35; 3340-3342.
 27. Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* 1994; 14; 4912-4919.
 28. Chaskes S, Tyndall R, Pigment production by *C. neoformans* from ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. *J. Clin Microbiol.* 1975; 1; 509-514.
 29. Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996, 3; 570–574.
 30. Chen SC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, Kidd SE, Bak N, Currie B Hajkovicz K, Korman TM, McBride WJ, Meyer W, Murray R, Sorrell TC. Clinical manifestation of *Cryptococcus gattii* infection: Determinants of neurological sequelae and death. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55; 789-798.
 31. Cherniak R, Morris LC, Belay T, Spitzer ED, Casadevall, A. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. *Infect. Immun.* 1995; 63, 1899–1905.
 32. Closets F, Barrabes A, Cotty F. Mycoses et parasitoses opportunistes au cours du SIDA. *Mycology Medic* 1989; 18; 97.
 33. Department of Health and human Services, USA. CS220776A. February 2011.
 34. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS* 2004;18; 555-562.

35. Edman JC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the URA5 gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol Cell Biol.* 1990; 10; 4538-4544.
36. Ellis DH. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. *J. Clin. Microbiol* 1987; 25; 430-431.
37. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28; 1642–1644.
38. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg* 1955.
39. Escandón P, Ngamskulrungrroj P, Meyer W, Castañeda E. In vitro mating of Colombian isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Biomédica* 2007; 27; 308-314.
40. Evans EE. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J. Immunol.* 1950; 64; 423-430.
41. Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* 2000; 68; 4225–4237.
42. Ferreira AS, Sampio A, Maduro AP, Silva I, Teles F, Martins ML, Inácio J. Genotypic diversity of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Northern Portugal. *Mycoses* 2014; 57; 98–104.
43. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 2012; 484; 186-194.
44. Fonseca Á, Boekhout T, Fell JW *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. *The Yeasts, A Taxonomic Study* 5th edn. Amsterdam Elsevier 2011; 1661–1737.
45. Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005; 437; 1360-1364.
46. Fraser JA, Heitman J. Evolution of fungal sex chromosomes. *Mol. Microbiol.* 2004;

- 51; 299–306.
47. Fraser JA, Subaran RL, Nichols CB, Heitman J. Recapitulation of the Sexual Cycle of the primary Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: Implications for an Outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic cell* 2003; 2; 1036-1045.
 48. Gaona-Flores V, Cervantes-Tovar R-M, Zaldivar PG, Martínez EA. Meningitis due to *Cryptococcus neoformans*: Treatment with Posaconazole. *Current HIV Research* 2012; 10; 620-623.
 49. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13; 122–143.
 50. Guevara-Silva EA, Ramírez-Crescencio MA, Soto-Hernández JL, Cárdenas G. Central nervous system immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS: Experience of a Mexican neurological centre. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2012; 114; 852-861.
 51. Hagen F, Chowdhary A, Prakash A, Yntema J-B, Meis JF. Molecular characterization of *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII isolated from Woody debris of divi-divi (*Caesalpinia coriaria*), Bonaire, Dutch Caribbean. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31; 193–196.
 52. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parnmen S, Lumbsch T, Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Journal Fungal Genetics and Biology* 2015; 78; 16-48.
 53. Halliday CL, Bui T, Krockenberger M, Malik R, Ellis DH, Carter DA. Presence of a and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *Journal of clinical microbiology* 1999; 37; 2920–2926.
 54. Halliday CL, Carter DA. Clonal Reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41; 703–711.
 55. Hansong M, Robin M. Chapter 5. Virulence in *Cryptococcus* Species. In: Laskin Allen I, Sima S, Geoffrey GM, editors: *Advances in Applied Microbiology*, vol. 67. Burlington: Academic Press 2009; 131-190.

56. Hardy J. The recent *Cryptococcus gattii* outbreak. A deadly pathway: From Trees to Lungs to Brain. Santa Maria 2017.
57. Heitman J, Carter DA, Dyer PS, Soll DR. Sexual Reproduction of Human Fungal Pathogens. Cold Spring Harb Perspect Med 2014; 4; 1-19.
58. Hu G, Liu I, Sham A, Stajich JE, Dietrich FS, Kronstad JW. Comparative hybridization reveals extensive genome variation in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. Genome Biol. 2008; 9; R41.
59. Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. Annual Review of Genetics 2002; 36; 557–615.
60. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 2002; 40; 1214–1218.
61. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, MacDougall L, Boekhout T, Kwon-Chung JK, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). PNAS 2004; 101; 17258–17263.
62. Kozel TR, Gotschlich EC. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. J. Immunol. 1982; 129; 1675–1680.
63. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D’Souza CA, Griffiths JI. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. Nat Rev Microbiol. 2011; 9; 193-203.
64. Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 1975; 67; 1197–1200.
65. Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia 1976; 68: 943–946.
66. Kwon-Chung KJ. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 1976; 68; 821–833.
67. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov: serotype B–C of *Cryptococcus neoformans*. International Journal of Systematic Bacteriology 1978; 28; 616–620.

68. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of a and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* 1978; 108; 337–340.
69. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology* 1982; 15; 535-537.
70. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120; 123–130.
71. Kwon.Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Díaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *TAXON* 2002; 52; 804-806.
72. Lazera MS, Pires FD, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Becerra CC, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Mycol* 1996; 34; 127–131.
73. Lengeler KB, Wang P, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Identification of the MATa mating-type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A MATa strain thought to have been extinct. *PNAS* 2000; 97; 14455–14460.
74. Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun*, 2001; 69; 115–122.
75. Lengeler KB, Fox DS, Fraser JA, Allen A, Forrester K, Dietrich FS, Heitman J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: A step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryotic Cell* 2002; 1; 704–718.
76. Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7; 186–196.
77. Li W, Averette AF, Desnos-Ollivier M, Ni M, Dromer F, Heitman J. Genetic diversity and genomic plasticity of *Cryptococcus neoformans* AD hybrid strains. *G3 (Bethesda)* 2012; 2; 83 – 97.
78. Lin X, Hull CM, Heitman J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature* 2005; 434; 1017 – 1021.
79. Littman ML, Borok R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: Natural carrier

- state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 1968; 35; 329-345.
80. Litvintseva AP, Lin X, Templeton I, Heitman J, Mitchell TG. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. *PLOS Pathogens* 2007; 3; e114.
81. Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley R, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Mirand M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Pertea M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. The Genome of the Basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 2005; 25; 1321–1324.
82. López-Martínez R, Castañón-Olivares LR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from natural sources. First International Conference on *Cryptococcus-Cryptococcosis*. Jerusalem, Israel 1989.
83. Madrenys N, De Vroey C, Wuytack CR, Torres-Rodriguez JM. Identification of the perfect state of *Cryptococcus neoformans* from 195 clinical isolates including 84 from AIDS patients. *Mycopathologia* 1993; 123; 65–68.
84. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, y el grupo de estudio criptococcal de IberoAmerica. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9; 189-195.
85. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis*. 2003 ;36; 789-794.
86. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8; 515-548.

87. Olszewski, MA, Noverr MC, Chen, GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am. J. Pathol.* 2004; 164; 1761–1771.
88. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Minh-Hong OL, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50; 291–322.
89. Phadke SS, Feretzaki M, Aplen-Clancey S, Mueller O, Heitman J. Unisexual Reproduction of *Cryptococcus gattii*. *PLOS ONE* 2014; 9; e111089.
90. Pickering LK, Peter G, Baker C, Gerber MA, MacDonald MD. Infecciones por *Cryptococcus neoformans*. En: *Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Informe del Comité de Enfermedades Infecciosas de la American Academy of Pediatrics* 25a ed. Médica Panamericana 2001; 210-211.
91. Programa de Estaciones Meteorológicas del Bachillerato Universitario (Red PEMBU), UNAM; <http://www.ruoa.unam.mx/pembu/estaciones%20PEMBU.html>
92. Rakesh V, Schweitzer AD, Zaragoza O, Bryan R, Wong K, Datta A, Casadevall A, Dadachova E. Finite-Element Model of Interaction between Fungal Polysaccharide and Monoclonal Antibody in the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *J. Phys. Chem.* 2008; 112; 8514–8522.
93. Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia AI, Davel G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Med Mycol.* 2009; 47; 177-184.
94. Rendón-Rojas MC. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excreta de paloma y gallina. Tesis profesional de Químico Farmacéutico Biólogo. ENEP Cuautitlan Izcalli, UNAM 1986.
95. Ribeiro MA, Ngamskulrungrroj P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in vitoria, es, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2008; 50; 315-320.
96. Rippon JW. Criptococosis. En: *Micología Médica*. 3a ed. Interamericana McGraw-

