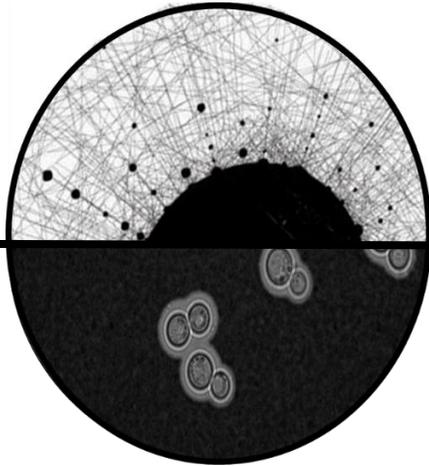




PONTIFICIA UNIVERSIDAD
JAVERIANA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID



**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, PROTEÓMICA Y DE LA
VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus
neoformans* var. *grubii*: EFECTO DEL HIERRO Y EL COBRE.**

NORIDA NATALLY VÉLEZ CUELLAR M.sc.

Directoras

Dra. CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO, PhD.
Dirección Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá Colombia

Dra. LUCIA MONTEOLIVA DÍAZ, PhD.
Dirección Universidad Complutense de Madrid España

Bogotá D.C (Colombia), Madrid (España)
2021

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, PROTEÓMICA Y DE LA VIRULENCIA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: EFECTO DEL
HIERRO Y EL COBRE.

GENOMIC, PROTEOMIC AND VIRULENCE CHARACTERIZATION OF CLINICAL
ISOLATIONS OF *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: EFFECT OF IRON AND COPPER.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

presentada por

NORIDA NATALLY VÉLEZ CUELLAR M.sc.

Directoras

Dra. CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO,
PhD.

Dra. LUCIA MONTEOLIVA DÍAZ,
PhD.

Dirección Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá Colombia

Dirección Universidad Complutense de
Madrid España

Bogotá D.C (Colombia), Madrid (España)
Junio de 2021

NOTA

“Esta tesis doctoral se ha realizado teniendo en cuenta las bases establecidas en el convenio de cooperación para la cotutela de tesis doctorales conducente al doble título de doctor firmado entre las dos universidades”. Por la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia), título de Doctor en Ciencias Biológicas y Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España).

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, PROTEÓMICA Y DE LA VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: EFECTO DEL HIERRO Y EL COBRE.



NORIDA NATALLY VÉLEZ CUELLAR M.sc.

Firma manuscrita de Claudia Marcela Parra Giraldo, PhD. La firma es fluida y se extiende por debajo de una línea horizontal.

Claudia Marcela Parra Giraldo, PhD.
Directora

Firmado por MONTEOLIVA
DIAZ LUCIA - DNI
32788575M el día
31/08/2021 con un
certificado emitido por
AC Sector Público

Lucia Monteoliva Díaz, PhD.
Directora

Bogotá D.C (Colombia), Madrid (España)
Junio de 2021

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, PROTEÓMICA Y DE LA VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: EFECTO DEL HIERRO Y EL COBRE.



NORIDA NATALLY VÉLEZ CUELLAR M.sc.

Carlos Javier Alméida Díaz, PhD.
Jurado

PLA ALONSO
JESUS
ALBERTO - DNI
50301295L

Firmado digitalmente por PLA ALONSO JESUS ALBERTO - DNI 50301295L
DN: C=ES, O=UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, OU=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, SERIALNUMBER=IDCES-50301295L, SN=PLA ALONSO, G=JESUS ALBERTO, CN=PLA ALONSO JESUS ALBERTO - DNI 50301295L
Razón: Soy el autor de este documento
Ubicación:
Fecha: 2022.07.21 07:48:54+0200'
Foxit PDF Reader Versión: 12.0.0

Jesús Pla Alonso, PhD.
Jurado

Gustavo Giusiano, PhD.
Jurado

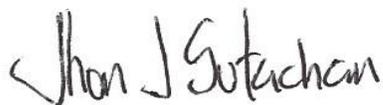
Ángel Augusto González Marín, PhD.
Jurado

Carolina Firacative, PhD.
Jurado

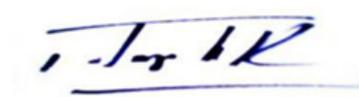
Bogotá D.C (Colombia), Madrid (España)
Junio de 2021

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, PROTEÓMICA Y DE LA VIRULENCIA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: EFECTO DEL
HIERRO Y EL COBRE.

NORIDA NATALLY VÉLEZ CUELLAR M.sc.



Jhon Jairo Sutachan Rubio, PhD.
Director de Posgrado
Facultad de Ciencias



Alba Alicia Trespalcios Rangel, PhD.
Decana
Facultad de Ciencias

Bogotá D.C., Colombia
Julio de 2022



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Norida Natally Vélez Cuellar,
estudiante en el Programa de Doctorado Microbiología y Parasitología,
de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

*Caracterización genómica, proteómica y de la virulencia de aislamientos clínicos de
Cryptococcus neoformans var. grubii: efecto del hierro y el cobre.*

y dirigida por: Lucia Monteoliva Díaz y Claudia Marcela Parra Giraldo

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 29 de Junio de 2021

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

DEDICATORIA

“Nuestra sociedad, en la que reina un urgente deseo de riquezas y lujos, no entiende el valor de la Ciencia. No se da cuenta de que la Ciencia es una de las partes más Preciosas de su Patrimonio Moral. Ni ha asumido de modo suficiente, el hecho de que la Ciencia está en la base de todo el progreso que aligera la carga de la vida y disminuye su sufrimiento”.

Marie Curie

A mi amada madre Nancy Cuellar,

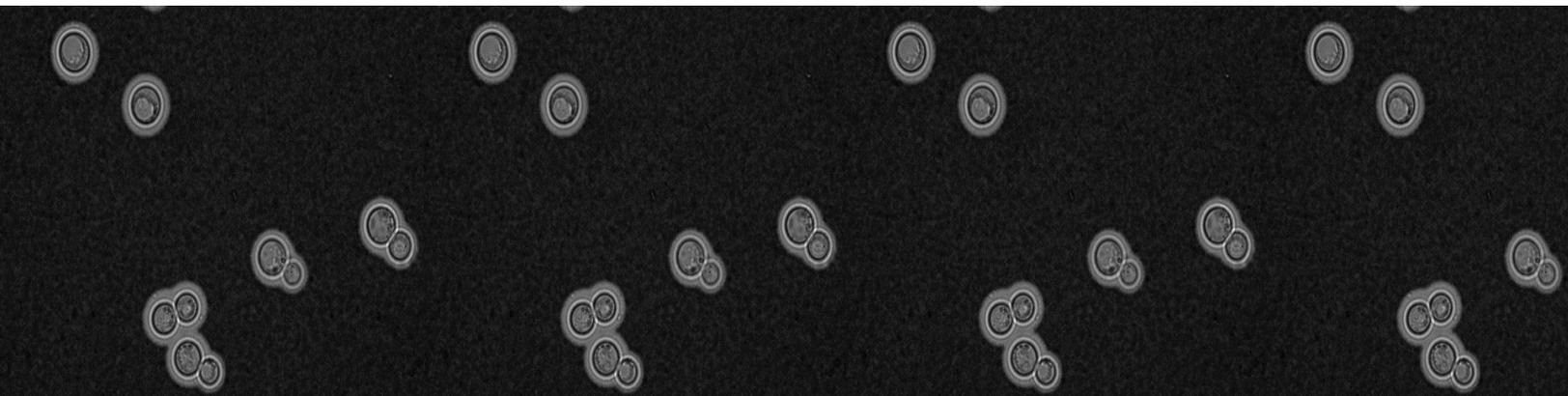
A quien admiro infinitamente.

A Javier Sánchez,

quien, en esta dura etapa, se matriculo conmigo y me apoyo siempre.

A mi abuelo Jesús María Cuellar Q.E.P.D

por su ejemplo de coraje y carácter.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda física, intelectual, moral y hasta a veces espiritual que me brindaron un gran grupo de personas de forma totalmente desinteresada.

Mi formación científica fue un camino tan largo y maravilloso, y debo iniciar agradeciéndole a la Dra. Patricia Escandón quien me encamino en el estudio de la Criptococosis y me alentó a continuar mis estudios a nivel Doctoral. A la Dra. Elizabeth Castañeda, por ser un ejemplo a seguir en el mundo de la ciencia y sobre todo en el estudio de la Criptococosis.

A la Dra. Claudia Marcela Parra, quien confió en mí y me brindó la oportunidad de desarrollar mi carrera científica, siempre bajo su tutela, guiada por su amplia experiencia y conocimientos. Gracias por escucharme, por creer en mí, permitirme tomar decisiones. Me llevo muchas enseñanzas académicas y lecciones de vida, gracias por su amistad incondicional y por apoyarme en situaciones difíciles.

A la Dra. Lucia Monteoliva, por su gran guía por apoyarme en gran parte en el análisis de proteínas, mil gracias por el ejemplo, el cariño sincero y el apoyo que me brindo desde el primer día, esto ha sido fundamental en mi crecimiento no solo profesional sino también personal.

Al Dr. Zaragoza por darme la oportunidad de realizar gran parte de mis experimentos en el Instituto Carlos III en Madrid, en el tiempo que compartí fue muy gratificante tanto personal como académico, conocí a una gran persona muy sabia y alegre. Doctor muchas gracias por todos por sus valiosos consejos, por su disposición para escucharme.

A mis amigos y confidentes Andrés Ceballos, María José Jiménez, Katherine Aguirre y Daniela Amado, por tantos momentos de diversión, bailes, salidas, reuniones, cenas, cafés en fin... Y sobre todo por ayudarme en situaciones estresantes, por estar en los momentos más difíciles de este proceso, espero la vida nos tenga juntos hasta viejos y verlos triunfar en este mundo tan complejo y maravilloso como lo es la investigación, seguro serán en el futuro unos grandes científicos los quiero montones colegas, amigos, confidentes, alcahuetas.

A las chicas del Carlos III (La rutina primero), Sofí, Carol, Violeta, Marta, Narda, Paula, y Ana gracias por hacerme sentir en casa a miles de kilómetros, gracias por las tardes de risas y por su ayuda incondicional.

A mi gran Universidad Pontificia Universidad Javeriana y a todos los profesores que estuvieron involucrados con mi formación académica gracias a ustedes aprendí las herramientas necesarias para poder afrontar gran parte de mi proyecto Doctoral.

