UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO DE *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE FUENTES NATURALES EN LA ALCALDÍA GUSTAVO A. MADERO, CIUDAD DE MÉXICO, UNA APROXIMACIÓN A SU HÁBITAT NATURAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

YURIXHI PAOLA AGUILERA LEÓN

ASESORA DRA. EDITH SÁNCHEZ PAREDES

Ciudad Universitaria CD. MX. 2022

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Agradecimientos

Este trabajo pudo llevarse a cabo gracias al apoyo de distintas instituciones que hicieron posible su culminación metodológica, por eso expreso mi agradecimiento para el Instituto Científico Pfizer y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA206619 por el apoyo para la compra de materiales y sobre todo por la beca otorgada.

Gracias al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por su colaboración para la investigación, especialmente a la Q.F.B. Verónica Ángeles Morales y al Dr. José Luis Soto Hernández por su tiempo y disposición.

Un agradecimiento especial a la Biol. Elva Bazán Mora y a la Q.F.B Erika Córdova Martínez por su apoyo, paciencia y dedicación en el asesoramiento técnico en materia de identificación morfológica y molecular de hongos microscópicos.

Muchas gracias a la Dra. Laura Rosio Castañón por aceptarme dentro de su línea de investigación, por sus conocimientos y tiempo brindados, por su dedicación y apoyo en la organización y gestión de los muestreos ambientales.

Gracias totales a mi asesora la Dra. Edith Sánchez Paredes por todo el apoyo académico y personal brindado, por creer en mí y alentarme a concluir este trabajo de la mejor manera posible, por todo el tiempo dedicado, por su paciencia e interés en mi aprendizaje y desarrollo profesional.

Finalmente agradezco a mi familia y seres queridos por apoyarme siempre, sobre todo en los momentos más difíciles por no permitir que me rindiera, por sus palabras de aliento y por sentirse orgullosos de mí. A todos, ¡Muchas gracias!

ÍNDICE

1 Introducción 1

1.1 Reseña histórica 1

1.2 Género Cryptococcus 1

1.2.1 El complejo C. neoformans/C. gattii 2

1.2.2 Genotipos del complejo C. neoformans/C. gattii 3

1.3 Ecología 4

1.3.1 Hábitat natural de Cryptococcus gattii 7

1.4 Patogenicidad y Factores de Virulencia 9

1.5 Criptococosis 12

1.5.1 Inmunología 14

1.5.2 Criptococosis causada por Cryptococcus gattii. 15

1.6 Técnicas moleculares aplicadas al estudio del complejo C. neoformans/C. gattii 16

2 Planteamiento del Problema 18

3 Hipótesis 19

4 Objetivos 19

4.1 General 19

4.2 Particulares 19

5 Materiales y Metodología 20

5.1 Obtención de datos 20

5.1.1 Datos clínicos 20

5.1.2 Datos de desplazamiento 20

5.2 Registro de árboles y tamaño de muestra 20

5.3 Muestreo 21

5.4 Procesamiento de muestras 22

5.4.1 Hongos filamentosos 22

5.4.2 Análisis de hongos filamentosos asociados a colonias marrón 22

5.4.3 Colonias levaduriformes 23

5.5 Pruebas de identificación 24

5.5.1 Síntesis de melanina 24

5.5.2 Hidrólisis de urea Christensen en tubo 24

5.5.3 Termotolerancia a 37°C 24

5.5.4 Resistencia a la L-canavanina 25

5.6 Genotipificación molecular por PCR-RFLP 25

5.6.1 Extracción de ADN 25

5.6.2 Amplificación del gen URA5 26
5.6.3 Doble digestión con enzimas de restricción 27
5.6.4 Genotipificación de la muestra clínica del paciente. 28

6 Resultados 28

6.1 Obtención de datos 28
6.1.1 Datos clínicos del paciente 28
6.1.2 Datos de desplazamiento del paciente 29

6.2 Registro de árboles y tamaño de muestra 29

6.3 Muestreo 30

6.4 Procesamiento de muestras 32
6.4.1 Hongos filamentosos 32
6.4.2 Hongos filamentosos 35
6.4.3 Análisis de hongos filamentosos asociados a colonias marrón 38
6.4.4 Colonias levaduriformes 43

6.5 Pruebas de identificación 46
6.5.1 Síntesis de Melanina 46
6.5.2 Hidrólisis de urea de Christensen en tubo 47
6.5.3 Termotolerancia a 37°C 48
6.5.4 Resistencia a la L-Canavanina 49

6.6 Genotipificación molecular por PCR-RFLP 51
6.6.1 Extracción de ADN 51
6.6.2 Amplificación del gen URA5 52
6.6.3 Doble digestión con enzimas de restricción 53
6.6.4 Genotipificación muestra clínica del paciente. 54

7 Discusión 55

8 Conclusiones 68

9 Anexo I 69

10 Referencias 73

Abreviaturas

SNC - Sistema Nervioso Central

LCR- Líquido cefalorraquídeo

ADN - ácido desoxiribonucleico

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés (Polymerase chain reaction)

RFLP- Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (Restriction fragment length polymorphism)

AFLP - Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica (Amplified fragment length polymorphism)

URA5 **-** Gen que codifica para la enzima orotidina-monofosfato pirofosforilasa de *Cryptococcus* spp.

GXM - Glucoroxilomanano, componente polisacárido estructural de la cápsula de *Cryptococcus*

GXM-gal - Glucoronoxilomanano - galactano, componente polisacárido estructural de la cápsula de *Cryptococcus*

VIH - Virus de Inmunodeficiencia Humana

SIDA- Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida

ADS - Agar Dextrosa Sabouraud

CGB - Medio Canavanina Glicina azul de Bromotimol

INNN- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez.

UFC- Unidad formadora de colonia

OTU- Unidad taxonómica operativa

1 Introducción

1.1 Reseña histórica

Cryptococcus es un género de hongos unicelulares que fue aislado y descrito por primera vez en 1894 a partir de jugo de melocotón por el Profesor Sanfelice, quien le asignó el nombre de *Saccharomyces neoformans*. A partir de entonces, surgieron más investigaciones acerca de este organismo describiendo así su carácter patógeno, al ser aislado de lesiones cutáneas en tibia por el patólogo Busse en 1895 y presentar tropismo hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) que fue descrito por el Doctor Versé en 1914. Después de distintos cambios en la nomenclatura, el nombre *Cryptococcus* fue designado por los Micólogos Vuillemin y Benham (Kwong-Chung et al., 2014) a partir de la etimología del griego *Krypto* (escondido u oculto) y *kokkos* (esfera) "esfera oculta". Actualmente se propone una clasificación como complejo de especies dentro del género *Cryptococcus*, basada principalmente en diferencias genéticas en ciertas regiones del genoma como el gen URA5, ITS entre otros. (Perfect y Casadevall 2002; Kwong-Chung et al., 2014; Hagen et al., 2015; Kwong-Chung et al., 2017).

1.2 Género *Cryptococcus*

El género *Cryptococcus* pertenece al phylum Basidiomycota, subphylum Agaricomicotina, familia *Tremellales* (en su estado anamorfo) dentro de este género se han descrito 38 especies (Kwong-Chung et al., 2014). El género está constituido microscópicamente por levaduras redondas u ovales, que desarrollan una cápsula de tamaño variable dependiendo de las condiciones de crecimiento, estas levaduras no fermentan azúcares, pero asimilan la dextrosa, galactosa, maltosa y sacarosa, además pueden llevar a cabo la hidrólisis de la urea; en situaciones particulares de estrés tienden a desarrollar pseudofilamentos (Bonifaz 2010). Al cultivarse en agar Dextrosa Sabouraud, las colonias suelen ser blancas o blanco- amarillentas, lisas y brillantes y pueden tomar una apariencia mucoide o escurrente (Arenas 2003).

El género *Cryptococcus* también presenta una fase sexual (teleomorfa), la cual ha sido descrita dentro de la familia *Filobasidiellae* con morfología filamentosa, en donde se desarrollan hifas dicarióticas de las cuales surgen los basidios unicelulares (holobasidios) con un ápice globoso que dan origen a cuatro cadenas de basidiosporas que pueden ser ovoides o alargadas con pared rugosa o lisa (Kwong- Chung 1975).2

1.2.1 El complejo *C. neoformans/C. gattii*

Desde 1970 se describió a *C. gattii* como una variedad de *C. neoformans* (De Vroey y Gatti 1989) utilizando características serológicas y diferencias fenotípicas de la fase sexual (Kwong-Chung 1976), posteriormente se sumó la aplicación de distintas técnicas moleculares con las que se determinó que *C. gattii* divergió de *C. neoformans* hace 16 a 160 millones de años (Chen et al., 2014) y en este periodo desarrollaron diversidad genética intra-especie, sin embargo, la existencia de híbridos con serotipos AB y BD inter-especie condujo a la formulación de un complejo de especies (Meyer y Trilles 2010). A pesar de las variaciones importantes halladas en el genoma de *C. gattii* (D´Souza et al., 2011) y de la propuesta de separar al grupo en siete especies distintas (Hagen et al., 2015), el manejo de una nomenclatura basada en la existencia de un complejo de especies sigue vigente, ya que no se ha establecido un consenso entre la comunidad científica (Kwong- Chung K. et al., 2017).

Dentro del género *Cryptococcus* el complejo de especies *Cryptococcus neoformans/ C. gattii* son consideradas patógenas para los humanos y otros mamíferos, aunque en raras ocasiones se han reportado otras especies del género como agentes causales de infección en humanos (Bonifaz 2018; Springer y Chaturvedi 2010; Tello et al., 2013). La patogenicidad de las especies del complejo está relacionada con la presencia de cápsula, producción de melanina, entre otras características que hacen posible la vida parasitaria facultativa de estas levaduras (Hull y Heitman 2002; Mada 2018). Las especies del complejo se diferencian de otras levaduras no patógenas del género *Cryptococcus* porque no utilizan la lactosa ni el nitrato de potasio y son capaces de crecer a 37° C (Bonifaz 2010). El tamaño y forma de las levaduras del complejo es variable dependiendo de la especie y del origen de los aislados, generalmente muestran una morfología redonda u oval con un diámetro frecuente de 4 a 12 µm, aunque existen reportes de aislados clínicos de levaduras de 1 a <30 µm de diámetro considerando el tamaño de la cápsula (Tello 2013; Fernandes 2016).

1.2.2 Genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii*

Según la clasificación actual, el complejo de especies comprende dos: *C. neoformans* y *C. gattii* con serotipos A, D y AD para la primera y serotipos B y C para la segunda especie (Kwon- Chung et al., 2002; Hagen et al., 2015). Durante los últimos años se ha demostrado mediante varias técnicas moleculares como AFLP, *PCR- fingerprinting* y RFLP, que existe una considerable heterogeneidad genética, por lo que se han designado subtipos dentro del complejo *C. neoformans/C. gattii* en donde se proponen las siguientes divisiones: *C. neoformans* (serotipo A) con 3 genotipos (VNI, VNII, VNB); *C. deneoformans* (serotipo D o VNIV); y otras 5 especies: *C. gattii, C. bacillisporus, C. deuterogattii, C. tetragattii y C. decagattii* (serotipos B o C y con genotipos VGI, VGII, VGIV, VGII y VGIV respectivamente) (Meyer et al., 1999; Boekhout et al., 2001; Meyer et al., 2003; Hagen et al., 2015; Maziarz y Perfect 2016). En la figura 1 se esquematizan todos los genotipos del complejo de especies de *Cryptococcus* según las distintas técnicas moleculares mencionadas, estas variedades difieren en fenotipo, genotipo y epidemiología, así como en área geográfica de distribución y hábitat natural (Granados y Castañeda 2004). Basado en análisis de tipificación de secuencias multilocus, *C. gattii* se ha clasificado en 5 tipos moleculares principales: VGI (AFLP4), VGII (AFLP6), y VGIV (AFLP10) que portan el serotipo B y VGIII (AFLP5) y VGIV (AFLP10) con el serotipo C (Ren et al., 2006; Hagen et al., 2015). Con estos hallazgos se ha observado que aproximadamente el 95% de las infecciones criptocócicas son causadas por *C. neoformans* (serotipo A), mientras que el 4 a 5% restante de infecciones son causadas por *C. neoformans* (serotipo D) o *C. gattii* (serotipos B/C) (Maziarz y Perfect 2016). Aunque esta clasificación ha sido útil en la vigilancia epidemiológica de la criptococosis, en la práctica clínica son raras las ocasiones en las que se hacen pruebas para determinar la especie o subtipo molecular, ya que estos datos generalmente no son relevantes para el tratamiento de los pacientes.

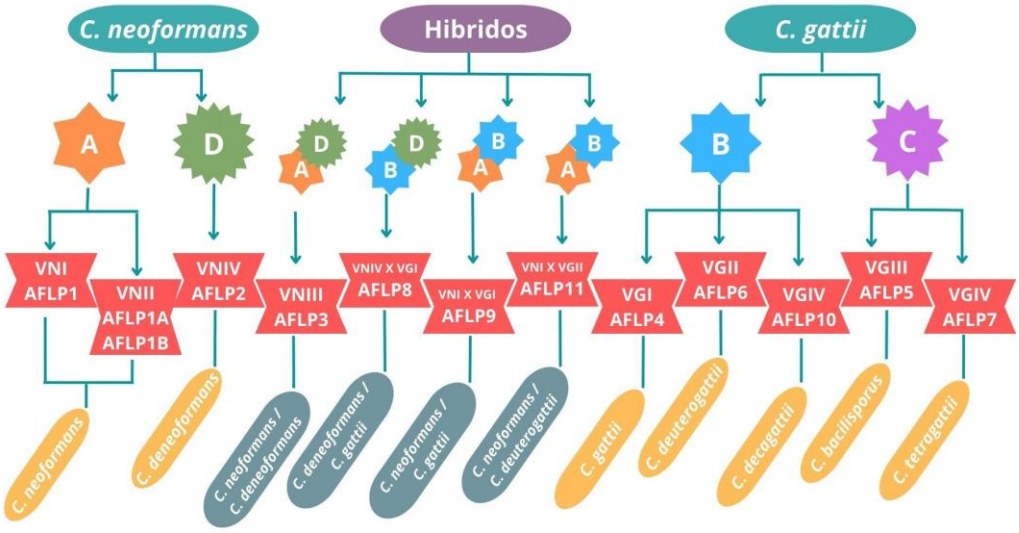


Figura 1. Complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, se muestran cuatro serotipos y sus relaciones de apareamiento (viñetas), ocho perfiles obtenidos por RFLP y once perfiles con AFLP (recuadros rojos). Siete especies propuestas por Hagen et al., 2015 y cuatro híbridos que solo han sido identificados mediante AFLP.

1.3 Ecología

Cryptococcus spp. Cuenta con características morfológicas y metabólicas que permiten su desarrollo en distintos ambientes. Aunque diferentes especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* han sido aisladas a partir de distintas especies de árboles (Grover et al. 2007; Randhawa, et al., 2011; Cattana et al., 2014; Schmertmann et al., 2019), se ha asociado puntualmente a *C. neoformans* con fuentes naturales ricas en nitrógeno como en suelos contaminados con guano de paloma (*Columba livia*) y otras especies de aves domésticas (González et al., 2010; Reiss et al., 2012), mientras que las especies de *C. gattii*, son frecuentemente aisladas a partir de detritus vegetales, específicamente en oquedades de árboles de diferentes especies de angiospermas y gimnospermas (Chaturvedi y Chaturvedi 2011; Springer et al., 2010; Schmertmann et al., 2019).

Estas fuentes naturales de donde se ha aislado a *Cryptococcus* sugieren su participación como organismo saprobio en el ecosistema, es decir, que este hongo es parte del proceso de reciclaje de nutrientes, degradando macromoléculas en moléculas más simples; esto se ha confirmado con el hallazgo de maquinaria metabólica que le confiere la capacidad de producir enzimas, como: lacasas, lipasas, proteasas y ADNasas (Almeida et al., 2015).

Gracias a los estudios de tipificación molecular, se ha determinado la distribución de los distintos genotipos de *C. neoformans* y *C. gattii* a nivel mundial, siendo el genotipo VNI el más prevalente en todo el mundo, excepto en Australia y Papúa Nueva Guinea donde se reporta una mayor prevalencia del genotipo VGI, en países del centro y sur de América el genotipo del complejo *C. gattii* reportado con mayor frecuencia es el VGIII (Cogliati 2013).

Lo anterior podría indicar una estrecha relación entre la abundancia de *Cryptococcus* con las condiciones ambientales tales como el clima, tipo de vegetación y temperatura de cada región geográfica, que son elementos importantes para el desarrollo de la levadura y otros organismos, asimismo hay características propias del hongo que garantizan su supervivencia en la naturaleza, pues se ha observado que ambas fases del hongo (saprobio y patógeno), se relacionan en un ciclo de vida que ocasionalmente involucra a los humanos dando pie al desarrollo de la criptococosis (Fig 2).

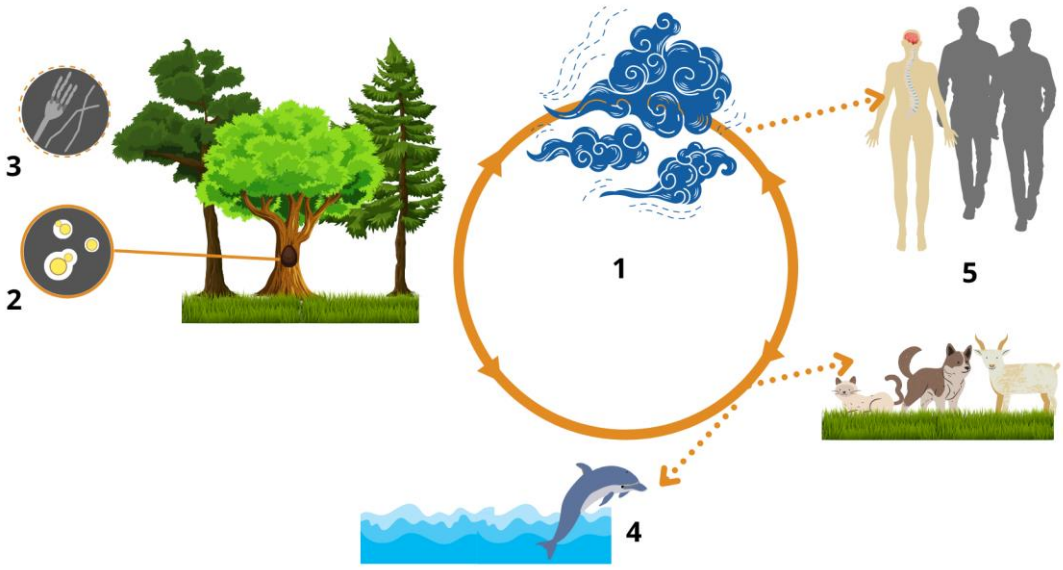


Figura 2. Ciclo natural propuesto para *C. gattii*. La información disponible indica que el hongo puede encontrarse en plantas, suelo, aire y agua (1). Las levaduras han sido aisladas de oquedades de árboles de diferentes especies (2). Sin embargo, la fase sexual solo se ha observado en condiciones de laboratorio, por lo que no se sabe si *C. gattii* completa su ciclo sexual en la naturaleza (3), solo un porcentaje reducido de mamíferos (4 y 5) que entran en contacto con levaduras desecadas o basidiosporas pueden desarrollar infecciones graves de pulmón y cerebro. (Modificado de Chaturvedi y Chaturvedi 2011).

Recientemente, con el empleo de técnicas de secuenciación masiva, se han reportado algunos géneros de hongos presentes en las oquedades de árboles en dónde también se encontraron diferentes especies de *Cryptococcus* (Vanhove et al., 2017; Schmertmann et al., 2019) esto toma relevancia ya que, tal como ocurre con otros microorganismos, las relaciones ecológicas tienen un impacto en el desarrollo de cualquier organismo, aunque no se ha identificado alguna correlación entre la presencia de otras especies de hongos con especies del complejo *C. neoformans/ C. gattii*, no debe descartarse la influencia de estos factores bióticos sobre la abundancia, distribución e incluso virulencia de la levadura. Con estos datos podríamos pensar que la capacidad patogénica de algunas especies de *Cryptococcus* tiene origen en las adaptaciones que le han conferido ventajas de supervivencia a uno o varios ambientes.

Curiosamente los elementos que permiten la patogénesis, conocidos como factores de virulencia son los mismos que el hongo utiliza como armas y escudos ante condiciones ambientales adversas, por ejemplo, las enzimas como la ureasa, tienen un papel fundamental en el aprovechamiento de nutrientes, ya que el amonio generado por la actividad ureolítica puede servir como fuente de nitrógeno adquiriendo una función nutricional en el hongo (Fu et al., 2018). La enzima fenoloxidasa participa en la producción de melanina, la acumulación de este pigmento en la pared celular confiere protección contra la radiación solar, ultravioleta y gamma, y reduce la toxicidad de metales pesados, facilitando el crecimiento del hongo sobre madera en descomposición al ser un sustrato rico en compuestos fenólicos y lignina (Trofa et al., 2011) además existe evidencia de que elementos genéticos en *C. gattii* tales como el factor de transcripción STE12**α** que participa en las vías de señalización en respuesta a diferentes estímulos ambientales, ya sea dentro de un hospedero o en el ambiente respondiendo con la regulación de la melanización para una óptima utilización del sustrato disponible (Ren et al. 2006). Las levaduras de *Cryptococcus* pueden sintetizar polisacáridos que forman una cápsula externa que le otorga la capacidad de vida intracelular efectiva contra amebas depredadoras, además de proteger a la célula de la desecación y estrés oxidativo (Casadevall et al., 2019).

Con estos datos podemos decir que lo que conocemos como factores de virulencia, no son más que características propias de algunas especies de *Cryptococcus* que han estado presentes desde el origen de estas levaduras, por lo que, al depositarse accidentalmente dentro

de los tejidos de un hospedero, estas especies activan los mismos mecanismos de supervivencia que en la naturaleza, y al repetirse sucesivamente estos eventos, la respuesta de estas levaduras ha sido adquirir aún más estrategias de protección con el único propósito de sobrevivir.

1.3.1 Hábitat natural de *Cryptococcus gattii*

C. gattii se aisló por primera vez en Australia y durante varios años se consideró como un organismo asociado principalmente a árboles de Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) (Ellis et. al. 1990) y no fue hasta nueve años después que se observó un cambio en su distribución al registrarse algunos brotes de criptococosis en áreas de Europa como la cuenca del Mediterráneo, Estados Unidos y en la Isla de Vancouver, Canadá, siendo este último uno de los brotes más importantes ocurrido en 1999, en donde se reportaron 218 casos de criptococosis (Byrnes y Marr 2011), lo que llevó a considerar la expansión del área geográfica de distribución de *C. gattii*. A partir de entonces, se han llevado a cabo numerosas investigaciones (Colom et al., 2012; Chen et al., 2014; Roe et al., 2018) relacionadas con la búsqueda de la fuente natural de *C. gattii*, hasta la fecha la lista de árboles a nivel mundial asciende a más de 50 especies pertenecientes a diversos géneros y familias de angiospermas y gimnospermas. En el cuadro 1 se muestran algunos géneros y especies de árboles con aislamientos positivos de la levadura en distintos países del mundo (Springer y Chaturvedi 2010; Morera et al., 2014; Maziarz y Perfect 2016).

Se ha descrito que las condiciones generales del hábitat natural de *C. gattii* como temperaturas altas durante el día (26 a 35 °C), humedad relativamente baja y precipitación pluvial escasa, deben mantenerse estables ya que su desarrollo puede verse afectado por variaciones en el pH, humedad, temperatura y luz solar, el requerimiento de cierta estabilidad de condiciones explica que esta levadura pueda encontrarse en los huecos de los troncos de árboles vivos, donde existen las condiciones para su desarrollo, indicando que este hongo no es exclusivo de materia en descomposición (Granados y Castañeda 2004; Colom et al., 2012; Randhawa et al., 2011).

No se ha considerado que la estacionalidad tenga un papel significativo en el aislamiento de *C. gattii*, porque aunque en algunos estudios se han reportado más aislamientos en temporada de lluvias (Colom et al., 2012), también se han recuperado mayor número de UFC en muestras de detritus de madera y aire en meses menos húmedos correspondientes al verano, se ha reportado además una variabilidad en la cantidad de aislamientos dependiendo de la especie del árbol del que se toman las muestras (Randhawa et al., 2011; Colom et al., 2012).

Cuadro 1. Diversos estudios en los que se muestra el aislamiento de *C. gattii* de diferentes especies de árboles en distintos países.

