

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Cryptococcus neoformans* EN
Galleria mellonella BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIERRO.

CARMEN ROSA ACOSTA MORA

PONTIFICIA UNIVESIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ

2015

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Cryptococcus neoformans* EN
Galleria mellonella BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIERRO.

CARMEN ROSA ACOSTA MORA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para obtener el título de:

BACTERIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ

2015

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Cryptococcus neoformans* EN
Galleria mellonella BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HIERRO.

CARMEN ROSA ACOSTA MORA



MELVA Y. LINARES LINARES MSc.

Directora



ZILPA A. SÁNCHEZ QUITIAN PhD

Codirectora



PATRICIA ESCANDON HERNANDEZ MSc.

Par evaluador

PONTIFICIA UNIVESIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

Bogotá

2015

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en su trabajo de grado”

A mis padres, Luis Antonio Acosta que desde el cielo guía mis pasos y Sixta Tulia Mora que siempre me ha apoyado incondicionalmente, a ellos que con cariño y esfuerzo me han brindado más de lo necesario.

A Jilber Andres Acero, quien ha estado a mi lado apoyándome durante todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por darme cada día de vida para realizar este logro que hoy se cumple.

Agradezco también a mi directora Melva Yomary Linares Linares, igualmente a la Dra. Claudia Marcela Parra Giraldo por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de proteómica y micosis humanas ya que fue una experiencia enriquecedora para mi carrera y como experiencia personal.

Doy un agradecimiento especial a mi codirectora Zilpa Adriana Sánchez Quitian, quien estuvo permanentemente guiándome en todo el proceso y de quien aprendí enormemente.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE IMÁGENES	9
TABLA DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	12
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
MARCO TEORICO	18
<i>Cryptococcus</i> spp.....	18
Criptococosis.....	19
Respuesta inmunológica.....	21
Infección e inmunidad innata.....	21
Infección e inmunidad adaptativa	23
Factores de virulencia y evasión del sistema inmune	23
1. Cápsula.....	23
2. Síntesis de melanina	28
3. Crecimiento a 37°C.....	29
Metabolismo del hierro	29
Figura tomada: Acta bioquím. clín. latinoam. v.39 n.3 La Plata jun./sept. 2005	31
Mecanismos de captación de hierro.....	32
Captación de hierro en <i>C. neoformans</i>	33
Hierro asociado a patogenicidad en <i>C. neoformans</i>	34
Modelos <i>in-vivo</i> en el estudio de infecciones	34
<i>Galleria mellonella</i> como modelo in-vivo para el estudio de infección por <i>C. neoformans</i>	36
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38

METODOLOGÍA.....	39
-Larvas de <i>Galleria mellonella</i> :.....	39
Objetivo 1: “Determinar la concentración basal de hierro en <i>Galleria mellonella</i> .”	39
Objetivo 2: “Evaluar el crecimiento de <i>C. neoformans</i> en presencia de hierro.”.....	42
Objetivo 3: “Evaluar la concentración de hierro consumido por <i>C. neoformans</i> a partir del medio de cultivo.”.....	43
Objetivo 4: “Evaluar la supervivencia de <i>G. mellonella</i> inoculada con <i>C. neoformans</i> bajo la influencia de diferentes concentraciones de hierro”	45
Objetivo 5: “Evaluar la influencia del hierro en el tamaño capsular de <i>C. neoformans</i> ”.	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
Objetivo 1: “Determinar la concentración basal de hierro en <i>Galleria mellonella</i> .”	52
Objetivo 2: “Evaluar el crecimiento de <i>C. neoformans</i> en presencia de hierro.”.....	53
Objetivo 3: “Evaluar la concentración de hierro consumido por <i>C. neoformans</i> a partir del medio de cultivo.”.....	55
Objetivo 4: “Evaluar la supervivencia de <i>G. mellonella</i> inoculada con <i>C. neoformans</i> bajo la influencia de diferentes concentraciones de hierro”	57
Objetivo 5: “Evaluar la influencia del hierro en el tamaño capsular de <i>C. neoformans</i> ”.	65
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

TABLA DE IMÁGENES

Figura 1. Agentes etiológicos de la Criptococosis.....	18
Figura 2. Respuesta inmune en Criptococosis.....	22
Figura 3. Composición del Glucoronoxilomanano (GXM)	23
Figura 4. Composición del Glucoronoxilomananogalactano (GXMGal)	24
Figura 5. Vía de señalización: en respuesta a la privación de hierro	27
Figura 6. Metabolismo de hierro	30
Figura 7. Extracción de hemolinfa de <i>Galleria mellonella</i>	40
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>C. neoformans</i> (JEC21 y H99) bajo concentración de 500 μ M de $FeCl_3$	43
Figura 9. Medición de hierro consumido por <i>C. neoformans</i> en medios de cultivo con $FeCl_3$ (0, 5, 50, 500 μ M).	45
Figura 10. Inoculación en larvas de <i>G. mellonella</i> : se inoculó con 10 μ L de suspensión con <i>C. neoformans</i>	46
Figura 11. Desinfección de larvas de <i>G. mellonella</i>	47
Figura 12. Medición de capsula en cepas (JEC21 y H99) sin contacto con $FeCl_3$.49	
Figura 13. Medición de capsula en cepas (JEC21 y H99) incubadas con $FeCl_3$..50	
Figura 14. Medición de capsula en cepas (JEC21 y H99) obtenidas de larvas post- infección.....	51
Figura 15. Curva de crecimiento <i>C. neoformans</i>	55
Figura 16. Curva de supervivencia de <i>G. mellonella</i> inoculada con cepas JEC21 y H99 de <i>C. neoformans</i>	58
Figura 17. Curva de supervivencia <i>G. mellonella</i> inoculada con cepa JEC21	60
Figura 18. Curva de supervivencia <i>G. mellonella</i> inoculada con cepa H99	63
Figura 19. Curva de supervivencia <i>G. mellonella</i>	64
Figura 20. Tamaño capsular de <i>C. neoformans</i>	65
Figura 21. Tamaño capsular de <i>C. neoformans</i> extraído de macerado de larvas muertas post-infección (H99).....	68
Figura 22. Tamaño capsular de <i>C. neoformans</i> extraído de macerado de larvas muertas post-infección (JEC21).....	69

TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>C. neoformans</i> utilizadas en el estudio	39
Tabla 2. Preparación de muestras y blancos.....	41
Tabla 3. Controles empleados en la inoculación de <i>C. neoformans</i>	47
Tabla 4. Concentración de hierro medida en hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	52
Tabla 5. Concentraciones de hierro medidas con STAT FAX 3300.....	57
Tabla 6. Prueba de igualdad de distribución de supervivencia	58
Tabla 7. Supervivencia <i>G. mellonella</i> inoculada con cepa JEC21	59
Tabla 8. Supervivencia <i>G. mellonella</i> inoculada con cepa H99	61

RESUMEN

Cryptococcus neoformans y *Cryptococcus gattii* son hongos patógenos estrechamente ligados que causan afecciones pulmonares y del sistema nervioso central en huéspedes inmunocomprometidos e inmunocompetentes. Ambas especies se encuentran en el medio ambiente y la infección se adquiere a través de la inhalación de propágulos infectantes.

La criptococosis es considerada una micosis oportunista en la cual se ven afectados principalmente pacientes inmunocomprometidos, su presentación clínica está dada por dos formas, dentro de las cuales se encuentran la pulmonar y extrapulmonar o diseminada. El desarrollo de la infección se ha asociado a factores de virulencia descritos en *Cryptococcus* spp. siendo destacados la producción de polisacáridos capsulares, disposición de melanina en la pared celular y crecimiento a 37°C.

Adicional a los factores de virulencia descritos normalmente, se ha señalado la presencia de hierro como un factor desencadenante en el desarrollo de la infección. El hierro es un elemento esencial en procesos fisiológicos tanto del hospedero como del hongo, el cual por ser eucariota comparte con los animales incluido el hombre, procesos celulares como la cadena respiratoria, metabolismo de aminoácidos, síntesis de ácidos nucleicos, los cuales están mediados por el hierro gracias a su capacidad de cesión y captación de electrones.

La disposición de hierro en el hospedero suscita la captación del elemento por parte del hongo, en el cual media procesos metabólicos que dan lugar al desarrollo de los factores de virulencia ya mencionados y en los que se ha visto una mayor expresión principalmente en el tamaño capsular, dando origen a células gigantes, a las que se les ha atribuido la capacidad de inhibir la fagocitosis. Esto se ha convertido en un problema en pacientes inmunocomprometidos, principalmente los seropositivos para VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) en los cuales la suplementación de

hierro hace parte del manejo terapéutico en respuesta a la anemia microcítica dada por una alteración en el metabolismo de dicho elemento.

Con el fin de evaluar el efecto de la biodisponibilidad de hierro en el aumento de la patogenicidad de *C. neoformans*, se planteó la utilización de dos cepas de dicha especie (H99 y JEC21), que corresponden a la variedad *grubii* y variedad *neoformans* respectivamente, las cuales fueron incubadas en medio mínimo suplementado con concentraciones de 0, 5, 50 y 500 μ M de ClFe₃ y posteriormente inoculadas en el modelo invertebrado *Galleria mellonella*.

La modulación de la patogenicidad de *C. neoformans* medida por hierro se evaluó mediante curvas de supervivencia de *G. mellonella* por el método estadístico Kaplan meier, donde se observó disminución en los días de muerte para la cepa H99 con 500 μ M de ClFe₃ y en la cepa JEC21 se observó un aumento de la patogenicidad con la concentración de 500 μ M de FeCl₃, lo cual se evidenció por la reducción en la supervivencia de *G. mellonella*, comparado con el resto de concentraciones evaluadas (5, 50 de ClFe₃).

Adicionalmente se valoró el tamaño capsular de *C. neoformans*, debido a que la capsula es el principal factor de virulencia descrito para el género *Cryptococcus* spp. La medición capsular se realizó mediante preparación en fresco con tinta china, evaluando diferentes condiciones (sin hierro, con hierro, post-infección), en las cuales la cepa JEC21 no reflejó cambios en su tamaño capsular, contrario a la cepa H99, en la cual se observó aumento del tamaño con la concentración de 50 y 500 μ M de ClFe₃ y post-infección.

Con estos datos se concluyó la modulación del hierro en la patogenicidad de *C. neoformans*, dado por la reducción en la supervivencia de *G. mellonella* inoculada con la cepa JEC21 con 500 μ M de ClFe₃ y la reducción en el inicio de mortalidad para la cepa H99 con la misma concentración de ClFe₃.

INTRODUCCIÓN

El género *Cryptococcus* spp. perteneciente al filum Basidiomycota comprende alrededor de 100 especies, dentro de las cuales *C. neoformans* y *C. gattii* se han descrito como patógenos humanos, dichas especies se han clasificado en varios serotipos, los cuales fueron determinados por variables antigénicas en su capsula polisacárida: *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipo D), *C. gattii* (serotipo B y C) y los híbridos AD, AB y BD [1]. *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) el principal agente etiológico de la infección denominada criptococosis (95%) y abarca un 99% de las infecciones en pacientes con SIDA [2,3] contrario a esto *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) está asociado a un 5% de las infecciones en todo el mundo [2, 3].

El desarrollo de la infección por *Cryptococcus* spp. se ha vinculado a la presencia de hierro, un elemento esencial en procesos fisiológicos del hospedero, dentro de los cuales se incluye la cadena respiratoria, la cual en organismos eucariotas es producida a nivel mitocondrial, metabolismo de aminoácidos y síntesis de ácidos nucleicos, entre otras [4 - 7]. Estas reacciones intracelulares están mediadas por la capacidad de cesión y captación de electrones de dicho elemento [6, 7].

Los distintos procesos fisiológicos en el hospedero están mediados por un equilibrio en el depósito y utilización del hierro, sin embargo, cuando esta homeostasis es alterada se favorece la disponibilidad de dicho elemento libre en el organismo, lo cual fomenta el crecimiento y proliferación de numerosos microorganismos, entre estos las especies fúngicas [4, 5, 8].

En pacientes VIH seropositivos se emplea adicional al tratamiento antirretroviral, suplementación con hierro, debido a que en estos individuos hay una alteración en el metabolismo de este elemento [5], razón por la cual se hace importante establecer concentraciones adecuadas de hierro que amortigüen la ferropenia, sin generar una sobrecarga que favorezca la captación de hierro por parte de microorganismos oportunistas como *C. neoformans*.

En *C. neoformans* se han encontrado varios sistemas de transporte que le permiten captar el hierro del medio ambiente, dentro de los que se destaca la presencia de reductasas en la superficie celular con una captación de alta y baja afinidad por el hierro [9]. Otro mecanismo descrito es la reducción no enzimática de hierro férrico por un reductor secretado, el ácido 3-hidroxiantranílico y la presencia de melanina en la pared celular, que puede contribuir a la captación del hierro adicional a la mediación en la resistencia al estrés oxidativo producido en las células fagocíticas del hospedero [9]. También se ha descrito la captación de hierro unido a sideróforos secretados por otros microorganismos, ya que el género *Cryptococcus* no produce sideróforos [4, 9, 10].

Basados en los mecanismos de captación de hierro expuestos anteriormente y su relación con la patogenicidad de *C. neoformans* se identifica la contribución de dicho elemento al desarrollo del tamaño capsular en asociación con CO₂, adicionalmente la presencia de hierro media la regulación de la enzima fenoloxidasas, intermediaria en la síntesis de melanina a partir de compuestos difenólicos como las catecolaminas, grupo que incluye la epinefrina, norepinefrina y dopamina, lo que explica el tropismo de este microorganismo por el sistema nervioso central (SNC) [4, 9].

Apoiados en información reportada de estudios previos realizados con *C. neoformans*, se establece la metodología para evaluar la patogenicidad del microorganismo a diferentes concentraciones de hierro, este es un diseño experimental, en el cual se emplearon dos cepas de *C. neoformans*: H99 var. *grubii* (serotipo A) y JEC21 var. *neoformans* (serotipoD), las cuales fueron incubadas en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de FeCl₃ (0, 5, 50 y 500 µM), posterior a la incubación, las células fueron lavadas con solución salina normal al 0,9% mediante centrifugación y se ajustó a partir del pellet una concentración de 1,5x 10⁸ cel/ mL (Concentración establecida en el proyecto al que pertenece este estudio) que posteriormente fue inoculada en el modelo invertebrado *Galleria mellonella* (1,5x 10⁶ cel/ Larva). Durante 15 días se observó la sobrevivencia

del invertebrado frente a la infección, este proceso fue evaluado por el método estadístico Kaplan-Meier, por el cual se determinó un aumento de la patogenicidad en la cepa menos virulenta (JEC21) con la concentración de 500µM, contrario a la cepa más virulenta (H99) en la cual no se observó una diferencia significativa en la patogenicidad con las diferentes concentraciones de hierro, sin embargo se observó reducción en el día de inicio de mortalidad en esta cepa a concentración de 500µM.

A partir del macerado de larvas infectadas se evaluó el tamaño capsular del microorganismo, encontrando un aumento en la cepa H99 con las diferentes concentraciones (0, 5, 50 y 500µM de ClFe₃) posterior a la infección, lo cual tendría un efecto en la inhibición de la fagocitosis por parte de los hemocitos de las larvas de *G. mellonella* que finalmente resultó en la muerte larval, contrario a esto en la cepa JEC21 no se observó cambios en el tamaño capsular, lo cual puede estar asociado al mayor porcentaje de sobrevivencia de *G. mellonella*, en las concentraciones de (0, 5, 50µM de ClFe₃) ya que en la concentración de 500µM hubo una reducción significativa de la sobrevivencia de la larva, lo que estaría relacionado a otros factores de virulencia diferentes a la capsula.

Con este estudio se identificó el papel del hierro en la mediación de la patogenicidad de *C. neoformans*, var *neoformans* (JEC21) determinado por un aumento en la mortalidad de *G. mellonella* con la concentración de 500µM y para *C. neoformans*, var *grubii* (H99) con 500µM, dado por la reducción en el día de inicio de la mortalidad.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criptococosis es una micosis oportunista que afecta pacientes inmunocomprometidos, aunque también se han reportado casos en pacientes inmunocompetentes [1]. En Colombia, la vigilancia de pacientes seropositivos ha sido importante en el estudio de infecciones oportunistas como la criptococosis, que en nuestro país no es de obligatorio reporte [11]. Según el boletín epidemiológico de la situación del VIH/Sida en Colombia 2013, en el periodo 1985-2012 se ha reportado un total de 95.187 casos de infección por VIH/SIDA. Para el año 2012 ingresaron al SIVIGILA 8.196 casos, de los cuales 5.914 fueron hombres y 2.282 mujeres, con un porcentaje de 72,2% y 27,8% respectivamente, asociando la infección al mecanismo de transmisión sexual en un 98.5% [12].