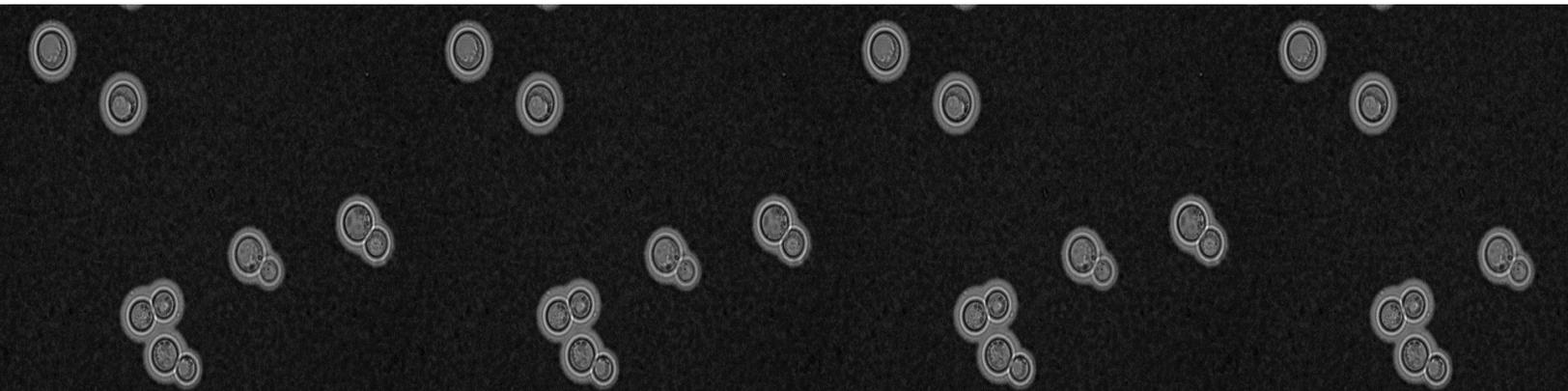
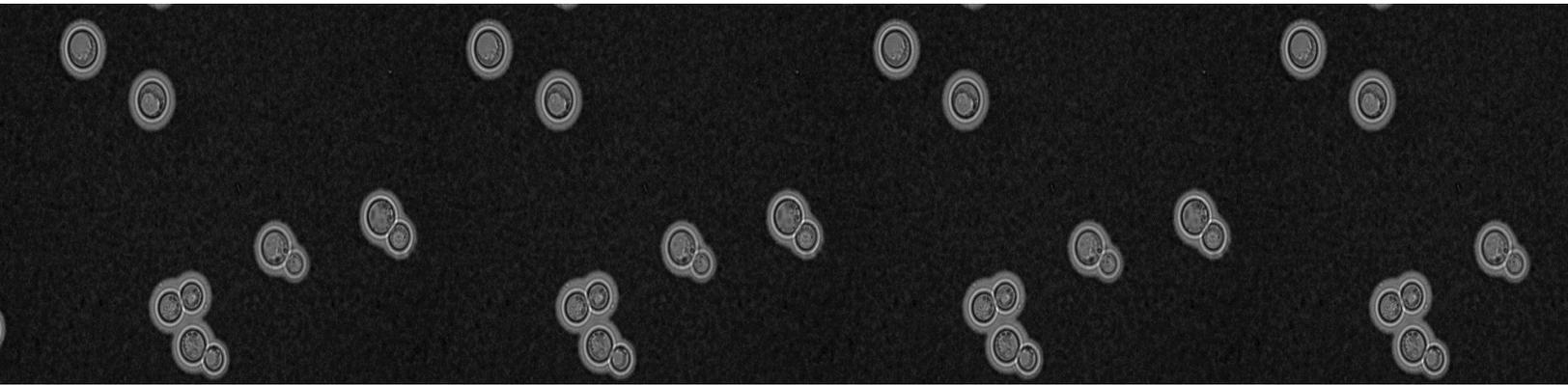


TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	1
Resumen	5
Abstract	11
Introducción.....	17
1. <i>Cryptococcus</i> y criptococosis: generalidades.....	18
1.1 Historia.	18
1.2 Clasificación taxonómica y tipificación molecular del complejo de especies <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	
1.3 Diferenciación fenotípica, bioquímica y ecológica del complejo de especies.	22
2. La criptococosis.	24
2.1 Manifestaciones clínicas.	24
2.2 Epidemiología de la criptococosis.	27
2.3 Tratamiento y susceptibilidad antifúngica.	28
3. Interacción hospedero-patógeno.	30
3.1 Factores de virulencia del <i>Cryptococcus</i>	30
3.1.1 Cápsula.	31
3.1.2 Producción de melanina.	32
3.1.3 Crecimiento a 37°C.....	33
3.1.4 Enzimas extracelulares.	33
3.1.5 Switching fenotípico.	34
3.1.6 Pareja sexual.	34
3.1.7 Cambios morfológicos en el tamaño total de la célula.	35
3.2 Respuesta inmune frente a la Criptococosis.	35
3.3 <i>Cryptococcus</i> como patógeno intracelular facultativo y diseminación al sistema nervioso central.	36
4. Papel de los metales hierro y cobre en la criptococosis.	37
4.1 Papel del hierro y del cobre en el proceso patogénico de <i>C. neoformans</i>	37
4.1.1 Papel del hierro, en el proceso patogénico de <i>C. neoformans</i>	38
4.1.2 Papel del cobre en el proceso patogénico de <i>C. neoformans</i>	40
4.2 Papel del hierro en la respuesta inmune frente a la Criptococosis.....	42
4.3 Papel del cobre en la respuesta inmune frente a la Criptococosis.....	43
5. Proteómica una herramienta para el estudio de hongos patógenos.	43
6. <i>G. mellonella</i> , modelo invertebrado para evaluar la capacidad patogénica de cepas de <i>C. neoformans</i>	45
Objetivos.....	47
1. Objetivo general	48
2. Objetivos específicos	48
Metodología.....	49

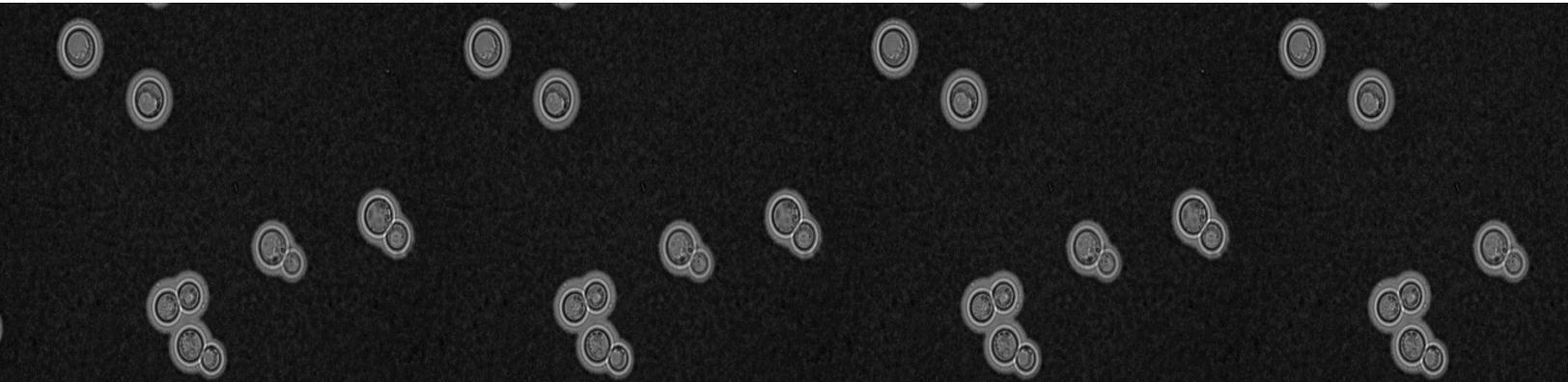
1. Material biológico: características biológicas y epidemiológicas.....	50
2. Microorganismos de referencia y medios de cultivo.....	50
3. Cinética de crecimiento.....	51
4. Patogenicidad de <i>C. neoformans</i> en <i>G. mellonella</i>	51
5. Efecto del cambio del tamaño capsular pre y post inoculación en <i>G. mellonella</i>	52
6. Inducción del tamaño de la cápsula.....	53
7. Inducción de células de Titán.....	53
8. Producción de melanina.....	54
9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	54
10. Extracción de proteínas citoplasmática.....	55
11. Preparación de proteínas para espectrometría de masas.....	56
12. Análisis de proteínas LC-MSMS (Q-exactive HF).....	56
13. Cuantificación relativa de las proteínas.....	57
14. Secuenciación del genoma y procesamiento de datos.....	59
15. Identificación y análisis de variantes genéticas.....	59
16. Tipificación de secuencias de múltilocus (MLST).....	61
17. Análisis estadísticos.....	62
Resultados	63
1. Caracterización de 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>: tipificación, estudio de la patogenicidad, principales factores de virulencia y polimorfismos de genes relacionados.	65
1.1. Identificación de las secuencias tipo de los aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	65
1.2 Determinación de la patogenicidad en <i>G. mellonella</i>	68
1.3 Determinación de la variación del tamaño capsular utilizando el modelo invertebrado <i>G. mellonella</i>	71
1.4 Inducción del crecimiento capsular en MOPS.....	73
1.5 Pigmentación de melanina.....	75
1.6 Determinación de la susceptibilidad a anfotericina B, fluconazol y voriconazol.....	77
1.7 Análisis de componentes principales (PCA).....	78
1.8 Determinación de variantes genéticas asociadas a genes involucrados en cápsula y producción de melanina.....	79
2. Estudio del efecto del hierro y el cobre en determinantes de virulencia y en la patogenicidad de dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>.....	84
2.1. Evaluación de curva de crecimiento de la cepa H99 en diferentes condiciones de precultivo con hierro y cobre.....	86
2.2. Evaluación de la capacidad patogénica de la cepa H99 en diferentes condiciones de precultivo con hierro y cobre.....	87
2.3 Efecto del precultivo con hierro y cobre en la capacidad patogénica en H0058-I 2807 y H0058- I-3102, aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	88

2.4 Efecto de hierro, cobre y su combinación en la modulación del tamaño capsular en H0058- I- 2807 y H0058-I-3102.....	90
2.5 Efecto en la producción de células tipo titán en H0058-I 2807 y H0058-I-3102.	94
2.6 Efecto en la producción de melanina en H0058-I 2807 y H0058-I-3102.....	95
3. Estudio proteómico del efecto del precultivo de la combinación de 50µM de hierro y 500 µM de cobre en H0058-I 2807 y H0058-I-3102, aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>.	97
3.1 Análisis global del efecto del precultivo en la combinación de hierro y cobre.	97
3.2 Análisis individual de los cambios proteómicos inducidos por hierro y cobre.....	100
3.3 Perfiles de proteínas relacionadas con la biosíntesis de cápsula, melanina y otros factores de virulencia en respuesta al estímulo de la combinación de hierro y cobre.....	105
4. Efecto de la combinación de 50+500 µM de hierro y cobre respectivamente en la patogenicidad de ocho aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> en el modelo <i>G. mellonella</i>.....	109
5. Determinación de variantes genéticas asociadas a genes involucrados en hierro y cobre.....	111
5.1 Análisis de las variantes no sinónimas de los aislamientos clínicos H0058-I 2807 y H0058- I-3102.	111
5.2. Análisis de los cambios de codificación no sinónimos de las variantes SNPs en 10 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	115
Discusión.....	118
1. Diversidad genotípica en un grupo de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> mediante tipificación por MLST.	119
2. La patogenicidad es independiente a la diversidad genotípica en un grupo de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	120
3. Clasificación de aislamientos patógenos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> a partir de los principales factores de virulencia: cápsula y melanina.	121
4. Identificación de variantes no sinónimas asociadas a genes de cápsula y de melanina que influyen en la patogenicidad.	122
5. Efecto del cultivo con hierro y cobre en la patogenicidad y en los principales factores de virulencia en aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	126
6. Efecto del cultivo con hierro y cobre en el proteoma de dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	128
Conclusiones.....	133
Referencias	136
Anexos.....	156