- Hill 1990; 629-9.
97. Rosario I, Hermoso M, Deniz S, Soro G, Alamo I, Acosta B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloac of pigeons. *Mycoses* 2005; 48; 421-424.
 98. Rosas AL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997; 153; 265–272.
 99. Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in nature site. *Infection and immunity* 1981; 21; 560-563
 100. Ruiz A, Neilson JB, Bulmer GS. A one year study on the viability of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Mycopathología* 1982; 77: 117-122.
 101. Safelice F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann Ig* 1894;4:463–95.
 102. Santangelo RT, Nouri-Sorkhabi, MH, Sorrell TC, Cagney M, Chen SC, Kuchel PW, Wright LC. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J. Med. Microbiol.* 1999, 48; 731–740.
 103. Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR. Criptococosis. En: *Enfermedades Infecciosas. Bases Clínicas y Biológicas.* 5a ed. McGraw-Hill Interamericana 1999; 200-201.
 104. Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14; 42-43.
 105. Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: Historical curiosity to modern pathogen. PMC 2014.
 106. Staib F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D. C.) (Farbreaktion fur *C. neoformans*). *Z. Hyg* 1962; 148; 466-475.
 107. Staib F, Grave B, Altman L, Mishra SK, Abel T, Blisse A. Epidemiology of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1978; 18; 73-76.
 108. Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J* 2002; 43; 792–794.
 109. Sun S, Billmyre RB, Mieczkowski PA, Heitman J. Unisexual reproduction drives

- meiotic recombination and phenotypic and karyotypic plasticity in *Cryptococcus neoformans*. PLOS Genetics 2014; 10; 1-21.
110. Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99; 3165–3170.
111. Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Part II *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Ann. Soc. belge Méd. trop. 1970; 50; 695-702.
112. Van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill, JR, Sobel JD, Johnson PC, Tuazon CU, Kerkering T, Moskovitz BL, Powderly WG, Dismukes WE. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1997; 337; 15-21.
113. Vázquez-Tsuji O, Martínez-Barbabosa I, Campos-Rivera T. Criptococosis. Historia natural y estado actual del tratamiento. Acta Pediátrica de México 2005; 26; 18-28.
114. Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. Dirección General de Epidemiología (DGE): http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN_DIA_MUNDIAL_2016a.pdf
115. Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60, 3864–3866.
116. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. Infect Immun 1995; 63; 3131-3136.
117. Wickes BL, Moore TD, Kwon-Chung KJ. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Microbiol 1994; 140; 543–550.
118. Wickes BL, Mayorga ME, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α -mating type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93; 7327-7331.
119. Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc. Soc. exp. Biol. 1968; 127; 820-830.

120. Wilson JW. Cryptococcosis (Torulosis, European blastomycosis, Busse-Buschke's Disease). Escuela de medicina, Universidad del sur de California 1956; 445.
121. Xu J, Luo G, Vilgalys RJ, Brandt ME, Mitchell TG. Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. Microbiology 2002; 148; 203-212.
122. Yoshikawa TT, Fujita N. Management of central nervous system cryptococcosis. West J Med 1980; 132; 123-133.

12. Anexo

Medio glucosado de Sabouraud

Utilizado universalmente para la identificación sistemática de hongos.

Fórmula:

Glucosa cruda	4g
Peptona granulada	1g
Agar agar	2 g
Agua destilada	100 mL

Fórmula modificada con antibiótico:

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar agar	0 g
agua destilada	1000 mL
Penicilina	20 U/mL
Estreptomina	40 µg/µL
Cloranfenicol	1 mg/mL

Medio agar-dextrosa-urea (Bioxon®)

Utilizado para observar la producción de ureasas de *Cryptococcus sp.*

Fórmula:

Dextrosa	1 g
Peptona	1 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Fosfato monopotásico	2g
Urea	20 g
Rojo fenol	0.012g
Agua destilada	1000 mL

Se disuelven 29 g del polvo en 100 ml de agua purificada y se esteriliza por filtración. Se disuelve por ebullición 15 g de agar en 900mL de agua destilada y se esteriliza. Después de enfriar se añade la solución de urea y se lleva a un pH final de 6.2 ± 0.2 .

Agar semilla de niger con y sin antibiótico

Medio selectivo para la identificación y aislamiento de *Cryptococcus* sp. en el cual, las colonias adquieren un color marrón oscuro por la degradación de compuestos fenólicos del medio y la síntesis de melanina en el hongo.