Autor	Lugar	Especies de árboles
Kidd, S. et al. 2007	Vancouver, Canadá	*Alnus* spp., *Cedrus spp., Pseudotsuga spp., Abies alba, Quercus garryana, Pinus* sp**.**
Cogliati, M. et al. 2016	Mediterráneo	*Ceratonia* sp., *Eucalyptus* sp., *Olea* sp., *Pinus* sp.
Randhawa 2003 **Grover et al. 2007**	India	*Cassia marginata, Mangifera indica, Pithecolobium dulce, Tamarindus indica, Syzygium cumini*
Schmertmann et al. 2019	Australia	*Eucalyptus camaldulensis, Angophora floribunda, Eucalyptus robusta, Eucalyptus tereticornis, Melaleuca* spp.,
Toro y Brevis 2015	Chile	*Prunus ceracifera artropurpurea, Eucalyptus camaldulensis*
Escandón et al. 2011	Colombia	*Corybia ficifolia, Terminalia catappa, Acacia decurrens, Croton bogotanus, Crupressus lusitánica, Ficus soatensis*
Cattana, et al. 2014 **Refojo et al. 2009**	Argentina	*Grevillea robusta, Tipuana tipu, Eucalyptus* sp, *Acacia visca, Ulmus campestris, Cupresus sempervirens, Cedrus deodara.*

1.4 Patogenicidad y Factores de Virulencia

La interacción que existe entre el hospedero y cualquier microorganismo puede clasificarse como positiva o negativa de acuerdo a la presencia o ausencia de daño, la enfermedad ocurre cuando el hospedero sufre el daño suficiente como para perturbar su homeostasis, de acuerdo a lo anterior el término patogenicidad se refiere a la capacidad de un microbio para causar daño en un hospedero, mientras que un factor de virulencia es definido como cualquier componente del patógeno que pueda causar daño en el hospedero (Casadevall y Pirovski 1999). En el caso particular de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* se han identificado y caracterizado los siguientes factores de virulencia que participan en el desarrollo de la criptococosis:

Cápsula: La cápsula es una de las características morfológicas particulares del género y uno de los factores de virulencia más estudiados dentro del complejo *C. neoformans/C. gattii* (Maziarz y Perfect 2016; Fernandes et al., 2016), la cápsula aporta cerca del 25% de la virulencia total según análisis de regresión lineal multivariada para determinar la contribución de diferentes factores de virulencia (Casadevall et al., 2019). Es una estructura que se encuentra sobre la pared celular, cubriendo toda la superficie de la levadura, presenta gran plasticidad morfológica debido a la presencia de dos complejos ramificados de los polisacáridos glucoronoxilomanano (GXM), compuesto de residuos de manosa con grupos laterales de xilosilo y glucoronilo y por otra parte glucoronoxilomanano-galactano (GXM gal) un polímero de galactosa unido a manosa, xilosa y ácido glucorónico (Casadevall et al., 2019; O´Meara y Alspaugh 2012). El modelo más aceptado propone que la producción de la cápsula ocurre mediante el transporte de estos azúcares del citoplasma hacia la pared celular a través de vesículas (Casadevall et al., 2019; Zaragoza 2019).

Existen variaciones en la estructura de la cápsula, que han sido observados por alteraciones en la unión de anticuerpos y por mediciones biofísicas que conducen a la heterogeneidad antigénica de acuerdo con el orden de cada uno de los residuos modificados en los polímeros de la cápsula (O´Meara y Alspaugh 2012). Las diferencias conformacionales de los polisacáridos dan lugar a características antigénicas que se han utilizado para definir los serotipos conocidos como A, B, C, D y AD, siendo A, D los serotipos de las especies dentro de *C. neoformans* y B, C los serotipos para las diferentes especies de *C. gattii,* lo anterior ha

tenido un papel importante como herramienta en el diagnóstico de la criptococosis, ya que a partir de estas características se han desarrollado diferentes pruebas serológicas (O´Meara y Alspaugh 2012; Casadevall et al., 2019).

La cápsula ha sido ampliamente estudiada entre otras cosas, por su papel en la patogénesis, pues se ha visto que desempeña funciones de protección, por ejemplo, cuando las levaduras se encuentran dentro de macrófagos, el glucoronoxilomanano, componente principal de la cápsula, reduce la producción de especies reactivas de oxígeno en los neutrófilos humanos, evitando la muerte de células criptocócicas. Además de esto, una de las respuestas que más se ha estudiado es el aumento de tamaño de esta estructura, y se ha observado que este proceso se desencadena al interactuar con células fagocíticas *in vivo* e *in vitro* (Voelz y May 2010; O´Meara y Alspaugh 2012) este engrosamiento de la cápsula inhibe la fagocitosis por macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Voelz y May 2010), además, la cápsula ayuda a las levaduras a evadir la respuesta inmune del hospedero ya que tanto el GXM como el GMX-gal alteran la producción de citocinas, afectando la maduración de células dendríticas y la presentación de antígenos (Elsegeiny et al., 2018; Zaragoza 2019). Otro mecanismo relacionado con la cápsula es el efecto de los polisacáridos capsulares sobre la viabilidad de algunos leucocitos, pues se ha probado que el GXM y el GXM-gal son potentes inductores de apoptosis (Zaragoza 2019), además se ha observado que la cápsula puede reducir la susceptibilidad a ciertos fármacos como el fluconazol en algunas cepas de *C. gattii* (Santos et al., 2014).

Melanina: La melanina es un pigmento marrón que se acumula en la pared celular de las especies patógenas de *Cryptococcus,* es sintetizado por la enzima fenoloxidasa a partir de hidroxifenoles (monofenoles, difenoles, L-dopa entre otros), que funcionan como sustrato (Almeida et al., 2015; Lee et al., 2019). La lacasa (fenoloxidasa) es codificada por los genes *LAC1* y *LAC2* (Zaragoza 2019), la síntesis de melanina ocurre mediante la acción de la fenoloxidasa que oxida los sustratos exógenos a su quitina correspondiente y estas son posteriormente sometidas a un reordenamiento espontáneo, seguido de una oxidación para formar monocromo y finalmente melanina, este proceso se encuentra regulado por los niveles de hierro, cobre y glucosa disponibles (Trofa et al., 2011), es por eso que los medios de cultivo que contienen compuestos fenólicos como el Agar Semilla de Niger, se emplean en el diagnóstico microbiológico de las especies patógenas *C. neoformans y C. gattii,* ya que

permite evidenciar el pigmento marrón de las colonias. La melanina es un factor de virulencia en el complejo *C. neoformans*/*C. gattii,* ya que se ha demostrado virulencia atenuada mediante la interrupción del gen *LAC1*, sin embargo, también existen reportes de cepas no melanizadas recuperadas de pacientes, en estos casos se propone la acción de los otros factores para crear un fenotipo virulento (Trofa et al., 2011).

La melanina contribuye al desarrollo de la infección promoviendo la supervivencia de las levaduras dentro de células fagocíticas y confiere protección contra especies reactivas de oxígeno eliminando los radicales libres (Esher et al., 2018), facilitando la supervivencia dentro de macrófagos alveolares (Samarasinghe et al., 2018), además las lacasas participan en el estallido oxidativo de los fagocitos al secuestrar y oxidar el hierro durante la infección (Esher et al., 2018).

Ureasas: Las ureasas son metaloenzimas dependientes de Ni que hidrolizan la urea para producir amonio y CO_2, son consideradas un importante factor de virulencia (Feder et al., 2015; Singh et al., 2013). Debido a que la urea se encuentra distribuida en todo el cuerpo humano, es concebible que los patógenos la utilicen como nutriente para su desarrollo (Fu et al., 2018). Algunos estudios indican que la producción de amonio ayuda a neutralizar microambientes ácidos, lo que favorece la supervivencia dentro de los fagolisosomas en macrófagos (Feder et al., 2015). También se ha observado que la presencia de ureasas puede promover el secuestro de levaduras en los microcapilares de la barrera hematoencefálica, facilitando la transmigración a través de las células, desencadenando la invasión al cerebro y a todo el SNC, esto ha sido demostrado en ratones infectados con levaduras modificadas de *Cryptococcus neoformans* con deleción en el gen *URE1,* que manifestaron una disminución en la carga fúngica en el tejido cerebral (Singh et al., 2013; Morrow y Fraser 2013; Feder et al., 2015).

Termotolerancia: Si bien, actualmente se ha estimado que existen cerca de 12 millones de especies de hongos, utilizando técnicas independientes del cultivo (Wu et al. 2019) solo una parte de estos son capaces de crecer a temperaturas elevadas incluyendo la temperatura corporal (37°C) (Köhler et al., 2015).

Se ha demostrado que la termotolerancia a 37°C puede proteger el material genético de las levaduras contra la acumulación de mutaciones perjudiciales, cumpliendo una función de

resguardo de la estabilidad genómica más allá de contribuir a la patogénesis (Esher et al., 2018). Los componentes de la respuesta antioxidante como la enzima superóxido dismutasa de manganeso y la trehalosa son importantes para el crecimiento a altas temperaturas (Petzold et al., 2006), además de que la termotolerancia de *Cryptococcus sp.* se encuentra mediada por diferentes vías de señalización, una de las más estudiadas es la vía de *Ras1/Ras2* y la proteína calcineurina, ésta se activa en respuesta al estrés térmico estimulando la expresión de genes necesarios para el crecimiento y supervivencia a 37°C (Shourian y Quereshi 2019).

Vida intracelular: Se ha documentado que las levaduras de las especies patógenas de *Cryptococcus* pueden sobrevivir y reproducirse dentro de macrófagos alveolares y células epiteliales del pulmón (Sabiiti y May 2012). Existe la hipótesis de que la internalización de levaduras dentro de macrófagos aumenta la virulencia y evasión inmunológica dentro de un hospedero, lo cual ha sido sustentado por la observación de índices más altos de gemación en levaduras que han sido fagocitadas que en las que se encuentran fuera de las células del hospedero, además del hallazgo de elementos que les permiten a estas especies sobrevivir intracelularmente, tal es el caso de la fosfolipasa Plb1 que logra la neutralización del fagolisosoma, favoreciendo la supervivencia de células criptocócicas dentro de los macrófagos (Coelho et al. 2014; Taylor y May 2016)

Se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales puede ocurrir: El caballo de Troya, que consiste en el transporte de las levaduras dentro de los tejidos del hospedero, atravesando barreras epiteliales y endoteliales. También se propone la penetración activa de células endoteliales por un mecanismo transcelular o para celular, y el tercer mecanismo es el uso de proteínas como la fosfolipasa B que interactúan con componentes del citoesqueleto de las células del hospedero como Rac1, promoviendo la invasión del cerebro (Coelho et al. 2014). La capacidad de vida intracelular se ha asociado a la patogénesis de la infección y a su diseminación hacía otros órganos, principalmente al SNC potencializando la virulencia e incluso ha sido relacionada con una baja respuesta al tratamiento.

1.5 Criptococosis

La criptococosis es una infección fúngica clasificada dentro de las micosis oportunistas y se ha registrado en distintos países del mundo siendo más frecuente en zonas tropicales y subtropicales (Springer y Chaturvedi 2010). Existen varias formas clínicas descritas, siendo

las más frecuentes: criptococosis pulmonar y criptococosis meningoencefálica (Tello et al., 2013). Este padecimiento era considerado poco común hasta 1980 cuando su incidencia aumentó con el inicio del síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA (Tello et al., 2013), ya que se relaciona con deficiencias en la inmunidad celular de los pacientes, además se han sumado otros factores de riesgo como: neoplasias, lupus eritematoso, trasplantes de órgano sólido o médula ósea, tratamiento con corticoides y otras terapias inmunosupresoras; en México se reporta una incidencia relativa dependiente del grupo poblacional estudiado, ya que en pacientes con neuropatías o SIDA, se presenta hasta en un 28%, mientras que en enfermos neutropénicos o patologías dermatológicas autoinmunes como lupus, se reporta una incidencia de 4.3 a 10% (Levitz y Boekhout 2006; López 2014). Las especies que frecuentemente causan esta infección son aquellas que forman parte del complejo *C. neoformans/C.gattii* y pueden afectar cualquier región anatómica del cuerpo, pero su principal tropismo es hacia el pulmón y el SNC (Maziarz y Perfect 2016; Negroni 2012). Esta micosis es la principal causa de meningitis en animales de compañía, especialmente en gatos y la segunda causa más frecuente de enfermedades infecciosas en koalas y otros marsupiales arbóreos en Australia e incluso existen reportes de criptococosis pulmonar en delfines (Miller et al., 2002; Rotstein et al., 2010; Krockenberger et al., 2010; Schmertmann et al., 2019).

Las manifestaciones más comunes de la forma pulmonar aguda casi siempre son asintomáticas en pacientes sanos, en algunas ocasiones se presentan síntomas muy leves con resolución de la infección en poco tiempo, sin embargo, en pacientes con algún factor de riesgo asociado pueden presentarse síntomas respiratorios como tos, dolor torácico, fiebre entre otros, pero si la infección no se controla puede desarrollarse neumonía o síndrome de complicación respiratoria aguda. Mientras que en la forma meningoencefálica en pacientes sanos o inmunocomprometidos la infección se manifiesta con cefalea, náuseas, vómitos y cambios en el estado mental como cambios de personalidad, letargo o confusión y algunos tipos de déficit motriz o sensorial. (Negroni 2012).

1.5.1 Inmunología

La infección es adquirida por inhalación de los propágulos infecciosos que pueden ser las basidiosporas o levaduras deshidratadas (Velagapudi et al., 2009) que se encuentran en el ambiente, al ser partículas pequeñas (entre 1 y 3 μm) con características propias de la pared celular que le permiten ser transportadas por viento y agua. Al ser inhaladas por humanos u otros mamíferos puede ocurrir su deposición en las cavidades alveolares en donde al encontrarse con macrófagos o células dendríticas se desencadena una respuesta inmune que generalmente elimina la infección en pacientes inmunocompetentes (Coelho et al., 2014).

Para la resolución de la infección es necesario el establecimiento de inmunidad mediada por células (Krockenberger et al., 2010). La respuesta inicial implica el reconocimiento del hongo por células inmunes innatas de los pulmones y la generación de señales que conducen a la expansión clonal de células T CD4+ específicas contra *Cryptococcus* (Meya et al., 2016), una vez activadas las células T CD4+ pueden diferenciarse en subconjuntos efectores de citocinas como Th1, Th2 y Th17, las que principalmente ayudan a la resolución de la infección son Th1 y Th17, por otro lado la respuesta Th2 se asocia con aumento en la inflamación y mayor riesgo de diseminación (Elsegeiny et al., 2018), se ha observado que esta última ocurre en pacientes con VIH desarrollando así una mayor vulnerabilidad (Meya et al., 2016). La diseminación puede ocurrir por internalización sin destrucción de levaduras dentro de células epiteliales alveolares o macrófagos, dentro de estas células las levaduras pueden gemar y multiplicarse mientras son transportadas hacia otros órganos como cerebro y médula espinal (Sabitii y May 2012; Chen et al., 2014; Elsegeiny et al., 2018; Esher et al., 2018) . Tanto en la respuesta inmunológica como en la diseminación se ha destacado el papel de los monocitos ya que juegan un papel importante en la fagocitosis de las levaduras y en la presentación de antígenos a las células T y producción de citocinas, sin embargo, también están involucrados en la diseminación de las levaduras hacia tejido nervioso ya que *Cryptococcus* es un patógeno intracelular facultativo, por lo tanto los monocitos pueden albergar levaduras y facilitar su entrada en diferentes tejidos sin que éstas sean reconocidas por el sistema inmune (Fu y Drummond 2020). Por otra parte, se ha observado que los pacientes inmunocompetentes que desarrollan criptococosis generalmente presentan alguna deficiencia en la producción de macrófagos, o algún otro factor de riesgo que incluye trastornos monogénicos no diagnosticados previamente (Saijo et al., 2014). Las

manifestaciones más comunes de la forma pulmonar aguda casi siempre son asintomáticas en pacientes sanos, en algunas ocasiones se presentan síntomas muy leves con resolución de la infección en poco tiempo, sin embargo, en pacientes con algún factor de riesgo asociado pueden presentarse síntomas respiratorios como tos, dolor torácico, fiebre entre otros, pero si la infección no se controla puede desarrollarse neumonía o síndrome de complicación respiratoria aguda. Mientras que en la forma meningoencefálica en pacientes sanos o inmunocomprometidos la infección se manifiesta con cefalea, náuseas, vómitos y cambios en el estado mental como cambios de personalidad, letargo o confusión y algunos tipos de déficit motriz o sensorial. (Negroni 2012).

1.5.2 Criptococosis causada por *Cryptococcus gattii.*

Una consecuencia de las diferencias genéticas entre *C. neoformans* y *C. gattii* es la manifestación de diferentes cuadros clínicos en los pacientes con criptococosis. Aunque *C. gattii* provoca síntomas similares a los provocadas por *C. neoformans*, se ha observado que los genotipos VGI, VGII, VGIII frecuentemente causan enfermedad en personas inmunocompetentes (Chen et al. 2014; Fernandes 2016; Esher 2018). Mientras que el tipo VGIV es más común en pacientes con algún factor de inmunocompromiso importante por ejemplo en personas que viven con VIH. A pesar de que se tiene documentada esta relación de virulencia con el genotipo, existen diferencias en las manifestaciones de cada una de las infecciones desarrolladas, esto se debe a que la criptococosis representa el resultado de interacciones complejas que incluyen el tamaño del inóculo inhalado, el tipo de virulencia individual de cada cepa de *C. gattii* (dependiente de la activación de determinados circuitos transcripcionales) y el estado inmunológico del paciente (Chen, et al., 2014).

Es común que las infecciones provocadas por *C. gattii* se presenten con abscesos cerebrales focales y lesiones localizadas en pulmón, mientras que las infecciones por *C. neoformans* son más generalizadas en todo el SNC (Esher 2018). Otra característica importante que distingue a la infección causada por *C. gattii* es el periodo de latencia ya que, a pesar de tener gran variación, se reporta un rango de 2 a 35 meses en presentar las primeras manifestaciones de la infección a partir de la exposición (MacDougall y Fyfe 2006; Kerri et al., 2012), a diferencia del periodo promedio que se observa en la criptococosis causada por *C. neoformans* de 110 meses (Chen et al., 2014).

En cuanto al tratamiento, se han observado diferencias en la susceptibilidad a antifúngicos, según los resultados de un estudio de vigilancia de sensibilidad antifúngica global (ARTEMISA DISK) realizado en 2009, se registró un aumento en la resistencia al fluconazol en cepas de *C. gattii*, siendo este el fármaco utilizado como tratamiento a largo plazo después de la Anfotericina B en casos de criptococosis meníngea (Pfaller et al., 2009; Rossi et al., 2016).

1.6 Técnicas moleculares aplicadas al estudio del complejo *C. neoformans/C. gattii*

Debido a las diferencias que existen entre *C. gattii* y *C. neoformans* y a su relevancia epidemiológica, clínica y ecológica es importante su análisis y caracterización a nivel molecular. Actualmente existen diferentes técnicas que permiten identificar el genotipo de una cepa del complejo *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii,* lo anterior ha servido como herramienta para conocer la distribución de cada uno de los genotipos en todo el mundo e identificar las diferencias en la abundancia de los genotipos en cada país (Cogliati 2012).

Aunque existen varios estudios que utilizan diferentes técnicas de tipo molecular, el grupo Ibero Americano de Estudio de *Cryptococcus* ha probado y estandarizado tres técnicas principales, estas son PCR fingerprinting del oligo M13, el análisis del gen *URA5* mediante las técnicas RFLP y AFLP (Meyer et al. 2003). La técnica RFLP utiliza el marcador *URA*5 de 779 pb, localizado en el cromosoma 7 que codifica para la enzima orotidina monofosfato pirofosforilasa en *Cryptococcus sp.* (Edam y Kwong-chung 1990; Meyer et al., 2003). Esta técnica, permite identificar patrones de bandas específicos para cada genotipo que corresponden a los fragmentos polimórficos originados por deleciones o inserciones de nucleótidos que han ocurrido de manera diferencial en ambas especies; distinguiendo ocho genotipos identificados actualmente en cepas de origen clínico y ambiental como se muestra en la Figura 3 (Meyer et al., 2003). Por otra parte, el AFLP consiste en la digestión directa del ADN genómico empleando enzimas de restricción, frecuentemente *Eco*R1 y en raras ocasiones a *Mse*I, seguido de la ligación de los adaptadores y posteriormente la amplificación de fragmentos seleccionados específicamente por PCR, con esta técnica se describen once subtipos moleculares incluyendo los híbridos entre las especies del complejo (Chen et al., 2014; Hagen et al., 2015).

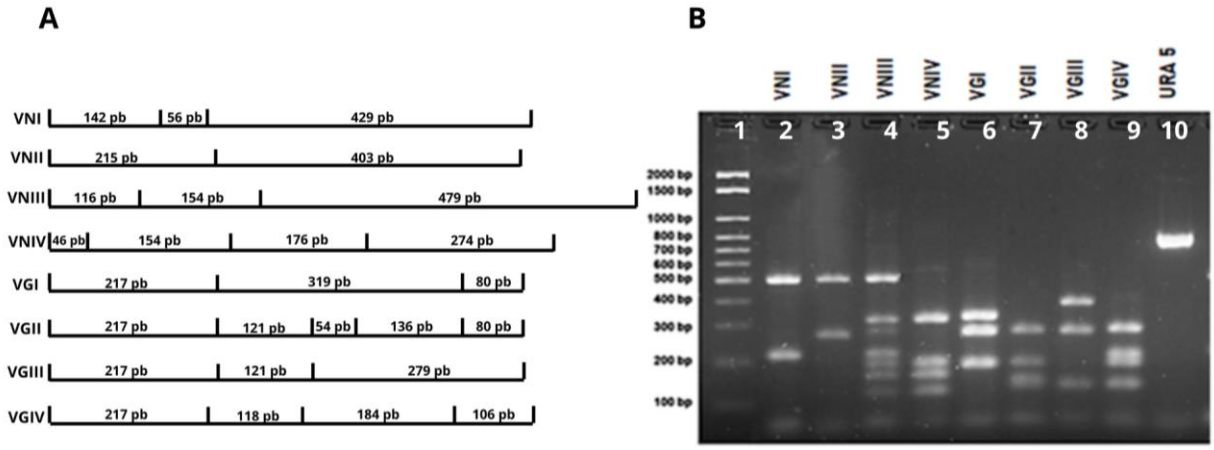


Figura 3. A) Puntos de corte del gen *URA5*, utilizando las enzimas de restricción *Sau*96I y *Hha*I. **B)** Gel de agarosa, se muestra el perfil de bandas del gen *URA5* obtenidos mediante RFLP, en los carriles 2-5 se muestran los genotipos de *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII y VNIV) y en los carriles 6-9 los genotipos de *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII, VGIV), carril 10 gen *URA5* de 779 pb sin digerir (Tomado de Aguiar et al., 2017).

2 Planteamiento del Problema

En las últimas décadas, la prevalencia de las infecciones fúngicas oportunistas ha ido en aumento en los pacientes con inmunosupresión ocasionada por diversos factores como: infección por VIH, uso indiscriminado de esteroides y otros inmunosupresores, procedimientos invasivos e implantación de dispositivos (como catéteres y sondas) en pacientes hospitalizados etc. Asimismo, cada vez más estudios señalan el potencial de diversas especies de hongos como patógenos emergentes, tal como sucede con las especies de *C. gattii* las cuales, además, tienen la capacidad de causar criptococosis en individuos inmunocompetentes, esta característica ha sido atribuida a la presión selectiva ejercida por fenómenos como el calentamiento global, ocasionando a su vez la expansión de la distribución geográfica de estas especies (Cogliati 2021; Sánchez et al. 2021).

La criptococosis es una enfermedad de distribución mundial, y los cambios detectados en su epidemiología, específicamente los brotes causados por *C. gattii* en regiones no consideradas tropicales han llevado a la reactivación de la búsqueda de este patógeno en el ambiente. En México existen reportes de criptococosis causada por *C. gattii* (López et al., 1996; Castañón et al., 2000; Castañón et al., 2009; López et al., 2014), cuyo mecanismo de infección ocurre a través de la inhalación de las partículas infectantes (levaduras y/o basidiosporas) que se desarrollan en ciertas especies de árboles, sin embargo, estas especies no han sido identificadas en la República Mexicana. A pesar de los esfuerzos realizados en el país por recuperar a la levadura de eucaliptos y otras especies de árboles (Castañón et al., 2007; Cervantes 2017), no se ha tenido éxito, por lo que en este trabajo se propuso incorporar los hábitos de desplazamiento de un paciente diagnosticado con criptococosis por *C. gattii*. La información obtenida en este estudio aportará datos útiles a la clínica y epidemiología de la criptococosis, además de contribuir al conocimiento de las interacciones ecológicas de *C. gattii* con especies vegetales y probablemente con otros microorganismos. Esta información apoyará el entendimiento del mecanismo de infección de la criptococosis, de su distribución ambiental e incluso podría ser empleada en la indagación clínica para un diagnóstico oportuno de la enfermedad.

3 Hipótesis

Al incorporar información de los hábitos de desplazamiento de un paciente diagnosticado con criptococosis por *C. gattii* en el muestreo, será más probable aislar a la levadura de su posible fuente natural.