ÍNDICE DE TABLAS

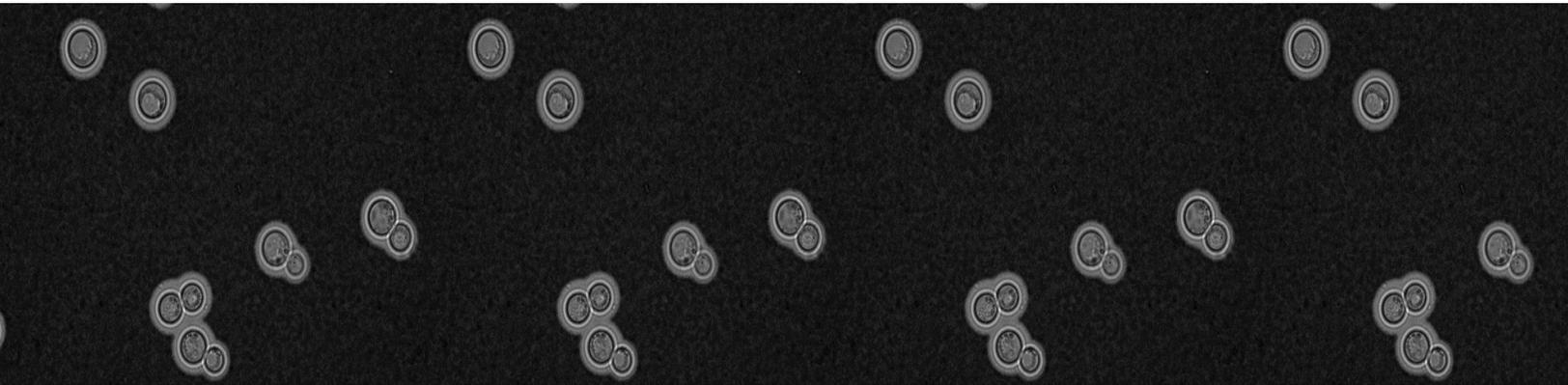
Tabla 1. Características genéticas del complejo de especies <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	21
Tabla 2. Perfiles alélicos MLST para 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> . En gris se observa el aislamiento tipo molecular VNII.....	66
Tabla 3. Clasificación de la patogenicidad de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> , según resultados obtenidos en el modelo invertebrado <i>G. mellonella</i> y cepas de referencia con alta (H99) y baja (JEC21) patogenicidad.	69
Tabla 4. Descripción de 39 genes relacionados a variantes sin sentido. En la tabla se describe los genes relacionados con los principales factores de virulencia en <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> , identificados a través del análisis de componentes principales y la prueba de asociación. Además, de los SNPs no sinónimos y los que están relacionados con codones de parada.....	83
Tabla 5. Características fenotípicas de dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> ..	84
Tabla 6. Efecto en la patogenicidad de ocho aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> en precultivo de 50 µM de hierro, 500 µM de cobre y en combinación en <i>G. mellonella</i>	109
Tabla 7. Descripción de variantes identificadas en dos aislamientos clínicos.....	112
Tabla 8. Proteínas con abundancia diferencial identificadas en dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> e identificación de variantes sin sentido.....	113
Tabla 9. Resumen de los resultados en diez aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> de secuencia tipo, efecto en la patogenicidad en precultivo con hierro, cobre y su combinación, inducción de la cápsula en MOPS y producción de melanina (sin precultivo con metales).....	116



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nomenclatura de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	20
Figura 2. Nomenclatura histórica del complejo de especies <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	21
Figura 3. Reproducción sexual y asexual de <i>Cryptococcus</i>	23
Figura 4. Vista esquemática del proceso de infección de la Criptococosis..	25
Figura 5. El modelo de diseminación de <i>C. neoformans</i> del medio ambiente al cerebro humano.	37
Figura 6. Mecanismos de captación de hierro en <i>C. neoformans</i>	40
Figura 7. Modelo de adquisición de cobre en <i>C. neoformans</i>	42
Figura 8. Flujos de trabajo de proteómica basada en espectrometría de masas (MS)	44
Figura 9. Escala de medición de la actividad del pigmento de melanina.	54
Figura 10. Desarrollo metodológico primer objetivo	64
Figura 11. Agrupamiento jerárquico en 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> , basado en el perfil alélico de MLST.....	67
Figura 12. Curvas de supervivencia de los 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> con a) baja, b) intermedia y c) alta patogenicidad en <i>G. mellonella</i> ..	70
Figura 13. Tamaño capsular en 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i>	72
Figura 14. Distribución del tamaño capsular pre y post inoculación en <i>G. mellonella</i> de 21 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> agrupados en las secuencias tipo más frecuentes.	73
Figura 15. Aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> que presentaron mayor cambio en la inducción de la cápsula..	74
Figura 16. Resumen de los principales resultados obtenidos en 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> ..	76
Figura 17. Resultados de susceptibilidad para a) anfotericina B, b) voriconazol y c) fluconazol de los 29 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	77
Figura 18. Coordenadas calculadas para cada aislamiento y su pertenencia a las categorías propuestas.....	79
Figura 19. Análisis de componentes principales empleando las variantes genómicas de 322 genes relacionados a cápsula, melanina y patogenicidad.....	82
Figura 20. Desarrollo metodológico 2 y 3 objetivo.....	85
Figura 21. Curva de crecimiento de la cepa H99 a diferentes concentraciones de a) hierro y b) cobre.....	86

Figura 22. Efecto de a) hierro y b) cobre y c) la combinación en la patogenicidad de H99 en <i>G. mellonella</i>	88
Figura 23. a) Curva de supervivencia de dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i>	89
Figura 24. Efecto de hierro, cobre y la combinación en la patogenicidad de dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	90
Figura 25. Distribución del a) tamaño capsular y b) celular de H99, 2807 y 3102..	91
Figura 26. Inducción de la capsula en medio MOPS de <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i> en la cepa H99 y en dos aislamientos clínicos (2807 y 3102).	93
Figura 27. Inducción de células tipo titan en cepas H99, 2807 y 3102.	95
Figura 28. Pigmentación de melanina en medio L-Dopa de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (H99, 2807 y 3102).	96
Figura 29. Diagrama de Venn de proteínas identificadas que difieren entre cada aislamiento y por condición..	98
Figura 30. a) El diagrama de Ven indica las 49 proteínas comunes de los dos aislamientos clínicos pre-cultivados en la combinación 50+500 μ M de hierro y cobre respectivamente.	101
Figura 31. Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos, celulares y moleculares de proteínas que aumentaron, disminuyeron y con abundancia significativa en dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	102
Figura 32. Análisis de interacción de las 30 proteínas que aumentaron en los dos aislamientos clínicos H0058-I-2807 y H0058-I-3102..	103
Figura 33. Análisis de interacción de las 14 proteínas que disminuyeron en los dos aislamientos clínicos H0058-I-2807 y H0058-I-3102..	104
Figura 34. Diagrama de Venn de proteínas relacionadas con los factores de virulencia que difieren entre cada aislamiento y por condición..	106
Figura 35. Abundancia relativa de proteínas que aumentaron y disminuyeron relacionadas a la cápsula y melanina <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	108
Figura 36. Efecto de 50 μ M de hierro, 500 μ M de cobre y su combinación sobre la patogenicidad de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	110
Figura 37. Análisis de SNPs en 49 proteínas en común en dos aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	114
Figura 38. Análisis de SNPs en 57 genes relacionados a cobre y hierro en 10 aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i>	117

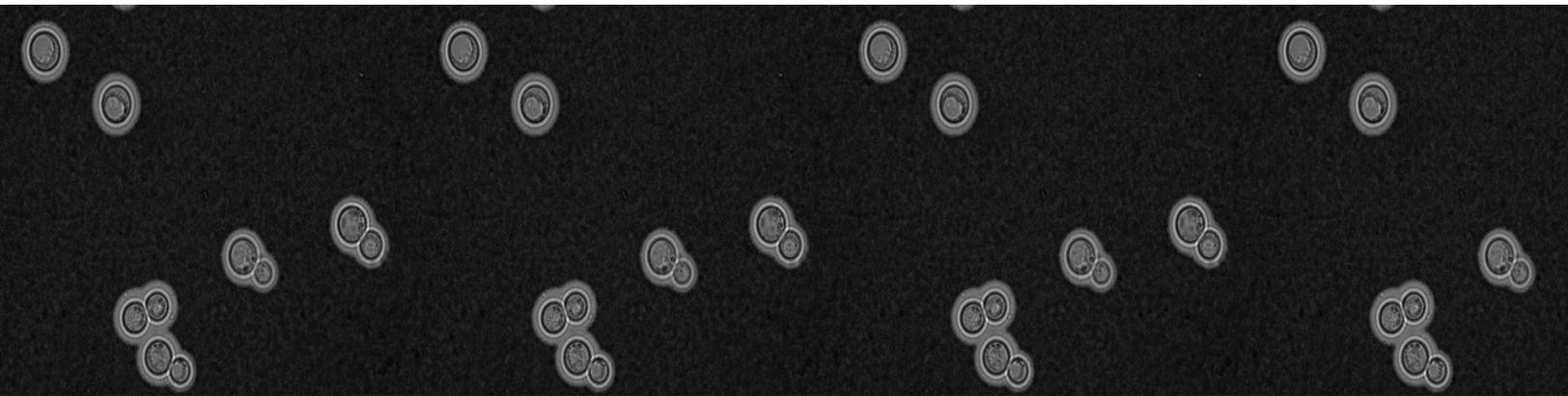


ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
BSA	(<i>Bovine Serum Albumin</i>), albúmina de suero bovino
CAP59	Polisacárido de cápsula
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CNV	Variantes de número de copias
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
DFVF	<i>Database of fungal virulence factors</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditioeritritol
EDTA	(<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>), ácido etilendiaminotetraacético
Fe	Hierro
FMAD	<i>Factor Analysis of Mixed Data</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GPD1	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa
GXM	Glucuronoxilomanano
HPLC	(High Performance Liquid Chromatography), cromatografía líquida de alta eficacia
IGS1	Espaciador intergénico
InDels	Inserciones/delecciones
INS	Instituto Nacional de Salud
ISHAM	Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico
LAC1	Lacasa
LC-MSMS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	L-3,4- dihidroxifenilalanina
MAT	<i>The mating type locus</i>
mg	Miligramos
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
ml	Mililitro
MLST	Tipificación de secuencias de múltiples locus

MOPS	Ácido 4-morfolinpropanosulfónico
MS	(<i>Mass Spectrometry</i>), espectrometría de masas
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGSEP	<i>Next generation sequencing experience platform</i>
nm	Nanómetro
O.D.	Densidad óptica
Pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLB1	Fosfolipasa B1
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorida
Ppm	Partes por millón
RFLP	<i>Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Restricción</i>
Rpm	Revolución por minuto
SDA	Agar Sabouraud dextrosa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SNV	Variantes de un solo nucleótido
SOD	Superóxido dismutasa
ST	Secuencias tipo
STR	Repeticiones cortas en tándem
SYBR	Benzotiazol-2-ilideno) metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TCM	Medio de células de titan
Tris-HCl	Trisaminometano-clorhidrato
UFC	Unidad formadora de colonias
URA5	Orotidina monofosfato pirofosforilasa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

YPD	<i>(Yeast extract Peptone Dextrose)</i> , extracto de levadura peptona y dextrosa
μL	Micro litro
μM	Micro molar
Σ	Desviación estándar



RESUMEN

Caracterización genómica, proteómica y de la virulencia de aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: efecto del hierro y el cobre.

Introducción

Durante el desarrollo de la enfermedad fúngica invasiva (EFI), los metales participan de manera importante en la interacción entre los hongos y las células del hospedero: el hierro y el cobre actúan como cofactores en múltiples reacciones enzimáticas. Estos metales en la célula fúngica se relacionan de manera importante con la expresión de factores de virulencia gobernados por metaloproteasas [1,2]. Por otro lado, en el hospedero, son esenciales en la respuesta eficiente de mecanismos efectores, por ejemplo, en las células del sistema inmunológico. Por lo tanto, el éxito en el establecimiento de la EFI puede depender de la capacidad para competir y adquirir metales del entorno del hospedero [3,4].

La levadura ambiental *C. neoformans* forma parte del complejo de especies que causa la criptococosis, una micosis oportunista adquirida por la inhalación de propágulos fúngicos presentes en el ambiente. Es una infección potencialmente fatal que afecta los pulmones y el sistema nervioso central [5]. Esta levadura produce infecciones frecuentemente en individuos inmunocomprometidos, por ejemplo, en pacientes con SIDA, con trasplante de órganos o con terapias inmunosupresoras[6].

Los metales son necesarios para las funciones esenciales celulares y los hongos patógenos han desarrollado maquinarias para equilibrar con precisión la delgada línea entre la adquisición de metales esenciales y la defensa contra la toxicidad de estos [1,3]. El suministro de estos metales dependiendo del ambiente en que se encuentre la levadura puede ser limitado, por ejemplo, el hierro disponible en hospederos mamíferos es extremadamente bajo y en la naturaleza los óxidos de hierro se forman por pH bajos donde la disolución es extremadamente lenta y es dada por la concentración de oxígeno. Asimismo, el cobre en la naturaleza no se encuentra totalmente disponible, ya que en pH básicos disminuye. Este metal normalmente está enlazado con la materia orgánica y en hospederos mamíferos es limitado [7]. En *Cryptococcus neoformans*, una de las funciones que desempeñan los metales como el hierro y el cobre es la regulación de la expresión de factores de virulencia como la cápsula o la producción de melanina, por lo que influyen en la infección sistémica exitosa [8,9].