En cuanto a la epidemiología nacional de la criptococosis, se reportó un estudio retrospectivo en un periodo de 5 años, dado entre el 2006 y 2010, en el cual se determinó una incidencia general en la población de 2,4 casos por un millón de habitantes y en pacientes SIDA una incidencia de 3,3 casos por cada mil pacientes. Este análisis se realizó en un total de 526 encuestas, de las cuales el 76,6 % eran hombres y el 74,9 % estaban entre los 21 y los 50 años. Adicionalmente, en el estudio se identificó un predominio de infección por VIH del 83,5%, y una progresión a SIDA en pacientes con criptococosis del 23% de los casos [11].

A partir de aislamientos recuperados en el estudio (413) se atribuyó un 95,6% de la infección a *C. neoformans* var. *grubii*, 1% a *C. neoformans* var. *neoformans* y 3,4% a *C. gattii* [11].

Un factor importante en el desarrollo de la criptococosis, adicional a la inmunosupresión, es la suplementación con hierro, la cual se considera parte del tratamiento en pacientes seropositivos, debido a la alteración en el metabolismo de dicho elemento, que genera de manera secundaria anemia microcítica [5]. En estado fisiológico las concentraciones de hierro en los fluidos se mantienen en

niveles bajos (10^{-18}), lo cual está dado por la fijación del hierro a proteínas como la transferrina y lactoferrina [6, 7].

La sobrecarga de hierro asociada a diferentes factores como la predisposición genética, estado nutricional e intervención terapéutica, que en este caso está relacionada con la suplementación de hierro, aumentan el riesgo de infecciones por diferentes microorganismos dentro de los cuales se encuentra *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Cryptococcus neoformans*, microorganismo objetivo del estudio [4, 8, 10, 13].

Aún no se ha descrito una relación directa entre el desarrollo de la criptococosis y el tratamiento con suplementos en estos pacientes, sin embargo, se ha descrito la relación de la patogenicidad del agente etiológico con el aumento de hierro en estado férrico [10], el cual es captado por microorganismos oportunistas.

Por las razones anteriormente descritas, este estudio pretende evaluar la relación de la biodisponibilidad de hierro con el desarrollo de factores de virulencia en *C. neoformans*, siendo el principal objetivo la evaluación del tamaño capsular, el cual puede asociarse a la patogenicidad e invasión en el hospedero, lo cual está principalmente relacionado con pacientes inmunosuprimidos que han recibido suplementos de hierro asociados a la terapia antiretroviral.

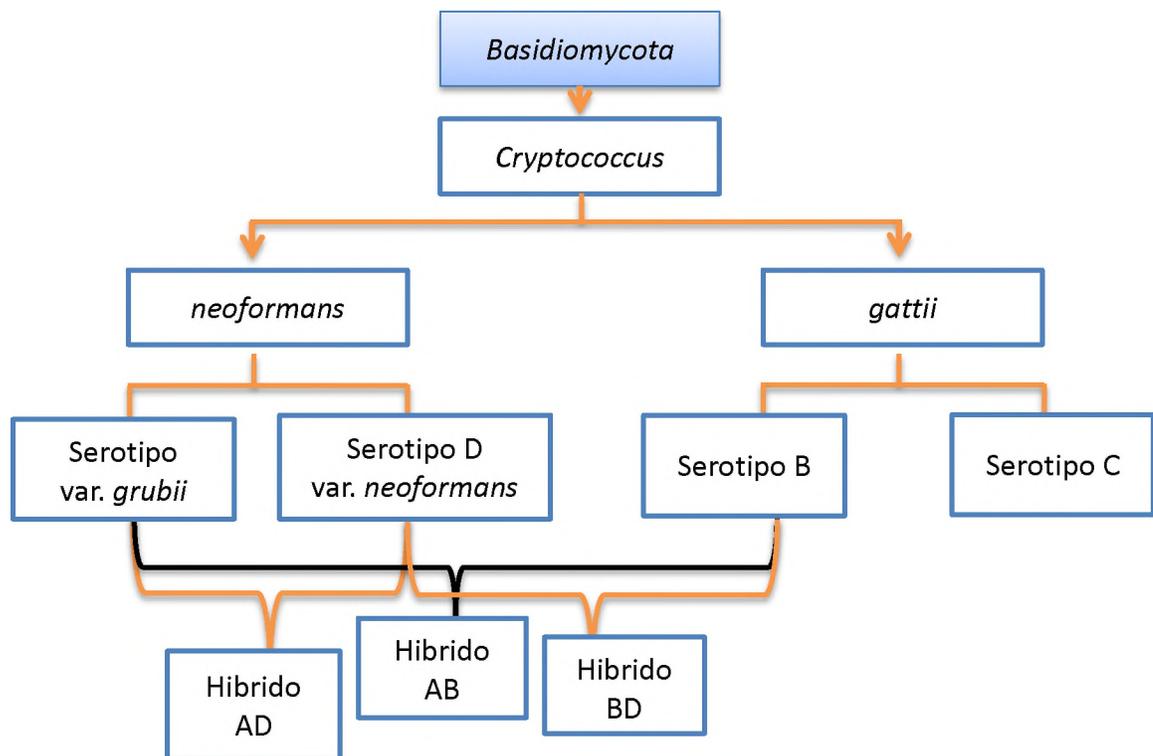
Los resultados de este estudio orientarían el manejo terapéutico de pacientes vulnerables a la infección, al implementar concentraciones de hierro adecuadas que amortigüen la ferropenia, sin generar una sobrecarga que pueda favorecer una infección por microorganismos oportunistas como *C. neoformans*.

MARCO TEORICO

Cryptococcus spp.

El género *Cryptococcus* perteneciente al filum Basidiomycota, es caracterizado por formas levaduriformes, ovales y encapsuladas. A este género pertenecen las especies *C. neoformans* y *C. gattii*, definidas como patógenos humanos, las cuales fueron caracterizadas por fenotipos fisiológicos y morfológicos [14]. Diferencias antigénicas de polisacáridos capsulares, permitieron la clasificación filogenética de *C. neoformans* en dos serotipos: variedad *neoformans* (serotipo D) y variedad *grubii* (serotipo A). En contraste con la especie *C. gattii* caracterizada por su capsula serotipo B y C, adicionalmente se describieron tres híbridos: AD, AB, BD [2, 14, 15].

Figura 1. Agentes etiológicos de la Criptococosis



Las dos especies exhiben diferentes distribuciones geográficas [17]:

- *C. neoformans*: la variedad *grubii* ha presentado una distribución mundial a diferencia de la variedad *neoformans* que ha estado restringida en países europeos, sin embargo las dos variedades comparten su asociación a excremento de aves, principalmente palomas (*Columba livia*).
- *C. gattii*: parecía estar restringido en regiones tropicales y subtropicales, sin embargo en 1999 se reportó un brote en la isla de Vancouver, Canada, lo cual hizo pensar la capacidad de esta especie para establecerse en climas templados. El serotipo B se ha asociado con varias especies de eucalipto dentro de las que se encuentran, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus Rudis*, y *Eucalyptus gomphocephala*, por el contrario el serotipo C ha sido aislado a partir de dendritos de almendros (*Terminalia cattapa*).

C. neoformans es causa principal de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, como VIH seropositivos, con leucemia y otros tipos de cáncer, o en aquellos que toman medicamentos corticosteroides [16,18]. *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) es responsable de la mayoría de los casos de criptococosis en huéspedes inmunocomprometidos [18]. Contrario a esto, *C. gattii* afecta principalmente a individuos inmunocompetentes [16].

Criptococosis

Micosis oportunista producida por *C. neoformans* (var. *neoformans* y var. *grubii*) y *C. gattii*, que afecta pacientes inmunocomprometidos, aunque también se han reportado casos en pacientes inmunocompetentes [1]. En Colombia según estudios recientes, se estimó una incidencia de 2,4 casos por un millón de habitantes y en pacientes SIDA 3,3 casos por cada mil pacientes, atribuyendo un 95,6% de la infección a *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* [12].

Esta patología es adquirida por la inhalación de esporas o levaduras desecadas y presenta dos formas clínicas, la pulmonar y la extrapulmonar o diseminada [3, 14,19, 20]:

- Pulmonar: generalmente asintomática o caracterizada por síntomas inespecíficos como tos, esputo escaso, en ocasiones hemoptisis, febrículas, pérdida de peso y malestar general. En las imágenes diagnosticas pueden evidenciarse nódulos, infiltrados lobares, intersticiales, patrón miliar, masas endobronquiales y cavitaciones.
- Extrapulmonar o invasiva: es característica de pacientes con SIDA y afecta órganos diferentes al pulmón, donde se efectúa la infección primaria. Dentro de los principales órganos afectados de encuentra [19, 20]:

- Sistema nervioso central (SNC): es la forma clínica más frecuente, en la mayoría de los casos cursa como meningitis o meningoencefalitis que puede presentarse de manera aguda, subaguda o crónica.

En pacientes inmunocomprometidos la respuesta inflamatoria es escasa, por lo que se evidencia fiebre sin foco o manifestaciones clínicas, por el contrario en personas inmunocompetentes, la presentación clínica es severa, esto como resultado de la reacción inflamatoria producida, la cual es caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas denominadas criptococomas, principalmente localizados en hemisferios cerebrales.

Dentro de las manifestaciones clínicas más comunes se encuentra cefalea, nauseas, vomito, fiebre, alteración de la conciencia, signos meníngeos e hipertensión intracraneana.

- Piel: puede ser primaria, siendo definida en la literatura como la identificación de *Cryptococcus spp.* en biopsia o cultivo de piel en ausencia de enfermedad diseminada; o secundaria en casos de diseminación hematógica.

La manifestación clínica característica de esta presentación está dada por infiltraciones dérmicas con contornos definidos, ocasionalmente fluctuantes, semejante al eritema nodoso.

- Ojos: más del 50% de pacientes con neurocriptococosis presentan afectaciones oculares, siendo más frecuente el papiledema secundario a meningitis, y menos frecuente la coroiditis en la cual un 5% de pacientes con meningitis cursa con esta presentación clínica.
- Hueso: produce osteolisis.
- Vísceras: lesiones granulomatosas.

Respuesta inmunológica

Infección e inmunidad innata

Los mecanismos de la inmunidad innata restringen el establecimiento de la infección por *Cryptococcus* spp. El primer medio de contención son las barreras físicas como la piel y mucosas, sin embargo el sistema del complemento, las células fagocíticas son los principales actores en la respuesta inespecífica frente a este microorganismo [16].

El sistema del complemento es una cascada de reacciones de proteínas séricas que pueden activarse por tres vías, la clásica (mediada por anticuerpos), lectinas, o alternativa (mediada por la superficie microbiana). Las tres vías convergen en la formación de C3 convertasa dando como resultado la escisión de C3 en C3a y C3b [16,21]. El C3b tiene dos funciones, la primera es la opsonización del microorganismo para posteriormente ser fagocitado y la segunda está dada por su acción de escisión sobre el C5, convirtiéndolo de esta manera en C5a y C5b, siendo

C5b una opsonina al igual que C3b. C5b es el desencadenante en la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b, C6, C7, C8, C9) [21, 22].

Figura 2. Respuesta inmune en Criptococosis: respuesta mediada principalmente por la cascada del complemento y la posterior opsonización dada por C3b, la cual favorece la fagocitosis.

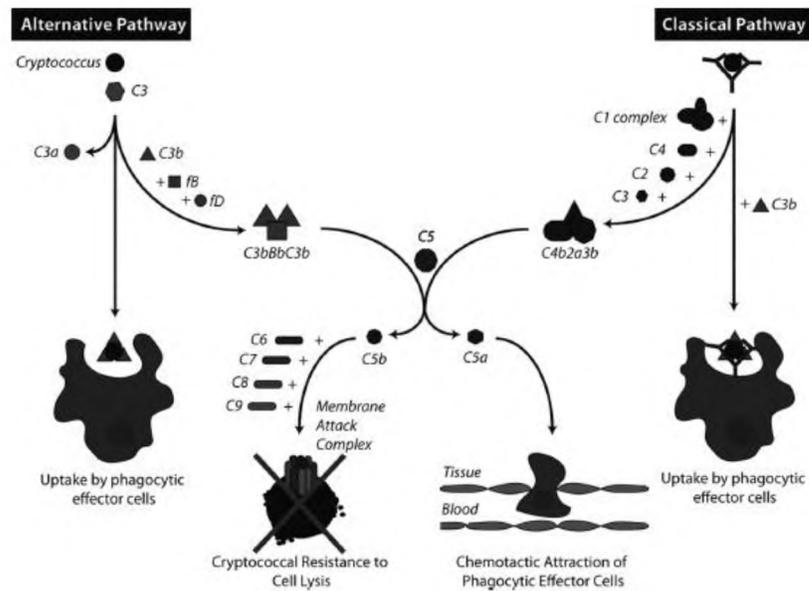


Figura tomada: EUKARYOTIC CELL, June 2010, p. 835–846

La fagocitosis es iniciada por el reconocimiento directo de la levadura o mediada por receptores que reconocen anticuerpos o complemento [16]. Los componentes de la capsula criptocócica pueden ser directamente reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), donde el glucuronoxilomanano se une a receptores Toll tipo 4 y el receptor de manosa de las células dendríticas se une a manoproteínas expresadas en la superficie celular de la levadura [16, 23].

Infección e inmunidad adaptativa

Los anticuerpos anticriptocócicos promueven la fagocitosis mediante el reconocimiento de la porción FC (fracción cristalizable) del anticuerpo por parte de receptores en las células fagocíticas. Por otro lado media la activación del complemento por la vía clásica [16].

Factores de virulencia y evasión del sistema inmune

1. Cápsula

La capsula está compuesta principalmente por Glucoronoxilomanano (GXM), el cual a su vez se compone α -1,3-ligado a residuos de manosa con grupos laterales de xilosil y glucuronil, pesa entre 1,700 y 7,000 kDa y abarca aproximadamente el 90% de la capsula de *C. neoformans* [2, 24, 25].

Figura 3. Composición del Glucoronoxilomanano (GXM): el Glucoronoxilomanano es un polisacárido compuesto por tres monosacáridos (Ácido glucurónico, xilosa y manosa)

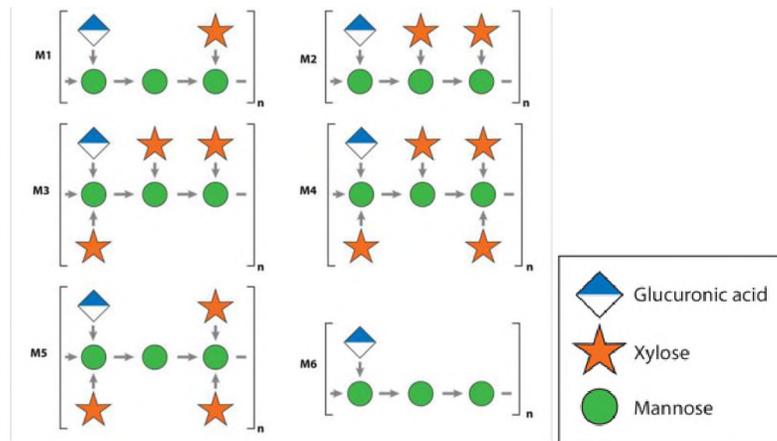


Figura tomada: Annu Rev Microbiol. 2009; 63: 223–247.

El Glucoronoxilomananogalactano (GXMGal) también hace parte en menor cantidad de la estructura capsular y está compuesto por α -1,6-ligado a polímeros de galactosa, manosa, xilosa y modificaciones de ácido glucurónico [24, 25].

Figura 4. Composición del Glucoronoxilomananogalactano (GXMGal): el Glucoronoxilomananogalactano es un polisacárido compuesto por cuatro monosacáridos (Ácido glucurónico, xilosa, manosa y galactosa)

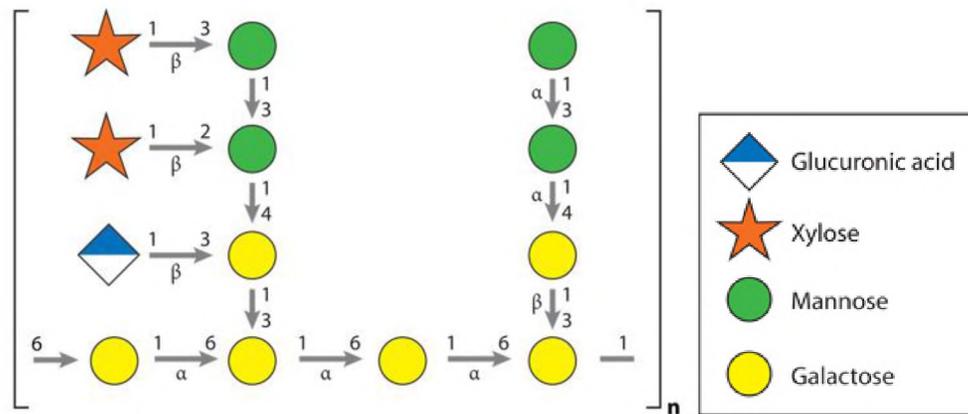


Figura tomada: Annu Rev Microbiol. 2009; 63: 223–247.

Los polisacáridos capsulares son sintetizados a partir de la polimerización de azúcares simples sobre una columna vertebral de hidratos de carbono, este proceso depende principalmente del metabolismo de carbohidratos, al suministrar eficientemente los azúcares necesarios para dicha síntesis [24,26].