4 Objetivos

4.1 General

- Aislar a *C. gattii* a partir de muestras ambientales de árboles relacionados al área de desplazamiento de un paciente diagnosticado con criptococosis ocasionada por *Cryptococcus gattii.*

4.2 Particulares

- Determinar si el crecimiento de *C. gattii* está relacionado con alguna especie de árbol localizado en el área de muestreo.
- Identificar las condiciones naturales que favorecen el crecimiento de *Cryptococcus gattii* en el ambiente.
- Identificar los principales hongos filamentosos que podrían estar relacionados con C. *gattii.*
- Analizar el aislado clínico de *C. gattii* proveniente del paciente y compararlo con el o los aislados de *Cryptococcus sp.* obtenidos del ambiente.

5 Materiales y Metodología

5.1 Obtención de datos

5.1.1 Datos clínicos

Se solicitaron datos al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía SS, de aquellos pacientes con diagnóstico de criptococosis. De la información obtenida se tomaron en cuenta sólo aquellos que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: registro de datos clínicos tales como síntomas respiratorios o neurológicos característicos de infección criptocócica, diagnóstico de laboratorio confirmado de criptococosis causada por *C. gattii*, disponibilidad de la cepa, pacientes con residencia en la Ciudad de México y que el paciente accediera a participar en el estudio.

5.1.2 Datos de desplazamiento

Se acudió a una reunión con el paciente y sus familiares a quienes se les proporcionaron dos formatos: una carta de consentimiento informado (Anexo I), en donde se explican los objetivos del proyecto, los beneficios que se esperan de éste, así como algunas aclaraciones sobre su participación en la investigación y confidencialidad de datos y un formato de entrevista semiestructurada con la intención de obtener datos acerca de sus hábitos de desplazamiento.

5.2 Registro de árboles y tamaño de muestra

1. Se realizaron visitas a las áreas referidas por el paciente o su familiar en la entrevista para seleccionar el lugar de muestreo y se eligió el sitio con mayor cantidad de árboles y de fácil acceso.
2. Se registraron en una bitácora los árboles encontrados dentro del área referida por el paciente, se excluyeron los individuos muy jóvenes y arbustos. De cada árbol se registró: la categoría (especie o nombre común), número de individuos por categoría y las coordenadas geográficas empleando un GPS de Exploración Garmín eTrex 20x.
3. Los datos registrados fueron posicionados sobre imágenes satelitales del área con ayuda del software Google Earth Pro.

4. Con los puntos georeferenciados se creó un mapa que incluye la delimitación del área en tres cuadrantes, la distribución del total de árboles dentro de los cuadrantes y los árboles que presentan oquedades, empleando el software QGIS 3.4.2.
5. Se calculó el tamaño de muestra tomando en cuenta sólo los árboles con oquedades, según el criterio de diferencia absoluta, distribución binomial con población conocida N, aplicando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{\frac{Z^2}{E^2 p}}{1 + \left[\frac{1}{N}\left(\frac{Z^2 q}{E^2 p} - 1\right)\right]}$$

En dónde (N) es la cantidad de árboles registrados con oquedades.
€ el error de precisión que aceptamos en este estudio fue igual a 9%.
(Z) el valor de las tablas corresponde a un nivel de confianza de 90%.
(p y q) son equivalentes a la variabilidad tomando como el valor de p=0.8 y el valor de q= 1-p

6. Con base en el tamaño de muestra se aplicó un muestreo por conglomerados en donde los individuos fueron seleccionados al azar.

5.3 Muestreo

1. Todos los árboles con oquedades seleccionados aleatoriamente se localizaron empleando sus coordenadas geográficas.
2. La muestra se obtuvo a partir de la oquedad con ayuda de un cepillo citológico estéril, descargando el sedimento en tubos de vidrio con 5 ml de NaCl al 0.85% con antibióticos penicilina, estreptomicina y cloranfenicol (Chaturvedi y Chaturvedi 2011) (Cattana et al., 2014).
3. En la toma de cada muestra se llenó un formato que contenía los siguientes datos: número de muestra, geo referencia del árbol, especie o nombre común del árbol; características de la oquedad que incluyen nivel de exposición al sol, altura, forma y profundidad.
4. Los tubos se almacenaron en un recipiente térmico durante el traslado al laboratorio, todas las muestras fueron procesadas antes de las 24 horas posteriores al muestreo.

5.4 Procesamiento de muestras

1. De cada muestra (tubo con suspensión original) se tomaron 100 µl y se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, por duplicado en tubos Ependorff (1.5ml) que contenían 900 µl NaCl al 0.9%.
2. Se tomaron 20µl de las diluciones 1:100, 1:1000 y de la suspensión original de cada muestra, por duplicado, y se extendieron por estría masiva en cajas de Petri desechables con Agar semilla de niger (Staib 1963) con antibióticos y bifenil.
3. Se incubaron a temperatura ambiente de 25 a 26°C durante una semana, en este tiempo, fueron revisados diariamente, vigilando el crecimiento de colonias levaduriformes con pigmento marrón y bordes lisos, así como de colonias filamentosas.

5.4.1 Hongos filamentosos

1. Los hongos filamentosos que se encontraban creciendo en la misma caja de donde se aislaron colonias levaduriformes, fueron aislados y purificados mediante resiembras y cultivos monospóricos en medio ADS.
2. Se realizó la identificación a nivel de género mediante la morfología macro y microscópica, empleando la técnica de bandera con cinta adhesiva y con azul de algodón y consultando bibliografía específica (Campbell et al., 2013).
3. Se registraron los géneros de hongos filamentosos más comunes en relación con el origen de la muestra.

5.4.2 Análisis de hongos filamentosos asociados a colonias marrón

1. Se tomó un registro fotográfico de las cajas de las cuales se aislaron colonias levaduriformes de color marrón a las 72 horas de incubación.
2. Las fotografías fueron analizadas empleando el software de diseño AutoCAD 2015® para medir el área de crecimiento de los hongos filamentosos asociados, tomando las medidas de las cajas de Petri desechables indicadas por el fabricante, usando como área total
3. Con estos datos se calculó la dominancia (λ) y diversidad (1-λ) empleando el índice de Simpson, que en términos estadísticos manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Este índice está fuertemente

influido por la importancia de las especies más dominantes, como su valor es inverso a la equidad, la diversidad puede calcularse como 1 – λ (Moreno 2001) (Guisande 2006).

$$\lambda = \Sigma p_i^2$$

Donde: pi = abundancia proporcional de la especie i, es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

5.4.3 Colonias levaduriformes

1. Todas las colonias levaduriformes color marrón (sospechosas de ser *Cryptococcus)* se analizaron mediante examen microscópico en preparaciones frescas con tinta china, para confirmar la presencia de cápsula y con azul de algodón para verificar la morfología levaduriforme (células redondas u ovoides y gemación).
2. En los aislados que presentaron contaminación por hongos filamentosos o mezcla de levaduras, con otras morfologías no características del género a nivel microscópico, se realizaron resiembras empleando estría por agotamiento en Agar semilla de niger y se dejaron incubar por 48 horas a 25°C.
3. En caso de persistencia de morfologías no características (células irregulares, muy alargadas, sin cápsula y sin gemaciones) se tomó una colonia con crecimiento de 48 horas en agar semilla de niger y se suspendió en un tubo Ependorff con perlas de vidrio y 1 ml de NaCl al 0.85%, se agitó en vortex por 1 minuto, con la finalidad de separar las células y se realizaron diluciones en tubos con NaCl hasta obtener una concentración de 10^3 células por ml, empleando conteo en cámara de Neubauer.
4. De esta suspensión se tomaron 10 µl y se sembraron por estría masiva en cajas de Petri desechables con agar semilla de niger, las cuales fueron incubadas a 25°C por 48 horas.
5. Este proceso se repitió hasta observar una morfología homogénea, con cápsula en los exámenes directos con azul de algodón y preparaciones en frescos con tinta china.
6. Las colonias levaduriformes beiges o blancas con cápsula se resembraron y conservaron por resiembra periódica en tubo con medio ADS a 4°C, para su posterior análisis.

5.5 Pruebas de identificación

Una vez que las colonias levaduriformes capsuladas fueron purificadas, se sembraron en cajas de Petri desechables con medio ADS y se incubaron a 25°C por 48 horas para obtener el inóculo y realizar las pruebas bioquímicas.

5.5.1 Síntesis de melanina

1. Cada aislado fue sembrado en agar semilla de niger por estría masiva.
2. Como controles positivos se sembraron las cepas de referencia *C. neoformans* FM726 y *C. gattii* FM724.
3. Se incubaron a 25°C por 48 horas.
4. Se registró la producción de pigmento marrón de las colonias levaduriformes a las 24 y 48 horas de incubación realizando un registro fotográfico a las 48 horas.

5.5.2 Hidrólisis de urea Christensen en tubo

1. Se inocularon dos tubos de vidrio con agar urea de Christensen por cada aislado.
2. Se empleó como control negativo *Candida albicans* FM828 y como control positivo *C. neoformans* FM726, ambas cepas de origen clínico.
3. Todos los tubos se incubaron a 30°C por 48 horas con revisión cada 24 horas.
4. Se realizó un registro fotográfico después de las 48 horas de incubación comparando con el resultado de las cepas de referencia.

5.5.3 Termotolerancia a 37°C

1. Se realizó una dilución en NaCl a una concentración del 0.5 de la escala de McFarland (Aryal 2020) de cada aislado.
2. Se tomaron 10 µl de la dilución y se sembraron por estría masiva en cajas de petri desechables con ADS y se incubaron por 5 días a 37°C.
3. Se tomaron como resultados positivos aquellos aislados que presentaron crecimiento de colonias levaduriformes.

5.5.4 Resistencia a la L-canavanina

1. Los aislados que dieron positivo para la prueba de síntesis de melanina y para las otras pruebas bioquímicas descritas con anterioridad, fueron sembrados por estría masiva en medio Agar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol (CGB) (Kwong-Chung et al., 1981).
2. Como control positivo se empleó la cepa de *C. gattii* FM724 y como control negativo a *C. neoformans* FM726 ambas de origen clínico.
3. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas con revisión cada 24 horas.

5.6 Genotipificación molecular por PCR-RFLP

5.6.1 Extracción de ADN

A partir de los aislados puros y caracterizados como *C. neoformans* y/o *C. gattii*, se sembraron por estría masiva en ADS para obtener la mayor cantidad posible de biomasa y se incubaron a 25°C por 48 horas.

Para la caracterización molecular se utilizaron las siguientes cepas de referencia:

Cuadro 2. Cepas de referencia de los ocho genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii.* (Meyer et al., 2003)

Genotipo	Cepa	Especie	Origen geográfico
VNI	WM148	*C. neoformans*	Australia
VNII	WM626	*C. neoformans*	Australia
VNIII	WM628	*C. neoformans*	Australia
VNIV	WM629	*C. neoformans*	Australia
VGI	WM179	*C. gattii*	Australia
VGII	WM178	*C. gattii*	Australia
VGIII	WM175	*C. gattii*	E.U.A
VGIV	WM779	*C. gattii*	Sudáfrica

1. Se tomó aproximadamente ¼ del área total de la caja (menos de 100 mg) de la biomasa y se colocó en microtubos de 2 ml que contenían perlas de vidrio y se lisaron en FastPrep® 5 ciclos de 1 minuto a 4 msn, con incubación en hielo de 1 min entre cada ciclo.
2. Se realizó la extracción de ADN empleando el Kit Quiagen® DNeasy Plant Mini (250) siguiendo las instrucciones del fabricante.
3. Se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 85 V por 1 hora, para evaluar la calidad del ADN.

5.6.2 Amplificación del gen *URA5*

1. Para la amplificación del gen *URA5*, se empleó una concentración de 10 ng de ADN.
2. Se realizó la mezcla para PCR bajo las siguientes condiciones, empleando MyTaq Mix de Bioline:

Cuadro 3. Mezcla de Reacción PCR punto final	
Reactivos	Volumen Final 50 µl
oligonucleótido forward URA5 (200 ng)	1.5 µl
oligonucléotido reverse SJ01 (200 ng)	1.8 µl
Taq Mix	10 µl
DNA (10 ng)	2.3 µl
H_2O Mili Q	34.4 µl

3. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Corbette Research PCR de ICAS usando las siguientes condiciones:

Cuadro 4. Condiciones de PCR			
Temperatura	Etapas	Tiempo	
94 °C	Desnaturalización inicial	3 min.	
94 °C	Desnaturalización	45 s.	
63 °C	Alineamiento	1 min.	35 ciclos
72 °C	Extensión	1 min.	
72 °C	Extensión final	7 min.	
4 °C	-	∞	

4. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con 5μl del producto de PCR para corroborar la amplificación del fragmento de 779 pb correspondiente al gen *URA5*, se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb (**λ**).
5. En caso de obtener bandas inespecíficas, se realizó otra electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cortó la banda que correspondía a los 779 pb y se purificó según las especificaciones del Kit Zymoclean Gel DNA Recovery de zymoresearch®.

5.6.3 Doble digestión con enzimas de restricción

1. El producto de 779 pb purificado del paso anterior se utilizó para la digestión con las enzimas de restricción *Sau961* y *Hha*l .
2. Para la reacción de digestión, se empleó una concentración de 200 ng de ADN del producto purificado de 779 pb, en tubos Ependorff de 500 µl se mezclaron los reactivos en el orden que se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 5. Mezcla de Reacción RFLP

Reactivos	Volumen Final 15 µl
Buffer NEB 10X	1.5 µl
Enzima *Sau*961 (5 000 U/ml)	0.6 µl
Enzima *Hha*l (20 000 U/ml)	0.3 µl
H_2O Mili Q	6.6 µl
Producto purificado-*URA*5 (200ng)	6 µl

3. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora (± 15 min.)
4. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y TAE al 1% con voltaje de 100V (10V por cada cm^2 de gel) durante 1.5 horas.
5. Se analizaron los patrones de bandeo y se compararon con los patrones de los ocho genotipos de referencia para identificar el genotipo de cada aislado.

5.6.4 Genotipificación de la muestra clínica del paciente.

1. La cepa del paciente (previamente caracterizada por pruebas bioquímicas) se sembró por estría masiva en cajas de Petri desechables de 90x15mm con medio ADS y se incubó a 25°C por 48 horas.
2. Se repitió el mismo procedimiento para extraer el ADN y posteriormente se realizó la amplificación del gen *URA5*, finalmente se llevó a cabo la doble digestión con enzimas de restricción siguiendo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.
3. Se comparó el patrón de bandeo con el de la cepa ambiental identificada en este trabajo como *C. gattii,* aislada de uno de los árboles relacionados con la ruta de desplazamiento del paciente.

6 Resultados

6.1 Obtención de datos

6.1.1 Datos clínicos del paciente

Se obtuvo un registro total de 37 pacientes con criptococosis causada por *C. gattii*, pero solo se pudo tener contacto con cinco, de los cuales únicamente dos pacientes tenían residencia actual en la Ciudad de México y accedieron a colaborar con la investigación. En este trabajo sólo trabajamos con uno de ellos, debido a que cumplió con todos los criterios de inclusión establecidos para este protocolo.

Paciente masculino de 32 años, fue diagnosticado con meningitis criptocócica por *Cryptococcus gattii* en octubre del 2015 tras presentar síntomas como cefalea intensa hemicraneana 10/10 intermitente, náuseas, vómitos, rigidez del cuello y delirium hipoactivo. El diagnóstico de laboratorio fue confirmado por observación de levaduras capsuladas en muestra de LCR mediante tinción negativa con tinta china y antígeno criptocócico 1:1000 con la técnica de aglutinación con partículas de látex (CALAS®). Recibió tratamiento intra-hospitalario con anfotericina B dosis acumulada de 1.2 gramos y egresó después de un mes con tratamiento ambulatorio de fluconazol, 800 mg cada 12 horas por 6 meses.

6.1.2 Datos de desplazamiento del paciente

Derivado de la entrevista con el paciente y sus familiares, se obtuvieron diferentes áreas que el paciente frecuentó meses antes de presentar los primeros síntomas. El paciente laboró como chofer de las rutas de transporte de la zona de la Alcaldía Gustavo A. Madero, CDMX y por las características del lugar se seleccionó el área con mayor cantidad de árboles y de fácil acceso, esta área abarca una sección de Av. Acueducto de Guadalupe (camellones y aceras), y es la colindancia de tres colonias (fig. 4): San Pedro Zacatenco, Residencial Zacatenco y Santa Isabel Tola, Alcaldía Gustavo A. Madero, CDMX.

Figura 4. Área de desplazamiento frecuente reportada por el paciente, localizada en una sección de Av. Acueducto de Guadalupe y Av. Insurgentes (árboles de camellones y aceras) que comprende a su vez la colindancia de tres colonias: Santa Isabel Tola, Residencial Zacatenco y San Pedro Zacatenco en la Alcaldía Gustavo A. Madero.

6.2 Registro de árboles y tamaño de muestra

La alcaldía Gustavo A. Madero se ubica entre los paralelos 19°35′00′ ′ y 19°27′43′ ′N, y los meridianos 99°03′45′ ′ y 99°11′00′ ′ W; a una altitud entre los 2,200 y 2,900 msnm. y presenta dos tipos de clima: Templado subhúmedo con lluvias en verano y seco semiseco templado,

las temperaturas más bajas se presentan en los meses de diciembre y enero (1.0°C-1.5°C) mientras que en abril y mayo se registran las más altas (34.3°C -32.5°C) (GODF, 2013).

En toda el área estudiada se registraron 400 árboles, 99 presentaron oquedades de los cuales, según el cálculo de tamaño de muestra utilizando el criterio de diferencia absoluta Distribución binomial Población conocida N, se obtuvo un total de 46 árboles.

Población conocida	**N=**	**99**
Error o precisión	**E (%)=**	**9**
Nivel de confianza (%)	**1-α=**	**90**
Valor de Z (tablas)	**Z=**	**1.645**
Variabilidad	**P ==**	**0.8**
(1-p)	**q =**	**0.2**

$$n = \frac{\frac{1.645^2}{9^2\ 0.8}}{1 + \left[\frac{1}{99}\left(\frac{1.645^2 0.2}{9^2 0.8} - 1\right)\right]}$$

Muestra calculada n= 45.551

Redondeando n= 46

6.3 Muestreo

Fueron muestreados un total de 46 árboles seleccionados aleatoriamente dentro de tres cuadrantes como se muestra en la figura 5. Se realizaron cuatro muestreos en un intervalo de tres meses, durante el primer muestreo (19/09/2018) se tomaron 15 muestras dentro del cuadrante 1. En el segundo muestreo (10/10/2018), se tomaron 10 muestras dentro del cuadrante 2. En el tercer muestreo (7/11/2018), se tomaron 13 muestras distribuidas dentro de los cuadrantes 1 (10 árboles) y 2 (3 árboles) como se muestra en el cuadro 6. En el cuarto muestreo (13/02/2019), se tomaron 8 muestras dentro del cuadrante 3.

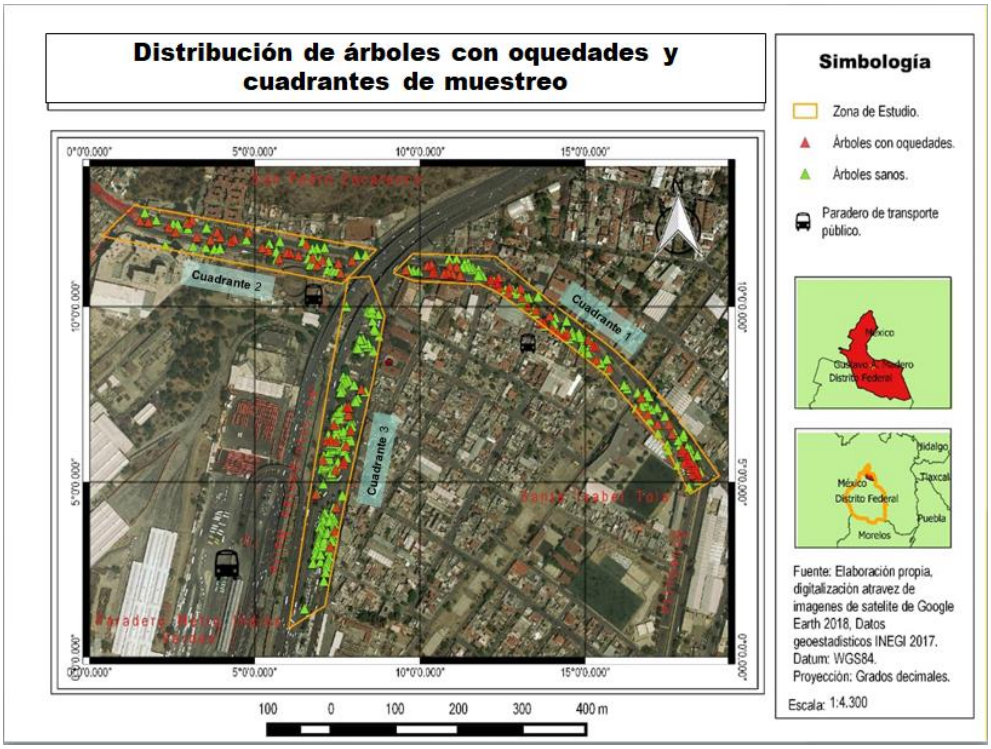


Figura 5. Distribución de árboles relacionado al área de desplazamiento del paciente. Cuadrante 1, Colonia Santa Isabel Tola, Cuadrante 2 Colonias San Pedro Zacatenco y Residencial Zacatenco. Cuadrante 3 Colonias Residencial Zacatenco y Santa Isabel Tola.

Cuadro 6. Número de árboles muestreados en cada período

	Fecha	Árboles muestreados	Cuadrante
Muestreo 1	19/09/18	15	1
Muestro 2	10/10/18	10	2
Muestreo 3	7/11/18	10	1
		3	2
Muestreo 4	13/02/19	8	3

6.4 Procesamiento de muestras

A partir de las muestras tomadas de los árboles se realizaron diluciones y se sembraron en agar semilla de niger, los primeros crecimientos de hongos filamentosos se observaron a las 24 horas de incubación, el mayor crecimiento de colonias fúngicas se registró principalmente en las cajas con la muestra sin diluir.

Las colonias levaduriformes crecieron poco antes de las 48 horas de incubación y fueron cubiertas rápidamente por hongos filamentosos (fig. 6), esto limitó significativamente la posibilidad de aislamiento, sin embargo, la mayoría de los aislados levaduriformes se obtuvieron a partir de las cajas que contenían la muestra sin diluir y la dilución 1:100 (Cuadro 7) en total se aislaron 23 colonias levaduriformes por su pigmentación en agar semilla de niger, obteniendo 4 colonias de color marrón sospechosas de pertenecer al género *Cryptococcus* y 19 de color beige, que también fueron recuperadas para descartar que fueran otras especies de *Cryptococcus*. También se observó crecimiento de colonias bacterianas de color amarillo intenso y rojizo, pero estas no fueron identificadas.

6.4.1 Hongos filamentosos

Durante el proceso de revisión de las cajas inoculadas con diluciones de las muestras tomadas de los árboles para aislar colonias levaduriformes, se observó la diversidad de hongos filamentosos que crecieron en el medio de cultivo y se tomó un registro fotográfico (fig. 7). En este estudio la identificación de los hongos filamentosos se realizó sólo a nivel de género, la mayoría de estos hongos crecieron antes de las 48 horas de incubación y después de la purificación e identificación morfológica obtuvimos como géneros más frecuentes a *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* de igual manera fueron frecuentes las colonias que incluso después de la purificación no presentaron estructuras de reproducción y no pudieron ser identificadas, estas se reportan en el cuadro 8 como *Mycelia sterilia*.