Objetivo

En principal objetivo de esta tesis es caracterizar el genotipo, la virulencia, el proteoma y el efecto del hierro y del cobre sobre la modulación de la patogenicidad en 29 aislamientos clínicos colombianos de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, con el fin de entender su implicación en la virulencia y aportar nuevos datos que ayuden a la predicción de nuevas dianas antifúngicas.

Resultados

1. *Caracterización genotípica, determinación de la variabilidad patogénica, crecimiento capsular, producción de melanina, susceptibilidad antifúngica y variantes no sinónimas de genes asociados, en aislamientos clínicos.*

Se genotiparon 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* utilizando el esquema de MLST identificándose 11 secuencias tipo (ST), siendo la ST69 la más frecuente seguida de ST2, ST93 y ST377. A continuación, se evaluó la patogenicidad de los aislamientos en *G. mellonella* clasificándolas en patogenicidad alta (12), intermedia (10) y baja (7) y se llevó a cabo el análisis de los principales factores de virulencia, como efecto en la cápsula pre y post inoculación en *G. mellonella*, inducción de la cápsula en MOPS y pigmentación de melanina en L-Dopa. En general en los aislamientos con baja patogenicidad se observaron cápsulas de mayor tamaño (1.730 μm de promedio) respecto a los de alta (0.630 μm) y de intermedia (0.498 μm) patogenicidad. De los 7 aislamientos categorizados con baja patogenicidad se observaron 3 con baja pigmentación, 2 intermedia y 2 con alta pigmentación. También dentro de los aislamientos de alta patogenicidad se incluían aislamientos con todos los niveles de pigmentación, 4 de baja, 3 de intermedia y 5 de alta.

Posteriormente, se investigó si con el estudio de las características fenotípicas observadas es posible clasificar los aislamientos clínicos de acuerdo con su patogenicidad. Para ello, se realizó un análisis de componentes principales utilizando las variables de mortalidad, cápsula y pigmentación de melanina, encontrándose relación entre el aumento del tamaño capsular y los aislamientos clasificados como de alta patogenicidad. Además, los aislamientos que se agruparon en las secuencias tipo más frecuentes como la ST69 y ST95 presentaron cápsulas grandes (X:2.42 μm), mientras que los aislamientos de la ST2 y ST377 presentaron cápsulas pequeñas (X:1.03 μm).

Seguidamente, se combinaron los datos obtenidos de las variables fenotípicas con genes asociados a los principales factores de virulencia. Tras la secuenciación del genoma completo de los 29 aislamientos clínicos y el análisis de polimorfismos (SNPs) se determinaron 48 variantes no sinónimas asociadas a los fenotipos observados y ubicadas en los dominios funcionales predichos para 39 genes. Entre ellas, se identificaron 48 variantes no sinónimas ubicadas en genes asociados a cápsula, melanina y patogenicidad como *PTP1*, *PMT4*, *IPK1*, *PBX2*, *OVA1* y *ROM2*; además, en 9 de estos genes los cambios detectados implicaban la aparición de codones de parada.

2. *Efecto de hierro y cobre en la patogenicidad, el tamaño capsular y producción de melanina en aislamientos clínicos de alta y baja patogenicidad.*

En la segunda parte de la tesis se exploró el efecto de hierro y cobre en el crecimiento de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, en su patogenicidad en *G. mellonella*, el crecimiento capsular y la pigmentación de melanina. La levadura fue capaz de crecer a concentraciones de hasta 50 μM de hierro y 500 μM de cobre. A continuación, se evaluó la patogenicidad tras el precultivo con hierro y cobre de 10 aislamientos clínicos con diferentes perfiles de patogenicidad basal (sin precultivo con los metales). En el 90 % de los aislamientos aumento la patogenicidad con la combinación de 50+500 μM de hierro y cobre respectivamente. Igualmente, se observó un aumento del crecimiento de la cápsula, se aceleró la producción de melanina y se indujo la aparición de células tipo titán.

3. *Análisis proteómico de los cambios inducidos por el hierro y el cobre y determinación de variantes genéticas en genes asociados a estos metales en dos aislamientos de baja y alta patogenicidad.*

Finalmente, para obtener información de los mecanismos implicados en los rasgos de virulencia inducidos en la combinación con 50 μM hierro y 500 μM de cobre, se realizó un análisis proteómico comparativo de extractos citoplasmático de dos aislamientos clínicos (H0058-I-2807 y H0058-I-3102) con diferente grado de patogenicidad tras su crecimiento en con dichos metales y sin ellos. En el precultivo de 50+500 μM de hierro y cobre se identificaron 1.484 proteínas en el aislamiento clasificado como de baja patogenicidad y 1.549 para el aislamiento de alta patogenicidad. Se detectaron 147 proteínas diferenciales que fueron específicas del precultivo con los metales en los dos aislamientos. Las proteínas diferenciales en el aislamiento de alta

patogenicidad fueron 130 (88 aumentaron y 42 disminuyeron su abundancia) y 198 en el aislamiento de baja patogenicidad (149 aumentaron y 49 disminuyeron su abundancia). Finalmente se detectaron 49 proteínas comunes entre los dos aislamientos: 30 con mayor abundancia, 14 con menor y 5 con diferente cambio según el aislamiento.

Las proteínas de los dos aislamientos cultivados en la combinación de hierro y cobre que aumentaron su abundancia están relacionadas entre otros procesos con el estrés celular, tráfico vesicular (Ap-1, Vps35), estructura de la pared celular (Och1, Ccr4, Gsk3), biosíntesis de pigmento (Hem15, Mln2), reparación de ADN (Chk1), transporte de proteínas (Mms2), así como proteína asociada a la SUMOilación (Uba2) y un transportador mitocondrial (Atm1). Por lo tanto, la presencia del precultivo con los metales influye sobre la abundancia de proteínas que están involucradas en la patogenicidad.

Conclusiones

Los aislamientos clínicos colombianos de *C. neoformans* var. *grubii* analizados presentaron diferencias en su capacidad patogénica la cual es multifactorial. Cuando se comparan las características demográficas y fenotípicas de acuerdo con las ST identificadas, queda claro que, en lugar de ser un grupo homogéneo, existe una amplia variabilidad tanto en la capacidad patogénica, como en el tamaño capsular y producción de melanina. Quizás las diferencias patogénicas entre los aislamientos obedezcan a las condiciones ambientales en que el hongo crece, el modelo utilizado y a las condiciones propias del hospedero.

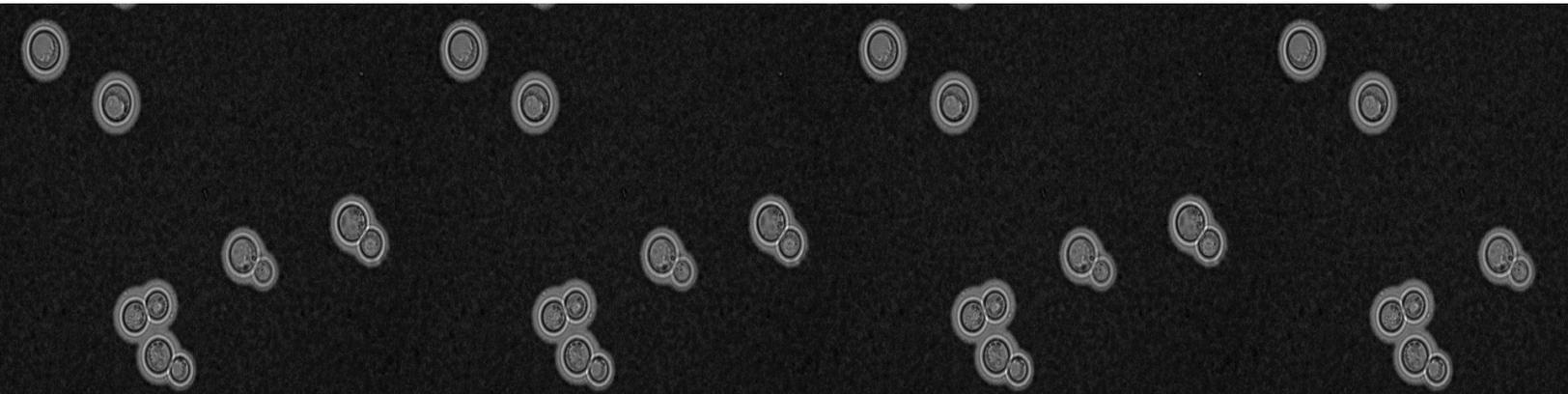
Los datos sugieren que el incremento del tamaño capsular es una variable clave para la diferenciación de aislamientos más o menos patógenas, independientemente del método empleado para su inducción. Históricamente la cápsula ha sido ampliamente estudiada dada su capacidad para modular la respuesta inmune del hospedero y los cambios morfológicos de esta estructura se han relacionado con resistencia antifúngicos y a condiciones de estrés, por lo que este proceso es importante para evadir la muerte por parte de las células fagocíticas.

En el estudio genómico de los 29 aislamientos clínicos se identificaron variantes no sinónimas que implican 9 codones de parada en genes relacionados con el polisacárido capsular, la síntesis de melanina, el crecimiento, el mantenimiento de la pared celular, la secreción de vesículas

extracelulares o la respuesta a estrés. Sería interesante ahondar en el estudio de las consecuencias a nivel de secuencia y función de proteína producidos por las variaciones genotípicas detectadas.

Responder y adaptarse a una gran cantidad de estímulos ambientales son habilidades claves que necesita *C. neoformans* para sobrevivir en nichos biológicos diferentes. El metabolismo de hierro y cobre es de gran importancia en la fisiología de esta levadura dado que interviene en distintos procesos biológicos. Esta es la primera investigación en que se combina el hierro y el cobre en el precultivo de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. Con esta aproximación, se comprobó que la combinación de estos metales aumentó la patogenicidad, el tamaño capsular, aceleró la producción del pigmento de melanina e indujo células tipo titán. Además, se observaron cambios proteómicos tras el precultivo con la combinación de 50 μM de hierro y 500 μM de cobre. Se detectó un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con respuesta a estrés oxidativo, integridad de pared celular, tráfico vesicular, cápsula y melanina.

Es interesante resaltar que el marcado aumento de la patogenicidad puede explicarse en parte por los resultados que indican que existe un vínculo entre el precultivo en combinación de hierro y cobre y cambios en proteínas asociadas a la cápsula, melanina, pared celular y tráfico vesicular. Sin embargo, para comprender mejor este proceso y sus mecanismos moleculares en detalle es necesario continuar explorando la dinámica de los metales en la patogenicidad y virulencia en esta levadura.



ABSTRACT

Genomic, proteomic, and virulence characterization of clinical isolates of

***Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: effect of iron and copper.**

Introduction

During invasive fungal disease (IFD) development, metals play an important role in the interaction between fungi and host cells, iron, and copper act as cofactors in multiple enzymatic reactions. These metals in the fungal cell are associated to the expression of virulence factors governed by metalloproteases [1,2]. On the other hand, in the host, they are essential in the efficient response of effector mechanisms, for example, in cells of the immune system. Therefore, the success of IFD establishment may depend on the ability to acquire and compete for metals from the host environment [3,4].

The environmental yeast *C. neoformans* is part of the species complex that causes cryptococcosis, an opportunistic mycosis, acquired by inhalation of fungal propagules present in the environment. It's a potentially fatal infection that affects the lungs and central nervous system [5]. This yeast frequently affects immunocompromised individuals, for example, in patients with AIDS, organ transplants, or immunosuppressive therapies [6].