Los azúcares que componen los polisacáridos capsulares son sintetizados en el citoplasma, la estructura característica de cada uno es ensamblada cerca de la pared celular para posteriormente ser transportados a través de esta, concluyendo así la formación de la capsula [24].

La cápsula está implicada en la evasión de la fagocitosis, afectando secundariamente el procesamiento y presentación antigénica y por ende la expansión clonal de linfocitos T [27]. Dicha evasión se ha asociado a la capacidad del microorganismo de cambiar su estructura capsular impidiendo de esta manera el reconocimiento por parte del sistema inmune y a la capacidad protectora de la capsula frente al estrés oxidativo mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno dentro de los fagolisosomas de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, convirtiéndolo de esta manera en un parásito intracelular facultativo [16, 27, 28].

La capacidad de *C. neoformans* de modificar el tamaño y estructura de su cápsula está ligada principalmente a factores fisiológicos en el huésped, dentro de los cuales se describen la exposición a dióxido de carbono y bajos niveles de hierro, elemento esencial en el metabolismo del microorganismo. Se cree que el aumento del tamaño capsular en *C. neoformans* frente a concentraciones disminuidas de hierro, contribuye a una mayor obtención del elemento por parte de la levadura y este cambio se produce durante las primeras horas de infección [16, 27].

Modificación de la cápsula a concentraciones bajas de hierro

Condiciones mínimas de hierro inducen el aumento del tamaño capsular en *C. neoformans*. Actualmente se han descrito vías de señalización que regulan la adaptación del microorganismo al medio [24]. Uno de los principales reguladores de la adaptación a la privación de hierro es el factor de transcripción tipo GATA Cir1, el cual responde también a altas concentraciones de hierro, aumentando la captación de este por la célula. En estudios realizados por Jung y colaboradores, utilizando mutantes Cir1 sometidas a bajas y altas concentraciones de hierro, se demostró el papel de este factor de transcripción en la regulación de diversos procesos que mantienen la integridad de la pared celular en medios con privación de hierro y

adicionalmente la regulación en la expresión de enzimas mediadoras en la síntesis de la capsula [24, 13].

Modificación de la cápsula a diferentes niveles de CO₂

C. neoformans en respuesta a diferentes niveles de dióxido de carbono utiliza la proteína Can2 (Anhidrasa carbónica) para convertir CO₂ a HCO₃ (Bicarbonato), con el fin de contrarrestar los elevados niveles de CO₂ en el medio pulmonar, permitiéndole de esta manera el crecimiento en el entorno. La producción de HCO₃ a pH fisiológico estimula la producción de cAMP activa la vía de señalización cAMP-PKA responsable de la producción de levaduras encapsuladas en el hospedero [24,29].

La respuesta celular a factores como el hierro y el CO₂, los cuales son de interés para este estudio son expuestos en la imagen a continuación:

Figura 5. Vía de señalización: la respuesta a la privación de hierro está dada por el factor de transcripción tipo GATA Cir1 que promueve la encapsulación, adicionalmente el Cir1 responde también a altas concentraciones de hierro, aumentando la captación de este por la célula.

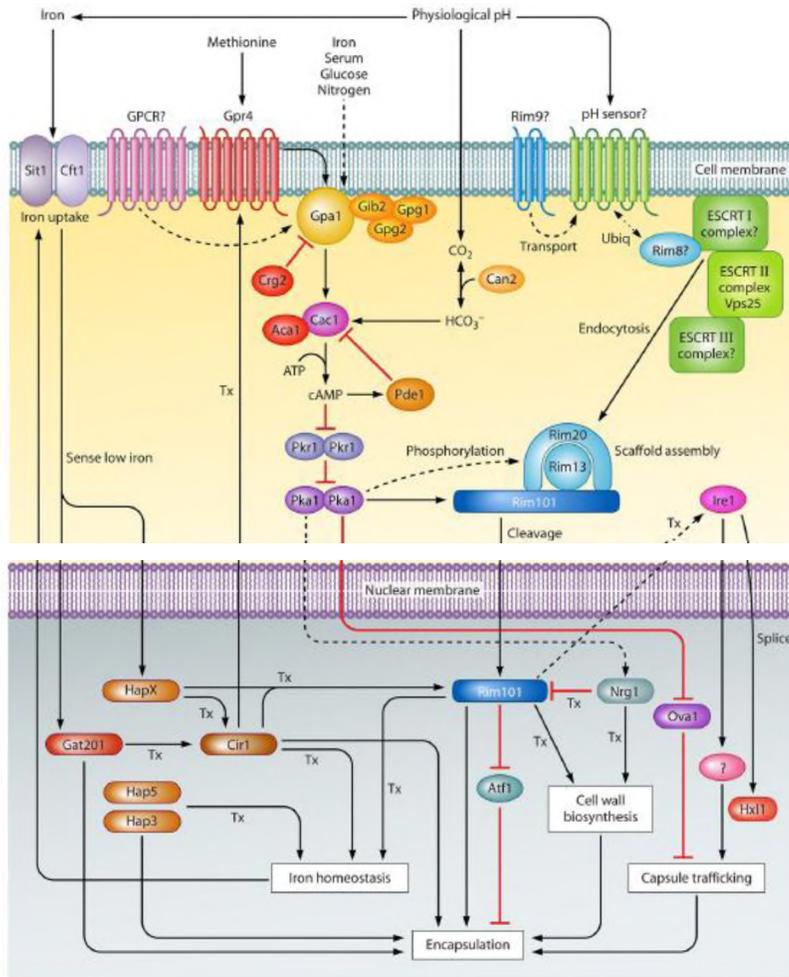


Figura tomada: American Society for Microbiology, July 2012 , p. 387–408

Modificación de la cápsula en respuesta a estrés

Es un factor represor en la inducción de la cápsula, lo cual está estrechamente relacionado con alteraciones en la integridad de la pared celular, impidiendo una

adecuada secreción capsular. La principal condición asociada es una elevada osmolaridad del entorno donde se encuentre el microorganismo [2, 24].

En cuanto al aumento del tamaño capsular en *C. neoformans*, estudios recientes han asociado este estado a la adición de polisacáridos diferentes a los preexistentes, produciendo de esta manera un aumento significativo de la densidad de la cápsula. Este hallazgo es de vital importancia en el entendimiento de la interacción del microorganismo con el sistema inmune del hospedero, ya que la acumulación de nuevas moléculas de polisacáridos que tienen diferentes propiedades físicas y antigénicas a las preexistentes podrían afectar el reconocimiento por parte de anticuerpos, complemento y por ende no se realizaría una fagocitosis efectiva de la levadura [2, 30, 31, 32].

2. Síntesis de melanina

La melanina es un pigmento que se encuentra en la pared celular de muchos hongos patógenos dentro de los cuales se encuentra *C. neoformans*. Hay varios tipos de melaninas: eumelaninas, feomelaninas, alomelaninas y piomelaninas, las cuales comparten características físicas como el color oscuro, insolubilidad y resistencia a hidrólisis ácida [33].

La melanización en *C. neoformans* está catalizada por la lacasa, una difenoloxidasas asociada a la pared celular que acciona la oxidación de compuestos difenólicos como las catecolaminas, grupo que incluye la epinefrina, norepinefrina y dopamina, esto explica el tropismo de este microorganismo por el sistema nervioso central (SNC). Los genes LAC 1 y LAC2 han sido identificados en *C. neoformans*, siendo LAC 1 el principal en la producción de melanina [33]. Este compuesto ha sido fuertemente asociado a resistencia al estrés oxidativo dentro de los fagolisosomas de las células fagocíticas del hospedero, esto adicional a la evasión del reconocimiento por parte de la respuesta inmune del mismo [33, 34].

3. Crecimiento a 37°C

C. neoformans es un microorganismo termotolerante en comparación con otros hongos, y puede por lo tanto, crecer a temperaturas corporales de los mamíferos [35].

4. Enzimas extracelulares

En *C. neoformans* se han descrito tres mecanismos de actividad enzimática que favorecen la patogenicidad y diseminación del microorganismo, dentro de estos se encuentra [36 - 38, 73]:

- Producción de proteasas: juegan un papel importante en la degradación tisular del hospedero, favoreciendo la invasión del parénquima pulmonar a partir del espacio alveolar.
- Fosfolipasa B: está localizada en la pared celular, manteniendo la integridad de ésta y adicionalmente contribuye a la invasión fúngica del tejido pulmonar y a la diseminación del microorganismo.
- Ureasa: cataliza la hidrólisis de urea a amoníaco y carbamato, esta actividad mejora la habilidad de *C. neoformans* para invadir el SNC (sistema nervioso central)

Metabolismo del hierro

El hierro es empleado por las células como cofactor de variadas actividades bioquímicas como el transporte de oxígeno, metabolismo energético y síntesis de DNA, esto debido a su capacidad de óxido-reducción que le permite asociarse a proteínas, transferir electrones y mediar reacciones catalíticas [6, 39].

Una gran cantidad de hierro (al menos 2,1 g) es empleado en la eritropoyesis, formación de hemoglobina en los eritrocitos y por ende el transporte de oxígeno, también una cantidad significativa está depositada en los macrófagos (~600 mg), adicionalmente se encuentra presente en la mioglobina (~ 300 mg), y el exceso de hierro en el organismo (~ 1 g) se almacena en el hígado [6].

La obtención nutricional del hierro está dada por tres vías dependiendo del estado químico del metal [6, 40]:

- Estado férrico Fe^{3+} : es reducido a ferroso Fe^{2+} por medio de reductasas DcytB (Citocromo B duodenal) ubicadas en el lumen intestinal.
- Estado ferroso Fe^{2+} : es transportado directamente a través de la membrana apical de los enterocitos por el DMT1 (Transportador divalente de metal 1).
- Grupo hem: es degradado por la hemooxigenasa, obteniendo de esta manera el hierro que compone la estructura tetrapirrólica.

Los iones ferrosos obtenidos de estas vías pueden ser almacenados por la ferritina o ser exportados a través de la membrana basolateral por medio de la ferroportina Fpn y posteriormente oxidados por la proteína de membrana hefaestina. La transferrina Tf se une al hierro en estado férrico Fe^{3+} para de esta manera ser transportado a donde se requiera [6, 40].

Figura 6. Metabolismo de hierro: el hierro es obtenido a partir de la dieta, este proceso se da mediante la DcytB que reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} y este es posteriormente internalizado por el DMT1, ya en el interior este elemento es distribuido para ser

almacenado en forma de ferritina o entregado a la transferrina para su transporte a los órganos que lo requieren.

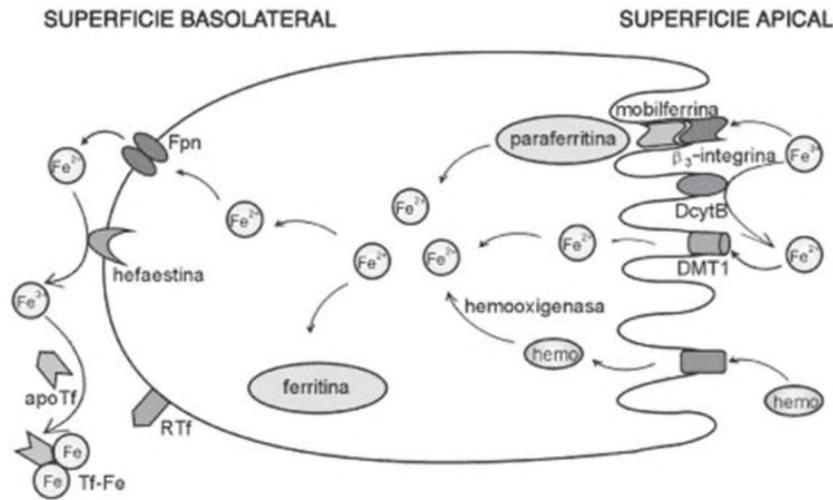


Figura tomada: Acta bioquím. clín. latinoam. v.39 n.3 La Plata jun./sept. 2005

La entrega de hierro a la transferrina es regulado por la hepcidina, péptido sintetizado por el hígado en respuesta al índice de saturación de la transferrina y el nivel de receptores dispuestos para esta proteína en el hígado, sin embargo la hepcidina también es sintetizada en procesos infecciosos e inflamatorios produciendo de esta manera una regulación negativa al impedir la entrega de hierro a la transferrina afectando directamente el metabolismo normal de este elemento, generando secundariamente procesos anémicos por deficiencia de hierro [5, 6, 7, 40].

Los mamíferos secuestran y retienen el hierro como un mecanismo de defensa, manteniendo así un entorno nutricional hostil para los patógenos invasores como es el caso de *C. neoformans*. Una gran cantidad de hierro está asociado a proteínas como transferrina, lactoferrina, ferritina y como hem en la hemoglobina.

La transferrina representa aproximadamente 1% del hierro total en el cuerpo humano, se mantiene a ~ 33% de saturación en suero y neutraliza eficazmente el

hierro libre. La lactoferrina es similar a la transferrina en estructura y función, pero esta proteína retiene el hierro en condiciones ácidas, mientras que la transferrina se une al hierro a pH neutro [41].

Teniendo en cuenta lo anterior, los patógenos compiten con el hospedero por la obtención de este elemento por medio de diversos mecanismos de captación, lo cual es importante para la virulencia [41, 42].

Mecanismos de captación de hierro

Los mecanismos de captación de hierro han sido más descritos en patógenos bacterianos, de los cuales muchos producen sideróforos que se unen con gran afinidad al hierro férrico y otros son capaces de utilizar proteínas como la ferritina, lactoferrina, grupo hemo y proteínas que contienen hemo [43]; por ejemplo *Staphylococcus aureus* durante la infección usa hierro del grupo hemo en lugar de la transferrina, por esta razón su capacidad Beta-hemolítica con lisis total de los glóbulos rojos [44].

Contrario a lo expuesto anteriormente, los mecanismos fúngicos en la captación de hierro han sido menos descritos [9], sin embargo se han detallado cuatro estrategias de captación y almacenamiento, lo cual les ha permitido competir eficazmente por este elemento en el medio [4]:

1. Reducción extracelular del hierro en estado férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) mediado por reductasas localizadas en la pared fúngica, dichas reductasas están asociadas a permeasas que permiten la internalización del hierro en el citoplasma.
2. Síntesis y secreción de sideróforos, que una vez unidos al hierro lo introducen en la célula fúngica mediante diversos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

3. Desarrollo de sistemas enzimáticos con actividad homóloga a la hemooxigenasa humana, haciendo posible la liberación del hierro de la hemoglobina tras la lisis eritrocitaria.
4. Acidificación del medio en condiciones anaerobias, secundario a la formación de hidrogeniones libres, lo cual permite la liberación del hierro unido a la transferrina sérica, facilitando la captación de este elemento.

El modelo fúngico mejor caracterizado es *Saccharomyces cerevisiae*, al cual se le han identificado dos sistemas de captación de alta afinidad [45, 46]:

1. Reducción de hierro férrico a ferroso por actividad de una reductasa de la superficie celular con posterior transporte a través de la membrana plasmática por una permeasa de alta afinidad por el hierro (complejo ferroxidasa multicobre).
2. Utilización de sideróforos de otros organismos.

Se han descrito mecanismos en el transporte de hierro similares al de *S. cerevisiae* en patógenos humanos. Los sistemas de reducción del hierro y utilización de sideróforos, también se han encontrado en *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* [47,48].

En *Candida albicans* se ha descrito un mecanismo adicional de captación similar a *S. aureus*, el cual está asociado a la actividad hemolítica, otorgándole la capacidad de utilizar el hierro del grupo hemo presente en la hemoglobina [49, 50].

Captación de hierro en *C. neoformans*

En *C. neoformans* se han encontrado varios sistemas de transporte que le permiten captar el hierro del medio ambiente, dentro de los que se destaca la presencia de reductasas en la superficie celular, el sistema de captación de alta afinidad compuesto por la permeasa CFT1 y la ferroxidasa Cfo1, la reducción extracelular no enzimática de hierro férrico por un reductor secretado, el ácido 3-hidroxiantranílico, la presencia de melanina en la pared celular, que puede contribuir a la reducción de hierro férrico [9, 51, 52]. Y por último también se ha descrito la captación de hierro unido a sideróforos secretados por otros microorganismos, ya que éste no produce sideróforos [9,51].

Hierro asociado a patogenicidad en *C. neoformans*

El hierro en toda célula eucariota es empleado como cofactor de variadas actividades bioquímicas como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la respiración mitocondrial, la biosíntesis de aminoácidos, lípidos y esteroides, esto debido a su capacidad de óxido-reducción que le permite asociarse a proteínas, transferir electrones y mediar reacciones catalíticas. Dicho elemento se vincula en *C. neoformans* al desarrollo del tamaño capsular en asociación con CO₂, adicionalmente la presencia de hierro media la regulación de la enzima fenoloxidasa, intermediaria en la síntesis de melanina a partir de compuestos difenólicos como las catecolaminas, favoreciendo la virulencia y patogenicidad de este microorganismo [6, 39].