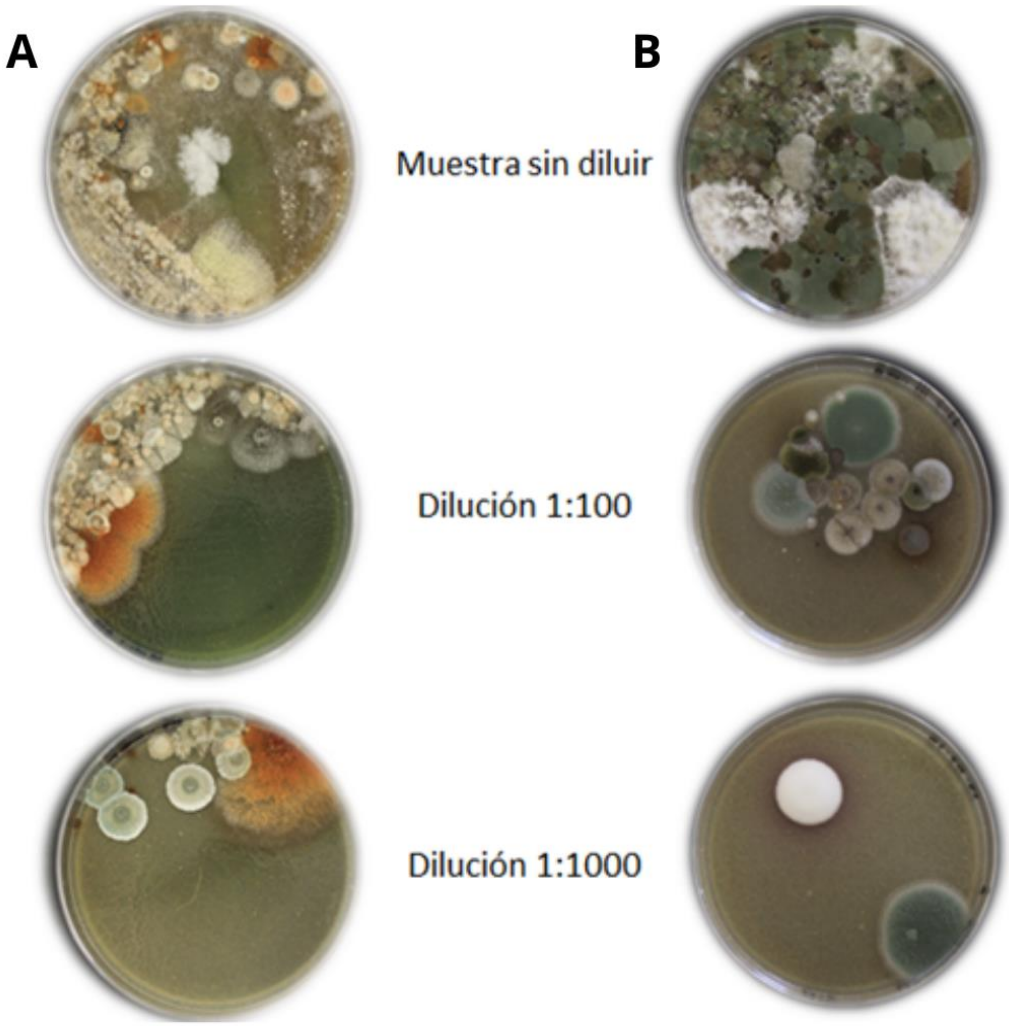


Figura 6. Crecimiento de colonias fúngicas con las diferentes concentraciones del inóculo en agar semilla de niger después de 72 hrs de incubación **A.** Muestra proveniente de *Schinus molle* (árbol de Pirul) **B.** Muestra proveniente de *Pinus sp.*

Cuadro 7. Datos generales de colonias levaduriformes aisladas de los árboles localizados dentro del área de desplazamiento del paciente. Clave de muestra: número de muestreo (M) y número del árbol (A). Código de la dilución: [] Muestra sin diluir, diluciones 1:100, 1:1000. A se refiere a la muestra y B a la réplica de cada muestra. Se aislaron 4 colonias de color marrón y 19 colonias de color beige.

Muestreo Fecha	Origen	Coordenadas	Clave muestra	Dilución	Color de la colonia
1° 19/09/2018	*Jacaranda mimosifolia*	N19°29.929' W0.99°06.767'	M1A1	1:100B	Beige
	Pinus sp.	N19°29.948' W0.99°06.779'	M1A2	[]A	Beige
	Erythrina coralloides	N19°29.978' W0.99°06.810'	M1A3	1:100A	Beige
	Erythrina coralloides	N19°30.062' W0.99°06.898'	M1A4	[]A	Beige
	Schinus molle	N19°30.105' W0.99°07.004'	M1A5	[]B	Beige
	Schinus molle	N19°30.095' W0.99°06.979'	M1A6	1:100A	Beige
2° 10/10/2018	*Schinus molle*	N19°30.108' W0.99°07.103'	M2A7	1:100B	Marrón
	Schinus molle	N19°30.108' W0.99°07.103'	M2A8	1:100B	Marrón
	Schinus molle	N19°30.108' W0.99°07.103'	M2A9	[]A	Beige
	Schinus molle	N19°30.137' W0.99°07.241'	M2A10	1:100A	Beige
3° 7/11/2018	*Pinus sp.*	N19°29.946' W0.99°06.780'	M3A11	[]A	Beige
	Pinus sp.	N19°29.946' W0.99°06.780'	M3A12	[]B	Beige
	Erythrina coralloides	N19°30.055' W0.99°06.903'	M3A13	[]A	Marrón
	Ficus sp.	N19°30.122' W0.99°07.117'	M3A14	1:100A	Beige
	Erythrina coralloides	N19°30.143' W0.99°07.220'	M3A15	[]A	Beige
	Eucalyptus camaldulensis	N19°30.057' W0.99°06.907'	M3A16	[]A	Beige
4° 13/02/2019	*Jacaranda mimosifolia*	N19°29.931' W0.99°07.091'	M4A17	[]A	Beige
	Pinus sp.	N19°29.938' W0.99°07.083'	M4A18	[]B	Beige
	Pinus sp.	N19°29.936' W0.99°07.084'	M4A19	[]B	Marrón
	Erythrina coralloides	N19°29.984' W0.99°07.079'	M4A20	[]B	Beige
	Casuarina sp.	N19°29.879' W0.99°07.092'	M4A21	[]A	Beige
	Casuarina sp.	N19°29.879' W0.99°07.092'	M4A22	[]B	Beige
	Casuarina sp.	N19°29.879' W0.99°07.092'	M4A23	[]B	Beige

6.4.2 Hongos filamentosos

Durante el proceso de revisión de las cajas inoculadas con diluciones de las muestras tomadas de los árboles para aislar colonias levaduriformes, se observó la diversidad de hongos filamentosos que crecieron en el medio de cultivo y se tomó un registro fotográfico (fig. 7). En este estudio la identificación de los hongos filamentosos se realizó sólo a nivel de género, la mayoría de estos hongos crecieron antes de las 48 horas de incubación y después de la purificación e identificación morfológica obtuvimos como géneros más frecuentes a *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* de igual manera fueron frecuentes las colonias que incluso después de la purificación no presentaron estructuras de reproducción y no pudieron ser identificadas, estas se reportan en el cuadro 8 como *Mycelia sterilia*.

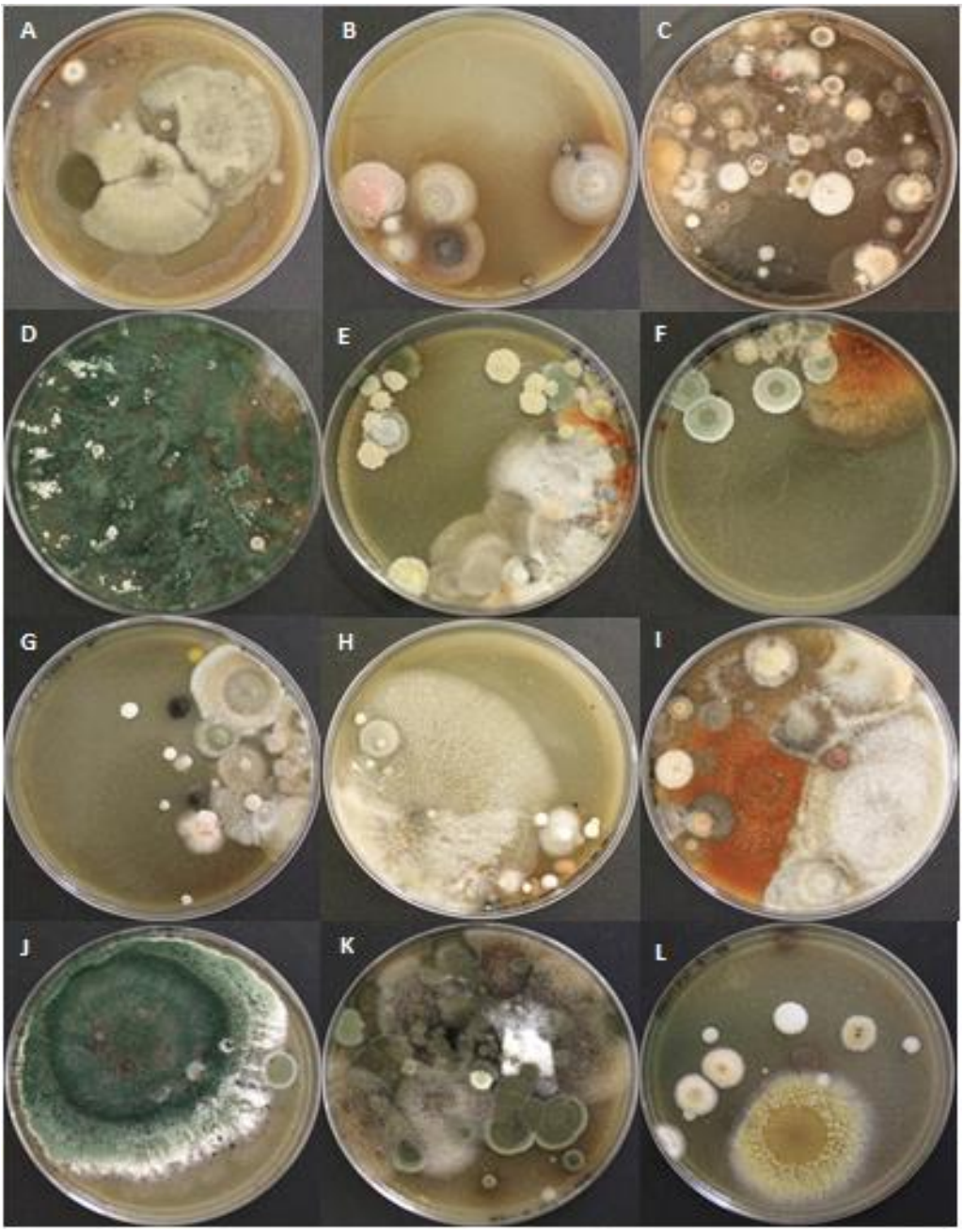


Figura 7. Crecimiento de hongos filamentosos a 72 horas de incubación. ***Muestreo 1 A)*** *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. *y Mycelia sterilia*, aislados de *Ficus* sp. ***B)*** *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Phaeosacardinula* sp., aislados de *Eucalyptus camaldulensis* ***C)*** *Aspergillus* sp., *Scytalidium* sp**.,** aislados de *Schinus molle***.** ***Muestreo 2 D)*** *Trichoderma* sp., **E-F)** *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. aislados de *Schinus molle*. ***Muestreo 3 G)*** *Aspergillus* sp., *Mycelia sterilia*, *Penicillium* sp. *aislados de Eucalyptus camaldulensis* ***H)*** *Mucor* sp., *Aspergillus* sp. aislados de *Erythrina coralloides*. ***I)*** *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scytalidium* sp., *aislados de Schinus molle*. ***Muestreo 4 J)*** *Trichoderma* sp. *y Cladosporium* sp., aislados de *Jacaranda mimosifolia* ***K-L)*** *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. *y Penicillium* sp., aislados de *Pinus* sp.

Cuadro 8. Géneros y Familias de hongos filamentosos aislados a partir de oquedades de diferentes árboles localizados dentro del área de desplazamiento del paciente con criptococosis.

Árbol	Familia	Género
Schinus molle	Aspergilaceae	*Aspergillus*
		Penicillium
	Helotiaceae	*Scytalidium*
	Mucoraceae	*Mucor*
	Davidiellaceae	*Cladosporium*
	Hypocreaceae	*Trichoderma*
		Acremonium
	Nectriaceae	*Fusarium*
Jacaranda mimosifolia	Mucoraceae	*Mucor*
	Hypocreaceae	*Trichoderma*
	Aspergilaceae	*Aspergillus*
Pinnus sp.	Mucoraceae	*Mucor*
	Davidiellaceae	*Cladosporium*
	Aspergilaceae	*Aspergillus*
		Mycelia sterilia
	Pleosporaceae	*Alternaria*
Casuarina sp.	Aspergilaceae	*Aspergillus*
	Helotiaceae	*Scytalidium*
Erythrina coralloides	Aspergilaceae	*Aspergillus*
	Davidiellaceae	*Cladosporium*
Eucalyptus camaldulensis	Aspergilaceae	*Aspergillus*
		Penicillium
	Mucoraceae	*Mucor*
	Davidiellaceae	*Cladosporium*
	Chaetothyriaceae	*Phaeosacardinula*
Ficus sp.	Aspergilaceae	*Aspergillus*
	Pleosporaceae	*Alternaria*

6.4.3 Análisis de hongos filamentosos asociados a colonias marrón

Una vez obtenidos los aislados de colonias levaduriformes color marrón se realizó la identificación de los géneros de hongos filamentosos que se encontraron creciendo en la misma caja y se procedió a realizar un análisis de dominancia (como se muestra en el apartado índice de Simpson) de acuerdo con el área de crecimiento y se calculó el índice recíproco de Simpson para conocer la diversidad de hongos asociados a las colonias levaduriformes sospechosas de ser *Cryptococcus.*

Después del análisis obtuvimos que el género que presentó mayor dominancia por su área de crecimiento fue *Mucor* (Fig. 10 y 11) relacionado al aislado levaduriforme de color marrón M4A19, seguido de *Scytalidium*, *Aspergillus* y *Penicillium,* sin embargo, la dominancia fue diferente en cada una de las cajas como se muestra en los gráficos 1, 2 y 3, por otra parte la caja en donde se obtuvo mayor diversidad de hongos filamentosos fue aquella de donde se recuperaron los aislados M2A7 y M2A8 (Fig. 9) que proviene de una muestra tomada de un árbol de Pirul (*Schinus molle*).

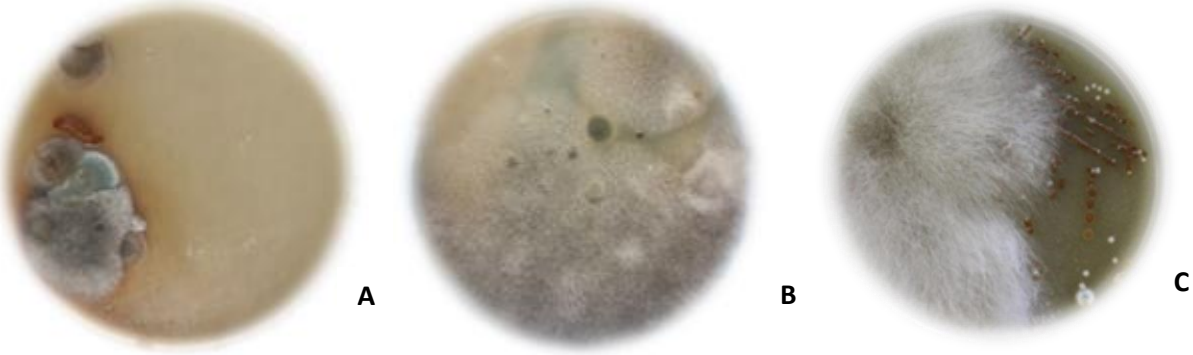
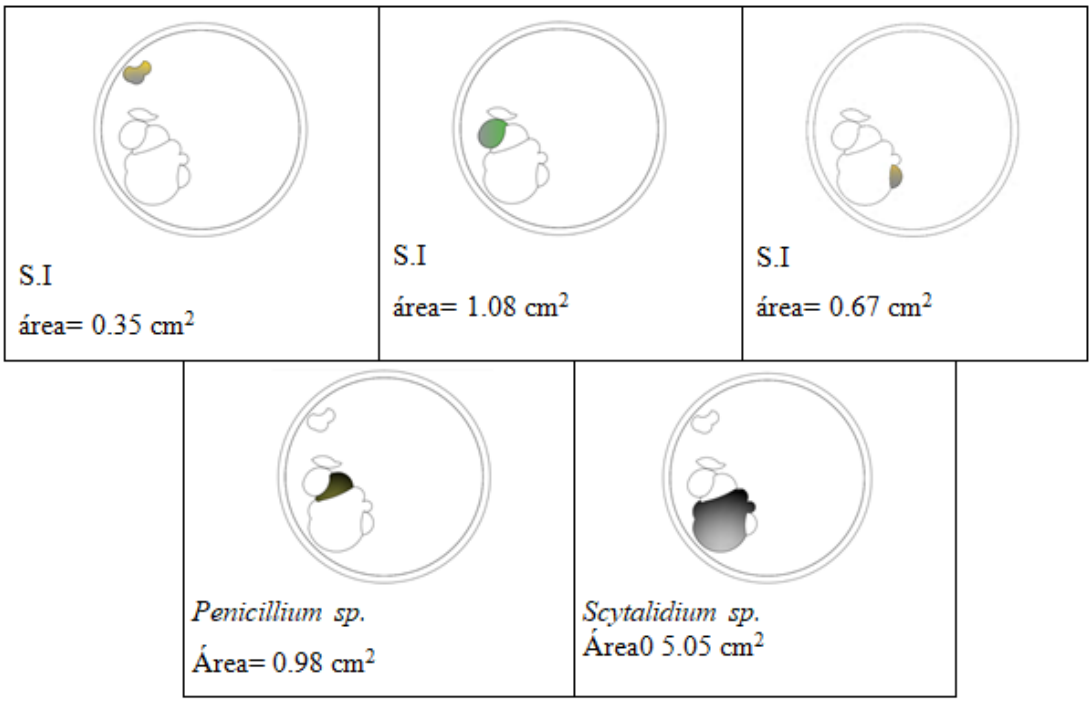


Figura 8. Hongos filamentosos asociados a colonias marrón sospechosas de ser *Cryptococcus* sp. En medio niger después de 48 horas de incubación A) caja de dónde se obtuvieron los aislados M2A7 y M2A8, dilución 1:100 muestra proveniente de *Pinus* sp. B) caja de dónde se obtuvo el aislado M3A13, muestra sin diluir proveniente de *Schinus molle* C) caja de dónde se obtuvo el aislado M4A19, muestra sin diluir proveniente de *Pinus* sp.



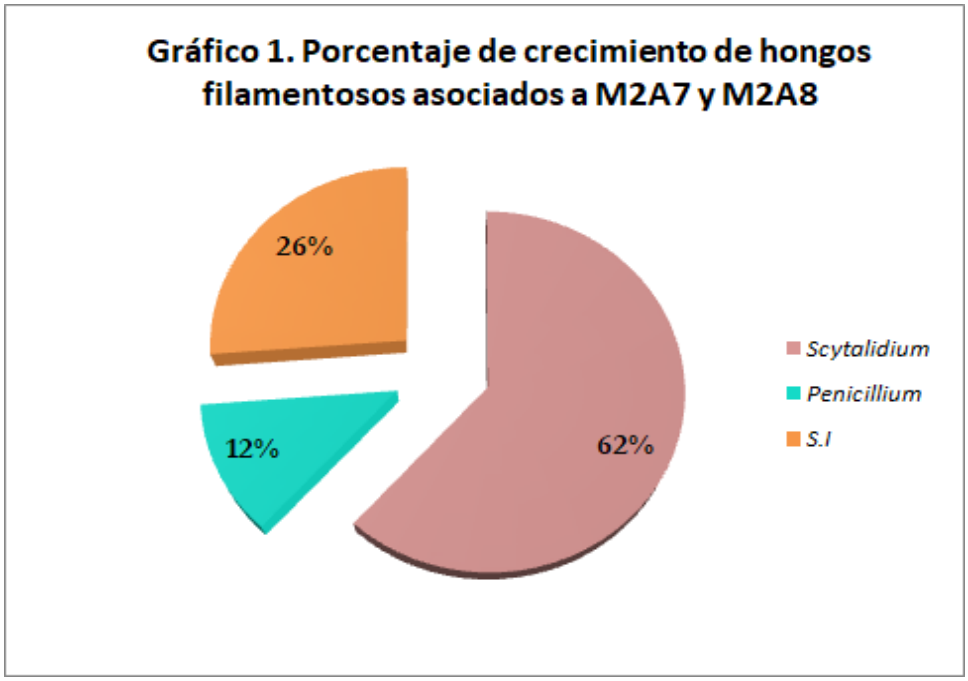
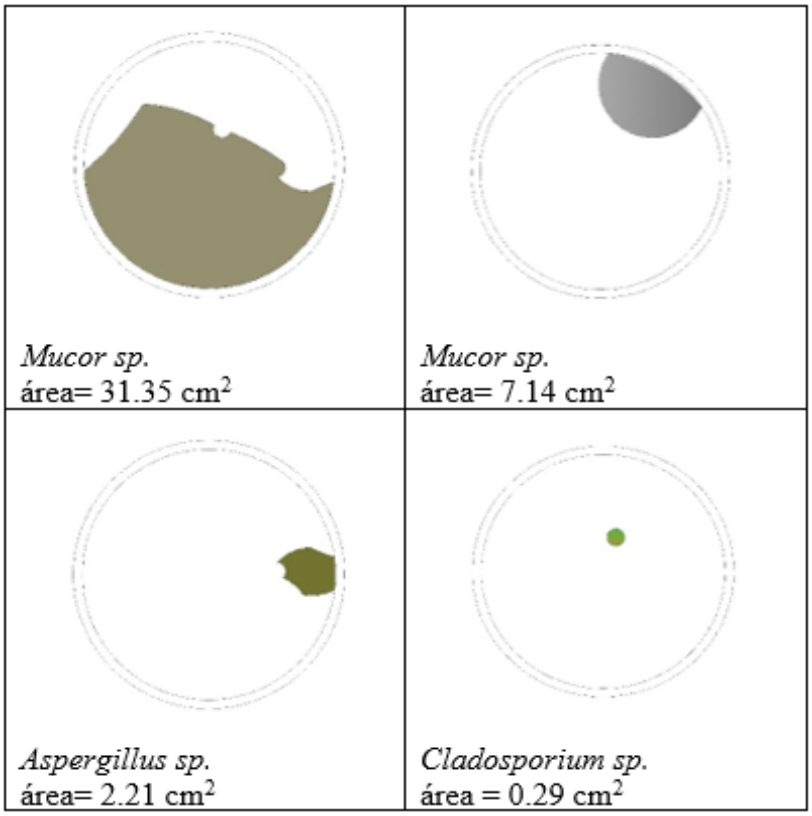


Figura 9. Cálculo del área y porcentaje de crecimiento de los hongos filamentosos asociados a los aislados de color marrón M2A7 y M2A8 proveniente del árbol *Pinus* sp.