Metals are required for essential cellular functions, and fungal pathogens have developed machinery to precisely balance the fine line between acquiring them and defending against their toxicity [1,3]. The supply of these metals can be limited as it depends on the surrounding environment. For example, the available iron in mammalian hosts is extremely low and in nature iron oxides are formed by low pH where dissolution is extremely slow and is driven by oxygen concentration (in the atmosphere/in the soil). Also, copper is not fully available in nature, since its abundance is decreased in basic pH conditions. This metal is normally bound to organic matter and is limited in mammalian hosts [7]. In *Cryptococcus neoformans*, one of the functions played by metals such as iron and copper is the regulation of the expression of virulence factors such as capsule or melanin production, thus influencing successful systemic infection [8,9].

Objective

The main objective of this thesis was to characterize the genotype, virulence, proteome and the effect of iron and copper on the modulation of pathogenicity in 29 Colombian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, to understand its implication in virulence and provide new data that may help to predict new antifungal targets.

Results

1. Genotypic characterization, determination of pathogenic variability, capsular growth, melanin production, and non-synonymous variants of pathogenesis associated genes in clinical isolates.

We genotyped 29 clinical isolates of *C. neoformans* var. *grubii* using the MLST scheme, identifying 11 type sequences (ST). ST69 was the most frequent followed by ST2, ST93 and ST377. Next, the pathogenicity of the isolates in *G. mellonella* was evaluated classifying them as high (12), intermediate (10) and low (7) pathogenicity. Additionally, the main virulence factors were analyzed: effect on the capsule pre and post inoculation in *G. mellonella*, capsule induction in MOPS and melanin pigmentation in L-Dopa. In general, in isolates with low pathogenicity, larger capsules (1.730 μm on average) were observed compared to those with high (0.630 μm) and intermediate (0.498 μm) pathogenicity. Of the 7 isolates categorized with low pathogenicity, 3 were observed with low pigmentation, 2 intermediate and 2 with high pigmentation. Also, within the high pathogenicity isolates, all levels of pigmentation were included, 4 low, 3 intermediate and 5 high.

The possibility to classify clinical isolates according to their observed pathogenesis-related traits was investigated. For this, a principal component analysis was carried out using the variables of mortality, capsule, and melanin pigmentation, finding a relationship between the increase in capsular size and the isolates classified as highly pathogenic. Furthermore, the isolates that were grouped into the most frequent sequence type such as ST69 and ST95 presented larger capsules (X: 2.42 μm), while the isolates of ST2 and ST377 presented small capsules (X: 1.03 μm).

Subsequently, the data obtained from the phenotypic variables were combined with genes associated with the main virulence factors. After the sequencing of the complete genome of the 29 clinical isolates and the analysis of polymorphisms (SNPs), 48 non-synonymous variants associated with the observed phenotypes and located in the predicted functional domains for 39

genes were determined associated with capsule, melanin, and pathogenicity, such as *PTP1*, *PMT4*, *IPK1*, *PBX2*, *OVA1* and *ROM2*, in addition to 9 of these genes the changes detected implied the appearance of stop codons.

2. *Effect of iron and copper on pathogenicity, capsular size, and melanin production in high and low pathogenicity clinical isolates.*

In the second part of the thesis, the effect of iron and copper on the growth of clinical isolates of *C. neoformans* var. *grubii* upon its pathogenic potential in *G. mellonella*, capsular growth, and melanin pigmentation was investigated. The yeast was able to grow at concentrations up to 50 μM of iron and 500 μM of copper. Next, the pathogenicity after preculture with iron and copper of 10 clinical isolates with different baseline pathogenicity profiles (without preculture with metals) was evaluated. In 90% of the isolates, the pathogenicity increased with the combination of 50 μM of iron and copper 500 μM , respectively. Likewise, an increase in capsule growth was observed, melanin production was accelerated, and the appearance of titan-like cells was induced.

3. *Proteomic analysis of the changes induced by iron and copper, and determination of genetic variants in genes associated with these metals in two isolates of low and high pathogenicity.*

Finally, a comparative proteomic analysis of cytoplasmic extracts of two clinical isolates with different degrees of pathogenicity was carried out after growth with and without 50 μM iron plus 500 μM copper. In the pre-enriched preculture, 1484 proteins were identified in the isolate classified as low pathogenicity and 1549 proteins for the isolation of high pathogenicity. Also, 147 proteins specific of the preculture with the metals for the two isolates were detected. Differential proteins in the high pathogenicity isolate amounted to 130 (88 increased and 42 decreased in abundance) and 198 in the low pathogenic isolate (149 increased and 49 decreased in abundance). Finally, 49 common proteins were detected between the two isolates: 30 with the higher abundance, 14 with the lower and 5 with different changes depending on the isolate.

Among the proteins that increased their abundance on both isolates when cultured in combination with iron and copper some of them are related to biological processes such as cell stress, vesicular traffic (*Ap-1*, *Vps35*), cell wall structure (*Och1*, *Ccr4*, *Gsk3*), pigment biosynthesis (*Hem15*, *Mln2*), DNA repair (*Chk1*), protein transport (*Mms2*), SUMOylation-associated protein

(Uba2), and a mitochondrial transporter (Atm1). Therefore, the presence of metals in preculture influences the abundance of proteins that are involved in pathogenicity.

Conclusions

Colombian clinical isolates of *C. neoformans* var. *grubii* were analyzed and showed differences in their pathogenic capacity, which is multifactorial. When the phenotypic characteristics are compared according to the identified STs, instead of being a homogeneous group, they exhibited wide variability in both pathogenic capacity, capsular size, and melanin production. Perhaps the pathogenic differences between the isolates are due to the environmental conditions in which the fungus grows, the model used, and the host's own conditions.

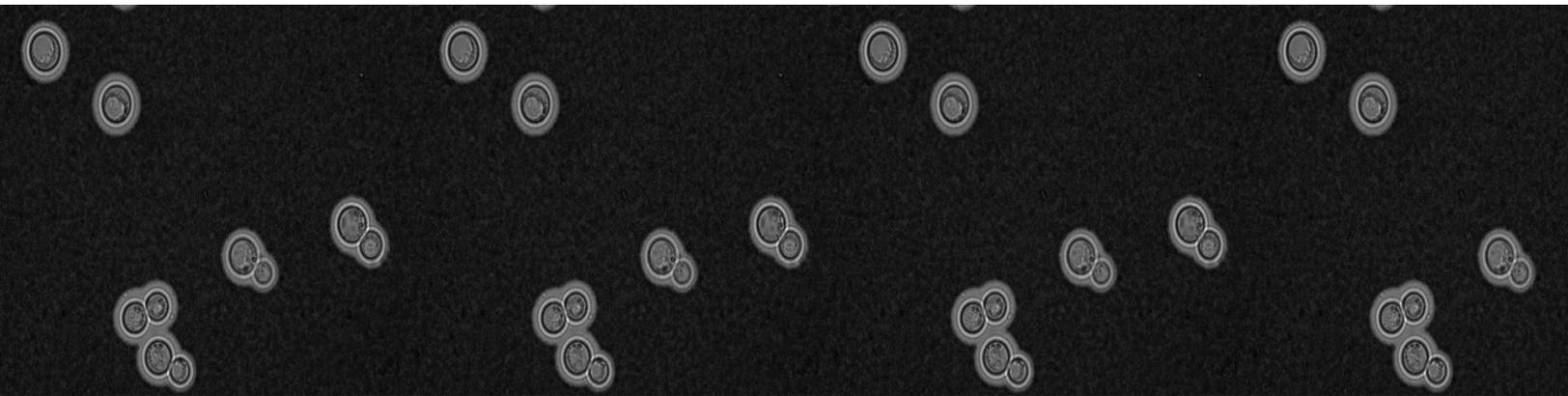
The data suggest that the increase in capsular size is a key variable for the differentiation of pathogenic profiles among isolates, regardless of the method used for its induction. Historically, the capsule has been widely studied given its ability to modulate the host's immune response and morphological changes in this structure have been related to antifungal resistance and stress thus highlighting its importance to avoid death by the phagocytic cells.

In the genomic study of the 29 clinical isolates, non-synonymous variants were identified that involved stop codons in genes related to capsular polysaccharide, melanin synthesis, growth, maintenance of the cell wall, secretion of extracellular vesicles, or the stress response. It would be interesting to delve into the consequences at the level of protein sequence and function produced by the genotypic variations detected.

Responding and adapting to a large number of environmental stimuli are key skills that *C. neoformans* needs to survive in different biological niches. The metabolism of iron and copper is of great importance in the physiology of this yeast because it intervenes in different biological processes. This is the first investigation in which iron and copper are combined in the preculture of clinical isolates of *C. neoformans* var. *grubii*. With this approach, evidence that the combination of these metals increased pathogenicity, capsular size, accelerated the production of the melanin pigment and induced titanium-like cells is provided. Furthermore, proteomic changes were observed after preculture with the combination of 50 μM iron and 500 μM copper. An increase in

the abundance of proteins related to oxidative stress response, cell wall integrity, vesicular traffic, capsule, and melanin was detected.

It is interesting to note that the marked increase in pathogenicity can be explained, in part, by the results that indicate that there is a link between the availability of iron and copper and changes in proteins associated with the capsule, melanin, cell wall and vesicular traffic. However, to better understand this process and its molecular mechanisms in detail, it is necessary to continue exploring the dynamics of metals in pathogenicity and virulence in this yeast. It would also be of great interest to include in these investigations various stimuli found by yeast in the different environments where it interacts with the host.



INTRODUCCIÓN

1. Cryptococcus y criptocosis: generalidades.

1.1 Historia.

El científico italiano Sanfelice en 1894 observó por primera vez un aislamiento de *Cryptococcus* de la fermentación de zumo de melocotón, visualizó microscópicamente una levadura encapsulada a la que llamó *Saccharomyces neoformans*. Al mismo tiempo en 1894 y 1895 Busse y Buschke por separado informaron del primer caso de la enfermedad en humanos causada por este hongo, recuperado de la lesión tibial de un paciente, al patógeno aislado lo llamó "*Saccharomycosis hominis*". En los años siguientes este patógeno se aisló de lesiones en hombres y en animales [10].

Curtis en 1896, aisló esta levadura de un absceso inguinal de un paciente francés, al inocular subcutáneamente diversos animales observó la formación de lesiones tumorales en pulmón, bazo y riñones, él nombro esta cepa como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* [11,12]. En 1901 Vuillemin al estudiar esta levadura no encontró las típicas ascosporas del género *Saccharomyces*, además, no fermentaban los carbohidratos y las clasificó en el género *Cryptococcus*; de esta forma nombró al primer aislamiento clínico de Busse como *C. hominis* y *C. neoformans* a los aislamientos de Sanfelice [10,11]. En 1935 el científico Rhoda Benham aclaró los diferentes nombres que se habían atribuido a esta levadura y desde esta investigación el género *Cryptococcus* fue aceptado [11,13]. Benham realizó un estudio en el que incluyó 22 aislamientos clínicos, incluyo aislamientos de Busse, Curtis y de otros investigadores identificados bajo el género *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Torula*. Al realizar observaciones morfológicas, serológicas y patológicas, Benham concluyó que todos los aislamientos pertenecían a una especie, *Cryptococcus hominis*.

Emmons en 1951 recuperó *Cryptococcus* de material vegetal en Virginia; en 1955 recuperó está levadura en muestras de excrementos de aves; se propuso que la exposición a los excrementos de aves contaminadas está relacionada con las infecciones en hombres y animales [14]. Kwong Chung en 1975 describe una levadura perteneciente al reino de los hongos que presenta una fase anamorfa (fase-asexual), lo clasifica en phylum basidiomicota Agaricomycotina; Tremellomycetes; Tremellales; Cryptococcaceae; Cryptococcus; Cryptococcus neoformans species complex [11,15].