Modelos *in-vivo* en el estudio de infecciones

La infección por *C. neoformans* ha sido previamente evaluada en modelos animales, dentro de los cuales se encuentran murinos e invertebrados, siendo los primeros relegados por aspectos bioéticos [53,54], según el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas (CIOM) para investigación con animales señalan los criterios éticos que deben seguirse en el manejo y cuidado de animales para experimentación [54]:

1. Reemplazo de animales conscientes por animales inconscientes o materiales no sensibles. Son alternativas de reemplazo:
 - Uso de técnicas físicas y químicas y predicciones basadas en las propiedades físicas de las moléculas.
 - Uso de modelos matemáticos y de computación, uso de organismos inferiores como invertebrados o microorganismos.
 - Uso de organismos muertos.
 - Uso de estados primarios de desarrollo, uso de métodos in vitro (fracciones subcelulares, fracciones de tejidos, suspensiones celulares, órganos, cultivos celulares, incluyendo células humanas).
2. Reducción del número de animales sin disminución de la precisión. Esto se logra con colonias genéticamente homogéneas, sin influencias ambientales, seleccionando el modelo animal adecuado, usando una metodología bioestadística avanzada y un banco de datos adecuado en que se publica tanto los resultados positivos como los negativos para no repetir experimentos
3. Refinamiento de las técnicas para reducir el dolor y las molestias. Se debe considerar los siguientes aspectos:
 - Cuidado y bienestar animal para evitar molestias innecesarias.
 - Destrezas y capacitación del personal para dar el tratamiento adecuado a los animales de experimentación.
 - Perfeccionamiento de métodos para detectar dolor.
 - Uso de anestésicos, analgésicos y tranquilizantes para disminuir el dolor.
 - Uso de técnicas no invasivas o telemétricas para evitar dolor y molestias.
 - Aplicar eutanasia anticipada o finalización del procedimiento doloroso (llamado punto final) para evitar la prolongación de sufrimiento

Recientes estudios han tomado ventaja de la fácil utilización de invertebrados como modelos de infección; amebas como *Acanthamoeba castellanii* y *Dictyostelium discoideum*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* y el insecto *Drosophila melanogaster*, han sido principalmente utilizados en el estudio de procesos

celulares, moleculares e infecciosos [55]. En *D. melanogaster* de tipo salvaje, hay una limitación especial dada por la resistencia a infección sistémica producida por diversos hongos, incluyendo *C. neoformans* [55, 56].

Galleria mellonella como modelo in-vivo para el estudio de infección por C. neoformans

En respuesta a la necesidad de un modelo que se ajuste a las condiciones de infección para *C. neoformans*, se implementó el uso de larvas de *G. mellonella*, polilla perteneciente al orden lepidóptero, suborden Glossata y clado Ditrysia. Esta permite el desarrollo de la patogenicidad del agente etiológico, dando un alto índice de mortalidad en estos insectos. El hongo dentro de la larva está sometido a fagocitosis por parte de los hemocitos, lo cual hace una representación de la respuesta inmune frente a estos patógenos [57].

G. mellonella ha sido utilizada también en el estudio de la patogénesis bacteriana de *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y patogénesis fúngica de *C. albicans* y *Aspergillus* spp., principalmente *A. fumigatus* y *A. flavus* obteniendo de igual manera que con *C. neoformans* la muerte de la larva [53, 58-66].

La respuesta inmune producida por *G. mellonella* durante la infección por *C. neoformans* es diferente en comparación con células de mamíferos, dado que los invertebrados carecen de respuesta inmune adaptativa y no hay producción de inmunoglobulinas, sin embargo, los insectos poseen mecanismos de respuesta inmune innata efectivos, los cuales están dados por la presencia de hemocitos que tienen capacidad fagocítica similar a la actividad de macrófagos y neutrófilos; células presentes en la respuesta innata de mamíferos, adicionalmente se ha reportado la producción de péptidos antimicrobianos en estos insectos que median la inmunidad frente a la infección [53].

En cuanto a los factores de virulencia de *C. neoformans* que este modelo permite evaluar, se encuentra el tamaño capsular, el cual se ve sometido a cambios morfológicos, caracterizados por aumento del tamaño capsular, dando lugar a células gigantes que logran inhibir la fagocitosis [11, 53]. El modelo *G. mellonella* también ha sido caracterizado en la especie *C. gattii* obteniendo igual utilidad y correlación que con *C. neoformans* [74].

A pesar de la gran utilidad que brinda este modelo en el estudio de diversas infecciones, dentro de estas la criptococosis, se han identificado ciertas desventajas principalmente dadas en la producción de este modelo, ya que muchas veces se ve afectado por factores fisiológicos y patológicos de los insectos si no se llevan las medidas adecuadas para su producción en masa. Otro aspecto importante es la caracterización genética de este modelo, siendo pobre en comparación con *D. melanogaster*. Sin embargo, dichas desventajas no han opacado el potencial de este organismo como modelo experimental, dado que sus ventajas sopesan sus desventajas.

Dentro de las ventajas adicionales a la evaluación de respuesta inmune y factores de virulencia, se une la gran correlación con resultados obtenidos en modelos murinos, su fácil manipulación y su tolerancia a 37°C, lo cual no es compatible con otros modelos como *C. elegans* o *D. melanogaster*, en los cuales la temperatura máxima a emplear es 25 °C [57].

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la patogenicidad de *Cryptococcus neoformans* expuesto a diferentes concentraciones de hierro en el modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración basal de hierro en *Galleria mellonella*.
2. Evaluar el crecimiento de *C. neoformans* en presencia de hierro.
3. Evaluar la concentración de hierro consumido por *C. neoformans* a partir del medio de cultivo.
4. Evaluar la supervivencia de *G. mellonella* inoculada con *C. neoformans* bajo la influencia de diferentes concentraciones de hierro.
5. Evaluar la influencia del hierro en el tamaño capsular de *C. neoformans*.

METODOLOGÍA

-Cepas de trabajo: En el estudio se emplearon las cepas descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *C. neoformans* utilizadas en el estudio

Código INS	Código	Especie	Variedad	Serotipo/ Pareja sexual	Virulencia	Referencia
H0058-I-1129	H99	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	A / α	Alta	[15,75]
H0058-I-1128	JEC21	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	D / α	Baja	[15,75]

Las cepas se emplearon en fase logarítmica de crecimiento, las cuales fueron sembradas en agar Sabouraud e incubadas por 24 horas a 37°C.

-Larvas de *Galleria mellonella*:

Las larvas fueron adquiridas con la empresa SCIENTIA COLOMBIA S.A.S Cali-Colombia, en último estadio larval (15 días antes de convertirse a pupa).

Objetivo 1: "Determinar la concentración basal de hierro en *Galleria mellonella*."

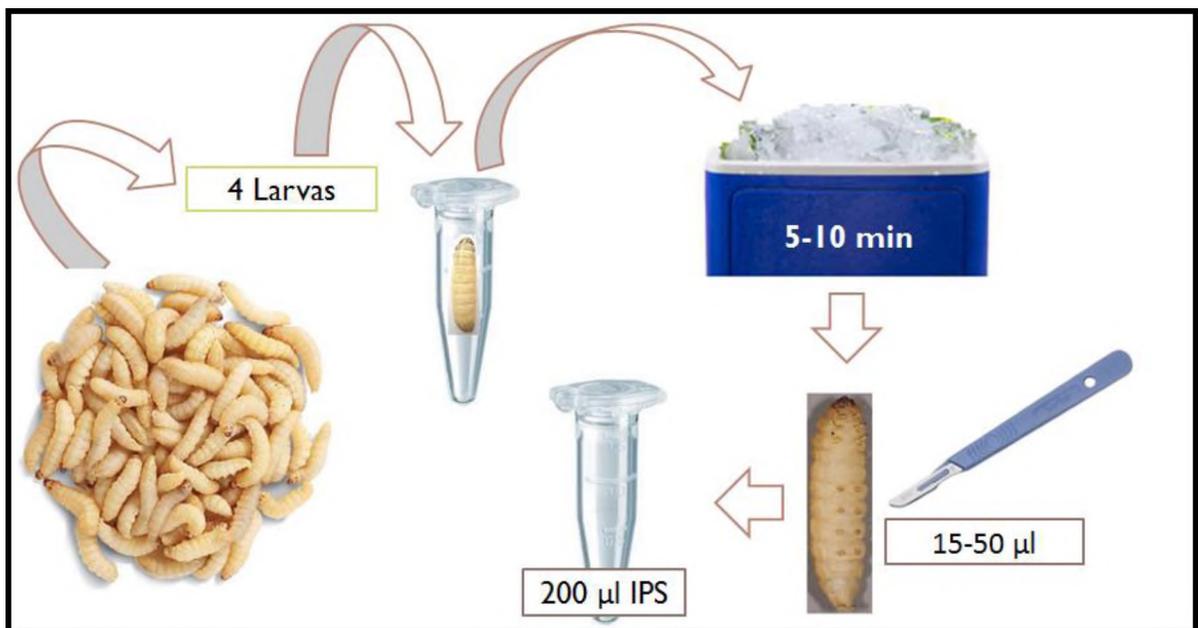
Se realizó medición de la concentración basal de hierro en *G. mellonella* con el fin de determinar la concentración de hierro en el organismo.

Para esto se seleccionaron cuatro larvas al azar, las cuales fueron introducidas individualmente en tubos eppendorf y posteriormente puestas en contacto con hielo, logrando de esta manera una sedación y disminución en la movilidad de estos

invertebrados. La exposición al frío se realizó aproximadamente por 10-15 minutos. A las larvas sedadas se les realizó una incisión en la última pata falsa, garantizando de esta manera una extracción de la hemolinfa sin agregados intestinales [67].

La hemolinfa extraída (aproximadamente 15-50 μ l por cada larva) se depositó en tubos eppendorf los cuales contenían 200 μ l de anticoagulante con propiedad antimelanizante: *Buffer Insect physiological saline* (IPS), para posteriormente realizar la medición de hierro en la hemolinfa, la cual fue medida dentro de un periodo de 10 minutos posteriores a la extracción, garantizando la calidad de la hemolinfa para el respectivo procedimiento [53, 67]. (Figura 7).

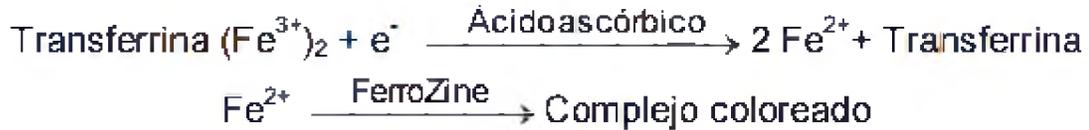
Figura 7. Extracción de hemolinfa de *Galleria mellonella*



La concentración basal de hierro de *G. mellonella* en último estadio larval fue medida por el método colorimétrico descrito a continuación.

Principio del método: el hierro se disocia del complejo sérico hierro-transferrina en medio ácido débil. El hierro libre se reduce a ión ferroso mediante el ácido ascórbico.

Los iones ferrosos en presencia de FerroZine forman un complejo coloreado, como se describe en la siguiente reacción:



Procedimiento: se siguieron las indicaciones de la casa comercial (SPINREACT) para el kit IRON-FZ dispuesto para la cuantificación de dicho elemento:

para determinar la concentración de hierro se puso en contacto 200 µL de la muestra (hemolinfa) con ácido ascórbico (reactivo de trabajo RT) y los iones ferrosos resultantes de esta reducción fueron coloreados con ferroZine (R3) (Tabla 2.) Luego se mezclaron e incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia (580 nm) del patrón y la muestra, frente al blanco del reactivo.

Tabla 2. Preparación de muestras y blancos: inserto de la casa comercial SPINREACT para el kit IRON-FZ.

<u>Reactivos</u>				
	<u>Blanco</u> <u>RT</u>	<u>Patrón</u>	<u>Blanco</u> <u>Muestra</u>	<u>Muestra</u>
RT (Tampón+ reductor) (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0
R3 (Color-FerroZine) (gotas)	1	1	-----	1
Agua destilada (µL)	200	-----	-----	-----
Patrón (µL)	-----	200	-----	-----
Muestra (µL)	-----	-----	200	200
Control (50 µM FeCl ₃)	-----	-----	200	200

En el procedimiento se utilizó un control con concentración conocida (50µM) FeCl₃.

La medición se realizó con el Stat Fax 3300, instrumento ampliamente utilizado en inmunoensayos de bioquímica a nivel clínico. Para este procedimiento se siguieron los lineamientos de la casa comercial.

Objetivo 2: “Evaluar el crecimiento de *C. neoformans* en presencia de hierro.”

La concentración de FeCl_3 a emplear en este objetivo fue determinada con base en revisión bibliográfica, la cual reportaba concentraciones de 10, 100 y 1000 μM , sin embargo al realizar la incubación empleando la mayor concentración (1000 μM) no se obtuvo crecimiento de ninguna de las cepas (JEC21 y H99), por lo cual se replanteo la concentración máxima de FeCl_3 a evaluar:

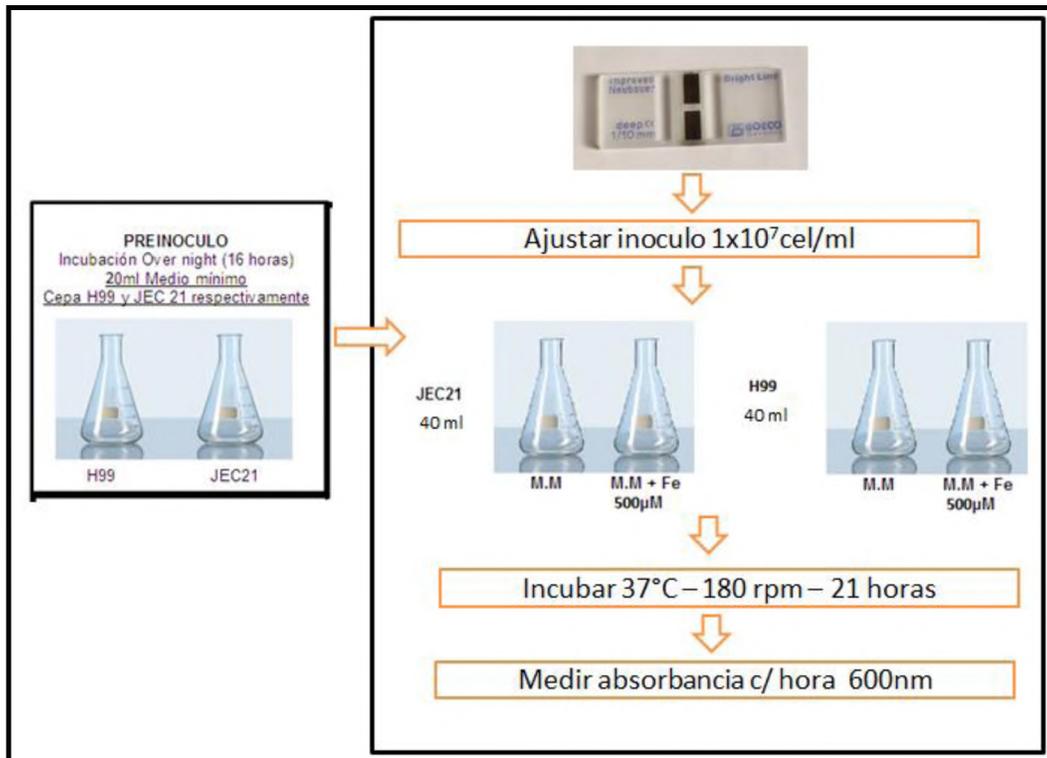
se determinó reducir a la mitad las concentraciones reportadas en la literatura (5, 50 y 500 μM de FeCl_3), de las cuales se empleó la máxima concentración (500 μM) con el fin de evaluar el crecimiento de las cepas de *C. neoformans* (JEC21 y H99) a mayor biodisponibilidad de hierro [9, 68].

Teniendo en cuenta lo anterior se inició con la incubaron de las cepas (H99 y JEC21) en 20mL de medio mínimo (compuesto por 5 g de glucosa, 5 g de asparagina, 0,4 g de K_2HPO_4 , 80 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg de Tiamina, 0,057 g de ácido bórico, 0,005 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,46 mg de molibdato de sodio por litro), toda la noche (16 horas). Las cepas utilizadas se emplearon a partir de cultivo fresco (< 24 horas) en agar Sabouraud dextrosa [69].

Posterior a la incubación en medio mínimo toda la noche, se midió el número de células/mL de cada cepa (H99 y JEC21) en cámara de Neubauer. El inóculo de cada cepa (H99 y JEC21) se ajustó a una concentración final de 1×10^7 células/mL para un volumen final de 40mL de medio mínimo. Esta preparación fue incubada a 37°C en agitación continua de 180 rpm por 21 horas, tiempo durante el cual se midió

la densidad óptica de cada medio de cultivo con la respectiva cepa. Dicha medición se realizó cada hora (Figura 8).

Figura 8. Curva de crecimiento de *C. neoformans* (JEC21 y H99) bajo concentración de 500 μM de FeCl_3 .



Objetivo 3: "Evaluar la concentración de hierro consumido por *C. neoformans* a partir del medio de cultivo."