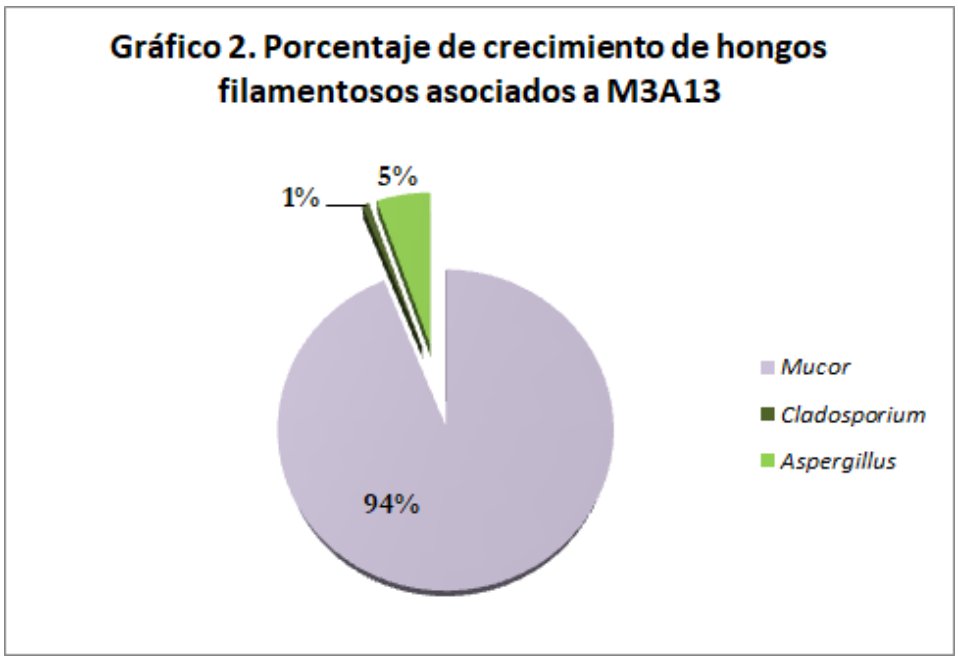
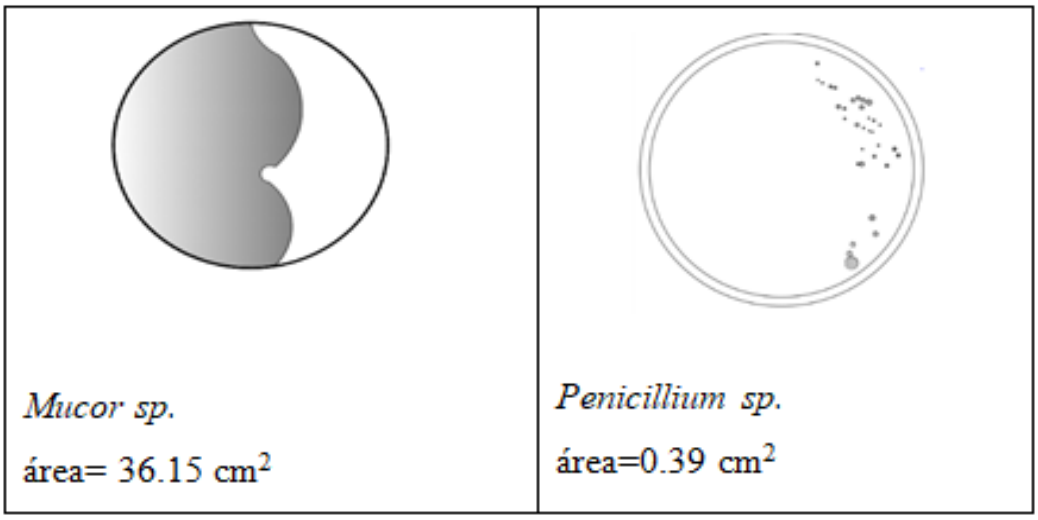


Figura 10. Cálculo del área y porcentaje de crecimiento de los hongos filamentosos asociados al aislado de color marrón M2A13 proveniente del árbol *Schinus molle.*



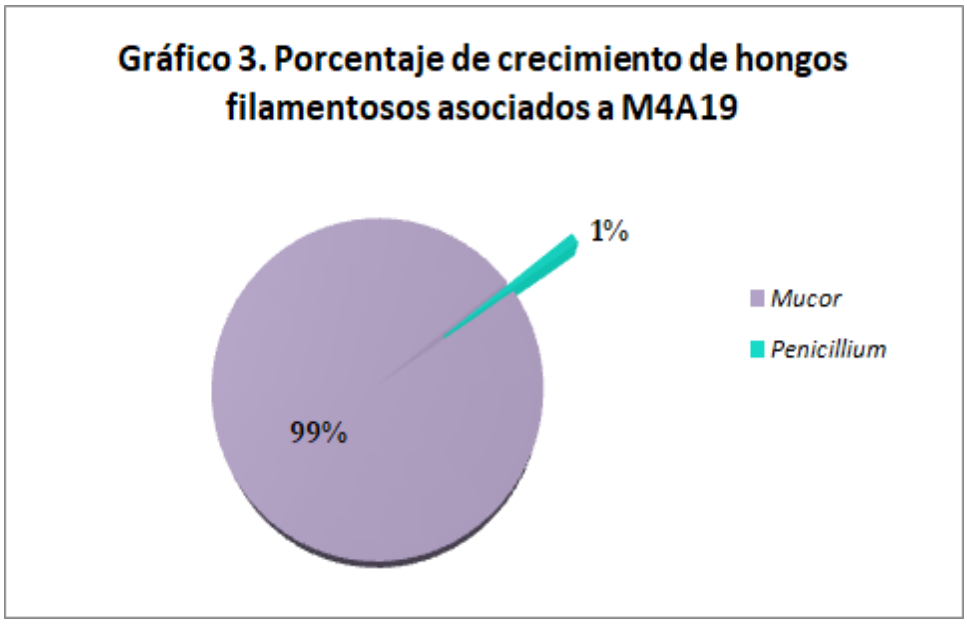


Figura 11. Cálculo del área y porcentaje de crecimiento de los hongos filamentosos asociados al aislado de color marrón M4A19 proveniente del árbol *Pinus* sp.

Índice de Simpson

	M2A7, M2A8		M3A13		M4A19	
	Área	**p_i**	**área**	**p_i**	**área**	**p_i**
Mucor	-		**38.49 cm²**	**0.9390**	**36.15 cm²**	**0.9893**
Scytalidium	**5.05 cm²**	**0.6211**	-		-	
Aspergillus	-		**2,21 cm²**	**0.0539**	-	
Penicillium	**0.98 cm²**	**0.1205**	-		**0.39 cm²**	**0.0106**
Cladosporium	-		**0.29 cm²**	**0.007**	-	
Mycelia Sterilia	**2.1 cm²**	**0.2583**	-		-	
Total	**8.13 cm²**		**40.99 cm²**		**36.54 cm²**	

$\lambda_{M2A7, M2A8} = (0.6211)^2 + (0.1205)^2 + (0.2583)^2 = 0.4640$

$\lambda_{M3A7} = (0.9390)^2 + (0.0539)^2 + (0.007)^2 = 0.8846$

$\lambda_{M4A4} = (0.9893)^2 + (0.0106)^2 = 0.9788$

- **Índice de diversidad de Simpson**

$1-\lambda_{M2A7, M2A8} = 1 - 0.4640 = 0.533$

$1-\lambda_{M3A7} = 1 - 0.8846 = 0.1114$

$1-\lambda_{M4A4} = 1 - 0.9788 = 0.1212$

6.4.4 Colonias levaduriformes

Morfología macroscópica

En total se obtuvieron 23 aislados de colonias levaduriformes con cápsula provenientes de 16 árboles pertenecientes a 7 géneros distintos (Cuadro 7). De estos, solo 4 presentaron colonias de color marrón en agar semilla de niger y fueron recuperados en un periodo de 24 a 48 horas de incubación. Los aislados marrón M2A7 y M2A8 se obtuvieron en el muestreo 2 de la misma caja de cultivo en la concentración 1:100 de dos colonias separadas, el origen de la muestra corresponde a *Schinus molle* (árbol de Pirúl). El tercer aislado M3A13 se obtuvo en el muestreo 3, de una caja con inóculo de la muestra sin diluir proveniente de *Erythrina coralloides* (árbol Colorín), mientras que el cuarto aislado marrón M4A19 obtenido del muestreo 4 (Fig. 12, B-1), se recuperó de una caja de cultivo con el inóculo de la muestra sin diluir proveniente de un árbol del género Pinus *sp*.

Los 19 aislados restantes presentaron coloraciones beige (Fig. 12 A1-3) en agar semilla de niger, recuperados en un periodo de 48 horas de incubación, obteniendo 6 aislados en el primer muestreo, 2 aislados en el segundo muestreo, 5 aislados en el tercer muestreo y 6 aislados en el cuarto muestreo.

Morfología Microscópica

Aislamientos color beige: Durante la purificación de estos aislados se observaron diferentes morfologías en donde la mayoría de las células presentaban forma esférica y ovoide con una sola gemación, en algunos casos se registró la presencia de células irregulares con dos o múltiples gemaciones y en otros aislados también se observó la presencia de formas muy alargadas (Fig. 13), que en ocasiones presentaban cápsula en tinción negativa con tinta china, aunque la mayoría de estas morfologías fueron desapareciendo en el transcurso de la purificación, en algunos aislados continuaron desarrollándose después de más de 3 ciclos de procesamiento.

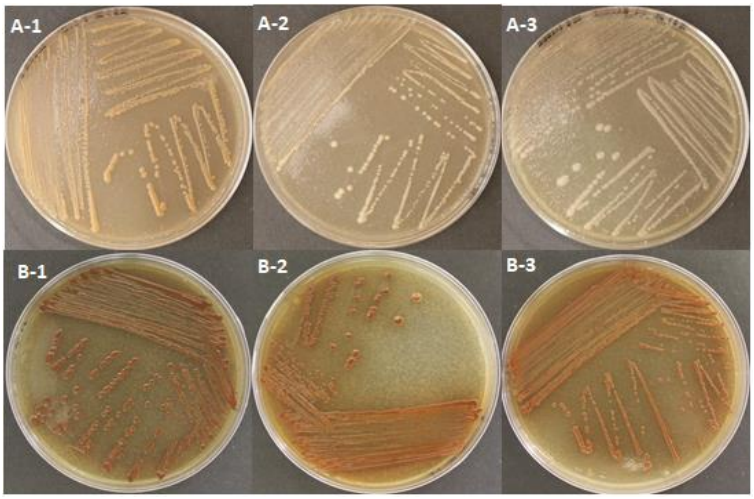


Figura 12. Morfología macroscópica de aislados obtenidos en diferentes muestreos en agar niger después de 48 horas de incubación A) Colonias de color beige, opacas, lisas con bordes regulares A-1) aislado M1A6 de *S. molle* A-2) aislado M1A1 de *J. mimosifolia* A-3) aislado M3A14 de *Ficus sp.* B) Colonias de color marrón, brillantes, lisas con bordes regulares B-1) aislado M4A19 de *Pinus sp*. B-2) aislado M2A8 de *S. molle* B-3) M3A13 de *Erythrina coralloides.*

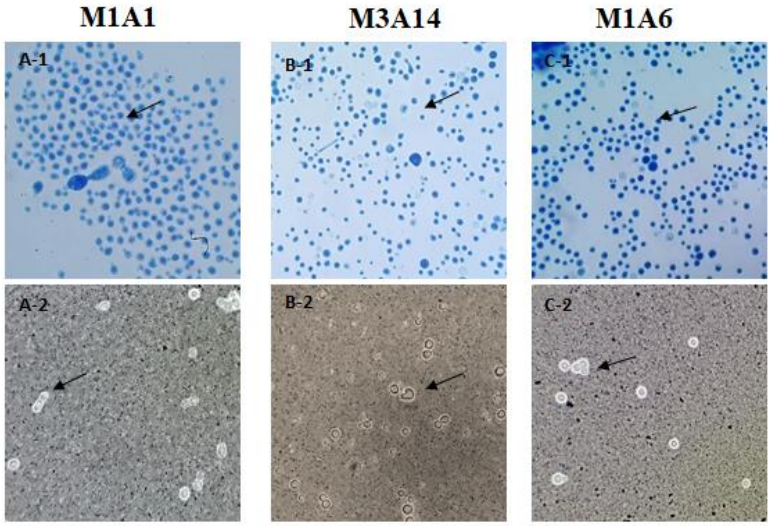


Figura 13. Morfologías irregulares observadas en aislados de color beige. Aumento 40X A-1) aislado M1A1 se observan células alargadas en examen directo con azul de algodón; A-2) morfología alargada encapsulada en preparación fresca con tinta china; B-2) aislado M3A14 se observan levaduras en gemación y células irregulares de mayor tamaño en examen directo con azul de algodón; B-2) morfología irregular encapsulada en preparación fresca con tinta china; C-1) aislado M1A6, levaduras en gemación única y múltiple en examen directo con azul de algodón; C-2) morfología encapsulada en preparación fresca con tinta china.

Aislados de color marrón: A diferencia de los aislados de color beige, en las colonias que presentaron pigmento marrón en agar semilla de niger, se observó una morfología homogénea desde los primeros exámenes directos en donde se observaron células esféricas regulares, gemación única y la presencia de cápsula en preparación fresca con tinta china (fig. 14). Al comparar la morfología con la cepa de referencia se observó que el grosor de la cápsula presenta mayor variación de tamaño en los aislados de origen ambiental en donde se observaron cápsulas delgadas y gruesas mientras que en la cepa control de *Cryptococcus* de origen clínico el grosor de la cápsula era homogéneo en la mayoría de las células.

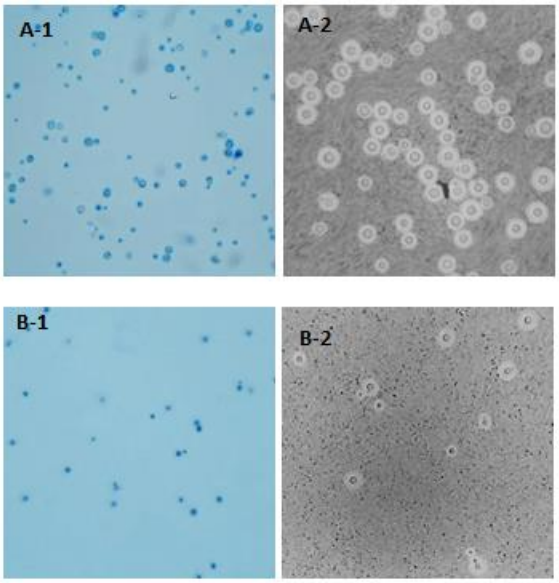


Figura 14. Morfología microscópica en aislados de color marrón después de la purificación. Aumento 0X A-1) aislado M4A19, se observan levaduras en gemación, con forma esférica; A-2) con cápsula en preparación fresca con tinta china; B-1) cepa control de *Cryptococcus* de origen clínico FM724, se observan levaduras esféricas en gemación en examen directo con azul de algodón; B-2) levaduras capsuladas en preparación fresca con tinción negativa con tinta china.

6.5 Pruebas de identificación

6.5.1 Síntesis de Melanina

Para corroborar la presencia de pigmento marrón (síntesis de melanina por la enzima fenoloxidasa) se tomó una asada de los aislados purificados que se encontraban en medio ADS, se sembraron en agar semilla de niger y se incubaron a 25°C por 48 horas. Después de la incubación se observó el crecimiento de colonias lisas, de bordes regulares, únicamente los aislados M2A7, M2A8, M3A13 y M4A19 presentaron una pigmentación de color marrón, de estos cuatro, solo en el aislado M4A19 se observaron colonias brillantes y de mayor tamaño (Fig. 15), similares a las observadas en la cepa control de *Cryptococcus gattii*. Los 19 aislados restantes que habían presentado colonias de color beige en agar semilla de niger fueron sembrados e incubados de la misma manera después de la purificación, sin embargo, después de las 48 horas las colonias conservaron coloraciones beige y blancas.

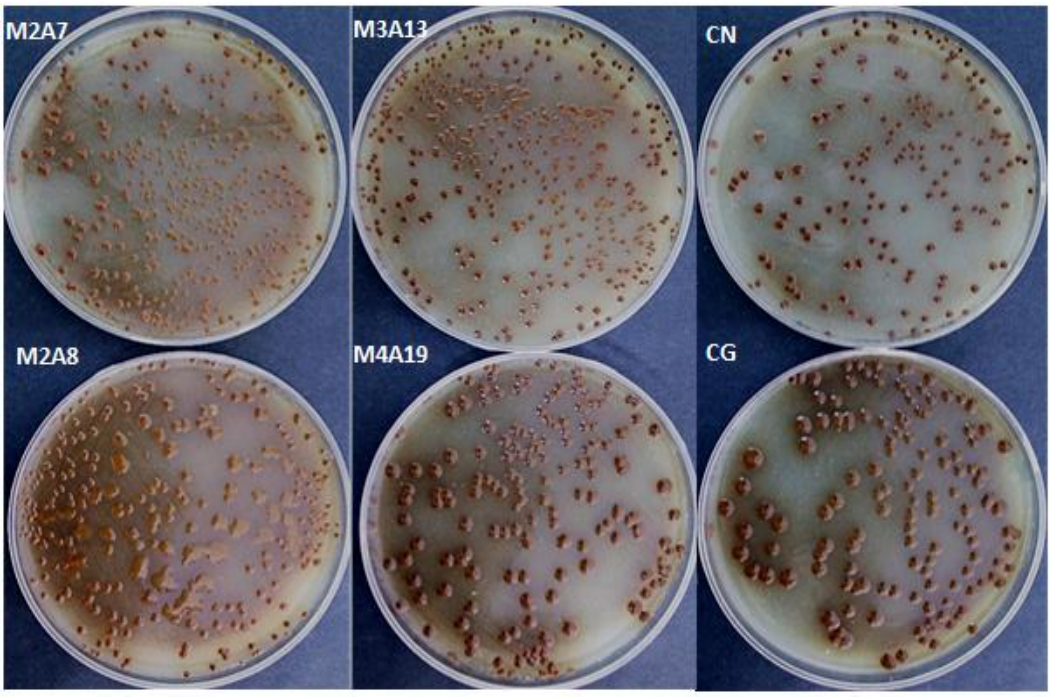


Figura 15. Aislados purificados M2A7, M2A8, M3A13 y M4A19 y controles CN), *C. neoformans* FM726 CG), *C. gattii* FM724 creciendo en agar semilla de niger, después de 48 horas de incubación, se observan colonias lisas, brillantes de color marrón.

6.5.2 Hidrólisis de urea de Christensen en tubo

Como se mencionó en la metodología, se sembró una asada de cada aislado en tubos de vidrio con medio urea de Christensen y se incubaron por 48 horas a 30°C. Después de incubarlos por 24 horas, se observó el viraje del medio, de color amarillo a rosa para los aislados M2A7, M2A8, M3A13 y M4A19 con pigmento marrón igual que la cepa control de *C. neoformans* FM726. En los 19 aislados restantes que presentaron colonias de color beige en agar semilla de niger, se observó un resultado parcial después de las 48 horas de incubación, obteniendo distintas coloraciones rosa pálido (Fig. 16), por lo que estos resultados se tomaron como negativos para la presencia de la enzima ureasa.

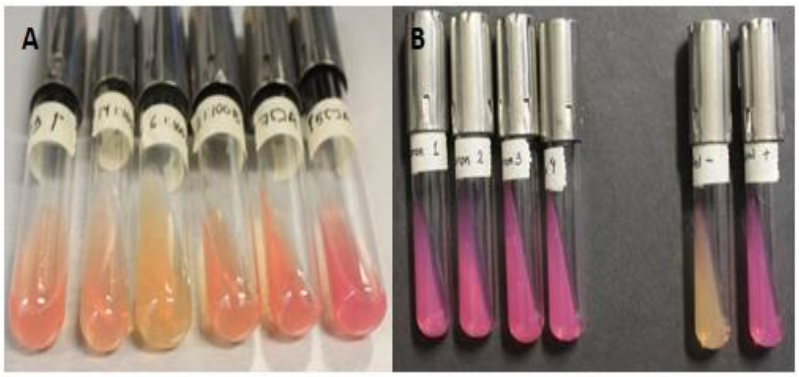


Figura 16. Prueba de hidrólisis de urea de Chistensen. A) Hidrólisis de urea en algunos aislados que presentaron colonias de color beige en agar semilla de niger M1A1, M1A6, M2A9, M3A11, M3A16, M4A22 resultados parciales/negativos. B) hidrólisis de urea en aislados que presentaron colonias de color marrón M2A7, M2A8, M3A13 y M4A19. Se muestran los controles positivos (cepa de *C. neoformans* FM726) y negativo (cepa de *C. albicans* FM828).

6.5.3 Termotolerancia a 37°C

Después de realizar la prueba de ureasa y síntesis de melanina, todos los aislados fueron procesados para obtener un inóculo a una concentración del 0.5 en la escala de McFarland, el cual fue sembrado en cajas con medio ADS e incubado por 5 días a 37°C. Se registró crecimiento de colonias después de las 48 horas de incubación en los aislados que presentaron colonias con pigmentos marrón en la prueba de síntesis de melanina M2A7, M2A8, M3A13 y M4A19, así como en algunos de los aislados que presentaron colonias de color beige M1A6, M2A10, M3A14 y M4A18, en el resto de aislados con colonias color beige no se observó crecimiento. La termotolerancia fue evaluada cualitativamente en escala de 1 a 3 de acuerdo a la proporción de colonias en cada caja de cultivo como se muestra en el Cuadro 8, tomando como 3 la proporción de colonias más parecida a la observada en las cepas control de *C. neoformans* y *C. gattii*.

El crecimiento a 37°C es uno de los principales factores de virulencia de las especies de *C. neoformans/C. gattii* y es considerado crucial para el inicio de la patogénesis, por ello se aplicó esta prueba a los aislados con cápsula que no pudieron ser caracterizados como levaduras del complejo *C. neoformans/C. gattii* mediante las pruebas de ureasa y síntesis de melanina, ya que se han reportado otras especies del género *Cryptococcus* como agentes causantes de criptococosis (Khawcharoenporn et al., 2007).

6.5.4 Resistencia a la L-Canavanina

Una vez realizadas las pruebas de síntesis de melanina, presencia de ureasa y crecimiento a 37°C, se obtuvieron diecinueve aislados con perfiles no característicos del género *Cryptococcus* y cuatro aislados identificados como *Cryptococcus sp*. Sin embargo, a los veintitrés aislados se les realizó la prueba de resistencia a la L-canavanina. Para realizar esta prueba, se tomó una asada de las colonias que se encontraban en medio ADS y se sembró en cajas de 60x15 mm con medio CGB y se incubaron durante 48 horas a 30°C. Se observó viraje del medio de color amarillo a azul cobalto, indicando un resultado positivo a las 48 horas de incubación para el aislado M4A19, además se registró crecimiento de pequeñas colonias igual que en la cepa control de *C. gattii* FM724, mientras que en los aislados M2A7, M2A8 y M3A13 el resultado fue negativo evidenciando sensibilidad a la L- Canavanina tal como la cepa control de *C. neoformans* FM726, de igual manera los diecinueve aislados restantes presentaron un resultado negativo.

El aislado M4A19 caracterizado como *C. gattii* mediante esta prueba, proviene de una muestra que fue tomada en el muestreo 4 (Cuadro 7) de una oquedad menor a 5 cm de diámetro, poco profunda, con exposición solar media, cerca de la base de un árbol *Pinus sp.,* (fig. 17 B) con coordenadas N 19°29.936' W099°07.084' localizado dentro del camellón correspondiente al cuadrante 3, a la orilla de la vialidad de ingreso a la colonia Santa Isabel Tola (Fig. 6). En el área se encontraban otros árboles como *Schinus molle* y *Eucalyptus sp*. y otros elementos como manchones de vegetación herbácea, suelo seco arenoso. En cuanto a fauna se observaron perros que rondaban el lugar y aves pequeñas, aunque no se observaron nidos en los árboles del área.

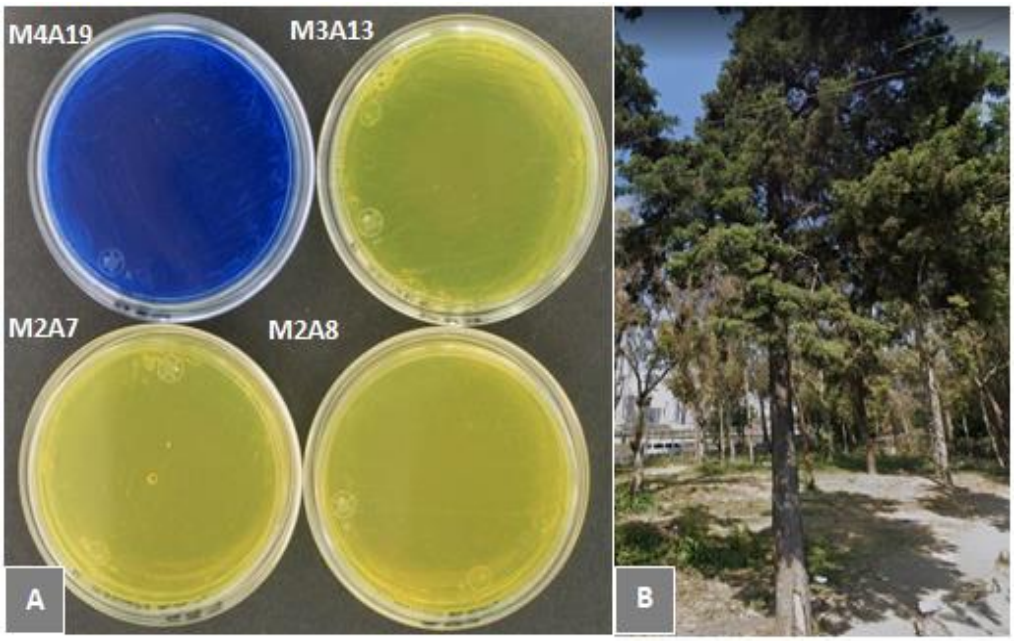


Figura 17. A) Resultados de la prueba de resistencia a la L- Canavanina, en medio CGB después de 48 horas de incubación en aislados caracterizados como *Cryptococcus sp*., se muestra resultado positivo en el aislado M4A19 y negativo en M3A13, M2A7 y M2A8; **B)** Árbol *Pinus sp.* relacionado al área de desplazamiento del paciente del cual se tomó el aislado M4A19 caracterizado como *C. gattii*.

6.6 Genotipificación molecular por PCR-RFLP

6.6.1 Extracción de ADN

En los aislados M2A7, M2A8 y M3A13 se obtuvo ADN genómico con un tamaño mayor a 6557 pb, mientras que en el aislado M4A19 se obtuvo ADN genómico con un peso molecular mayor a 23130 pb, muy parecido a la cepa control correspondiente a *C.gattii* VGI.