Desde su descubrimiento los casos de criptococosis eran raros, la incidencia de la enfermedad aumentó debido al inicio de la terapia inmunosupresora y de la epidemia de sida, siendo una infección común en personas con sida [16]. En el año 1999, en la isla de Vancouver en Columbia Británica, Canadá, se describió el primer brote de criptococosis registrado en la historia que afectó tanto a humanos como animales [17].

Hoy en día en el género *Cryptococcus*, se reconocen dos especies patógenas en humanos y animales: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* con diferencias claras a nivel epidemiológico, bioquímico y genético, y más de otras 30 especies ambientales, asociadas a diferentes ecosistemas [18].

1.2 Clasificación taxonómica y tipificación molecular del complejo de especies C. neoformans /C. gattii.

Debido a la importancia de *C. neoformans/C. gattii* como hongos patógenos humanos, varios grupos de investigación se centran en la caracterización genotípica, para lo cual se han descrito diversas técnicas de tipificación molecular: Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE) [19], PCR Huella Digital [20], Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD) [21], Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) [22], Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen *PLB1* o *URA5* [23,24] y más recientemente, Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) y secuenciación del genoma completo [25].

Algunas de las técnicas anteriormente mencionadas han permitido agrupar a los miembros del complejo en ocho tipos moleculares por huella digital y trece genotipos por AFLP (ver **figura 1**) [20,25]. Adicionalmente, se han establecidos tres serotipos híbridos adicionales AD, AB y BD [26]. AFLP y MLST han demostrado la existencia de un nuevo tipo molecular en Botswana (genotipo VNB) que parece estar restringido geográficamente a África subsahariana [27].

Las dos especies *C. neoformans* y *C. gattii* han mostrado capacidad de reproducción sexual o telomorfo y reproducción asexual o anamorfo. La forma sexual genera basidiosporas y la forma asexual genera blastoconidias [15,28]. Los telomorfos pertenecen al género *Filobasidiella* de los basidiomicetos y se conocen como *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*.

En el año 2015, Teun Boekhout y colaboradores realizaron una propuesta para designar siete clados MLST identificados entre *C. neoformans* y *C. gattii* en nuevas especies: *C. neoformans* var. *neoformans* (*C. neoformans*) y *C. neoformans* var. *grubii* (*C. deneoformans*) como dos especies independientes y considerar 5 especies más en *C. gattii* como se explica en la **figura 2** [29]. Hasta la fecha, la nomenclatura propuesta recientemente no ha logrado aceptación dentro de la comunidad científica (Debate generado en la X Conferencia Internacional sobre *Cryptococcus* y Criptococosis, Brasil 2017). Falta consenso sobre los límites y número de límites de especies putativas. En la presente investigación para identificar estos patógenos fúngicos los indicaremos como: *Cryptococcus neoformans* complejo de especies y *Cryptococcus gattii* complejo de especies, términos que son bien aceptados entre micólogos, veterinarios y médicos [18,30].

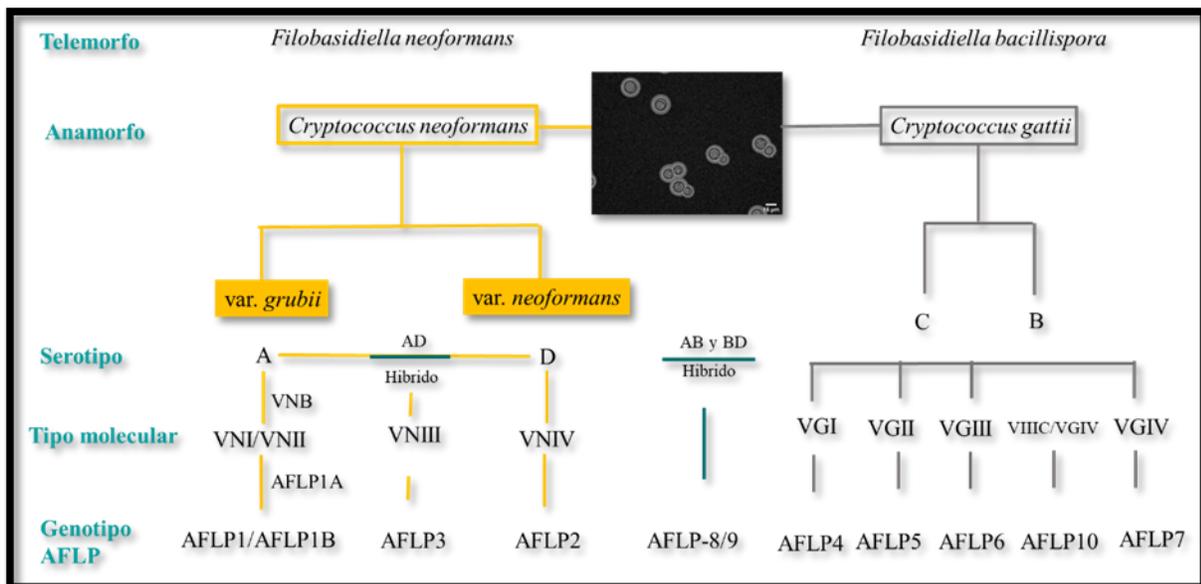


Figura 1. Nomenclatura de *C. neoformans* y *C. gattii* [20,25].

Nombre común	Tipo molecular	Nombre propuesto *	Nombre actual
<i>C. neoformans</i>	VNI/VNII/VNB	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> Complejo de especies
	VNIV	<i>C. deneoformans</i>	
	VNIII	<i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>	
<i>C. gattii</i>	VG I	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i> Complejo de especies
	VG II	<i>C. deuterogattii</i>	
	VG III	<i>C. bacillisporus</i>	
	VG III C/VG IV	<i>C. tetragattii</i>	
	VG IV	<i>C. decagattii</i>	
	AD	Híbrido <i>C. deneoformans</i> x <i>C. gattii</i>	
	AB		
	BD		

Figura 2. Nomenclatura histórica del complejo de especies *C. neoformans* y *C. gattii*. *Propuesta de nueva nomenclatura de *Cryptococcus* Hagen *et al* [29]. Figura modificada de Malik R, *et al.*, 2021 [30].

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) ha revolucionado al análisis genómico y transcriptómico, permitiendo el estudio de la expresión génica con un gran nivel de profundidad. Las diferencias entre los tipos moleculares de *C. neoformans* y *C. gattii* en la actualidad son más evidentes a nivel genómico (ver **tabla 1**). A continuación, se expondrán las características esenciales de *C. neoformans* [31]. Se han secuenciado los genomas completos de varias cepas de *C. neoformans*. El tamaño total del genoma es de ~18-19 Mb que contienen ~6500 genes ricos en intrones y está organizado en 14 cromosomas. Además, el genoma es rico en transposones, muchos de las cuales se agrupan en regiones centroméricas [32].

Tabla 1. Características genéticas del complejo de especies *C. neoformans* y *C. gattii*[32].

Característica	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
Número de cromosomas	~12-14	~13-15
Tamaño total del genoma	~18-19 Mb	~18-20 Mb
Tamaño del genoma mitocondrial	24-32 Kb	34.7 Kb

El proyecto genoma del complejo de especies ha realizado grandes avances, construyendo genotecas de cepas de referencia del serotipo A (H99/125.31) del serotipo D (JEC20/JEC21) y del

serotipo B (WM2276/E566), permitiendo que esta información sea accesible para poder utilizarla en investigación genómica y proteómica [32,33]. Rhodes J y col, encontraron aneuploidía en todos los cromosomas de *C. neoformans* var. *grubii*, tanto en las cepas de linaje único como en las híbridas y varios híbridos diploides entre *C. neoformans* var. *grubii*. También, *C. neoformans* var. *neoformans* mostró aneuploidía que conduce a la pérdida de heterocigosidad en varios cromosomas, los autores proponen un intercambio genético limitado en *C. neoformans* var. *grubii* [34].

Los aislamientos de *C. neoformans* son principalmente haploides, pero se ha descrito que los híbridos de *C. neoformans* var. *grubii* y var. *neoformans* son diploides [35]. A partir del estudio de la secuenciación del genoma completo es posible extraer los datos de los genes *housekeeping* utilizado en el esquema de MLST, La comparación de los genomas a esta escala resulta útil, dado que es posible observar diversidad genética, intercambio entre linajes y entre regiones geográficas, además esto ha permitido estudios de asociación de fenotipos relacionados con todo el genoma [36].

1.3 Diferenciación fenotípica, bioquímica y ecológica del complejo de especies.

La característica principal que diferencia a *C. neoformans* /*C. gattii* de otras especies de levaduras es su termotolerancia, y la forma y composición química de la cápsula. La cápsula es una estructura con características morfológicas importantes, compuesta por varios polisacáridos, glucoroxilomanano, galactoxilomanano y manoproteína. Las diferencias en la estructura del glucoroxilomanano explican las variaciones antigénicas y es la base de la separación de los serotipos existentes A, B, C, D, AD [37].

La capacidad de utilizar las fuentes de nitrógeno y carbono es diferencial para cada especie [31,38]. La asimilación de nitrógeno es utilizada como medio diagnóstico, en 1982 Kwon-Chung propuso el uso del agar L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) para distinguir las dos especies [39]. La resistencia de *C. gattii* a L-canavanina y la capacidad de utilizar la glicina como fuente de nitrógeno y carbono permite la identificación esta especie, ocasiona el cambio de color del medio de verde a azul, en *C. neoformans* no se evidencia el cambio del medio permaneciendo verde [39].

Como ya se ha comentado, el complejo de especies *C. neoformans* /*C. gattii* han mostrado capacidad de reproducción sexual o telomorfa y reproducción asexual o anamorfa. La forma sexual genera basidiosporas (propágulo de forma sexual). La forma asexual genera blastoconidias (propágulo de forma asexual) [40,41]. Éstas últimas se caracterizan por ser levaduras haploides (1N) heterotálicas con un sistema bipolar, presentan un locus MAT con dos alelos (a y α) que controlan la pareja sexual [31] (**figura 3**).

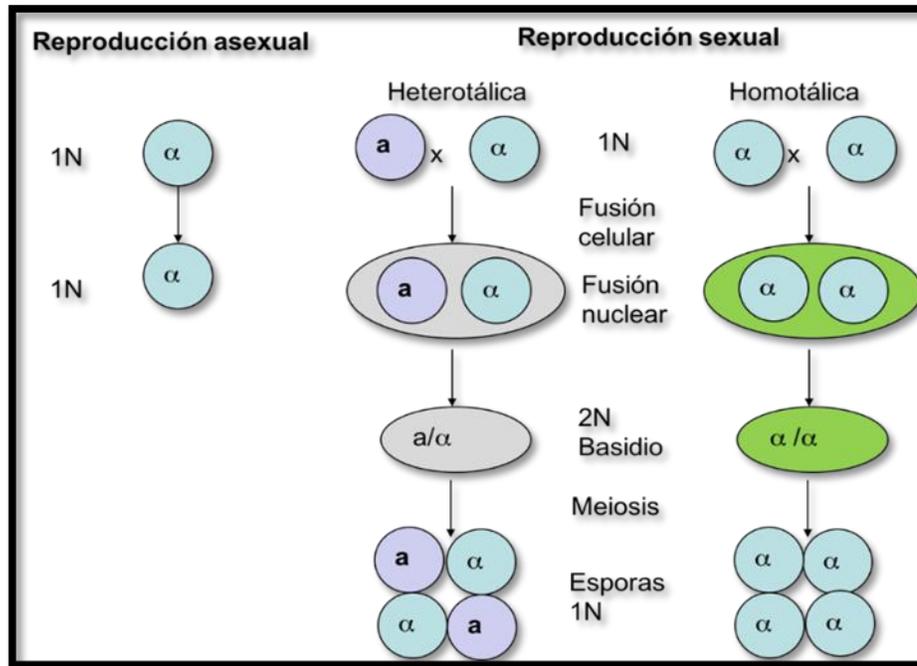


Figura 3. Reproducción sexual y asexual de *Cryptococcus*. Figura tomada de Ene J, *et al.*.,2014 [42].