Fórmula:

Semilla de niger o alpiste negro (*Guizotia abyssinica*) pulverizado, 70 g

Agar bacteriológico 20 g

Penicilina 20 U/mL

Estreptomina 40 µg/µL

Cloranfenicol 1 mg/mL

Agua destilada 1000 mL

Se remoja el alpiste negro en 1L de agua, se hierve 30 min y luego se filtra en gasa y papel filtro. Se pone el volumen a 1L de agua y se esteriliza a 120°C por 20 min. En caso de utilizarlo con antibiótico, se le agrega después de la esterilización.

Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol:

Para diferenciar *C. neoformans* de *C. Gatti*. La L-canavanina inhibe el crecimiento de *C. neoformans*. De las cepas serotipo A, 60% son resistentes a L-canavanina, pero no asimilan la glicina presente en el medio.

Fórmula:

Solución A:

Glicina 10 g

Fosfato monopotásico (KH₂PO₄) 1 g

Sulfato de magnesio (MgSO₄) 1 g

Tiamina-HCl 1 mg

Sulfato de L-canavanina 30 mg

Agua destilada 100 mL

Se disuelven los ingredientes y se esterilizan por filtración (0.45 µm) a un pH de 5 a 6.

Solución B:

Azul de bromotimol 0.4g

Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.01N 64 mL

Agua destilada 36mL

Se mezclan y esterilizan a 15 lb por minuto 20 g de agar, 20 mL de la solución B y 880 mL de agua destilada. Esta se enfría a 50°C y se agregan 100 mL de la solución A mezclándolo bien.

La lectura se realiza a las 72 h; *C. neoformans* no desarrolla crecimiento ni coloración en el medio (que normalmente es amarillo-dorado), *C. gattii* crece y cambia de color el medio a azul cobalto por modificaciones de pH.

Tinción inversa con tinta china ⁵

Para visualizar a *Cryptococcus* sp. en el microscopio óptico.

La tinta china se emplea en una dilución 1:2 con agua destilada.

Se coloca una gota del producto biológico por examinar en un portaobjetos con una gota de tinta china y se coloca el cubreobjetos.

(Arenas Roberto, 2011).

Tinción Gram ⁵

Se prepara un frotis de una pequeña porción de levaduras en cultivo o directamente del producto biológico y se fija a la flama.

Se colorea con cristal violeta durante un minuto y se lava con agua destilada.

Después, se cubre la muestra con lugol y se deja durante un minuto.

Se lava y se decolora rápidamente con alcohol-acetona. Nuevamente se lava ligeramente con agua destilada.

Cubrir la muestra con safranina y dejar durante 15 segundos.

Lavar nuevamente para finalizar.

Extracción del DNA con kit DNeasy® Plant.

1. Romper el tejido del ejemplar fúngico (≥ 100 mg de peso húmedo o ≥ 20 mg de tejido liofilizado) usando el Tissue Ruptor, the Tissuelyser o un mortero.
2. Añadir 400 uL de Buffer AP1 y 4 uL de RNase A. Agitar en el vortex e incubar durante 10 min a 65°C. Invertir el tubo 2 o 3 veces durante la incubación. Nota: no hacer la mezcla de los buffers antes de usarse.

3. Agregar 130 uL de Buffer AP2. Mezclar e incubar por 5 min en hielo. Recomendación: Centrifugar el lisado por 5 min a 20 000 x g (14 000 rpm).
4. Pipetear el lisado en una columna QIAshredder Mini spin, 2 ml en un tubo recolector. Centrifugar por 2 min a 20 000 x g (14 000 rpm).
5. Transferir la fracción acuosa en un tubo nuevo sin perturbar el sedimento. Añadir el volumen de 1.5 de Buffer AP3/E y mezclar pipeteando.
6. Transferir 650 uL de la mezcla en una columna DNeasy Mini spin en un tubo recolector de 2 ml. Centrifugar por un min. ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Descartar el filtrado. Repetir este paso con la muestra restante.
7. Coloque la columna de centrifugación en un nuevo tubo recolectores de 2 ml. Agregue 500 microlitros de Buffer AW, y centrifugar por 1 minuto a ≥ 6000 x g. Descartar el filtrado.
8. Añadir otros 500 microlitros de Buffer AW. Centrifugar por 2 min. a 20 000 x g. Nota: remover la columna de centrifugación del tubo recolector cuidadosamente de tal modo que ésta no entre en contacto con el fluido.
9. Transferir 1.5 ml de la columna de centrifugación en un nuevo tubo colector de 2 ml, y agregar 100 microlitros de Buffer AE por elución. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente. Centrifugar por un minuto a ≥ 6000 x g. Repetir este paso. (QIAGEN, 2006).