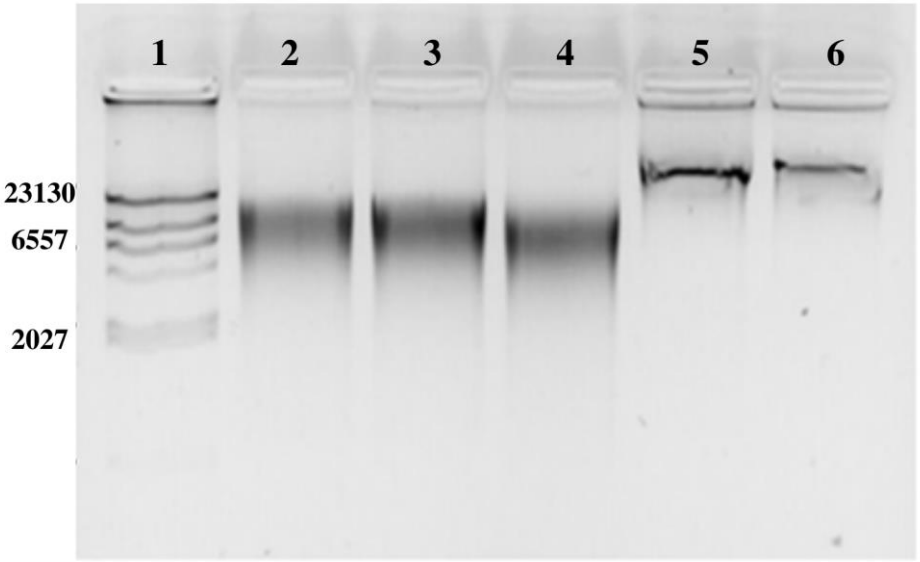


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% muestra la calidad del ADN genómico de aislados ambientales obtenidos de los árboles. Carril **1**. Marcador de peso molecular Lambda *Hind* III, Aislados caracterizados bioquímicamente como *C. neoformans* Carril **2.** M2A7 Carril **3.** M2A8 Carril **4.** M3A13. Carril **5**. aislado ambiental caracterizado bioquímicamente como *C. gattii* M4A19. Carril **6.** cepa control de *C. gattii* WM 179.

6.6.2 Amplificación del gen *URA5*

Como se mencionó anteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen *URA5* con la finalidad de hacer la identificación molecular del género *Cryptococcus*, por lo que se esperaba obtener un fragmento de 779 pb aproximadamente, según la caracterización del gen en especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* (Edman y Kwon- Chung 1990) (Meyer et al., 2003). Los resultados de la amplificación muestran bandas que se aproximan al tamaño esperado (779 pb) del gen *URA5* (fig. 19) para las cepas de referencia y para los aislados M2A7, M2A8 y M3A13, mientras que para el aislado M4A19 se obtuvo una banda de un tamaño aproximado de 700 pb.

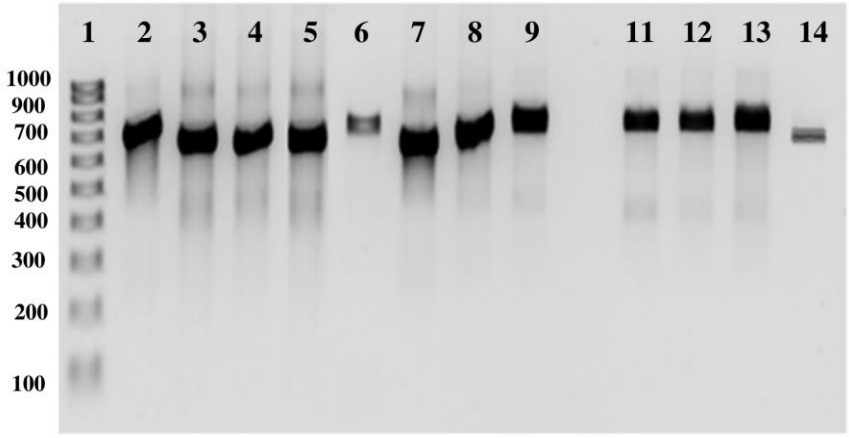


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gen *URA5*. **Carril 1)** marcador de peso molecular de 100 pb; **Carriles 2-5)** cepas de referencia de *Cryptococcus* correspondientes a los genotipos de *C. neoformans* **Carriles 6-9)** cepas de referencias, genotipos de *C. gattii*, se observan bandas de aproximadamente 779 pb. **Carriles 11-14)** aislados ambientales obtenidos de árboles relacionados con la ruta del paciente M2A7, M2A8, M3A13 y M4A19 se observa una banda de aproximadamente 700 pb.

6.6.3 Doble digestión con enzimas de restricción

Para determinar el genotipo de los aislados, se realizó la digestión con las enzimas de restricción *Sau*96I y *Hha*l siguiendo el procedimiento que se indica en la metodología. Después de realizar la electroforesis se analizaron los patrones de bandeo (fig. 20). Al comparar con las cepas de referencia, se observó que el patrón de bandeo de los aislados M2A7, M2A8 y M3A13 corresponde con el genotipo VNI de *C. neoformans*, mientras que el bandeo observado en el aislado M4A19 corresponde al genotipo VGI de *C. gattii*.

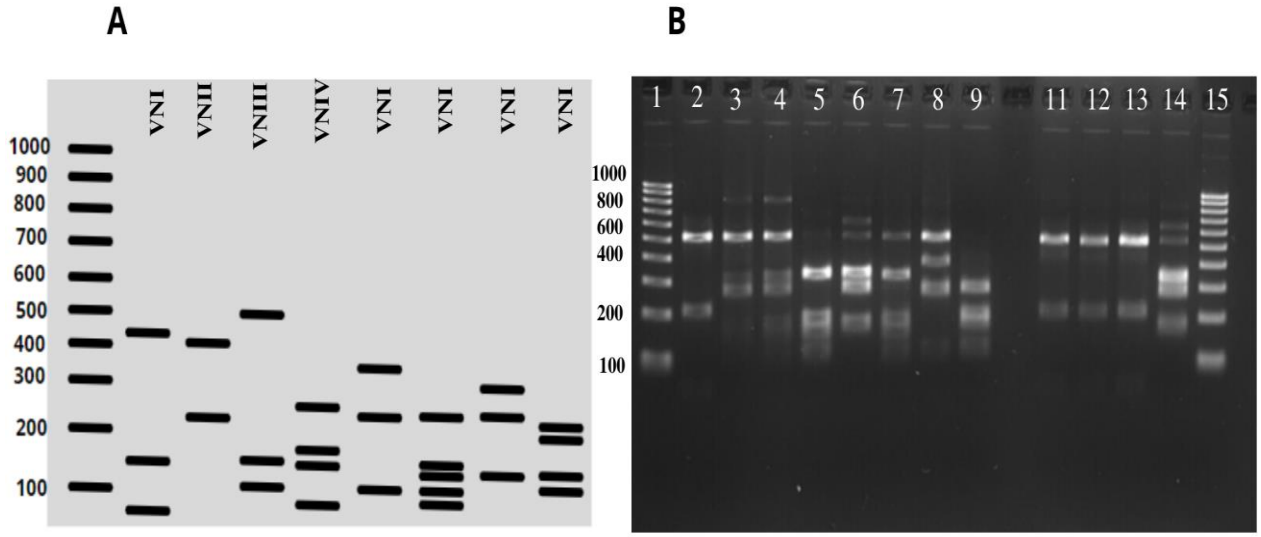


Figura 20. A) Esquema de PCR-RFLP del gen URA5 de los 8 genotipos de las especies del complejo *C. neoformans/ C. gattii* reportado por Meyer et al., 2003 con con las enzimas *Sau961* y *HhaI* del gen *URA5*. **B**) Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos digeridos con las enzimas *Sau*96I y *Hha*I del gen *URA5*. **Carril 1 y 15** marcador de peso molecular de 100 pb; **Carriles 2-9** cepas de referencia de los 8 genotipos del complejo de especies *C. neoformans/ C, gattii*; **Carriles 11-13** aislados ambientales de árboles caracterizados bioquímicamente como *Cryptococcus neoformans*, el patrón de bandeo corresponde con el genotipo VNI. **Carril 14**. El aislado ambiental caracterizado bioquímicamente como *C. gattii* corresponde con el genotipo VGI.

6.6.4 Genotipificación muestra clínica del paciente.

Después de caracterizar la cepa del paciente, proporcionada por el INNN, mediante las pruebas bioquímicas de hidrólisis de urea, síntesis de melanina y resistencia a la L-canavanina, se llevó a cabo la extracción de ADN y la amplificación del gen *URA5* en donde se observó una banda de aproximadamente 700 pb igual que las cepas de referencia (Fig. 21) de *C. gattii* WM179, *C. neoformans* WM148 y el aislado de *Pinus* relacionado a la ruta de desplazamiento del paciente M4A19. Posteriormente se realizó la digestión del gen *URA5* con las enzimas de restricción *Sau*96I y *Hha*I para su genotipificación, en donde se observó que el patrón de bandeo de la cepa aislada del paciente 277 INNN coincide con el patrón de bandas del aislado M4A19 y ambos corresponden con el genotipo VGI según la cepa de referencia de *C. gattii* WM179.

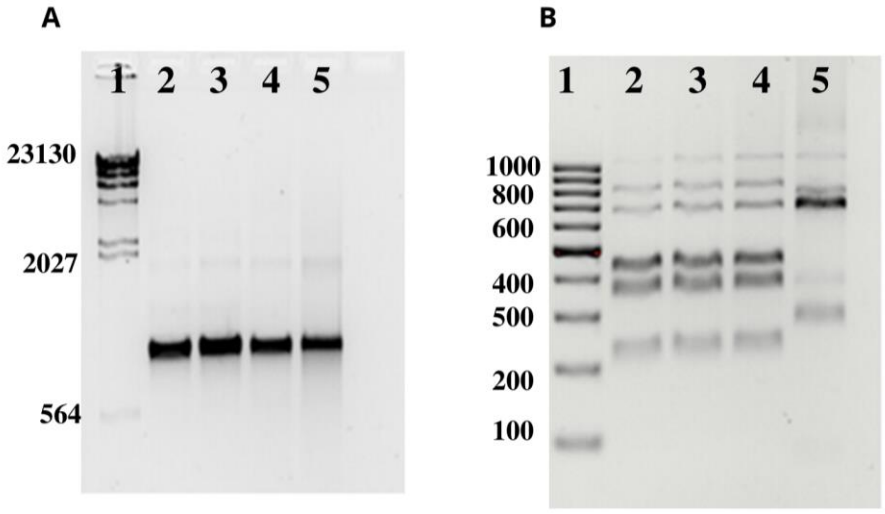


Figura 21. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gen *URA5*. **Carril 1.** marcador Lambda *Hind* III, Carril **2.** cepa del paciente 277 INNN,Carril **3.** aislado M4A19, **Carriles 4** y **5** cepas de referencia de *C. gattii* y *C. neoformans.* **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos digeridos con las enzimas Sau*96I* y *HhaI* **Carril 1**. Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2.** cepa recuperada del paciente 277 INNN. **Carril 3.** aislado M4A19 recuperado de *Pinus* sp. **Carril 4**. cepa de referencia *C. gattii* WM179. Carril **5.** cepa de referencia *C. neoformans.*

7 Discusión

La criptococosis meníngea causada por *C. gattii,* es una micosis de baja incidencia en México (López et al., 2014) (Cervantes 2017), aunque la mortalidad es menor que con *C. neoformans*, se ha observado que los pacientes con afectación cerebral por *C. gattii* presentan secuelas neurológicas más graves que incluyen hidrocefalia, ataxia, pérdida auditiva, afectación en la concentración y presiones intracraneales más altas que a menudo requieren cirugía, además de que las infecciones ocasionadas por esta especie siguen un curso clínico prolongado y responden más lentamente a la terapia antifúngica (Walraven et al., 2011). En la clínica es poco común la identificación de *C. gattii* y el diagnóstico es un reto para el médico, debido a que esta micosis es más común en pacientes inmunocompetentes y presenta síntomas que pueden confundirse con otras infecciones ocasionadas por bacterias y virus. Aunque la criptococosis meníngea no está formalmente reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida, lo cual reduce aún más su estudio, se encuentra en la lista de enfermedades con menor financiamiento según el informe Global de innovación para enfermedades desatendidas (G- finder) de 2016, con solo el 0.2% de los fondos disponibles relevantes para investigación y desarrollo (Molloy et al., 2017). Lo anterior, destaca la necesidad de generar nuevas investigaciones enfocadas a la epidemiología, ecología, fisiopatogenia y distribución de *C. gattii,* incluyendo el hábitat o reservorios naturales de donde los pacientes pueden estar adquiriendo al hongo, por lo que el punto de partida de este estudio fue seguir la ruta de desplazamiento de un paciente diagnosticado con criptococosis causada por *C. gattii* en la Ciudad de México.

El método de muestreo basado en los hábitos de desplazamiento de un paciente, se utilizó debido a la baja o nula frecuencia de aislamiento de la especie *C. gattii* a partir de muestras ambientales en nuestro país, ya que en estudios previos realizados por Sánchez (2001), Castañón et al., (2007) y Cervantes (2017), se aplicó el criterio de selección "zonas transitadas de la ciudad con gran cantidad de árboles" para elegir el área de trabajo, realizando muestreos aleatorios simples sin éxito alguno.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo podemos plantear que la utilización de los datos de desplazamiento de un paciente con criptococosis por *C. gattii* facilita la localización de las posibles fuentes naturales de la levadura y consecuentemente su aislamiento. Ya que el paciente nos señaló la ruta por la que habitualmente transitaba antes

de la infección, pudimos inferir que en esa zona podría encontrarse el sitio en el que la levadura habita y que por lo tanto la exposición continua a este sitio y a los propágulos infectantes del hongo, podrían aumentar la posibilidad de que el paciente pudiera adquirir la infección.

En este trabajo, logramos el aislamiento de *C. gattii* a partir de un árbol del género *Pinus,* el análisis bioquímico y genotípico tanto de la cepa ambiental como la clínica, mostraron los mismos resultados, aunque para confirmar si se trata de la misma cepa se requieren estudios más finos como, por ejemplo, un análisis de genoma completo.

El éxito de aislamiento de *C. gattii* también podría estar relacionado con otros factores ambientales como la temporada en la que se realizó el muestreo (septiembre-febrero), meses correspondientes a la temporada de otoño y el inicio del invierno en México. Durante esta temporada, el clima es generalmente seco, con temperaturas moderadas y poca precipitación pluvial (Vidal 2005). Estos resultados, coinciden con los obtenidos en otros estudios realizados a partir de muestras tomadas de oquedades de distintos árboles (Randhawa et al., 2011) y muestras de aire (Kidd et al., 2007), en donde se reportan mayor cantidad de aislamientos de *C. gattii* en condiciones ambientales de baja humedad y temperaturas elevadas, correspondiendo al otoño en India y al verano en Canadá. El método de aislamiento empleado en el presente estudio contribuyó probablemente en la recuperación de la cepa de *C. gattii*, sin embargo, sólo pudimos obtener un solo aislado, esto puede deberse al número de árboles estudiados, ya que solo se muestreo el 50% de los árboles presentes en el área de estudio (46 de un total de 99), por lo que se propone que en estudios a futuro se incremente el número de árboles muestreados y consecuentemente el número de muestras por cada árbol registrado.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto importante que pudo favorecer la frecuencia de aislamiento fue la modificación que implementamos en la técnica de cepillado de oquedades, descrita por Randhawa et al., (2005). La modificación consistió en el uso de cepillos citológicos en lugar de hisopos, lo que resultó en una obtención más sencilla y abundante del sedimento dentro de las oquedades, pues solo fue necesario sumergir el cepillo una vez en la solución salina para tomar la muestra, a diferencia del hisopo de algodón que no fue de gran utilidad para tomar el sedimento y al sumergirlo en la solución salina el algodón se desprendía quedando en el fondo del tubo, caso contrario al cepillo (fibras de plástico) con el que se obtuvo mayor cantidad de muestra con un solo raspado.

Otro punto a destacar en la metodología del presente estudio, es la técnica de dilución en placa con medio agar semilla de niger (*Guizotia abyssinica*), que consistió en sembrar la muestra (sedimento de las oquedades de los árboles suspendido en solución salina) y dos diluciones adicionales, a diferencia de la metodología original (Randhawa et al., 2005) en dónde solo se sembró la muestra sin diluir, esta modificación se realizó con la finalidad de reducir la cantidad de microorganismos contaminantes en la muestra original y facilitar el crecimiento y aislamiento de colonias sospechosas de ser *Cryptococcus*. Lo anterior permitió la observación de la morfología macroscópica, así como la evaluación de dominancia (según el área de crecimiento) de otros hongos filamentosos en diferentes concentraciones del inóculo. A pesar de que esta modificación redujo considerablemente la presencia de hongos filamentosos e hizo posible el aislamiento de dos colonias de *Cryptococcus* posteriormente identificadas como *C. neoformans* en la dilución 1:100, en algunos otros casos redujo el crecimiento de las colonias levaduriformes, ya que en las cajas con diluciones 1:100 y 1:1000 se observó menor crecimiento, de ahí que la mayoría de las colonias sospechosas de ser *Cryptococcus* (colonias de color beige) se aislaron de cultivos de la muestra sin diluir (cuadro 7). Los hongos contaminantes más frecuentes y con mayor área de crecimiento fueron identificados dentro del orden de los Mucorales los cuales presentan una tasa de crecimiento rápida, mientras que las colonias levaduriformes tienen un crecimiento más lento y su desarrollo puede verse afectado debido a la competencia por el espacio y por la disponibilidad de nutrientes, tanto en el medio ambiente como en los medios sintéticos (Schmertmann et al., 2019). Aunque se ha planteado una relación de *C. gattii* con comunidades fúngicas específicas que favorecen su crecimiento en las oquedades de los árboles, los resultados de este estudio coinciden con los reportados por Schmertmann et al. (2019) al no haber una relación clara entre la presencia de *C. gattii* y otras especies de hongos. No podemos descartar que la baja frecuencia de aislamiento de *C. gattii* también podría estar relacionada con una baja abundancia de la levadura en el ambiente, por lo que no puede ser detectada sólo con metodologías basadas en cultivo y probablemente se requiere de la aplicación de técnicas más sensibles, como las técnicas moleculares.

Los métodos que incluyen análisis moleculares y filogenéticos permiten caracterizar comunidades microbianas en cualquier sustrato, estos métodos están basados en el estudio de la diversidad genética y son independientes del cultivo (Goyal et al. 2017), estas pruebas ofrecen mayor sensibilidad permitiendo la detección e identificación de hongos poco

abundantes o incluso no cultivables en condiciones *in vitro*. Una de las ventajas de trabajar con moléculas de ADN es su estabilidad ante condiciones adversas (poca humedad, altas temperaturas, largos periodos de tiempo, etc). La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, debido a su potencial se han desarrollado distintas variantes como: PCR-RFLP, PCR-AFLP, RT-PCR entre otras, que permiten, entre otras cosas, la identificación de género o incluso especies de distintos microorganismos. Además de la PCR, también se podría utilizar otra tecnología como la secuenciación que nos permitiría un análisis más profundo del material genético, este tipo de estudios tienen un amplio rango de aplicaciones como la taxonomía, medicina, evolución, ecología de poblaciones etc. La secuenciación de primera generación tipo Sanger ha sido ampliamente utilizada para conocer el genoma completo o fragmentos distintivos, de distintas especies principalmente de microorganismos de importancia médica (Valdelamar et al. 2011), en el caso de los hongos se utilizan las regiones ITS como código de barras (Taberlet et al., 2012) (Necochea y Canul 2004). Dentro de las ventajas de esta técnica son que no requiere del cultivo *in vitro*, presentan una alta sensibilidad y los resultados pueden obtenerse en menos tiempo, sin embargo, presenta algunas desventajas como costos relativamente más elevados por el equipo y reactivos requeridos, una buena calidad del material genético, además el uso de biomarcadores específicos para cada taxón de hongos (Vargas 2013). En los últimos años ha surgido la secuenciación de próxima generación o NGS (*next-generation sequencing*) que consiste en un análisis metagenómico basado en amplicones o *metabarcoding*, con el concepto de que cada unidad taxonómica operativa (OTU) puede identificarse inequívocamente usando códigos de barras de ADN. Esta tecnología actualmente es el método más utilizado para la evaluación de microbiomas (Schmertmann et al., 2019) y las ventajas que ofrece son: alta sensibilidad, capacidad para caracterizar comunidades microbiológicas y el tiempo de obtención de datos es relativamente rápido, sin embargo, también presenta desventajas relacionadas con el costo y con el análisis de datos por el requerimiento de análisis bioinformáticos especiales (Taberlet et al., 2012) (Schmertmann et al., 2019). Lo anterior no sugiere el reemplazo de los métodos basados en cultivo por la secuenciación, sino el uso de estas técnicas en conjunto para la identificación de organismos a partir de muestra ambientales, que nos permitan obtener mayor información sobre las posibles interacciones de *Cryptococcus* con otros microorganismos. Esta información no sólo tendría impacto a nivel ecológico sino también en la salud humana con datos que ayuden a

comprender la evolución de la levadura en términos de su patogenicidad, pues se ha comprobado que ciertas bacterias como *P. aeruginosa* (aislados clínicos y ambientales) pueden inhibir el crecimiento de *C. neoformans* gracias a la secreción de factores bacterianos con acción fungistática como la piocianina, proteasas y ramnolípidos (Dhamgaye et al., 2015) (Mayer, y Kronstand 2019). Estos estudios abren una ventana en la investigación de posibles tratamientos para la criptococosis en respuesta a la resistencia a los antifúngicos, basados en los compuestos secretados por bacterias que inhiben el crecimiento de *Cryptococcus* y aunque no se ha encontrado una correlación entre la presencia de *Cryptococcus* con otros hongos (Schmertmann et al. 2019), no se puede descartar la posibilidad de que estos organismos también puedan influir positiva o negativamente en el crecimiento de *Cryptococcus* como saprobio en el medio ambiente o como patógeno dentro de un hospedero mamífero, de tal manera que pudiera existir una posible influencia de microorganismos que conforman la microbiota natural del cuerpo humano sobre el desarrollo de la criptococosis como ya se ha reportado en patologías causadas por la levadura *Candida albicans* (Morales et al., 2013) (Mayer et al., 2013).

Con respecto a las plantas como posibles nichos ecológicos de diferentes microorganismos, se han realizado algunos estudios acerca de la microbiota en el género *Pinus,* una de las principales coníferas que habita bosques del hemisferio norte, zonas subalpinas, boreales templadas y subtropicales (Millberg et al., 2015), son árboles perennes que pueden cambiar sus hojas cada 2-8 años dependiendo del clima y la especie. Estas investigaciones describen las comunidades fúngicas asociadas a estos árboles (Marmolejo 2018) (Wang et al. 2019) y se propone que estos microorganismos cumplen una función importante en la reincorporación de nutrientes al suelo, como patógenos latentes o como hongos endófitos. El aislamiento de *C. gattii* a partir de distintas especies de *Pinus sp*. ha sido reportado en otros países (Kidd et al., 2007) (Cogliati et al., 2016), sin embargo, no se ha comprobado que exista una correlación significativa de *C. gattii* con alguna especie de *Pinus*. De acuerdo a lo reportado en la literatura, nos hemos planteado que el aislamiento de *C. gattii* a partir de *Pinus* obtenido en este trabajo, podría estar relacionado con la interacción con las comunidades de hongos endófitos halladas en distintas especies de este tipo de árbol, debido a que la cantidad de materia orgánica que se encuentra disponible cuando sus acículas mueren, crea un hábitat ideal para el desarrollo de hongos microscópicos, en donde la

competencia por los nutrientes podría estar reducida significativamente, esto sin considerar las relaciones ecológicas posiblemente benéficas para *C. gattii* y para otras especies de *Cryptococcus*. Además, se ha descrito que la madera de pino es rica en compuestos fenólicos (Metsämuuronen y Sirén 2019), recordemos que estos compuestos son aprovechables para diferentes especies de *Cryptococcus,* ya que son requeridos para la síntesis de melanina, un pigmento importante para la supervivencia de estas levaduras en el medio ambiente y en el hospedero. Por otra parte en los pinos se han identificado ciertos géneros de bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (que también pueden encontrarse dentro de la microbiota natural de mamíferos) y curiosamente se han realizado estudios sobre la interacción de *Cryptococcus* con bacterias ambientales como *Bacillus safensis* y *Acinetobacter baumanii*, en donde se ha descrito que estas bacterias pueden inducir la formación de cápsulas más grandes, la producción de melanina y la formación de células titánicas en células criptocócicas, adquiriendo una función positiva para la supervivencia de *Cryptococcus* en ambientes adversos (Mayer y Kronstand 2019), no sólo en la naturaleza sino también como patógeno dentro del hospedero, ya que estas mismas características coinciden con los factores de virulencia, en especial las células titánicas observadas en aislados clínicos de *C. gattii* (Fernandes et al., 2016). Estas interacciones además de explicar la presencia de *C. gattii* en el pino, probablemente tienen un impacto en la evolución de los mecanismos de patogenicidad en levaduras del complejo *C. neoformans/ C. gattii.*

Por otra parte los hongos filamentosos asociados al aislado de *C. gattii* M4A19, *Mucor* y *Penicillium,* así como *Aspergillus* y *Cladosporium* (aislados de otros individuos de *Pinus sp.* en este estudio) han sido reportados en otros estudios realizados en México y otras partes del mundo, con tasas de aislamiento moderadas en diferentes especies de *Pinus* (Marmolejo 2018) (Wang et al,. 2019). Aunque no podemos descartar que tanto las bacterias, como las comunidades fúngicas características del pino y de otras especies de árboles pueden estar participando como antagonistas, este factor ligado con las condiciones ambientales en las que se realizó este estudio, podrían estar limitando el crecimiento de *C. gattii*, lo cual explicaría la frecuencia tan baja de aislamiento de esta levadura. Para corroborar si existe una relación entre el género *Pinus* y *C. gattii* se propone una estrategia de muestreo a partir de acículas y corteza de pino en distintas épocas del año.