Las blastoconidias pueden presentar pareja sexual “a” o “ α ” como ha sido demostrado *in vitro* por la producción de teleomorfos basidiomicetos. La pareja sexual MAT α es la que presenta predominancia es capaz de llevar a cabo la reproducción asexual y se presenta en una mayor concentración en el ambiente. El proceso mediante el cual ocurre el apareamiento se divide en seis etapas: conjugación, filamentación, formación de basidios, fusión nuclear, meiosis y esporulación [43]. La reproducción asexual se da por gemación de sus blastoconidias y de forma alternativa mediante un proceso llamado fructificación haploide que tiene lugar en medios con limitaciones severas de nitrógeno o agua [43]. Durante esta reproducción la levadura puede ingresar tanto en ciclo homotálico como heterotálico [42]. La reproducción sexual homotálica da lugar a esporas de la misma pareja sexual. Por su parte en el apareamiento heterotálico una feromona de señalización

entre una célula “a” y “α” resulta en la fusión celular, los núcleos no se fusionan, pero forman un dicarion filamentosos, las puntas de las células filamentosas se diferencian en basidios, en el que se producen la fusión nuclear y la meiosis **ver figura 3** [41,44,45] .

En cuanto a su distribución geográfica, ecosistema y hospedero susceptibles la especie *C. neoformans* se encuentra distribuido a nivel mundial, se ha aislado tanto de zonas urbanas como rurales principalmente del suelo contaminado con excrementos de palomas y otras aves. Esta especie afecta en su mayoría a personas con inmunocompromiso a nivel de respuesta células adaptativa, esencialmente en pacientes con linfopenia de LTCD4+, lo que ocurre en pacientes en estado SIDA, y otras situaciones patológicas que conlleven a esta inmunosupresión [46]. En cuanto a *C. gattii* este se encuentra distribuido en regiones tropicales, subtropicales y templadas [47], solo de manera excepcional durante el brote de la isla de Vancouver, se registró un cambio significativo al comportamiento conocido [17], lo que impulso estudios a varios niveles, que no son objeto de esta tesis. En la naturaleza se asocia con árboles como *Eucalyptus* spp, *Terminalia catappa*, acacias almendros, entre otros [48]. Su afectación clínica, incluye personas aparentemente inmunocompetentes, que presentan deterioro a nivel pulmonar por múltiples razones, neumonías a repetición, asma, bronquiectasias, fibrosis pulmonar entre otras [49,50].

2. La criptococosis.

2.1 Manifestaciones clínicas.

Como se ha dicho anteriormente, la criptococosis es una enfermedad micótica sistémica oportunista causada por el complejo de especies *C. neoformans* /*C. gattii*, que afecta a humanos y animales. Existen reportes esporádicos en pacientes inmunosuprimidos indicando la participación de otras especies como *C. laurenti* o *C. albidus* entre otros [51]. Se cree que la enfermedad es iniciada por la inhalación de propágulos presentes en el ambiente (ver **figura 4**), es una infección potencialmente fatal que compromete el sistema respiratorio y el sistema nervioso central (SNC), puede afectar tanto a personas inmunosuprimidas, como inmunocompetentes y la presentación clínica y gravedad de la enfermedad depende de la especie, y del estado del inmunocompromiso del hospedero [46]. Así, durante el curso de la enfermedad, los propágulos inhalados se alojan inicialmente en los alvéolos donde producen infección asintomática [52]. Y pueden ocurrir diferentes desenlaces, uno donde la respuesta inmunológica puede ser suficiente para que no se

desarrolle la enfermedad, y el hongo sea eliminado y otro donde la infección asintomática no active la respuesta inmunológica o no lo suficiente y el hongo entre en una fase de latencia. Esta hipótesis es la más aceptada en los casos de meningitis criptococcica en pacientes con SIDA, donde se considera que el hongo se adquirió previamente y en el momento de la disminución de la respuesta inmunológica el hongo se activa y produzca una forma aguda y diseminada de la enfermedad [53].

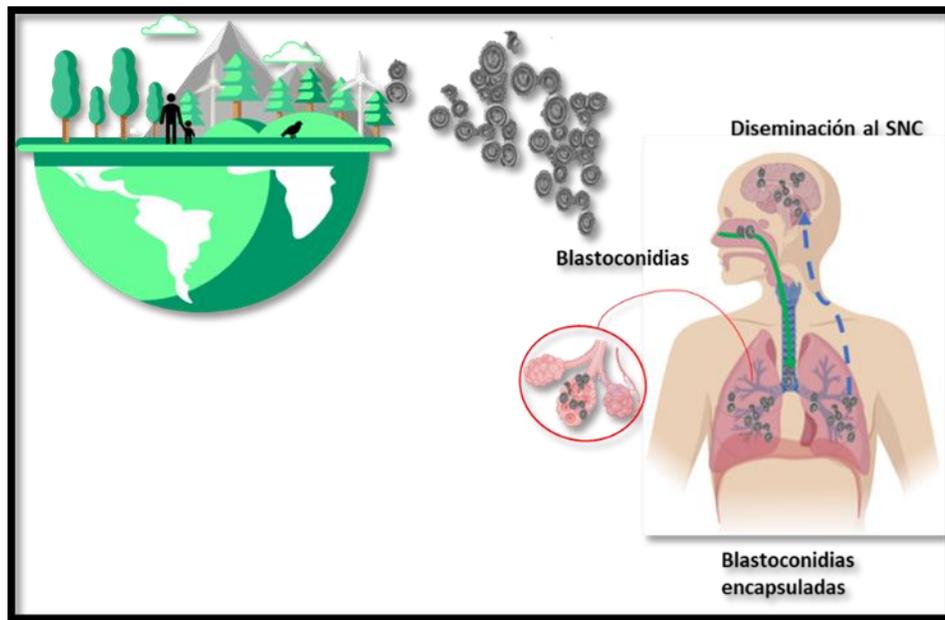


Figura 4. Vista esquemática del proceso de infección de la Criptococosis. Figura tomada de Sabiiti W, *et al.*, 2012 y modificada por el autor mediante el software Biorender [54].

También se ha descrito una mayor susceptibilidad de la enfermedad en hombres que en mujeres de cualquier edad, raza y condición socio económica. Otros factores que predisponen a adquirir la enfermedad son pacientes con enfermedades crónicas como diabetes, cirrosis, fallo renal y algún tipo de tumor o trasplante, enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, leucemias, linfomas, con tratamiento con corticosteroides, entre otros [41].

La infección diseminada es más común en pacientes inmunocomprometido, la levadura puede propagarse desde los pulmones hacia el sistema nervioso central (SNC) siendo este es el sitio más comúnmente afectado donde puede causar meningoencefalitis [53]. Entre las manifestaciones clínicas se encuentran las neumonías, lesiones en piel (criptococosis cutánea), la meningitis con o sin lesiones focales cerebrales (criptococomas), y cuadros muy graves en formas diseminadas de la enfermedad donde pueden comprometer vísceras, huesos y tracto genito urinario [55]. Estas

formas diseminadas ocurren en pacientes profundamente enfermos donde se diagnóstica, enfermedad fúngica invasiva (EFI), que incluye meningoencefalitis criptococcica, siendo esta última, casi siempre la sintomatología por la que se llega al diagnóstico final [56].

Las manifestaciones clínicas pueden diferir según la especie y la condición de base del paciente. En pacientes VIH positivo los síntomas de meningoencefalitis suelen ser sub-agudos durante un periodo de días a semanas, presentando cefalea, fiebre, vómito y fotofobia [6]. Otros síntomas que sugieren enfermedad diseminada incluyen tos, disnea y manifestaciones en piel, en el examen físico puede evidenciarse letargo, confusión y alteración del estado de conciencia [55]. La criptococosis en pacientes VIH seronegativos pero inmunocomprometidos como personas trasplantadas presentan signos y síntomas variables. En estos pacientes la infección ocurre de un 2.8 a 8% y es la tercera infección fúngica invasiva más común en este escenario, después de *Candida* y *Aspergillus* [57]. La mayoría de los pacientes presentan signos y síntomas de meningoencefalitis subaguda como la fiebre, alteración del estado mental, meningitis, pérdida de la visión y convulsiones [58]. La enfermedad causada por *C. gattii* presenta compromiso del SNC especialmente en forma de criptococoma y se manifiesta con síntomas como fiebre, escalofrío y pérdida de peso asociado a fiebre y cefalea [59]. En comparación con la infección por *C. neoformans*, las secuelas como papiledema, convulsiones y déficits neurológicos focales han sido reportadas con mayor frecuencia en las infecciones por *C. gattii* [60].

El diagnóstico se puede realizar por examen directo, antigenemia o por cultivo. El examen directo se basa en la observación mediante tinta china diluida en solución salina o la observación con microscopio de contraste de fases. Se observan blastoconidias redondas u ovaladas, rodeadas por un gran halo claro que corresponde a la cápsula. El diagnóstico indirecto se realiza mediante serología, es una técnica que detecta antígenos capsulares en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR). Entre las técnicas disponibles para la detección del antígeno polisacárido capsular se encuentra la aglutinación con látex y el inmunoensayo enzimático [61]. La visualización de la levadura se realiza por histopatología como biopsias, con base en las coloraciones de rutina (hematoxilina- eosina y ácido periódico Schiff) o coloraciones especiales (mucicarmina de Meyer), donde se observa en el tejido zonas quísticas con levaduras encapsuladas [41].

2.2 Epidemiología de la criptococosis.

Cryptococcus causa diversas presentaciones clínicas, los datos registrados a nivel mundial de manera significativa, corresponde a la meningitis criptococcica, enfermedad con la cual debutan muchos pacientes en estado SIDA y que sufren pacientes con baja adherencia a la terapia antirretroviral [26,62]. Se estima que la carga mundial de la meningitis criptocócica asociada al VIH es de 278.000 casos de personas positivas [63]. Las infecciones por *C. neoformans*, a nivel mundial causan aproximadamente 220.000 casos de meningitis criptocócica en todo el mundo cada año entre las personas con VIH/SIDA, (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, CDC, Atlanta, EE. UU 2017 <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>). La mayor carga de la enfermedad se produce en el África subsahariana, donde se estima que la mortalidad oscila entre un 50% a un 70% [64,65].

A principios de la década de 1980, fecha en la cual se produjo la aparición de la inmunodeficiencia causada por el VIH/SIDA, se incrementaron los reportes de criptococosis [5,20,21]. Con la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) en algunos países como EEUU a mediados de los años 90, se observó una disminución de la incidencia de la criptococosis [66]. En África subsahariana, se observó una leve disminución como muestra un estudio prospectivo de pacientes con criptococosis meníngea en la ciudad del Cabo realizado en el Hospital Jooste [67].

En Colombia las investigaciones realizadas sobre la situación clínica y epidemiológica de la criptococosis indican un aumento directamente proporcional a los diagnósticos de infección por VIH y el progreso a SIDA. Para el periodo 1997-2016 la incidencia promedio anual fue de 1.1 casos por 1000 habitantes/año en pacientes con SIDA y en la población general es de 0.23×10^6 habitantes/año [6,68]. La mayoría de los casos clínicos reportados en el país corresponden a *C. neoformans* en un 87.5% [68].

El CDC de Atlanta indica que el 1% de la población infantil menor de 13 años infectada por el VIH/SIDA contrae la enfermedad [61]. En Sudáfrica, la incidencia de la criptococosis en los niños VIH positivos fue de 47 casos por cada 100.000 [69]. En Colombia, la cifra de prevalencia de criptococosis en niños menores de 16 años es de 2.6%, con mayor frecuencia en niños que en niñas [70].