Para cumplir con este objetivo se evaluaron tres concentraciones de hierro, según revisión bibliográfica, lo cual permite determinar el consumo de dicho elemento por parte de *C. neoformans* en distintas condiciones de biodisponibilidad [9, 68]:

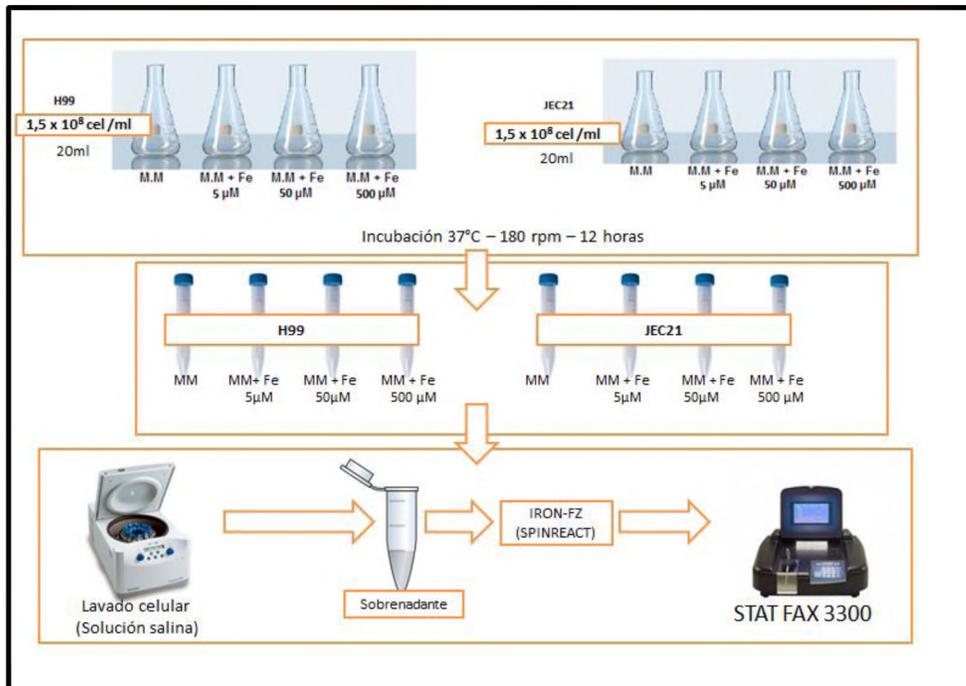
- FeCl_3 : 0, 5, 50, 500 μM .

Se empleó medio mínimo con y sin suplementación:

1. Hierro (FeCl₃): se evaluó la utilización de hierro, con el fin de observar una reducción del elemento a estado ferroso, importante para la internalización a nivel intracelular.
2. Ausencia de hierro: en esta condición se evaluó el metabolismo del microorganismo en ausencia de hierro.

Las cepas de *C. neoformans* (H99 y JEC21) a una concentración de 1.5×10^8 células/mL (concentración establecida en ensayos previos del proyecto al que pertenece este estudio), fueron incubadas en 20mL de medio mínimo suplementado con las diferentes concentraciones de FeCl₃ descritas anteriormente, dicha incubación se realizó por un periodo de 12 horas a una temperatura de 37°C y agitación constante de 180 rpm [69]. Posterior a la incubación se tomó 10mL de cada medio de cultivo y se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm. La medición del hierro se realizó a partir del sobrenadante, con el mismo principio descrito en el objetivo 1 (Figura 9).

Figura 9. Medición de hierro consumido por *C. neoformans* en medios de cultivo con FeCl_3 (0, 5, 50, 500 μM).



En el procedimiento se utilizó un control con concentración conocida (50 μM) FeCl_3 .

Objetivo 4: “Evaluar la supervivencia de *G. mellonella* inoculada con *C. neoformans* bajo la influencia de diferentes concentraciones de hierro”.

Se incubaron dos cepas de *C. neoformans* (JEC21 y H99) a una concentración inicial de $1,5 \times 10^8$ cel/mL, con las diferentes concentraciones de hierro, las cuales fueron descritas en el objetivo 3.

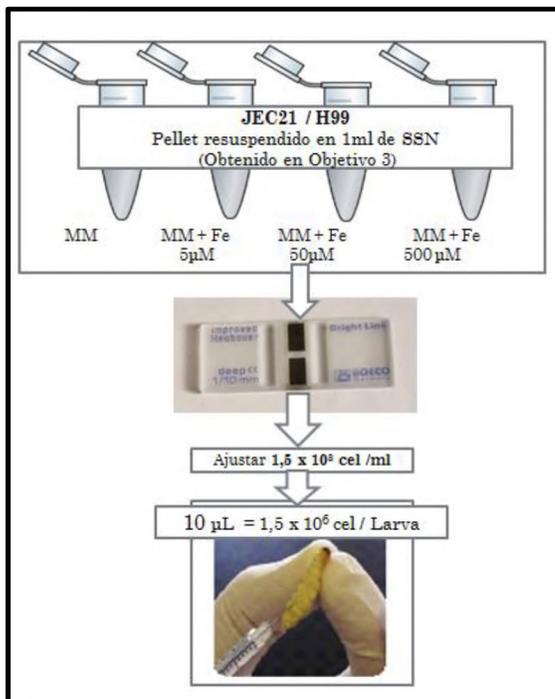
Posterior a la incubación se tomó 10 mL de los diferentes medios y se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm para obtener el pellet, el cual fue resuspendido con solución salina 0,85 % con el fin de lavar las células, este proceso se realizó dos veces para

finalmente resuspender el pellet en 1mL de solución salina, a partir del cual se determinó el número de células/mL en cámara de Neubauer.

La concentración de cel/mL determinada para cada medio, se ajustó para obtener una concentración de 1.5×10^8 cel/mL, la cual posteriormente se inoculó a las respectivas larvas, generando de esta manera un modelo de infección.

Para la inoculación se clasificaron grupos de 20 larvas, a las cuales se inyectaron 10 μ L de una suspensión de *C. neoformans* preincubado con y sin FeCl₃ con jeringa de insulina (concentración equivalente a 1.5×10^6 cel/ larva). Esta inoculación se realizó en la última pata falsa de la larva (Figura 10).

Figura 10. Inoculación en larvas de *G. mellonella*: se inoculó con 10 μ L de suspensión con *C. neoformans* (pre-incubado con concentraciones de 0, 5, 50 y 500 μ M de FeCl₃), lo cual equivale a concentración de 1.5×10^6 cel/ Larva.



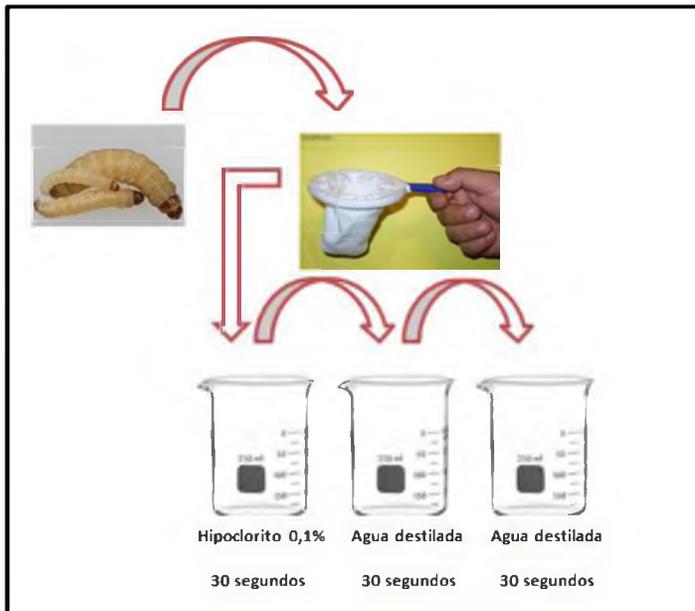
En este modelo de infección se emplearon tres controles descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Controles empleados en la inoculación de *C. neoformans* (pre-incubado con concentraciones de 0, 5, 50 y 500 μM de FeCl_3) en el modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

Control absoluto	20 larvas	Larvas sin ningún tipo de manipulación en el laboratorio.
Control inoculación	20 larvas	Larvas inoculadas con solución salina 0.85%.
Control desinfección	20 larvas	Larvas que han sido desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 0,1%.

Todas las larvas, excepto el control absoluto, fueron previamente desinfectadas utilizando hipoclorito de sodio al 0,1% seguido por dos lavados con agua destilada (Figura 11).

Figura 11. Desinfección de larvas de *G. mellonella*: procedimiento realizado previo a la infección, utilizando hipoclorito de sodio al 0,1%.



Posterior a la inoculación se registró diariamente el número de larvas muertas identificando características como flacidez, ausencia de movilidad y coloración negra. Adicionalmente, se realizó el análisis de supervivencia de las larvas mediante el método de Kaplan-Meier (KM).

KM utiliza una función de supervivencia no paramétrica para un grupo analizado, es decir su probabilidad de supervivencia después del momento de inoculación. La comparación de esta supervivencia entre grupos se realizó con la aplicación las pruebas de *Breslow* y *log-rank*, estas pruebas permiten identificar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados, evidenciando si estas diferencias se presentan al inicio o al final del periodo de observación (*Breslow* y *log-rank* respectivamente). Este análisis se realizó utilizando el programa SPSS – IBM [53, 57].

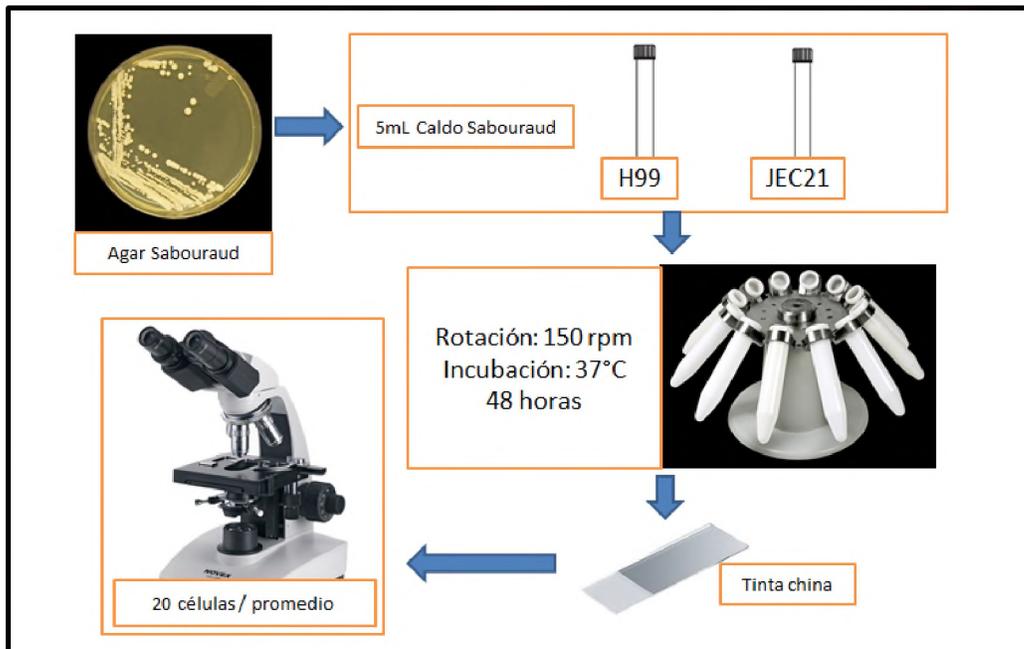
Se realizaron tres réplicas de cada experimento.

Objetivo 5: “Evaluar la influencia del hierro en el tamaño capsular de *C. neoformans*”.

Medición de cápsula de cepas sin tratamiento

Las cepas de *C. neoformans* (H99 y JEC21) fueron extraídas de cultivo fresco en agar Sabouraud dextrosa y resuspendidas en 5mL de caldo Sabouraud, las cuales fueron incubadas por 48 horas con una agitación constante de 150 rpm y temperatura de 37°C. Posterior a la incubación se realizó una preparación en fresco con tinta china (1 gota de medio y 1 gota de tinta) entre lámina y laminilla, la medición se efectuó en microscopio óptico con objetivo de 100x y la utilización de micrómetro ocular con resolución de 1 µm. Se observaron 20 células, a las cuales se les midió el tamaño capsular (de la pared celular al borde de la capsula) y posteriormente se realizó promedio de los datos [70] (Figura 12).

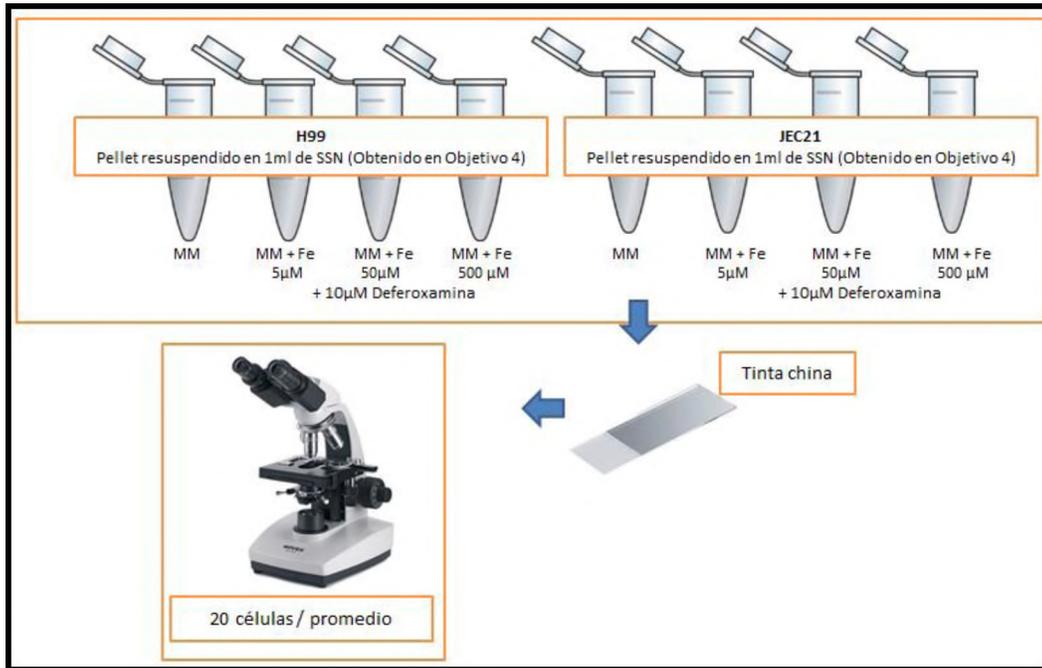
Figura 12. Medición de capsula en cepas (JEC21 y H99) sin contacto con FeCl_3 : se realizó mediante la incubación de las cepas en caldo sabouraud, a partir de un cultivo fresco (<24 horas) en agar sabouraud, posterior a esto se hizo preparación en fresco entre lamina y laminilla con tinta china, lo cual fue observado en microscopio óptico a 100X.



Medición de cápsula de cepas incubadas con FeCl_3 .

El pellet obtenido a partir del cultivo de *C. neoformans* con FeCl_3 fue resuspendido en 1 mL de solución salina 0,85 %, y posteriormente se realizó la medición del tamaño capsular. Para esto se hizo una preparación en fresco con tinta china (figura 13).

Figura 13. Medición de capsula en cepas (JEC21 y H99) incubadas con FeCl₃: para esto se obtuvo el pellet de células preincubadas con concentración de 0, 5, 50 y 500 μ M de FeCl₃ a las cuales se les realizó preparación en fresco entre lamina y laminilla con tinta china, y posteriormente observado en microscopio óptico a 100X.