Los géneros de hongos filamentosos observados en las muestras tomadas de oquedades de distintos árboles principalmente de los grupos: Pezizomycotina (*Aspergillus, Penicillium*, *Acremonium, Fusarium, Trichoderma*), Pucciniomycotina (*Rhodotorula*) y Mucoromycotina (*Mucor*) (Naranjo y Gabaldón 2019), son en su mayoría conocidos como hongos ambientales, comunes en el suelo que pueden ser transportados por el aire y cumplen una función como organismos saprobios participando en la descomposición de madera y hojarasca (Hamed 2013) (Hyde et al., 2007), esto explicaría su aislamiento de los árboles, probablemente la acción de enzimas degradadoras de lignina, sean uno de los factores importantes en la formación y desarrollo de oquedades, además está documentado que estos mismos géneros pueden tolerar altas temperaturas, condiciones de estrés osmótico, baja disponibilidad de nutrientes, entre otras características que les confieren la capacidad de invadir tejidos blandos y producir infecciones en mamíferos (Naranjo y Gabaldón 2019).

Los géneros de hongos reportados en este trabajo coinciden con los registrados previamente en el micobioma de las oquedades de ciertas especies de árboles (Schmertmann et al., 2019), sin embargo, la diversidad observada es mucho más baja comparada con ese estudio, esto probablemente se deba a la metodología empleada, ya que en nuestro caso solo se registró la diversidad y abundancia, debido a que no era el objetivo principal del presente trabajo.

Schinus molle, conocido comúnmente como árbol de pirúl o pirú, es originaria de las regiones Andinas (do Prado et al., 2018), es un árbol perennifolio de 15 m de altura, con copa redonda, en México es utilizada para la reforestación de zonas verdes y camellones (Lazos 2001). Esta especie fue una de las más abundantes en el área de muestreo y según los resultados del análisis de las muestras, fue la especie en donde se observó mayor diversidad de hongos filamentosos, esta diversidad podría estar relacionada con la morfología de los troncos de *S. molle,* ya que tiende a presentar oquedades y protuberancias, por lo que es comúnmente atacado por especies de hongos macroscópicos relacionados con la pudrición blanda, proceso que consecuentemente involucra la invasión de otros hongos microscópicos con la capacidad de continuar el proceso de pudrición, según algunos estudios, la madera de *Schinus molle* contiene altas cantidades de compuestos fenólicos así como un buen porcentaje de lignina y un pH de 6.4 (Salem et al., 2016) (Mejía y Rutiaga 2008), condiciones bajo las

cuales pueden desarrollarse diversos microorganismos incluyendo los hongos del género *Cryptococcus*.

Se obtuvieron dos aislados de *C. neoformans* de la misma muestra tomada de *S. molle*, lo cual podría deberse a la gran cantidad de materia orgánica que se acumula en las grandes oquedades del tronco de estos árboles, así como la humedad y la disposición continua de nutrientes mantenida por la presencia de otros microorganismos; curiosamente el género *Schinus* y en específico *Schinus molle* es conocido por las propiedades antisépticas en sus hojas, corteza y raíces (Segni 2013), las cuales se deben a la presencia de componentes antibióticos y antifúngicos como pineno, mirceno, sabineno entre otros y según estudios realizados, los aceites esenciales de esta especie, no inhiben el crecimiento de *C. neoformans,* pero sí el de otros hongos y bacterias (do Prado et al., 2018) (De Mendoça Rocha et al., 2012). La inhibición de otros microorganismos podría reducir la competencia en estos microambientes favoreciendo el desarrollo de levaduras de *Cryptococcus,* en cuanto a los hongos filamentosos asociados, se identificó a los géneros: *Scytalidium, Penicillium* y un hongo dematiáceo con hifas irregulares que no pudo ser identificado por carecer de estructuras reproductivas. Los géneros *Penicillium* y *Scytalidium* fueron aislados en otro estudio de oquedades de árboles de donde también se aislaron a especies de *Cryptococcus,* sin embargo, no reportan ninguna correlación positiva o negativa con hongos filamentosos (Schmertmann et al., 2019).

Erythrina coralloides, es un árbol de 9 metros de alto, con tronco grueso y corteza lisa, copa globosa con ramas espinosas, caducifolio con hojas compuestas grandes y flores alargadas (en forma de espada) de color rojo (CONABIO, 2019), algunas especies del género son originarias de México y es común encontrar ejemplares de gran tamaño en los camellones de la CDMX.

Aunque existen estudios acerca del efecto de los alcaloides concentrados en sus flores, corteza y semillas sobre el crecimiento de bacterias y hongos (Bernardino et al., 2016), también se ha descrito su uso para el tratamiento de enfermedades respiratorias, así como sus efectos ansiolíticos, sedantes, antiinflamatorios y antihipertensivos en medicina tradicional (Merlugo et al., 2015), hay muy pocos reportes de la interacción del género *Erythrina* con hongos microscópicos (Gunatilaka 2006). En estos árboles, se ha documentado muy bien el

proceso de polinización, el cual es realizado por aves paseriformes y colibríes (Bruneau 1997), por lo que es probable que distintas partes del árbol, incluidas las oquedades se encuentren contaminadas con excremento de aves, un sustrato rico en nitrógeno de donde repetidas veces se ha aislado a *Cryptococcus neoformans.* En diversos trabajos se ha comprobado que *C. deneoformans* (VNIV) es el tipo molecular aislado con mayor frecuencia de excretas de aves, mientras que *C. neoformans* (VNI), el genotipo de los tres aislados M2A7, M2A8 y M3A13 recuperados en este trabajo, se aísla frecuentemente de ambos sustratos tanto de material vegetal como de sitios contaminados con guano de aves (Springer et al., 2017).

Aunque *C. neoformans* y *C. gattii* han sido aislados de distintas partes vegetales como corteza, flores, hojas y suelo en otros estudios, consideramos que en las oquedades de distintas especies de árboles podrían encontrarse condiciones aún más favorables de desarrollo, ya que estos sitios pueden albergar cientos de organismos que mantienen interacciones ecológicas relacionadas con el proceso de descomposición que confieren disponibilidad continua de nutrientes. La formación de oquedades ocurre generalmente en árboles maduros debido a la exposición constante a fuerzas naturales como el viento, el fuego, la lluvia y a la presencia de insectos como termitas y escarabajos, así como de hongos y bacterias (Gibbons y Lindenmayer 2002). Las lesiones en la corteza interna del tronco facilitan la entrada de organismos saprobios, principalmente hongos, ocasionando la descomposición de la madera en donde la celulosa y lignina son convertidas a dióxido de carbono y agua con liberación de energía (Shortle y Dudzik 2012), por otra parte se ha documentado la importancia ecológica de las oquedades de los árboles ya que funcionan como refugio para distintas especies de aves, murciélagos, ardillas, zarigüeyas y otros mamíferos pequeños (Goldingay 2009), así como microhabitats para comunidades de insectos saproxílicos y bacterias (Sánchez et al., 2017) (Galván et al., 2017).

Teniendo en cuenta estos reportes y considerando que las condiciones de humedad, temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno y composición química son elementos que favorecen y controlan el crecimiento de los hongos dentro de las oquedades (Sánchez 2001), estos podrían mantenerse más estables que en el exterior. Además, el reciclaje de nutrientes y el dinamismo energético mantenido por otros organismos, también podría favorecer el desarrollo de comunidades de hongos microscópicos. En Australia, se describió el

microbioma de las oquedades de distintas especies de árboles, en donde se reportaron diversos géneros y familias de hongos microscópicos, incluyendo el género *Cryptococcus* y de otros hongos filamentosos que coinciden con reportados en este estudio (Schmertmann et al., 2019). Estos hallazgos y los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a plantear que las oquedades funcionan como microhabitats para el género *Cryptococcus,* así como para otros hongos, pero se requieren más estudios para conocer las condiciones que permiten el desarrollo de las comunidades fúngicas.

C. gattii es identificado con menor frecuencia no solo en México sino en otros países de Latinoamérica (Firacative et al., 2018), esto además de estar relacionado con su baja abundancia en el ambiente, también podría deberse a las dificultades del diagnóstico, ya que los síntomas neurológicos que se presentan en la infección suelen presentarse también en otras patologías, aunado al hecho de manifestarse en pacientes inmunocompetentes, aleja al médico de considerar una infección por hongos, por lo que las pruebas de identificación a nivel de especie son escasamente solicitadas. Actualmente a nivel clínico, el diagnóstico de criptococosis se realiza mediante técnicas convencionales como observación de levaduras capsuladas en LCR contrastado con tinta china, desarrollo de colonias marrón en agar semilla de niger, detección de antígeno criptocócico, perfil de asimilación y fermentación de azúcares (Vitek) entre otros, pero pocas veces se realiza la identificación etiológica rigurosa de *C. neoformans/C. gattii,* ya que la metodología para diferenciar estas dos especies implica cultivos diferenciales o el empleo de técnicas moleculares que requieren más tiempo y recursos.

El medio diferencial CGB para la identificación de *C. gattii* es utilizado principalmente para fines de investigación en algunos laboratorios y a pesar de que su interpretación es bastante sencilla y tiene una alta especificidad para identificar a *C. gattii* (Klein et al., 2009), su elaboración es complicada y costosa, además de que con este método no es posible identificar a las especies del complejo y otras características del aislado como el genotipo, el cual ha sido recientemente asociado con resistencia a los antifúngicos, por ejemplo, el genotipo VGIII (uno de los más frecuentes en latinoamérica) presenta una reducida sensibilidad a los azoles, específicamente al fluconazol (Engelthaler et al., 2014) (Firacative et al., 2018). Estos datos destacan la importancia de la aplicación de técnicas moleculares como la PCR-RFLP

utilizada en este estudio, con la que se identificaron cuatro cepas y sus genotipos (tres genotipos VNI y uno genotipo VGI), provenientes de oquedades de diferentes especies de árboles.

La cepa M4A19 caracterizada como *C. gattii* (VGI), recuperada de *Pinus sp*., fue comparada con el aislado clínico JC277 del paciente que participó en este trabajo. Los análisis morfológicos de ambas cepas mostraron diferencias en el tamaño de la cápsula, ya que en el aislado JC277 presentó cápsulas más grandes, mientras que en el aislado ambiental M4A19 se describieron cápsulas más pequeñas. Ambos aislados presentaron colonias de color beige, brillantes y lisas en medio ADS y colonias marrón brillantes en agar semilla de niger, ambas fueron positivas para la prueba de hidrólisis de urea a las 24 horas de incubación y mostraron resistencia a la L- canavanina. En los análisis de PCR-RFLP, se obtuvo el mismo patrón de bandas, el cual correspondió con el genotipo VGI de la cepa control. Por otra parte, se analizó la información obtenida del caso clínico del paciente en el cual se basó esta investigación y aunque existen pocos casos publicados de criptococosis causada por el genotipo VGI, se encontraron algunas manifestaciones clínicas que coinciden con las que presentó el paciente en 2014. El paciente reportó síntomas moderados como dolor de cabeza, fiebre intermitente y confusión por tres meses antes de ser canalizado al INNN, este tipo de sintomatología moderada es similar con el de otros casos de criptococosis provocada por *C. gattii* VGI en otros países (McCulloh et al., 2011) (Walraven et al., 2011) (Mukhopadhyay et al., 2015) (Andreou et al., 2019) , otra característica en la que coinciden los diferentes casos, es la manifestación de síntomas neurológicos, principalmente alteraciones visuales, confusión o como en el caso del paciente que participó en este trabajo, la presencia de Delirium hipoactivo, de igual manera los casos provocados por *C. gattii* VGI a menudo involucran el desarrollo de masas fúngicas (criptococomas) en pulmón (McCulloh et al., 2011) (Andreou et al., 2019) y cerebro (Mukhopadhyay et al., 2015), que si no son resueltos con el tratamiento, generalmente requieren cirugía.

Con los resultados obtenidos en este estudio surgen nuevos planteamientos de investigación que podrían contribuir a la caracterización del hábitat de *Cryptococcus gattii* y a la identificación de posibles factores que influyen en su crecimiento. En estudios futuros sería recomendable ampliar el número de árboles muestreados debido a la baja frecuencia de

aislamiento observada en este trabajo, o bien con la implementación de técnicas más sensibles basadas en el análisis genético de las muestras. Adicionalmente, podrían enfocarse diversos estudios en el análisis de las características ecológicas de los sitios de aislamiento de la levadura, por ejemplo, la temperatura, humedad, exposición solar, presencia de insectos, aves u otro tipo de animales, grado de urbanización, uso de suelo y vegetación. Para este último podría realizarse un análisis de componentes presentes en el material vegetal (corteza, hojas, flores, frutos) o desarrollarse un protocolo adicionando medios de cultivo con distintos componentes vegetales de especies determinadas de árboles, tomando como referencia los resultados obtenidos en esta tesis podría realizarse este procedimiento con el material vegetal de *Pinus*, *Erythrina coralloides* y *Schinus molle* y de esta manera observar si estos tienen algún efecto sobre el crecimiento de levaduras de *Cryptococcus*.

Aunque diversos estudios han contribuido a un mejor entendimiento del comportamiento de las especies de *C. gattii* en el ambiente, algunos eventos como el brote de criptococosis ocurrido en 1999 en la isla de Vancouver y el Noreste de la costa del Pacifico en Estados Unidos (Byrnes et al., 2011) han llevado a los investigadores a considerar una expansión del nicho ecológico de estas levaduras por dos principales razones, la primera, son las adaptaciones que presentan estos organismos y que hasta ahora han sido llamados como factores de virulencia, enfocándonos en el contexto biológico podemos designarlos también como factores de supervivencia (Sánchez et al., 2021) ya que permiten el desarrollo de estos hongos ante los desafíos ambientales. A pesar de que dichos factores son similares entre las especies de *C. neoformans* y *C. gattii* se sabe que algunos genotipos de *C. gattii* (VGI, VGII) parecen comportarse como patógenos primarios, afectando a pacientes sin ningún factor de inmunocompromiso aparente, además se ha documentado recientemente que las condiciones bioclimáticas tienen un mayor impacto en el desarrollo de las especies de *C. gattii* (Cogliati 2021).

La segunda razón que ha llevado a considerar la expansión del nicho ecológico de *C. gattii* es el calentamiento global, debido a que regiones geográficas templadas y frías de todo el mundo han experimentado incrementos en la media de la temperatura, creando un ambiente propicio para organismos que anteriormente se encontraban restringidos a las zonas tropicales (El-Sayed y Kamel 2020) (Nnadi y Carter 2021), de esta manera se explica el aumento en el número de casos ocasionados por estas especies en regiones con clima

templado y frío (Cogliati 2021) Por otra parte, estos efectos relacionados al cambio climático también han afectado la distribución de especies vegetales incluyendo especies de árboles a partir de las cuales se han recuperado especies de *C. gattii* como *Eucalyptus camaldulensis, Olea europaea*, *Ceratonia siliqua* y *Pinus halepensis* (Cogliati 2021), favoreciendo su llegada a otras zonas del mundo. Por estas razones es importante la vigilancia epidemiológica así como el monitoreo ambiental para detectar la presencia de especies de C. *gattii* un patógeno con alto potencial emergente, todo esto para localizar las zonas con una alta taza de aislamiento de estas especies, caracterizar las condiciones que favorecen su crecimiento y con base en esto tomar medidas para proteger a la población de posibles infecciones o brotes, tales como restringir el acceso, eliminar o modificar los servicios de poda en caso de ser zonas urbanas para evitar la dispersión por viento, recomendar el uso de mascarillas en dichas zonas y en todo caso de encontrar alguna correlación específica con alguna especie o género de árboles, solicitar su eliminación del catálogo de especies utilizadas para reforestación de áreas verdes de la CDMX.

En conjunto, los resultados de ésta y otras investigaciones futuras enfocadas al estudio de los factores que favorecen la presencia de *C. gattii* en el ambiente, constituirán una herramienta de utilidad en la epidemiología de la criptococosis en nuestro país.

8 Conclusiones

- Se obtuvo un aislado de *C. gattii* a partir de un árbol (*Pinus sp.*), localizado dentro del área de desplazamiento de un paciente diagnosticado con criptococosis causada por *C. gattii*.

- *Pinus sp.* puede constituir una fuente de infección importante para la adquisición de la criptococosis particularmente por las especies de *C. gattii* en personas inmunocompetentes.

- El aislado ambiental de *C. gattii* obtenido en este estudio presenta características morfológicas microscópicas similares al aislado clínico obtenido del paciente y las mismas características bioquímicas y según la identificación mediante PCR-RFLP ambos aislados son genotipo VGI.

- Las condiciones ambientales favorables para el aislamiento de *C. gattii* corresponden a la temporada de otoño con baja humedad, y temperaturas moderadas, similares a las reportadas en otros estudios realizados en diferentes países.
- En este estudio se obtuvieron tres aislados de *C. neoformans* genotipo VNI a partir de oquedades de *Schinus molle* y *Erythrina coralloides* localizados en una zona transitada de la alcaldía Gustavo A. Madero, CDMX.
- Las oquedades de los distintos árboles aquí reportados son nichos ecológicos potenciales para el desarrollo de colonias fúngicas incluyendo a especies del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, lo que sugiere que la distribución ecológica de estas levaduras no se restringe a un solo hábitat.
- Los géneros de hongos filamentosos más frecuentes aislados a partir de oquedades de árboles en donde también se obtuvieron colonias de *Cryptococcus* fueron *Mucor*, *Scytalidium*, *Aspergillus* y *Penicillium.*

9 Anexo I

Carta de consentimiento Informado

Título del protocolo: Panorama epidemiológico de la criptococosis en México, clínica, prevalencia, incidencia, fuentes naturales y epidemiología.

Investigadores responsables: Dra. Laura Rosio Castañón Olivares y Dra. Edith Sánchez Paredes.

Sede dónde se realizará el estudio: Unidad de Micología, Facultad de Medicina, UNAM.

Nombre del Paciente:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. La criptococosis es una infección de distribución universal causada por hongos de la especie *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* que inicia a nivel pulmonar, llegando a cerebro y médula espinal, donde puede causar afecciones graves que atentan contra la vida del paciente. Los ambientes donde se encuentran estos microorganismos son el guano de aves y árboles de diferentes especies. Comúnmente la infección se adquiere por vía respiratoria, es más frecuente en hombres de 20 a 40 años de edad y puede presentarse en personas sanas y en personas que presenten alguna condición que altere el sistema inmunológico como VIH/SIDA, diabetes, cáncer entre otras.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO: Aislar a *C. gattii* a partir de muestras ambientales de árboles relacionados al área de desplazamiento de pacientes inmunocompetentes diagnosticados con criptococosis ocasionada por *Cryptococcus gattii* y establecer la relación del árbol como un probable hospedero natural de la levadura.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO: La criptococosis no es una infección de reporte obligatorio en el sistema de salud mexicano por lo que la presente investigación servirá para obtener más datos relacionados con la epidemiología de esta enfermedad en el país, así

como identificar otros posibles ambientes donde habite este hongo, que puedan ser la fuente de infección para los humanos.

4. PROTECCIÓN DE DATOS: Su confidencialidad será garantizada ya que, la información clínica o sus datos generales, que sean útiles para la presente investigación, sólo podrán obtenerse a través del médico o institución a cargo, quienes actuarán siempre apegados a las normas de bioética vigentes.

5. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio: Teléfono: 5623 2136
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento**.**

Ciudad de México, México a _____ de _____ del _____.

Yo, _____, originario de_____ y con residencia en la CdMx desde hace_____, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

_____

Nombre y firma del participante

_____

Nombre Testigo 1

_____

Nombre Testigo 2

Esta parte debe ser completada por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

_____

Firma del investigador o su representante

FORMATO DE ENCUESTA PARA EL PACIENTE O FAMILIAR

Nombre: JC

Edad: 33 años Fecha: 15/02/20

Domicilio: _____

Teléfono: _____ Ocupación: Chofer transportista

Domicilio del lugar de trabajo: _____

¿Tiene mascotas? Sí [/] No [ ]

(Perro) Gato Aves (Roedores) Otro: Ratas

¿Ha salido fuera de su lugar de residencia? Sí [/] No [ ]

¿A dónde?

"Indique ruta"

¿Ha viajado fuera del país? Sí [ ] No [/]

¿A dónde?

"Indique ruta" Distintos estados de la de republica

¿Cuáles son sus hábitos de movilidad diaria?

(Trabajo) Escuela Mercado Parque Otro:

¿Qué medios de transporte utiliza?

Caminando Metro (Microbús) Bicicleta Auto particular Otro:

¿En sus hábitos diarios tiene contacto con plantas? Sí [ ] No [/]

¿De qué especie?

¿Cuáles fueron los síntomas iniciales de la enfermedad? Dolor de cabeza

¿En qué momento notó que inició la criptococosis? Abril 2015

¿Relaciona el inicio de los síntomas con algún cambio de actividad diaria? Cambio de domicilio

¿Ha padecido alguna otra enfermedad? No

10 Referencias

Aguiar, P., Pedroso, R., Borges, A. S., Moreira, T. A., Araújo, L. B., & Rodero, D. (2017). The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of Cryptococcus neoformans isolated in a Brazilian University Hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *59*, e13. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759013

Almeida, F., Wolf, J. M., & Casadevall, A. (2015). Virulence-Associated Enzymes of Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic cell*, *14*(12), 1173–1185. https://doi.org/10.1128/EC.00103-15

Alspaugh, J. A., Davidson, R. C., & Heitman, J. (2000). Morphogenesis of Cryptococcus neoformans. *Contributions to microbiology*, *5*, 217–238. https://doi.org/10.1159/000060352

Andreou, M., Cogliati, M., Kolonitsiou, F., Stroumpos, C., Stamouli, V., Ravazoula, P., Siagris, D., Papadogeorgaki, H., Christofidou, M., & Lekkou, A. (2019). *Cryptococcus gattii* infection in an immunocompetent host in Greece. *Medical mycology case reports*, *27*, 1–3. https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2019.12.002

Argüero Licea, B., Garza Garza, D., Flores Urbieta, V., & Cervantes Olivares, R. A. (1999). Aislamiento y caracterización de Cryptococcus neoformans var. gattii a partir de muestras de Eucalyptus camaldulensis en la ciudad de México [Isolation and characterization of Cryptococcus neoformans var. gattii from samples of Eucalyptus camaldulensis in Mexico city.]. *Revista iberoamericana de micologia*, *16*(1), 40–42.

Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J. W., Hop, W., Abeln, E., Dromer, F., & Meyer, W. (2001). Hybrid genotypes in the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans. *Microbiology (Reading, England)*, *147*(Pt 4), 891–907. https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-891

Byrnes, E. J., 3rd, & Marr, K. A. (2011). The Outbreak of Cryptococcus gattii in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues. *Current infectious disease reports*, *13*(3), 256–261. https://doi.org/10.1007/s11908-011-0181-0

Campbell, C. K., & Johnson, E. M. (2013). *Identification of pathogenic fungi*. John Wiley & Sons.