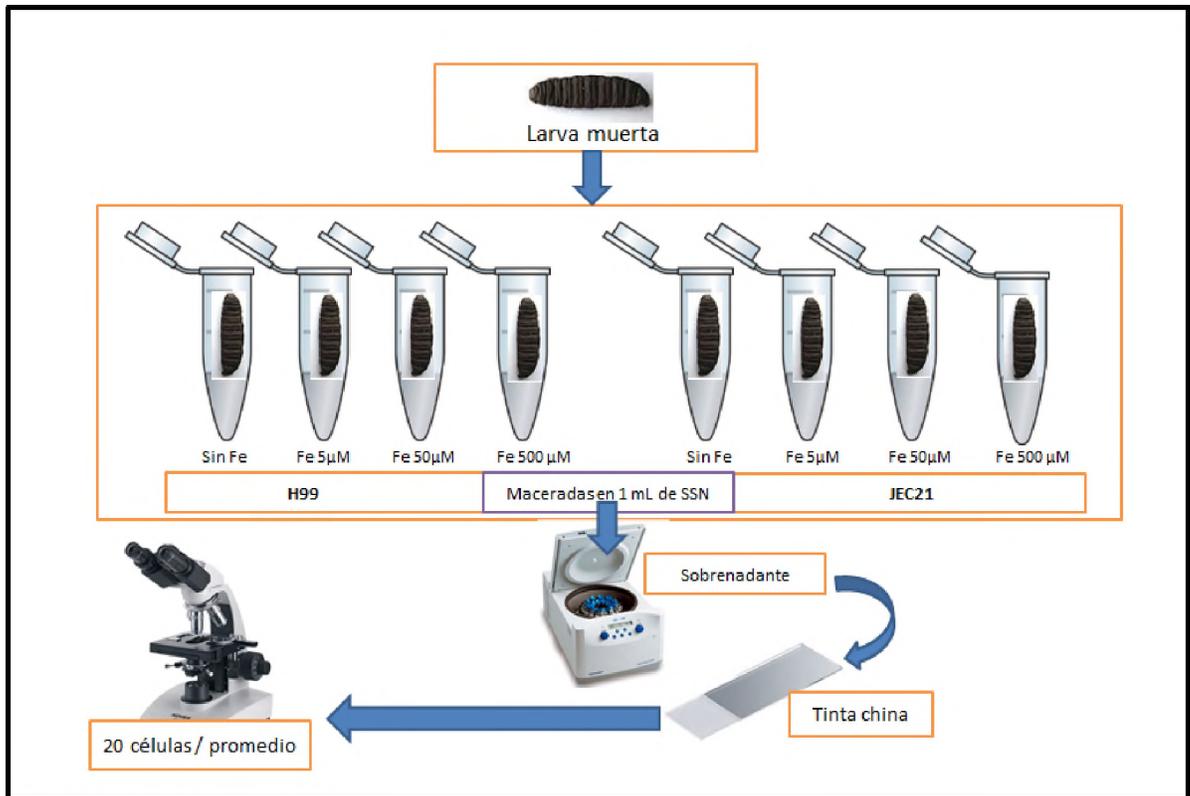


Medición de cápsula en cepas obtenidas a partir del macerado de larvas de *G. mellonella* infectadas con *C. neoformans* (preincubado con y sin FeCl₃)

Durante los 15 días del experimento post-infección, se realizó recolección diaria de larvas muertas correspondientes a las dos cepas de *C. neoformans* (H99 y JEC21), las cuales fueron maceradas individualmente en tubos eppendorf con 1mL de solución salina 0,85 %.

El macerado fue centrifugado por 5 minutos a 10000 rpm para eliminar lípidos que puedan interferir con la observación. La medición de tamaño capsular y celular fue realizada mediante preparación en fresco con tinta china, utilizando el sobrenadante del macerado, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Figura 14).

Figura 14. Medición de capsula en cepas (JEC21 y H99) obtenidas de larvas post-infección: obtención a partir de macerados de larvas muertas en 1 mL de solución salina 0,85 %, del cual se empleó el sobrenadante obtenido por centrifugación y posteriormente preparado entre lamina y laminilla con tinta china y observado en microscopio óptico a 100X.



Se realizó medición del 50% de larvas muertas, las cuales fueron escogidas al azar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1: “Determinar la concentración basal de hierro en *Galleria mellonella*.”

En el desarrollo de este objetivo se empleó el STAT FAX 3300, equipo empleado en análisis bioquímicos a nivel clínico, el cual se fundamenta en un sistema hidráulico asociado a espectrofotometría y se empleó el kit IRON- FZ de la casa comercial SPIREACT con un rango de medida de 1,85 µg/dL hasta el límite de linealidad de 1000 µg/dL.

La concentración basal de hierro en la hemolinfa de *G. mellonella* no fue determinada, ya que en la medición de dicho elemento en el control de concentración conocida (50 µM) se obtuvo gran variabilidad en los resultados, lo cual no permite la validación de la prueba y por ende los resultados obtenidos en esta (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de hierro medida en hemolinfa de *G. mellonella*: se realizó con la utilización del kit IRON- FZ de la casa comercial SPINREACT. El resultado se obtuvo por lectura de densidades ópticas (OD) A 580 nm en el equipo STAT FAX 3300.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN µM Primera medición	CONCENTRACIÓN µM Segunda medición	CONCENTRACIÓN µM Tercera medición
Control 50 µM	232	66,9	77,2
Hemolinfa	10,8	0,8	0,4

Si se tuviera en cuenta la concentración determinada en la segunda medición:

0,8 µM = 4,6µg/dl ($7,4 \times 10^{-8}$ ppm), en la que el control estuvo cerca de la concentración esperada, se encuentra que los niveles de hierro son muy bajos en

comparación con mediciones hechas en estudio previo realizado por Malik y colaboradores 2009, en el cual se determinó una concentración de 11 ppm para los insectos pertenecientes al orden lepidóptero, como es el caso de *G. mellonella*. Cabe aclarar que la concentración descrita (11 ppm) puede variar según las condiciones alimenticias y el estadio de la larva [71].

Por otro lado Malik y colaboradores midieron la concentración de diferentes metales de *Bombix mory* en diferentes estadios, utilizando la técnica de espectrometría de absorción atómica, lo cual presenta una alta sensibilidad para la detección a nivel de ppm de diferentes metales [91]. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede inferir que el método utilizado en este estudio para la medición de hierro, no fue el más apropiado, ya que el kit IRON-FZ es empleado en la práctica clínica para la medición en suero humano, adicionalmente para esta prueba se ha reportado interferencias en la lectura dada por lípidos presentes en la muestra, razón por la cual se podría disminuir la efectividad del método fotométrico para el análisis de hierro en la hemolinfa, la cual está compuesta aproximadamente por un 90% de agua y el porcentaje restante corresponde a iones (Hierro, manganeso, cobre, zinc, sodio, potasio, magnesio, cloro), lípidos, azúcares, factores humorales y células siendo más destacados los hemocitos [71].

Dadas las posibles interferencias descritas anteriormente, se hace necesaria la utilización de un método más sensible en la medición de hierro, es por esto que la espectrometría de absorción atómica es la técnica más indicada, ya que permite evaluar concentraciones específicas de un analito en una mezcla determinada.

Objetivo 2: “Evaluar el crecimiento de *C. neoformans* en presencia de hierro.”

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las dos cepas de *C. neoformans* (JEC21 y H99) en medio mínimo con la concentración máxima (500µM de FeCl₃) a evaluar

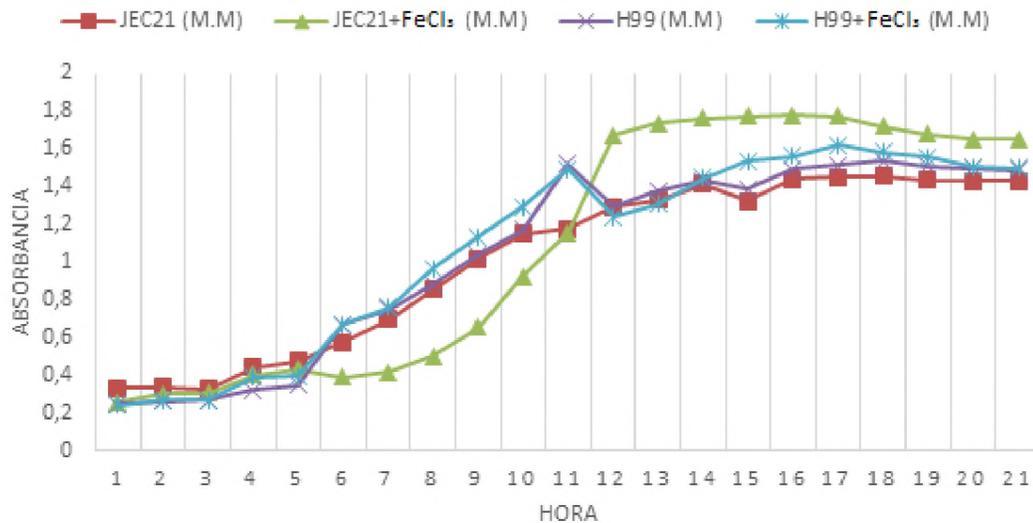
en el estudio, esto con el fin de observar el comportamiento de las cepas en un medio con abundante biodisponibilidad de hierro.

Como resultado se observó un comportamiento de adaptación o fase logarítmica durante las primeras cinco horas, seguido de una fase exponencial hasta las 13 horas de cultivo y finalmente una fase estacionaria (Figura 15). Con los resultados obtenidos se observó que tanto *C. neoformans* H99 como JEC21 crecen en medio mínimo y en medio suplementado con 500 μ M de hierro, sin observarse diferencias significativas entre las dos cepas ($p=0.02$).

El metabolismo del hierro es de gran importancia en las células eucariotas, ya que este elemento interviene en procesos intracelulares, dentro de los que se destaca la cadena respiratoria, el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de ácidos nucleicos [4-7]. Este proceso fisiológico del microorganismo se puede asociar a su crecimiento en el medio dispuesto para el estudio, con el cual se evidenció todas las fases consistentes con una curva de crecimiento determinada para microorganismos.

Con estos resultados se confirmó el crecimiento de las dos cepas en medio mínimo y suplementado con hierro, lo que permitió establecer esta concentración como la máxima a utilizar en un rango de 5 a 500 μ M. A pesar de que la literatura reporta concentraciones de hierro en un rango de 10 a 1000 μ M, con buen crecimiento, en este estudio no se observó crecimiento en la concentración de 1000 μ M (datos no mostrados). Este comportamiento posiblemente se deba a la inhibición del crecimiento dado por una alta concentración de este elemento [9, 24, 68].

Figura 15. Curva de crecimiento *C. neoformans*: se emplearon dos condiciones a evaluar (medio mínimo y medio mínimo suplementado con 500 μM de FeCl_3). En las dos cepas (JEC21 y H99) se observaron las diferentes fases de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria), determinando así el adecuado desarrollo de las cepas en el medio de cultivo dispuesto para el estudio.



Objetivo 3: “Evaluar la concentración de hierro consumido por *C. neoformans* a partir del medio de cultivo.”

Al evaluar la concentración de hierro consumida por *C. neoformans* se encontró que mediante el uso del kit IRON- FZ no fue posible su determinación, ya que los valores obtenidos presentaron concentraciones muy variables que no corresponden a los valores de hierro esperados. Durante el proceso se empleó un control con una concentración conocida de hierro (50 μM), para el cual tampoco fue posible una medición concordante (Tabla 5). El medio mínimo tiene una concentración de hierro reportada de 5 μM lo cual no fue posible corroborar con el kit utilizado [72].

El kit IRON-FZ de la casa comercial SPINREACT utilizado en el ensayo tiene instaurado un rango de lectura de 1,85 µg/dL hasta el límite de linealidad de 1000 µg/dL, el cual abarca todos los datos recolectados. Sin embargo, estos resultados no son validados, debido a la incoherencia de la medición obtenida del control con concentración conocida (50µM).

Estos resultados posiblemente se pueden deber a la disposición de este kit, el cual está determinado para la medición de hierro en suero. Adicionalmente, el FeCl₃ es estable por 7 días en refrigeración y las condiciones de crecimiento de las cepas (H99 y JEC21) en los medios dispuestos para la medición (Medio mínimo sin y con 5, 50, 500 µM de FeCl₃) fueron incubados a 37°C por 16h, lo cual pudo haber interferido con la correcta cuantificación de este elemento. Otro factor que puede estar relacionado es la composición del medio mínimo (Glucosa, asparagina, K₂HPO₄, MgSO₄ • 7H₂O, CaCl₂ • 2H₂O, Tiamina, ácido bórico, CuSO₄ • 5H₂O, MnCl₂ • 4H₂O, ZnSO₄ • 7H₂O y molibdato de sodio) en la cual uno o varios de sus componentes pueden estar interfiriendo en la reacción mediada por los reactivos del kit y por ende en la lectura y cuantificación del hierro, obteniéndose de esta manera gran variabilidad en los resultados.

Teniendo en cuenta las inconsistencias en los resultados obtenidos mediante la utilización del STAT FAX 3300, se decidió utilizar los resultados de las absorbancias para realizar el cálculo empleando la ecuación descrita en el inserto del kit IRON-FZ, obteniendo igualmente resultados inconsistentes (datos no mostrados).

Ecuación

(A)Muestra – (A) blanco de muestra x 100 µg/dL (Concentración del patrón)

(A) Patrón

Tabla 5. Concentraciones de hierro medidas con STAT FAX 3300 en los medios de cultivo dispuestos para las cepas de *C. neoformans* (JEC21 y H99). Se observó variabilidad en los resultados del control de concentración conocida (50 μM) y en las muestras analizadas para cada cepa: medio mínimo sin y con suplementación de hierro (5, 50 y 500 μM).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN μM Primera medición	CONCENTRACIÓN μM Segunda medición	CONCENTRACIÓN μM Tercera medición
Medio mínimo	10,1	10,3	38,0
Control 50 μM	232	66,9	77,2
Medio JEC21	27	15,9	8,5
Medio JEC21 +5 μM	8,3	68,8	10,5
Medio JEC21 +50 μM	148,4	138,3	13,8
Medio JEC21 +500 μM	36,6	26,5	7,2
Medio H99	3,1	78,5	68,4
Medio H99 +5 μM	2,5	36,9	25,7
Medio H99 +50 μM	7,8	165,9	155,8
Medio H99 +500 μM	159,2	11,5	149,1

Objetivo 4: “Evaluar la supervivencia de *G. mellonella* inoculada con *C. neoformans* bajo la influencia de diferentes concentraciones de hierro”.

Los resultados presentados corresponden al análisis de las tres replicas, en las cuales se observó una supervivencia del 100% para el control absoluto, control de inoculación y control de desinfección, lo que permite validar los ensayos realizados, además se observó diferencias significativas en la supervivencia de *G. mellonella* entre la cepa JEC21 y H99 (Figura 16, tabla 6).

Figura 16. Curva de supervivencia de *G. mellonella* inoculada con cepas JEC21 y H99 de *C. neoformans* (preincubadas con 0, 5, 50 y 500 μM de FeCl_3): se obtuvo 100% de supervivencia para los controles (absoluto, inoculación y desinfección) lo cual permite validar el ensayo.

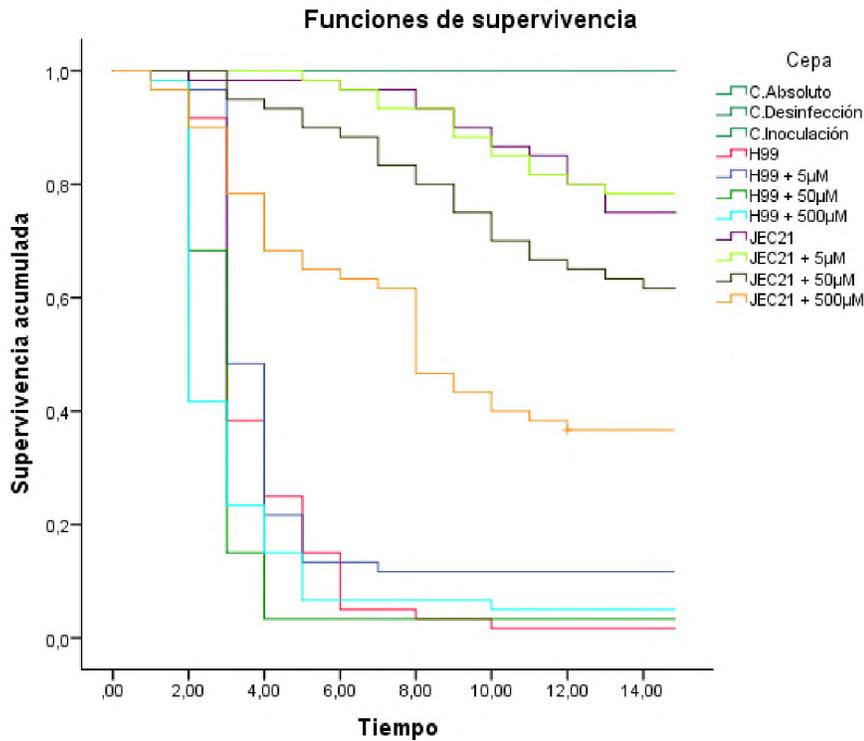


Tabla 6. Prueba de igualdad de distribución de supervivencia (cepa JEC21 y H99 sin y con concentraciones de FeCl_3 5, 50, 500 μM)

Comparaciones globales	
	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,000

Análisis en cepa JEC21

Para la cepa JEC21 sin FeCl_3 , el porcentaje de supervivencia fue del 93% hasta el día 8 y al finalizar el experimento se observó un 75% de supervivencia. Contrario a

esto, en la cepa JEC21 con las diferentes concentraciones de FeCl₃ (5, 50 y 500 μM) se encontró a los 8 días un porcentaje de supervivencia del 92%, 80%, 46% y al final del experimento se observó un porcentaje de supervivencia de 78%, 61%, 35% respectivamente. Las larvas que sobrevivieron pasaron a pupa, por lo que se estableció el día 15 como el último día del experimento (Tabla 7).

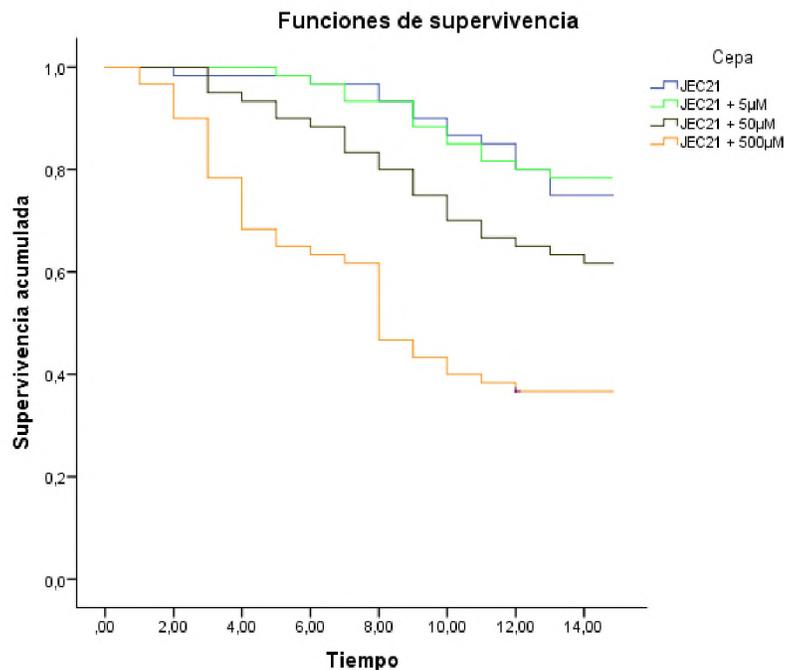
Tabla 7. Supervivencia *G. mellonella* inoculada con cepa JEC21 (preincubada con 0, 5, 50, 500 μM de FeCl₃)

Tiempo en días	ENSAYOS JEC21 SIN FeCl ₃			ENSAYOS JEC21 5 μM FeCl ₃			ENSAYOS JEC21 50 μM FeCl ₃			ENSAYOS JEC21 500 μM FeCl ₃		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
1	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	18	20
2	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	18	16
3	19	20	20	20	20	20	20	20	17	20	18	9
4	19	20	20	20	20	20	20	20	16	17	17	7
5	19	20	20	20	20	19	20	20	14	17	17	5
6	19	19	20	20	20	18	20	20	13	16	17	5
7	19	19	20	20	19	17	20	20	10	15	17	5
8	19	17	20	20	19	16	20	20	8	11	14	3
9	19	15	20	20	17	16	20	19	6	10	13	2
10	18	15	19	18	17	16	20	18	4	10	12	2
11	18	15	18	18	15	16	20	16	4	10	11	2
12	17	15	16	17	15	16	19	16	4	10	10	1
13	15	15	15	16	15	16	18	16	4	10	10	1
14	15	15	15	16	15	16	17	16	4	10	10	1
15	15	15	15	16	15	16	17	16	4	10	10	1

La prueba de Breslow (Wilcoxon) evalúa los eventos producidos al inicio del seguimiento y la prueba log-rank, evidencia las diferencias de supervivencia tardía, teniendo en cuenta esto al analizar la curva de supervivencia de *G. mellonella* (cepa JEC21 sin y con concentraciones de FeCl₃ 5, 50, 500 μM), se encontró una diferencia significativa, principalmente dada por la cepa JEC21 con 500 μM, que a

diferencia de las otras condiciones evaluadas tuvo un pequeño pico de mortalidad en el día 3 y 4 , y al finalizar el ensayo presento una supervivencia de 35% , la cual está muy disminuida en comparación con las demás condiciones evaluadas (Figura 17).

Figura 17. Curva de supervivencia *G. mellonella* inoculada con cepa JEC21 (preincubada con 0, 5, 50, 500 μ M de FeCl_3)



La disminución significativa de la supervivencia de *G. mellonella* inoculada con la cepa JEC21 con 500 μ M de FeCl_3 da indicio de la modulación de la patogenicidad mediada por el hierro, lo cual está determinado por la mortalidad de las larvas.

Con base en estos resultados se puede inferir la captación del hierro, por parte *C. neoformans* var. *neoformans* dada la gran biodisponibilidad de este elemento en el medio de cultivo, lo que posiblemente favoreció una mayor actividad celular y por ende el aumento de la patogenicidad en la cepa expuesta a 500 μ M de FeCl_3 .

Análisis en cepa H99

Para la cepa H99 sin FeCl₃, el porcentaje de supervivencia fue de un 3% hasta el día 8 y al finalizar el experimento se observó un 2% de supervivencia. Contrario a esto, en la cepa H99 con las diferentes concentraciones de FeCl₃ (5, 50 y 500 µM) se encontró a los 8 días un porcentaje de supervivencia del 12%, 3%, 7% y al final del experimento se observó un porcentaje de supervivencia de 12%, 3%, 5% respectivamente. Las larvas que sobrevivieron pasaron a pupa, por lo que se estableció el día 15 como el último día del experimento (Tabla 8).

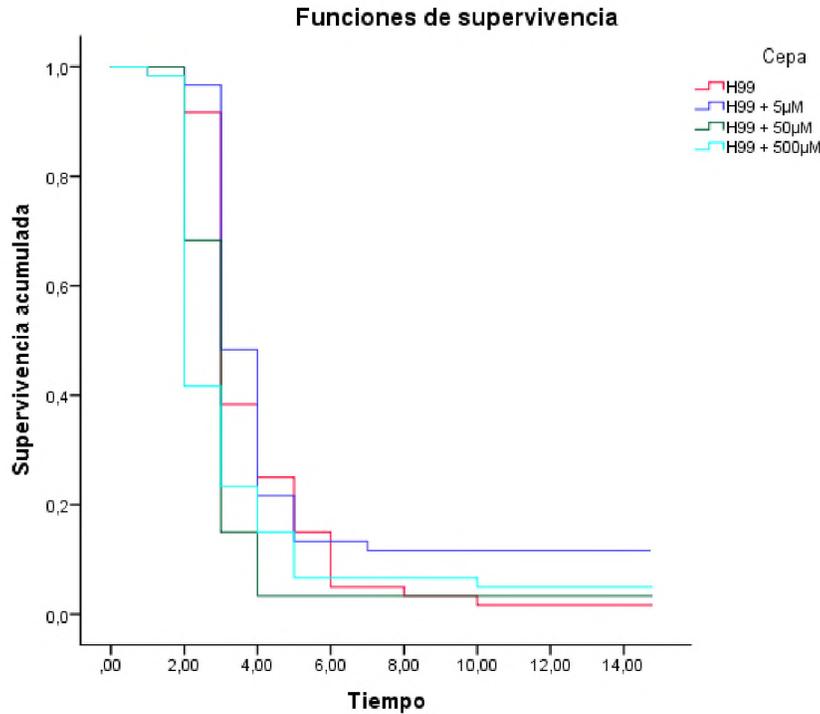
Tabla 8. Supervivencia *G. mellonella* inoculada con cepa H99 (preincubada con 0, 5, 50, 500 µM de FeCl₃)

Tiempo en días	ENSAYOS H99 SIN FeCl ₃			ENSAYOS H99 5 µM FeCl ₃			ENSAYOS H99 50 µM FeCl ₃			ENSAYOS H99 500 µM FeCl ₃		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
1	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	20
2	19	20	16	20	20	18	16	16	9	17	6	2
3	18	5	0	19	7	3	4	4	1	13	0	1
4	14	1	0	8	2	3	0	2	0	8	0	1
5	8	1	0	5	0	3	0	2	0	3	0	1
6	2	1	0	5	0	3	0	2	0	3	0	1
7	2	1	0	4	0	3	0	2	0	3	0	1
8	1	1	0	4	0	3	0	2	0	3	0	1
9	1	1	0	4	0	3	0	2	0	3	0	1
10	0	1	0	4	0	3	0	2	0	2	0	1
11	0	1	0	4	0	3	0	2	0	2	0	1
12	0	1	0	4	0	3	0	2	0	2	0	1
13	0	1	0	4	0	3	0	2	0	2	0	1
14	0	1	0	4	0	3	0	2	0	2	0	1
15	0	1	0	4	0	3	0	2	0	2	0	1

Al evaluar la curva de supervivencia de *G. mellonella* (cepa H99 sin y con concentraciones de FeCl₃ 5, 50, 500 μM) mediante la prueba de Breslow (Wilcoxon) y log-rank no se encontró diferencias significativas entre la cepa sin y con las diferentes concentraciones de FeCl₃ (Figura 18). Sin embargo la cepa H99 con 500 μM presentó un pico de mortalidad en el día 2, reduciendo la supervivencia de las larvas a cerca de un 40%, esto contrario a las demás condiciones (0, 5 y 50 μM) que presentaron el pico en el día 3.

Estos resultados pueden sugerir la modulación de la patogenicidad de H99 con 500 μM, basados en la reducción del tiempo en el pico de mortalidad, que para esta cepa sin hierro en ensayo previo del proyecto al que pertenece este estudio, se estimó al 3 día con la concentración inoculada (1.5×10^6 cel/ Larva).

Figura 18. Curva de supervivencia *G. mellonella* inoculada con cepa H99 (preincubada con 0, 5, 50, 500 μM de FeCl_3)



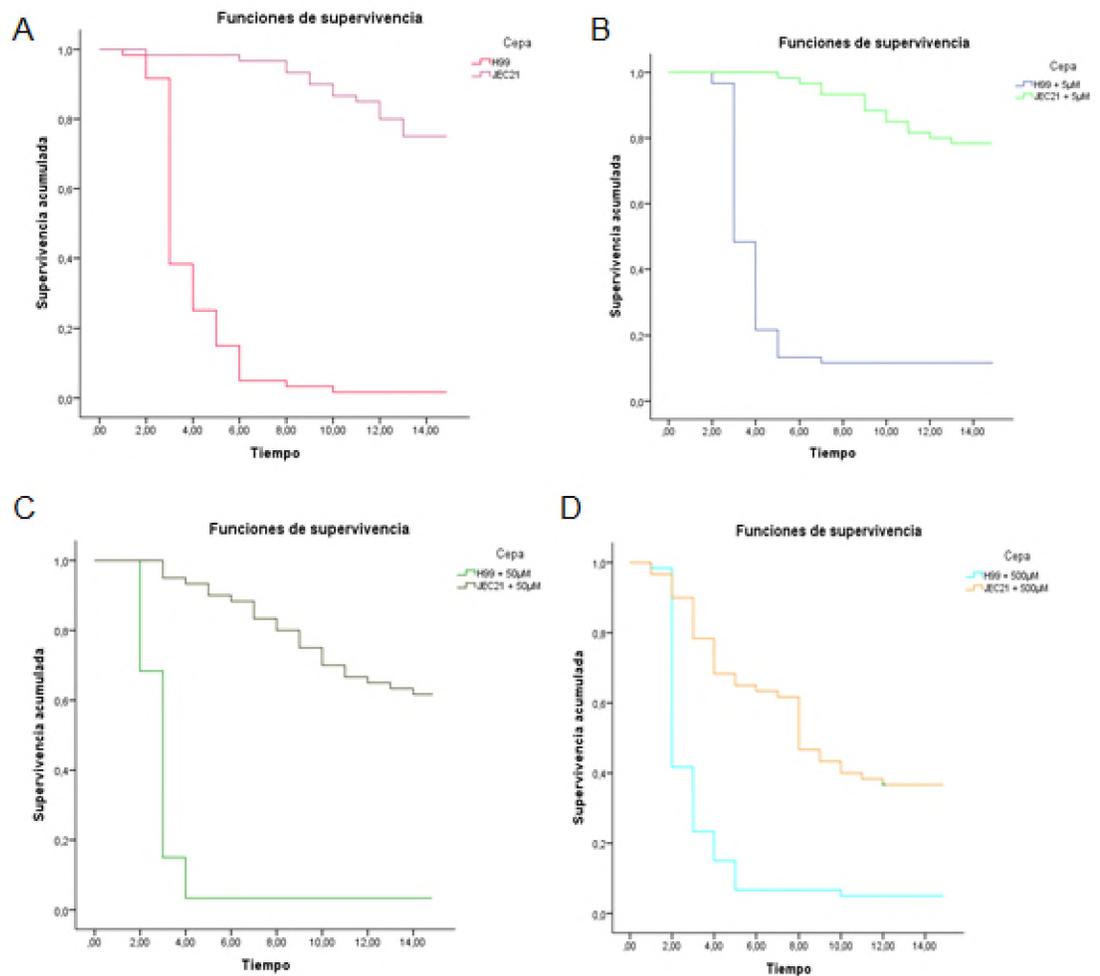
Adicionalmente se evaluó de manera individual las cepas sin y con exposición a las distintas concentraciones de FeCl_3 5, 50, 500 μM .

Análisis de las cepas H99 y JEC21

Se observa una diferencia significativa al comparar las cepas (H99 y JEC21) en cada condición (sin y con diferentes concentraciones de FeCl_3 5, 50, 500 μM). Evidentemente la cepa H99 es más patógena que la JEC21, lo cual está reportado en la literatura [86], aunque la cepa JEC21 aumentó su patogenicidad como resultado de la biodisponibilidad del hierro otorgada por la concentración de 500 μM , no llega a ser tan patógena como la H99, en la cual se observó un porcentaje de supervivencia de *G. mellonella* cercano al cero y picos de mortalidad en el comienzo de la infección (día 2 y 3) (Figura 19), lo cual puede estar relacionado con la

incapacidad de *G. mellonella* de mediar una respuesta inmune efectiva frente a la infección por *C. neoformans* var. *grubii*.

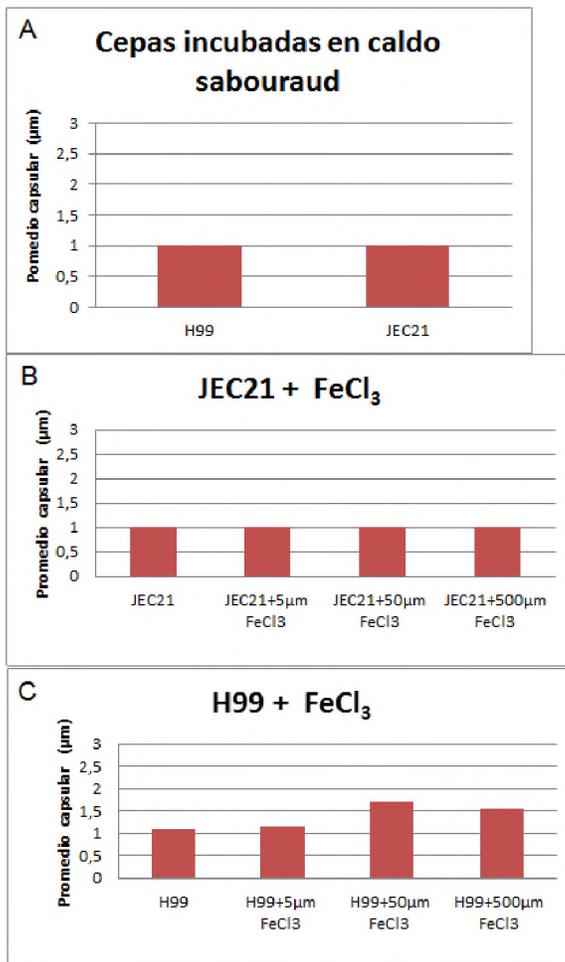
Figura 19. Curva de supervivencia *G. mellonella*. A) Cepa H99 y JEC21 sin FeCl₃. B) Cepa H99 y JEC21 con 5µM FeCl₃. C) Cepa H99 y JEC21 con 50µM FeCl₃. D) Cepa H99 y JEC21 con 500µM FeCl₃



Objetivo 5: “Evaluar la influencia del hierro en el tamaño capsular de *C. neoformans*”.

Para determinar las diferencia en el tamaño capsular de *Cryptococcus* se realizó la medición de las cepas H99 y JEC21 sin ninguna preincubación o crecimiento en medio mínimo, con el fin de tomar esta medida como control frente a las mediciones de cápsula en las diferentes condiciones evaluadas (Figura 20a). El tamaño capsular para las cepas sin ningún tratamiento fue de 1 μm , que al compararlo con el tamaño de la cepa JEC21 después de someterla a las diferentes concentraciones de FeCl_3 no mostro cambios en su tamaño capsular. Por el contrario, en la cepa H99 se observó un aumento en el tamaño capsular en las concentraciones de 50, 500 μM de FeCl_3 (Figura 20 b, c).

Figura 20. Tamaño capsular de *C. neoformans*. A) Cepas H99 y JEC21 (*C. neoformans* var. *grubii* y var. *neoformans* respectivamente) incubadas sin FeCl_3 . B) Cepa JEC21 incubada con FeCl_3 (5, 50, 500 μM). C) Cepa H99 incubada con FeCl_3 (5, 50, 500 μM)



Al realizar el análisis del tamaño capsular en la cepa H99 post-infección se observó que sin hierro hubo un aumento en este parámetro respecto al medido pre-infección, lo cual ha sido descrito en estudios previos por Zaragoza y colaboradores 2004, donde se relaciona dicho incremento con los factores a los que se expone el microorganismo dentro del hospedero, como lo son los niveles bajos de hierro y altos niveles de CO₂ que inducen el aumento del tamaño capsular [24, 31, 53].