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*, *67*(8), 3703–3713. https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3703-3713.1999

Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., & Wear, M. P. (2019). The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*, *10*(1), 822–831. https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087

Castañón, L. R., Arreguín, R., Ruiz, G. M., y Santos, G., López, R. (2000). Frequency of Cryptococcus species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. *Revista latinoamericana de microbiologia*, *42*(1), 35–40. https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi001f.pdf

Castañón, L. R., Sánchez, E., Arreguín, R. A., Ruiz, G. M., Carmona, A., & López, R. (2007). Aislamiento de Cryptococcus albidus en árboles de eucalipto. *Revista Mexicana de Micología*, (25), 21-25. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88302506

Castañón-Olivares, L. R., Martínez, K. M., Cruz, R. M., Rivera, M. A., Meyer, W., Espinosa, R. A., Martínez, R. L., & Santos, G. M. (2009). Genotyping of Mexican Cryptococcus neoformans and C. gattii isolates by PCR-fingerprinting. *Medical mycology*, *47*(7), 713–721. https://doi.org/10.3109/13693780802559031

Cattana, M. E., Sosa, M., Fernández, M., Rojas, F., Mangiaterra, M., & Giusiano, G. (2014). Native trees of the Northeast Argentine: natural hosts of the Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii species complex. *Revista iberoamericana de micologia*, *31*(3), 188–192. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.005

Chaturvedi, V., & Chaturvedi, S. (2011). Cryptococcus gattii: a resurgent fungal pathogen. *Trends in microbiology*, *19*(11), 564–571. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.010

Chen, S. C., Meyer, W., & Sorrell, T. C. (2014). Cryptococcus gattii infections. *Clinical microbiology reviews*, *27*(4), 980–1024. https://doi.org/10.1128/CMR.00126-13

Coelho, C., Bocca, A. L., & Casadevall, A. (2014). The intracellular life of Cryptococcus neoformans. *Annual review of pathology*, *9*, 219–238. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104653

Cogliati M. (2013). Global Molecular Epidemiology of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, *2013*, 675213. https://doi.org/10.1155/2013/675213

Cogliati, M., D'Amicis, R., Zani, A., Montagna, M. T., Caggiano, G., De Giglio, O., Balbino, S., De Donno, A., Serio, F., Susever, S., Ergin, C., Velegraki, A., Ellabib, M. S., Nardoni, S., Macci, C., Oliveri, S., Trovato, L., Dipineto, L., Rickerts, V., McCormick-Smith, I., … Colom, M. F. (2016). Environmental distribution of Cryptococcus neoformans and C. gattii around the Mediterranean basin. *FEMS yeast research*, *16*(4), fow045. https://doi.org/10.1093/femsyr/fow045

Cogliati M. (2021). Global warming impact on the expansion of fundamental niche of Cryptococcus gattii VGI in Europe. *Environmental microbiology reports*, *13*(3), 375–383. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12945

Colom, M. F., Hagen, F., Gonzalez, A., Mellado, A., Morera, N., Linares, C., García, D. F., Peñataro, J. S., Boekhout, T., & Sánchez, M. (2012). Ceratonia siliqua (carob) trees as natural habitat and source of infection by Cryptococcus gattii in the Mediterranean

environment. *Medical mycology*, *50*(1), 67–73. https://doi.org/10.3109/13693786.2011.574239

D'Souza, C. A., Kronstad, J. W., Taylor, G., Warren, R., Yuen, M., Hu, G., Jung, W. H., Sham, A., Kidd, S. E., Tangen, K., Lee, N., Zeilmaker, T., Sawkins, J., McVicker, G., Shah, S., Gnerre, S., Griggs, A., Zeng, Q., Bartlett, K., Li, W., … Cuomo, C. A. (2011). Genome variation in Cryptococcus gattii, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *mBio*, *2*(1), e00342-10. https://doi.org/10.1128/mBio.00342-10

De Vroey, C., & Gatti, F. (1989). Cryptococcus neoformans var. gattii Vanbreuseghem and Takashio, 1970. *Mycoses*, *32*(12), 675. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1989.tb02200.x

Dhamgaye, S., Murray, G. L., & Peleg, A. Y. (2015). The influence of bacterial interaction on the virulence of Cryptococcus neoformans. *Virulence*, *6*(7), 677–678. https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1088632

Ellis, D. H., & Pfeiffer, T. J. (1990). Natural habitat of Cryptococcus neoformans var. gattii. *Journal of clinical microbiology*, *28*(7), 1642–1644. https://doi.org/10.1128/jcm.28.7.1642-1644.1990

El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environmental science and pollution research international*, *27*(18), 22336–22352. https://doi.org/10.1007/s11356-020-08896-w

Elsegeiny, W., Marr, K. A., & Williamson, P. R. (2018). Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. *Frontiers in immunology*, *9*, 651. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00651

Engelthaler, D. M., Hicks, N. D., Gillece, J. D., Roe, C. C., Schupp, J. M., Driebe, E. M., Gilgado, F., Carriconde, F., Trilles, L., Firacative, C., Ngamskulrungroj, P., Castañeda, E., Lazera, M., Melhem, M. S., Pérez-Bercoff, A., Huttley, G., Sorrell, T. C., Voelz, K., May, R. C., Fisher, M. C., … Meyer, W. (2014). Cryptococcus gattii in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. *mBio*, *5*(4), e01464-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01464-14

Esher, S. K., Zaragoza, O., & Alspaugh, J. A. (2018). Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *113*(7), e180057. https://doi.org/10.1590/0074-02760180057

Feder, V., Kmetzsch, L., Staats, C. C., Vidal-Figueiredo, N., Ligabue-Braun, R., Carlini, C. R., & Vainstein, M. H. (2015). Cryptococcus gattii urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *The FEBS journal*, *282*(8), 1406–1418. https://doi.org/10.1111/febs.13229

Fernandes, K. E., Dwyer, C., Campbell, L. T., & Carter, D. A. (2016). Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under

Capsule-Inducing Conditions. *mSphere*, *1*(6), e00350-16. https://doi.org/10.1128/mSphere.00350-16

Firacative, C., Lizarazo, J., Illnait-Zaragozí, M. T., Castañeda, E., & Latin American Cryptococcal Study Group (2018). The status of cryptococcosis in Latin America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *113*(7), e170554. https://doi.org/10.1590/0074-02760170554

Fu, M. S., Coelho, C., De Leon-Rodriguez, C. M., Rossi, D., Camacho, E., Jung, E. H., Kulkarni, M., & Casadevall, A. (2018). Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. *PLoS pathogens*, *14*(6), e1007144. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144

Fu, M. S., & Drummond, R. A. (2020). The Diverse Roles of Monocytes in Cryptococcosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *6*(3), 111. https://doi.org/10.3390/jof6030111

González-Hein, G., González-Hein, J., & Díaz Jarabrán, M. C. (2010). Isolation of Cryptococcus neoformans in dry droppings of captive birds in Santiago, Chile. *Journal of avian medicine and surgery*, *24*(3), 227–236. https://doi.org/10.1647/2009-003.1

Granados, D. P., & Castañeda, E. (2005). Isolation and characterization of Cryptococcus neoformans varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial ecology*, *49*(2), 282–290. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0236-y

Grover, N., Nawange, S. R., Naidu, J., Singh, S. M., & Sharma, A. (2007). Ecological niche of Cryptococcus neoformans var. grubii and Cryptococcus gattii in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia*, *164*(4), 159–170. https://doi.org/10.1007/s11046-007-9039-2

Gunatilaka A. A. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, *69*(3), 509–526. https://doi.org/10.1021/np058128n

Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parnmen, S., Lumbsch, H. T., & Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans species complex. *Fungal genetics and biology : FG & B*, *78*, 16–48. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009

Hull, C. M., & Heitman, J. (2002). Genetics of Cryptococcus neoformans. *Annual review of genetics*, *36*, 557–615. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.052402.152652

Esher, S. K., Zaragoza, O., & Alspaugh, J. A. (2018). Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *113*(7), e180057. https://doi.org/10.1590/0074-02760180057

Johannson, K. A., Huston, S. M., Mody, C. H., & Davidson, W. (2012). Cryptococcus gattii pneumonia. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, *184*(12), 1387–1390. https://doi.org/10.1503/cmaj.111346

Khawcharoenporn, T., Apisarnthanarak, A., & Mundy, L. M. (2007). Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*, *35*(2), 51–58. https://doi.org/10.1007/s15010-007-6142-8

Kidd, S. E., Chow, Y., Mak, S., Bach, P. J., Chen, H., Hingston, A. O., Kronstad, J. W., & Bartlett, K. H. (2007). Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen Cryptococcus gattii in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and environmental microbiology*, *73*(5), 1433–1443. https://doi.org/10.1128/AEM.01330-06

Klein, K. R., Hall, L., Deml, S. M., Rysavy, J. M., Wohlfiel, S. L., & Wengenack, N. L. (2009). Identification of Cryptococcus gattii by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *Journal of clinical microbiology*, *47*(11), 3669–3672. https://doi.org/10.1128/JCM.01072-09

Krockenberger, M. B., Malik, R., Ngamskulrungroj, P., Trilles, L., Escandon, P., Dowd, S., Allen, C., Himmelreich, U., Canfield, P. J., Sorrell, T. C., & Meyer, W. (2010). Pathogenesis of pulmonary Cryptococcus gattii infection: a rat model. *Mycopathologia*, *170*(5), 315–330. https://doi.org/10.1007/s11046-010-9328-z

Köhler, J. R., Casadevall, A., & Perfect, J. (2014). The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *5*(1), a019273. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019273

Kwon-Chung, K. J., Bennett, J. E., Wickes, B. L., Meyer, W., Cuomo, C. A., Wollenburg, K. R., Bicanic, T. A., Castañeda, E., Chang, Y. C., Chen, J., Cogliati, M., Dromer, F., Ellis, D., Filler, S. G., Fisher, M. C., Harrison, T. S., Holland, S. M., Kohno, S., Kronstad, J. W., Lazera, M., … Casadevall, A. (2017). The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere*, *2*(1), e00357-16. https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16

Kwon-Chung K. J. (1975). A new genus, filobasidiella, the perfect state of Cryptococcus neoformans. *Mycologia*, *67*(6), 1197–1200.

Kwon-Chung K. J. (1976). A new species of Filobasidiella, the sexual state of Cryptococcus neoformans B and C serotypes. *Mycologia*, *68*(4), 943–946.

Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. S. (2014). Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *4*(7), a019760. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760

López, R., Soto, J. L., Ostrosky, L., Castanón, L. R., Angeles, V., & Sotelo, J. (1996). Cryptococcus neoformans var. gattii among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. *Mycopathologia*, *134*(2), 61–64. https://doi.org/10.1007/BF00436865

Marmolejo M, y José G. (2018). Distribución vertical de hongos en hojas de tres especies de pinos en Nuevo León, México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, *9*(50), 379-399. https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i50.253

Mayer, F. L., & Kronstad, J. W. (2019). The Spectrum of Interactions between *Cryptococcus neoformans* and Bacteria. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *5*(2), 31. https://doi.org/10.3390/jof5020031

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*(2), 119–128. https://doi.org/10.4161/viru.22913

McCulloh, R. J., Phillips, R., Perfect, J. R., Byrnes, E. J., 3rd, Heitman, J., & Dufort, E. (2011). Cryptococcus gattii genotype VGI infection in New England. *The Pediatric infectious disease journal*, *30*(12), 1111–1114. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31822d14fd

MacDougall, L., & Fyfe, M. (2006). Emergence of Cryptococcus gattii in a novel environment provides clues to its incubation period. *Journal of clinical microbiology*, *44*(5), 1851–1852. https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1851-1852.2006

Mejía-Díaz, L. A., & Rutiaga-Quiñones, J. G. (2008). Chemical composition of Schinus molle L. wood and kraft pulping process. *Revista mexicana de ingeniería química*, *7*(2), 145-149. Recuperado en 09 de marzo de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382008000200007&lng=es&tlng=en.

Merlugo, L., Santos, M. C., Sant'Anna, L. S., Cordeiro, E. W., Batista, L. A., Miotto, S. T., Garcia, C. V., Moreira, C. M., & Mendez, A. S. (2015). Alkaloids in Erythrina by UPLC-ESI-MS and In Vivo Hypotensive Potential of Extractive Preparations. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, *2015*, 959081. https://doi.org/10.1155/2015/959081

Metsämuuronen, S., & Sirén, H. (2019) Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochem Rev* 18, 623–664. https://doi.org/10.1007/s11101-019-09630-2

Meya, D. B., Manabe, Y. C., Boulware, D. R., & Janoff, E. N. (2016). The immunopathogenesis of cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome: understanding a conundrum. *Current opinion in infectious diseases*, *29*(1), 10–22. https://dx.doi.org/10.1097%2FQCO.0000000000000022

Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S., Huynh, M., Castañeda, E., & IberoAmerican Cryptococcal Study Group (2003). Molecular typing of IberoAmerican Cryptococcus neoformans isolates. *Emerging infectious diseases*, *9*(2), 189–195. https://doi.org/10.3201/eid0902.020246

Meyer, W., Marszewska, K., Amirmostofian, M., Igreja, R. P., Hardtke, C., Methling, K., Viviani, M. A., Chindamporn, A., Sukroongreung, S., John, M. A., Ellis, D. H., & Sorrell, T. C. (1999). Molecular typing of global isolates of Cryptococcus neoformans var. neoformans by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, *20*(8), 1790–1799. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:8<1790::AID-ELPS1790>3.0.CO;2-2

Miller, W. G., Padhye, A. A., van Bonn, W., Jensen, E., Brandt, M. E., & Ridgway, S. H. (2002). Cryptococcosis in a bottlenose dolphin (Tursiops truncatus) caused by Cryptococcus neoformans var. gattii. *Journal of clinical microbiology*, *40*(2), 721–724. https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.721-724.2002

Molloy, S. F., Chiller, T., Greene, G. S., Burry, J., Govender, N. P., Kanyama, C., Mfinanga, S., Lesikari, S., Mapoure, Y. N., Kouanfack, C., Sini, V., Temfack, E., Boulware, D. R., Dromer, F., Denning, D. W., Day, J., Stone, N., Bicanic, T., Jarvis, J. N., Lortholary, O., … Loyse, A. (2017). Cryptococcal meningitis: A neglected NTD?. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(6), e0005575. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005575

Morales, D. K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L. E., Jacobs, N. J., & Hogan, D. A. (2013). Control of Candida albicans metabolism and biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa phenazines. *mBio*, *4*(1), e00526-12. https://doi.org/10.1128/mBio.00526-12

Morera, N., Hagen, F., Juan-Sallés, C., Artigas, C., Patricio, R., Serra, J. I., & Colom, M. F. (2014). Ferrets as sentinels of the presence of pathogenic Cryptococcus species in the Mediterranean environment. *Mycopathologia*, *178*(1-2), 145–151. https://doi.org/10.1007/s11046-014-9773-1

Morrow, C. A., & Fraser, J. A. (2013). Is the nickel-dependent urease complex of Cryptococcus the pathogen's Achilles' heel?. *mBio*, *4*(4), e00408-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00408-13

Mukhopadhyay, S. L., Kumar, M., Chickabasaviah, Y. T., Bahubali, V. K. H., Raj, P. A., Bharath, R. D., & Siddaiah, N. (2015). Cerebellar cryptococcoma due to Cryptococcus gattii VGI; a rare and first report from India. *JMM Case Reports*, *2*(3), e000052. https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.000052

Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS pathogens*, *17*(4), e1009503. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503

Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *94*(4), 1443–1476. https://doi.org/10.1111/brv.12510

Negroni R. (2012). Cryptococcosis. *Clinics in dermatology*, *30*(6), 599–609. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.005

Roe, C. C., Bowers, J., Oltean, H., DeBess, E., Dufresne, P. J., McBurney, S., ... & Engelthaler, D. M. (2018). Dating the Cryptococcus gattii dispersal to the North American pacific northwest. *Msphere*, *3*(1), e00499-17. https://doi.org/10.1128/mSphere.00499-17

O'Meara, T. R., & Alspaugh, J. A. (2012). The Cryptococcus neoformans capsule: a sword and a shield. *Clinical microbiology reviews*, *25*(3), 387–408. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12

Perfect, J. R., & Casadevall, A. (2002). Cryptococcosis. *Infectious disease clinics of North America*, *16*(4), 837–vi. https://doi.org/10.1016/s0891-5520(02)00036-3

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Bijie, H., Dzierzanowska, D., Klimko, N. N., Letscher-Bru, V., Lisalova, M., Muehlethaler, K., Rennison, C., Zaidi, M., & Global Antifungal Surveillance Group (2009). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of clinical microbiology*, *47*(1), 117–123. https://doi.org/10.1128/JCM.01747-08

Petzold, EW, Himmelreich, U., Mylonakis, E., Rude, T., Toffaletti, D., Cox, GM, ... y Perfect, JR (2006). Caracterización y regulación de la vía de síntesis de trehalosa y su importancia en la patogenicidad de Cryptococcus neoformans. *Infección e inmunidad* , *74* (10), 5877-5887. https://doi.org/10.1128/IAI.00624-06

do Prado, A. C., Garces, H. G., Bagagli, E., Rall, V., Furlanetto, A., Fernandes Junior, A., & Furtado, F. B. (2019). Schinus molle essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. *Journal of applied microbiology*, *126*(2), 516–522. https://doi.org/10.1111/jam.14157

Randhawa, H. S., Kowshik, T., & Khan, Z. U. (2003). Decayed wood of Syzygium cumini and Ficus religiosa living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of Cryptococcus neoformans. *Medical mycology*, *41*(3), 199–209. https://doi.org/10.1080/369378031000137251

Randhawa, H. S., Kowshik, T., Chowdhary, A., Prakash, A., Khan, Z. U., & Xu, J. (2011). Seasonal variations in the prevalence of Cryptococcus neoformans var. grubii and Cryptococcus gattii in decayed wood inside trunk hollows of diverse tree species in north-western India: a retrospective study. *Medical mycology*, *49*(3), 320–323. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.516457

Refojo, N., Perrotta, D., Brudny, M., Abrantes, R., Hevia, A. I., & Davel, G. (2009). Isolation of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Medical mycology*, *47*(2), 177–184. https://doi.org/10.1080/13693780802227290

Ren, P., Springer, D. J., Behr, M. J., Samsonoff, W. A., Chaturvedi, S., & Chaturvedi, V. (2006). Transcription factor STE12alpha has distinct roles in morphogenesis,

virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast Cryptococcus gattii. *Eukaryotic cell*, *5*(7), 1065–1080. https://doi.org/10.1128/EC.00009-06

De Mendonça Rocha, P. M., Rodilla, J. M., Díez, D., Elder, H., Guala, M. S., Silva, L. A., & Pombo, E. B. (2012). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (Schinus molle L.). *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(10), 12023–12036. https://doi.org/10.3390/molecules171012023

Rossi, S. A., Trevijano-Contador, N., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A. C., de Oliveira, H. C., Werther, K., de Freitas Raso, T., Mendes-Giannini, M. J., Zaragoza, O., & Fusco-Almeida, A. M. (2016). Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Isolates. *Frontiers in microbiology*, *7*, 153. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00153

Rotstein, D. S., West, K., Levine, G., Lockhart, S. R., Raverty, S., Morshed, M. G., & Rowles, T. (2010). Cryptococcus gattiivgi in a spinner dolphin (Stenella longirostris) from Hawaii. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, *41*(1), 181–183. https://doi.org/10.1638/2009-0145.1

Sabiiti, W., & May, R. C. (2012). Mechanisms of infection by the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. *Future microbiology*, *7*(11), 1297–1313. https://doi.org/10.2217/fmb.12.102

Saijo, T., Chen, J., Chen, S. C., Rosen, L. B., Yi, J., Sorrell, T. C., Bennett, J. E., Holland, S. M., Browne, S. K., & Kwon-Chung, K. J. (2014). Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by Cryptococcus gattii in otherwise immunocompetent patients. *mBio*, *5*(2), e00912–e914. https://doi.org/10.1128/mBio.00912-14

Salem, MZ, Zayed, MZ, Ali, HM y Abd El-Kareem, MS (2016). Composición química, actividades antioxidantes y antibacterianas de extractos de la rama de madera de Schinus molle que crece en Egipto. *Revista de ciencia de la madera*, *62* (6), 548-561. https://doi.org/10.1007/s10086-016-1583-2

Samarasinghe, H., Aceituno-Caicedo, D., Cogliati, M., Kwon-Chung, K. J., Rickerts, V., Velegraki, A., Ackaglar, S., & Xu, J. (2018). Genetic Factors and Genotype-Environment Interactions Contribute to Variation in Melanin Production in the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. *Scientific reports*, *8*(1), 9824. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27813-3

Sánchez, E. 2001. Aislamiento de Cryptococcus spp de importancia médica asociados a Eucalyptus spp sanos, en Ciudad Universitaria, UNAM [Tesis de licenciatura, UNAM] Repositorio UNAM.

Sánchez, E., Aguilera, P., Alvarado, E., Castañón, L. y Martinez, M. (2022) Climate change and global distribution of Cryptococcosis. En M., Frías, C., Brunner, M., Reyes, y

Duarte, E. (Eds.), The Impact of Climate Change on Fungal Diseases. (pp. 181-202). Springer.

Sánchez, I. R., Ferrer, J., Galante, E., & Marcos-García, M. A. (2017). Bacteria and hoverflies (Diptera: Syrphidae) in tree hollows from the Iberian Mediterranean forest. *Environmental entomology*, *46*(1), 137-142. https://doi.org/10.1093/ee/nvw158

Santos, J. R., Holanda, R. A., Frases, S., Bravim, M., Araujo, G., Santos, P. C., Costa, M. C., Ribeiro, M. J., Ferreira, G. F., Baltazar, L. M., Miranda, A. S., Oliveira, D. B., Santos, C. M., Fontes, A. C., Gouveia, L. F., Resende-Stoianoff, M. A., Abrahão, J. S., Teixeira, A. L., Paixão, T. A., Souza, D. G., … Santos, D. A. (2014). Fluconazole alters the polysaccharide capsule of Cryptococcus gattii and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. *PloS one*, *9*(11), e112669. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112669

Shen, W. C., Davidson, R. C., Cox, G. M., & Heitman, J. (2002). Pheromones stimulate mating and differentiation via paracrine and autocrine signaling in Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic cell*, *1*(3), 366–377. https://doi.org/10.1128/EC.1.3.366-377.2002

Shortle, W. C., & Dudzik, K. R. (2012). Wood decay in living and dead trees: a pictorial overview. *Gen. Tech. Rep. NRS-97. Newtown Square, PA: US Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station. 26 p.*, *97*, 1-26. https://doi.org/10.2737/NRS-GTR-97

Shourian, M., & Qureshi, S. T. (2019). Resistance and Tolerance to Cryptococcal Infection: An Intricate Balance That Controls the Development of Disease. *Frontiers in immunology*, *10*, 66. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00066

Singh, A., Panting, R. J., Varma, A., Saijo, T., Waldron, K. J., Jong, A., Ngamskulrungroj, P., Chang, Y. C., Rutherford, J. C., & Kwon-Chung, K. J. (2013). Factors required for activation of urease as a virulence determinant in Cryptococcus neoformans. *mBio*, *4*(3), e00220-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00220-13

Schmertmann, L. J., Irinyi, L., Malik, R., Powell, J. R., Meyer, W., & Krockenberger, M. B. (2019). The mycobiome of Australian tree hollows in relation to the *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans* species complexes. *Ecology and evolution*, *9*(17), 9684–9700. https://doi.org/10.1002/ece3.5498

Springer, D. J., Ren, P., Raina, R., Dong, Y., Behr, M. J., McEwen, B. F., Bowser, S. S., Samsonoff, W. A., Chaturvedi, S., & Chaturvedi, V. (2010). Extracellular fibrils of pathogenic yeast Cryptococcus gattii are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PloS one*, *5*(6), e10978. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010978

Springer, D. J., & Chaturvedi, V. (2010). Projecting global occurrence of Cryptococcus gattii. *Emerging infectious diseases*, *16*(1), 14–20. https://doi.org/10.3201/eid1601.090369

Springer, D. J., Mohan, R., & Heitman, J. (2017). Plants promote mating and dispersal of the human pathogenic fungus Cryptococcus. *PloS one*, *12*(2), e0171695. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171695

Staib F. (1963). membranfiltration und negersaat (guizotia abyssinica)-naehrboden fuer den cryptococcus neoformans-nachweis (braunfarbeffekt) [membrane filtration and guizotia abyssinica culture media for the demonstration of cryptococcus neoformans (brown color effect)]. *Zeitschrift fur Hygiene und Infektionskrankheiten; medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Virologie*, *149*, 329–336.

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, *21*(8), 2045–2050. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x

Taylor-Smith, L. M., & May, R. C. (2016). New weapons in the Cryptococcus infection toolkit. *Current opinion in microbiology*, *34*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.018

Trofa, D., Casadevall, A., Nosanchuk, J. (2011). Melanin: Structure, Function, and Biosynthesis in Cryptococcus. En J., Heitman et al. (Ed) *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast (*pp. 55-66) Washington, DC, ASM Press.

Valdelamar, L. M. M., Díaz, A. S., & Flores, R. C. (2011). Secuenciación de fragmentos de ADN.

Vanhove, M., Beale, M. A., Rhodes, J., Chanda, D., Lakhi, S., Kwenda, G., Molloy, S., Karunaharan, N., Stone, N., Harrison, T. S., Bicanic, T., & Fisher, M. C. (2017). Genomic epidemiology of Cryptococcus yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. *Molecular ecology*, *26*(7), 1991–2005. https://doi.org/10.1111/mec.13891

Velagapudi, R., Hsueh, Y. P., Geunes-Boyer, S., Wright, J. R., & Heitman, J. (2009). Spores as infectious propagules of Cryptococcus neoformans. *Infection and immunity*, *77*(10), 4345–4355. https://doi.org/10.1128/IAI.00542-09

Voelz, K., & May, R. C. (2010). Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic cell*, *9*(6), 835–846. https://doi.org/10.1128/EC.00039-10

Walraven, C. J., Gerstein, W., Hardison, S. E., Wormley, F., Lockhart, S. R., Harris, J. R., Fothergill, A., Wickes, B., Gober-Wilcox, J., Massie, L., Ku, T. S., Firacative, C., Meyer, W., & Lee, S. A. (2011). Fatal disseminated Cryptococcus gattii infection in New Mexico. *PloS one*, *6*(12), e28625. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028625

Wang, L., Ren, L., Li, C., Gao, C., Liu, X., Wang, M., & Luo, Y. (2019). Effects of endophytic fungi diversity in different coniferous species on the colonization of Sirex noctilio (Hymenoptera: Siricidae). *Scientific reports*, *9*(1), 5077. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41419-3

Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, *10*(3), 127–140. https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106

Zaragoza O. (2019). Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*, *10*(1), 490–501. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383