Al evaluar H99 con las distintas concentraciones de hierro, se evidenció aumento del tamaño capsular post-infección respecto al medido pre-infección en la cepa con 5 µM lo cual puede estar relacionado al igual que la cepa sin hierro a la exposición dentro del hospedero debido a que el aporte de hierro in-vitro no es significativo,

esto no se ve reflejado en las cepas con 50 y 500 μM , las cuales mantuvieron un valor de tamaño capsular post- infección cercano al medido pre-infección, lo cual se puede asociar al mayor aporte de hierro realizado in- vitro que favoreció la adaptación de esta cepa en el hospedero.

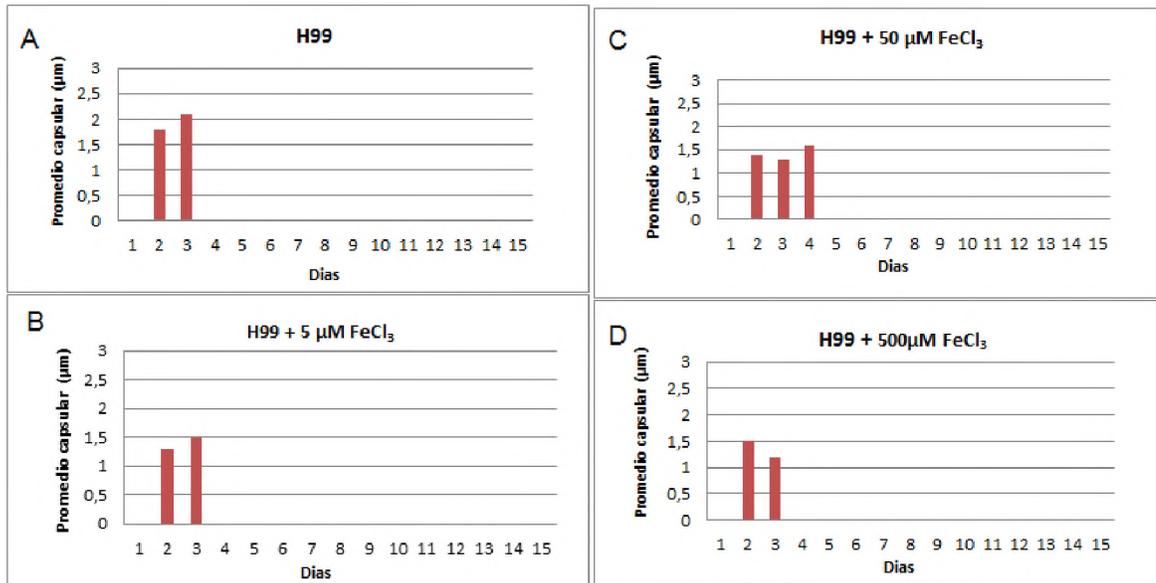
Posiblemente la alta virulencia de *C. neoformans var. grubii* esté relacionada con la expresión de una cápsula de gran tamaño que le permita evadir la respuesta inmune del hospedero, en este caso los hemocitos de *G. mellonella*, generando así mayor patogenicidad al producir mortalidad en los primeros días de infección (Figura 21).

Estos resultados al ser relacionados con la supervivencia de *G. mellonella*, evaluada en el objetivo 4 , corroboran lo mencionado anteriormente ya que la cepa H99 sin hierro en el día 3 presento un pico de muerte según las curvas de supervivencia, día en el que se determinó un promedio capsular de 2.1 μm .

La misma situación se presentó con la cepa H99 con 5 μM y 500 μM de hierro, las cuales mostraron un pico de mortalidad el día 3 y 2 respectivamente, donde se determinó un promedio de tamaño capsular de 1,5 μm para ambas.

Por último la cepa H99 con 50 μM de hierro, que mostro un pico de mortalidad el día 3, pero contrario a las demás condiciones evaluadas, este día presento el promedio capsular más bajo, que fue de 1,3 μM , siendo mayor en el día 4 (1,6 μM) pero con un bajo pico de mortalidad, por lo cual se tendría que tener en cuenta otros factores de virulencia diferentes al evaluado, que puedan estar interviniendo en la patogenicidad y por ende en la muerte de las larvas.

Figura 21. Tamaño capsular de *C. neoformans* extraído de macerado de larvas muertas post-infección. A) Cepa H99 (sin contacto con FeCl_3). B) Cepa H99 ($5 \mu\text{M}$ FeCl_3). C) Cepa H99 ($50 \mu\text{M}$ FeCl_3). D) Cepa H99 ($500 \mu\text{M}$ FeCl_3)

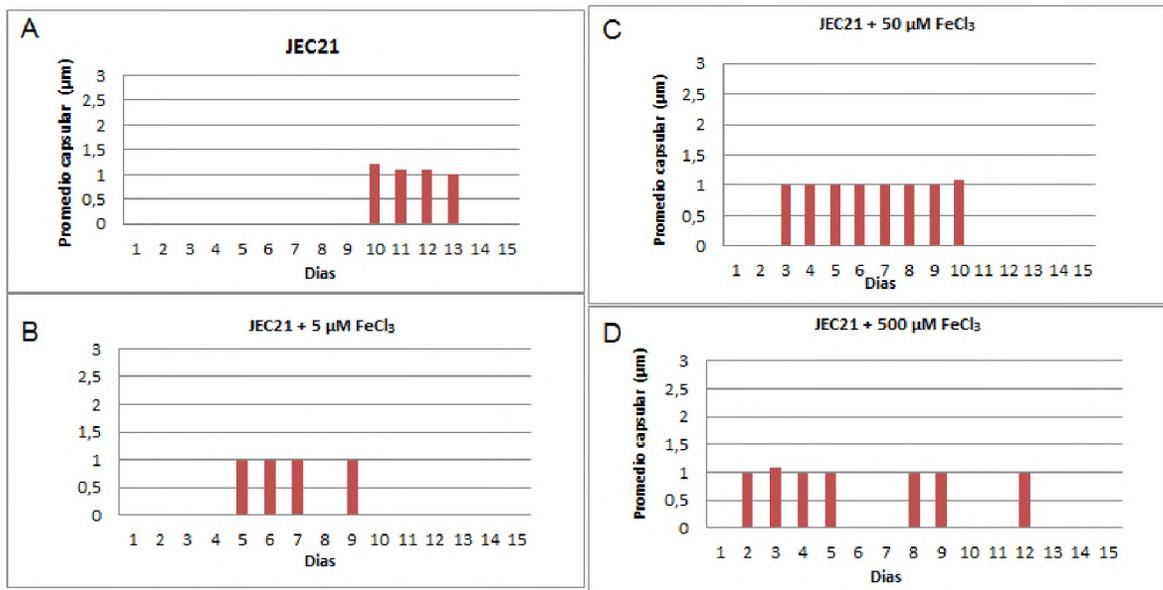


En la cepa JEC21 no se observaron cambios en el tamaño capsular pre y post infección, ni con las diferentes concentraciones de FeCl_3 , esto sugiere la ausencia de modulación de este elemento en el tamaño capsular (Figura 21), sin embargo al relacionar los datos obtenidos en este objetivo con la supervivencia de *G. mellonella* evaluada en el objetivo 4, en el cual hubo una marcada reducción de la sobrevivencia del modelo de infección con la concentración de $500 \mu\text{M}$, se puede inferir la modulación del hierro en otros factores de virulencia diferentes al evaluado en este estudio, lo cual conlleva al aumento de mortalidad larval con esta concentración.

La ausencia de cambios en el tamaño capsular, podría facilitar la fagocitosis de las levaduras por parte de los hemocitos de *G. mellonella* retrasando así el inicio de mortalidad y por tanto aumentando la sobrevivencia de las larvas.

Para evaluar la reducción de la supervivencia de las larvas con la concentración de 500 μM en *C. neoformans* var. *neoformans* (JEC21) es necesario contemplar otros factores de virulencia diferentes a la cápsula que es el objetivo de este ensayo.

Figura 22. Tamaño capsular de *C. neoformans* extraído de macerado de larvas muertas post-infección. A) Cepa JEC21 (sin contacto con FeCl_3). B) Cepa JEC21 (5 μM FeCl_3). C) Cepa JEC21 (50 μM FeCl_3). D) Cepa JEC21 (500 μM FeCl_3).



CONCLUSIONES

- La concentración basal del hierro a partir de muestras de hemolinfa no fue posible determinarla con el método Iron-FZ.
- El medio mínimo permitió el crecimiento normal de las dos cepas empleadas en este estudio y la determinación de la concentración de hierro máxima a utilizar.
- La variabilidad en la cuantificación de hierro a partir del medio mínimo no permitió establecer la cantidad de hierro consumido por el microorganismo.
- Con la cepa H99 considerada de alta virulencia, se observó un bajo porcentaje de supervivencia en *G. mellonella*, lo que confirma su alta patogenicidad. Además al pre incubar esta cepa con 500uM de hierro el pico de mortalidad disminuyo del día 3 (sin hierro) al día 2.
- En la cepa H99 sin suplemento de hierro, se encontró relación entre los picos de muerte en la curva de supervivencia de *G. mellonella* y el aumento del tamaño capsular medido en dichos días, lo cual asocia la expresión de este factor de virulencia en la evasión del sistema inmune del hospedero.
- Para la cepa JEC21 no se observó aumento del tamaño capsular bajo ninguna condición evaluada.
- En la cepa JEC21 se logró modular la patogenicidad con la mayor concentración de FeCl₃ empleada en el estudio (500 µM), dando como resultado un porcentaje de sobrevivencia en *G. mellonella* del 35%.
- Teniendo en cuenta que *C. neoformans* es el principal agente etiológico de criptococosis en personas inmunocomprometidas (95,6% *C. neoformans* var. *grubii*, y 1% a *C. neoformans* var. *neoformans*) es importante que basados en los resultados de este estudio, en el cual se presentó un marcado aumento de virulencia en la cepa JEC21 con 500 µM y para H99 con 500 µM en menor proporción, se implementen concentraciones adecuadas de suplementos de hierro, con el fin de prevenir en gran parte estas infecciones oportunistas.

RECOMENDACIONES

- Es importante contemplar nuevos métodos en la medición de hierro en la hemolinfa de *G. mellonella* que brinden resultados óptimos, dados por la reducción significativa las posibles interferencias.
 - Espectrometría de absorción atómica.
- Dada las interferencias que pueden presentar los lípidos en la cuantificación del hierro se recomienda utilizar acetato de etilo para la remoción de lípidos de la hemolinfa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(7):a019760.
2. Heitman J, Microbiology ASf. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*: ASM Press; 2011.
3. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):507-44, v-vi.
4. Álvarez F, Fernández-Ruiz M, Aguado JM. Iron and invasive fungal infection. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(4):217-25.
5. Kosalaraksa P, Bunupuradah T, Vonthanak S, Wiangnon S, Hansudewechakul R, Vibol U, et al. Prevalence of anemia and underlying iron status in naive antiretroviral therapy HIV-infected children with moderate immune suppression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(12):1679-86.
6. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*. 2011;434(3):365-81.
7. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol*. 2008;88(1):7-15.
8. Schaible UE, Kaufmann SH. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(12):946-53.
9. Jung WH, Sham A, Lian T, Singh A, Kosman DJ, Kronstad JW. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e45.
10. Jung WH, Hu G, Kuo W, Kronstad JW. Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(10):1511-20.
11. Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón A, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomedica*. 2012;32(3):386-98.
12. y MdS, Protección Social RdC. Boletín epidemiológico, situación del vih/sida Colombia 1983 a 2012. . 2013.
13. Jung WH, Sham A, White R, Kronstad JW. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol*. 2006;4(12):e410.
14. Lin X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):401-16.
15. Barchiesi F, Cogliati M, Esposto MC, Spreghini E, Schimizzi AM, Wickes BL, et al. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *J Infect*. 2005;51(1):10-6.
16. Voelz K, May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell*. 2010;9(6):835-46.
17. Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol*. 1997;14(2):42-3.

18. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):515-48.
19. Castañeda E, Lizarazo J. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. Infectio. 2012;16, Supplement 3:123-5.
20. Tello M, Gutiérrez E, Béjar V, Galarza C, Ramos W, Ortega-Loayza AG. Criptococosis. Revista Médica de Risaralda. 2013;19:147-53.
21. Murphy K, Janeway CA, Mowat A. Janeway's immunobiology. London: Garland Science; 2012.
22. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003;163(9):1009-21.
23. Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. Infect Immun. 2005;73(2):820-7.
24. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. Clin Microbiol Rev. 2012;25(3):387-408.
25. Doering TL. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. Annu Rev Microbiol. 2009;63:223-47.
26. Guimarães AJ, Frases S, Cordero RJ, Nimrichter L, Casadevall A, Nosanchuk JD. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. Cell Microbiol. 2010;12(6):740-53.
27. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol. 2009;68:133-216.
28. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(7):517-29.
29. Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO(2). Infect Immun. 2003;71(11):6155-64.
30. Maxson ME, Cook E, Casadevall A, Zaragoza O. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. Fungal Genet Biol. 2007;44(3):180-6.
31. Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. Biol Proced Online. 2004;6:10-5.
32. Maxson ME, Dadachova E, Casadevall A, Zaragoza O. Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. Eukaryot Cell. 2007;6(1):95-109.
33. García-Rodas R, Trevijano-Contador N, Román E, Janbon G, Moyrand F, Pla J, et al. Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. Front Microbiol. 2015;6:798.
34. Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 2004;5(1):1-10.
35. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. FEMS Yeast Res. 2006;6(4):463-8.

36. Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, et al. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37508-14.
37. Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1761-71.
38. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*. 2000;68(2):443-8.
39. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(10):940-59.
40. - Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación JF - *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005;- 301-314.
41. Weinberg ED. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science*. 1974;184(4140):952-6.
42. Kronstad J, Saikia S, Nielson ED, Kretschmer M, Jung W, Hu G, et al. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot Cell*. 2012;11(2):109-18.
43. Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:611-47.
44. Skaar EP, Humayun M, Bae T, DeBord KL, Schneewind O. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science*. 2004;305(5690):1626-8.
45. Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, et al. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*. 1994;76(2):403-10.
46. Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*. 1996;271(5255):1552-7.
47. Ramanan N, Wang Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*. 2000;288(5468):1062-4.
48. Hissen AH, Wan AN, Warwas ML, Pinto LJ, Moore MM. The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene sidA, encoding L-ornithine N5-oxygenase, is required for virulence. *Infect Immun*. 2005;73(9):5493-503.
49. Luo G, Samaranyake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2971-4.
50. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1994;62(11):5154-6.
51. Nyhus KJ, Wilborn AT, Jacobson ES. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1997;65(2):434-8.
52. Jung WH, Do E. Iron acquisition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(6):686-91.
53. García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One*. 2011;6(9):e24485.

54. Rodríguez Yunta E. Desafíos éticos de la manipulación genética y la investigación con animales. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2012;29:535-40.
55. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(9):1378-83.
56. Sabiiti W, May RC, Pursall ER. Experimental models of cryptococcosis. *Int J Microbiol*. 2012;2012:626745.
57. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005;73(7):3842-50.
58. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*. 2000;182(13):3843-5.
59. Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun*. 2003;71(5):2404-13.
60. Morton DB, Barnett RI, Chadwick JS. Structural alterations to *Proteus mirabilis* as a result of exposure to haemolymph from the larvae of *Galleria mellonella*. *Microbios*. 1984;39(157-158):177-85.
61. Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, Jakubowicz T. The involvement of protein kinase A in the immune response of *Galleria mellonella* larvae to bacteria. *Acta Biochim Pol*. 2007;54(1):167-74.
62. Hu K, Li J, Li B, Webster JM, Chen G. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). *Bioorg Med Chem*. 2006;14(13):4677-81.
63. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010;1(6):475-82.
64. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(2):153-7.
65. Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*. 2004;158(1):73-9.
66. St Leger RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(1):320-4.
67. Harding CR, Schroeder GN, Collins JW, Frankel G. Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. *J Vis Exp*. 2013(81):e50964.
68. Cadieux B, Lian T, Hu G, Wang J, Biondo C, Teti G, et al. The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis*. 2013;207(8):1339-47.
69. Choi JN, Kim J, Jung WH, Lee CH. Influence of iron regulation on the metabolome of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*. 2012;7(7):e41654.

70. Franzot SP, Mukherjee J, Cherniak R, Chen LC, Hamdan JS, Casadevall A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect Immun*. 1998;66(1):89-97.
71. Malik F, Malik MA. Variation in Metal Ion Concentrations in the Haemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori* During Development. *Academic Journal of Entomology*. 2009;2(1):5.
72. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Cowart RE, Sprigg HA, Tingler MJ, Jacobson ES. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis*. 1993;167(1):186-90.
73. Eigenheer RA, Lee YJ, Blumwald E, Phinney BS, Gelli A. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*. 2007 2007-06-01 00:00:00;7(4):499-510.
74. Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE*. 2014;9(8). PubMed PMID: 25133687.
75. Huérfano S, Cepero MC, Castañeda E. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*. 2003. 2003 2003-09-01;23(3):-287. Epub 2003-09-01.
76. Escandón P, Ngamskulrungrroj P, Meyer W, Castañeda E. In vitro mating of Colombian isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Biomédica*. 2007;27:308-14.