En la evaluación de tipos moleculares, asociados a estos eventos, se ha identificado que el tipo molecular VNI es el más frecuente tanto en Colombia como a nivel mundial [71], seguido en menor proporción de VNII [23], VNIII y VNIV [46]. En cuanto a *C. gattii* presenta genotipos cambiantes y su aparición es poco frecuentes en el tiempo, es decir en poblaciones específicas y asociadas a zonas geográficas limitadas, se asocia con mayor frecuencia a diversos árboles, como *Eucaliptos*, *Acacias*, *Almendros*, entre otros [72]. En muestras ambientales VGI se reporta con mayor frecuencia en Australia [71] y VGII en Sur y Norte América [73–75], siendo este último el patrón que ha ocasionado el único brote reportado a nivel mundial en la Isla de Vancouver y en el pacífico norte de Estados Unidos. Este hecho cambio la epidemiología de la enfermedad, y dio un nuevo impulso al estudio tanto biológico como molecular, además, a partir del estudio de brote se originó el reconocimiento actual de dos especies [76]. El patrón molecular VGIII predomina en países Iberoamericanos, aunque existen reportes en Nuevo Méjico y en India [23,77,78] y VGIV se encuentra en África del Sur y América Central [76,79]. Recientemente Farrer y colaboradores en el 2019 describieron un nuevo linaje VGV, descubierto en los bosques de Miombo en Zambes central, África, se ha descrito que este nuevo tipo molecular es capaz de causar una infección pulmonar leve en ratones, la identificación con RFLP no es capaz de distinguir éntrelos tipos moleculares VGIV y VGV [80].

2.3 Tratamiento y susceptibilidad antifúngica.

El tratamiento depende, principalmente, de dos factores: el sitio anatómico involucrado y el estado inmunológico del hospedero. Para el tratamiento en adultos, adolescentes y niños, se recomienda un régimen de corta duración con desoxicolato de anfotericina B 10 mg/kg/día por una semana y flucitosina 100 mg/kg/día, dividido en cuatro dosis por día, seguido de una semana de fluconazol 1200mg/día para adultos, para niños y adolescentes 12 mg/kg/día hasta una dosis máxima de 800, para tratar la meningitis criptocócica entre las personas con el VIH mg al día. Para el régimen de consolidación se recomienda un tratamiento de ocho semanas después de la fase de inducción con fluconazol 800 mg al día para adultos, 6-12 mg/kg día para niños y adolescentes, y para tratar la meningitis criptocócica entre las personas con el VIH hasta un máximo de 800 mg al día. Finalmente, para la fase de tratamiento se recomienda fluconazol 200 mg al día para adultos, 6 mg/kg/día para adolescentes y niños [81]. La mayoría de los países de América Latina no cuentan con 5-fluocitosina, por lo que se usan otras alternativas de tratamiento. En Colombia, según protocolo de estudio y manejo de pacientes con criptococosis, se establece que en caso de no contar

con 5-fluocitosina se puede utilizar Anfotericina B 0,7mg/kg/día + fluconazol 800mg/día vía oral durante 2 semanas en la fase de inducción. En la fase de mantenimiento se utiliza fluconazol 800mg/día por un mínimo de 8 semanas [82].

En varios estudios los perfiles de susceptibilidad *in vitro de Cryptococcus*, varía según el serotipo, la ubicación geográfica, origen y población estudiada, entre otros. En África (Ruanda, Congo, Gabon, Costa de Marfil) y Camboya, realizaron un estudio retrospectivo con 162 aislamientos de *C. neoformans* entre 1998-2001 de pacientes VIH positivos con el objetivo de evaluar la susceptibilidad de Anfotericina B (AMB), Voriconazol (VRC) y Fluconazol (FLC). Los aislamientos fueron sensibles a AMB (0.094µg/ml), excepto en uno de Camboya (MIC 0.125µg/ml). El 50% de los aislamientos africanos, observaron una MIC <8 µg/ml para FLC y en el 22% para los de Camboya. Voriconazol fue sensible en todos los aislamientos. Los resultados de este estudio parecen confirmar que la resistencia de *C. neoformans* a varios azoles no es un fenómeno constante y que el VRC podría representar una alternativa de tratamiento útil para la criptococosis [83].

Pfaller y colaboradores realizaron estudios que involucraron gran diversidad de zonas geográficas, evaluando la susceptibilidad a diferentes antifúngicos en aislamientos clínicos y frente a diversas infecciones fúngicas. En el Programa de Vigilancia Antifúngica ARTEMIS entre 2001-2002, realizó susceptibilidad a 237 aislamientos clínicos de *C. neoformans* a VRC, Posaconazol (PSC) y FLC. Este estudio incluyó países provenientes de cuatro continentes (Asia, Europa, América Latina y Norte América). Las MIC de los fármacos antifúngicos se determinaron mediante pruebas de microdilución en caldo de acuerdo con el CLSI. El 98% de los aislamientos presentaron MIC de <8µg/ml para FLC. En general, PSC y VRC demostraron actividades comparables (MIC 90, 0.12-0.25µg/ml) [84]. En el 2011 este mismo autor, determinó los valores de corte epidemiológico para *C. neoformans*, este análisis fue importante debido a que los puntos de corte de susceptibilidad clínica están ausentes, este tipo de análisis proporciona la interpretación para detectar la resistencia a FLC, PSC y VRC. Utilizaron la colección de 1.271 aislamientos clínicos de esta levadura obtenida de los programas de ARTEMIS y SENTRY, la prueba de susceptibilidad se realizó utilizando las recomendaciones de CLSI. Las MICs para FLC, PSC y VRC fueron 4 mg/L, 0.12 mg/L y 0.06 mg/L, respectivamente [85]. Confirmando que la resistencia a los antifúngicos es poco común entre los aislamientos de *C. neoformans*.

Espinel-Ingroff y colaboradores en el 2012 propusieron puntos de corte para *C. neoformans* y *C. gattii* basados en los tipos moleculares, frente a FLC, VRC y Itraconazol. Incluyeron un total de 2.985 aislamientos de *C. neoformans* y 705 para *C. gattii*, los aislamientos contenían todas las representaciones de los tipos moleculares NVI-VNIV y VGI-VGIV respectivamente. Para determinar la susceptibilidad utilizaron las recomendaciones de CLSI. Las MICs en todos los antifúngicos evaluados presentaron valores diferenciales para cada tipo molecular, para FLC se presentaron tres MICs diferentes: 8 µg/ml (VNI, VGI, VGIIa y VGIII), 16µg/ml (VNIII y VGIV) y 32µg/ml (VGII). En Itraconazol 0,25µg/ml (VNI), 0,5µg/ml (VGI a VGIII), y 1µg/ml (VGIV) y VRC, 0,12µg/ml (VNIV), 0,25µg/ml (VNI, VNIII, VGII y VGIIa) y 0,5 µg/ml (VGI) [86]. Estos resultados pueden llegar aportar en la detección de aislamientos con mecanismos de resistencia adquirida, sin embargo, en la práctica clínica son muy pocos los laboratorios que realizan un diagnóstico hasta tipo molecular.

3. Interacción hospedero-patógeno.

3.1 Factores de virulencia del Cryptococcus.

Los factores de virulencia se han definido clásicamente como: componentes de un patógeno que al ser eliminados deterioran la capacidad patogénica y su virulencia, pero no la viabilidad [87]. Casadevall y Pirofski en el 2001 [88], propusieron una diferenciación de los factores de virulencia en dos componentes relativos y constitutivos, donde la capacidad relativa de un microorganismo para causar enfermedad depende de características específicas que al ser expresada por el microorganismo confiere patogenicidad y la capacidad de causar enfermedad. Estas características sirven para discriminar patógenos de no patógenos. Por otra parte, en los factores de virulencia constitutivos se agrupan factores que el hongo utiliza para crear un nicho ecológico, entre los que podrían estar algunas enzimas como las proteasas y fosfolipasas, los cuales modificarían la magnitud y extensión de la enfermedad pero no son determinantes singulares de la virulencia [88].

Sin embargo, en una mirada igualmente analítica más holística, la propuesta de Kölher y colaboradores, proponen 4 eventos esenciales en la instauración de una micosis, (i) sobrevivir en las condiciones fisiológicas del hospedero (ii) eludir y penetrar barreras de protección (iii), digerir y absorber el tejido del hospedero y (iv) finalmente, evadir la respuesta inmunológica [89].

En relación a lo anteriormente mencionado se describirán tanto los factores de virulencia relativos de *C. neoformans*, donde la cápsula y la melanina son protagonistas, como factores constitutivos incluyendo factores asociados a la adherencia y las enzimas como las fosfolipasas, proteinasas y ureasa, el switching fenotípico y el tipo sexual [90–92]. Todos estos actúan de manera combinada y secuencial, mediante su expresión regulada de manera conjunta y dinámica, logrando la implementación de los cuatro eventos necesarios para establecer la micosis. La termo tolerancia, la capacidad de adaptación intracelular, y la de modular tanto el tamaño de su cuerpo celular como de la cápsula, son comportamientos conjuntos indispensables para la instauración de la criptococosis. En el presente trabajo se evaluó el comportamiento de la expresión de estos factores relativos, cápsula y melanina en cepas clínicas de *C. neoformans*.

3.1.1 Cápsula.

La cápsula es el factor de virulencia relativo más característico y el principal factor de virulencia que determina la capacidad patogénica del complejo de especies que produce la criptococosis [2]. Por este motivo, se ha estudiado con profundidad su estructura, así como, su síntesis y los factores que la regulan como el gen *CAP69* [92,93].

La cápsula se encuentra anclada a la célula por la pared celular. Está constituida por dos polisacáridos repetidos glucuronoxilomanano (GXM) y glucuronoxilomananogalactano (GXMGal), también incluye manoproteínas, ácido hialurónico y ácido siálico [31]. Como característica esencial, la cápsula es capaz de cambiar de tamaño por diversas señales, lo que ha permitido la propuesta de diferentes hipótesis acerca de sus funciones, dentro de las cuales se le atribuye, por ejemplo, en tamaño grandes su capacidad para inhibir la fagocitosis y en tamaños más pequeños el controlar la activación de la vía clásica del complemento. De igual manera, esta estructura ayuda a la levadura a sobrevivir dentro del fagolisosoma [53].

Está notable capacidad de la cápsula de variar de tamaño durante la infección se asocia con la virulencia de *Cryptococcus* en el hospedero mamífero, de hecho, dependiendo de las condiciones ambientales específicas, el tamaño de la cápsula es muy variable, no sólo entre las cepas, sino también entre las células individuales. Varias condiciones ambientales han demostrado inducir el incremento del tamaño capsular: niveles altos de CO₂, bajo nivel de concentración de hierro, valores de pH básico y la presencia de suero de mamífero, entre otros [94]. Esta capacidad cambiar

de tamaño de la cápsula es una característica esencial que ha permitido la propuesta de diferentes hipótesis acerca de sus funciones. Se le atribuye, por ejemplo, en tamaños grandes su capacidad para inhibir la fagocitosis y en tamaños más pequeños el controlar la activación de la vía clásica del complemento. De igual manera, esta estructura ayuda a la levadura a sobrevivir dentro del fagolisosoma [53].

El análisis del genoma ha permitido la identificación de genes involucrados en la síntesis de la cápsula y necesarios para la virulencia de *C. neoformans* como la familia de los genes CAP (*CAP10*, *CAP59*, *CAP60* y *CAP64*) [32,95]. Aunque se conocen muchos otros genes necesarios para la síntesis de la cápsula (*UXS1*, *UGD1* y *CAS31-35*, *CAS1*, *CAS3* entre otros), la función bioquímica de muchas de las proteínas que codifican todavía no se ha caracterizado [96–98]. O'Meara y Alspaugh en el 2012, en una amplia revisión sobre la cápsula de *Cryptococcus* recopilaron los genes involucrados en la síntesis y crecimiento de la cápsula, así como las rutas de transducción de señales involucradas en estos procesos. Entre ellas están la detección de niveles de hierro en el ambiente a través de Cir1, la respuesta a cambios de pH a través de Rim101 y la respuesta a estrés que involucra la ruta de Hog1 y Pka1/AMPC [99].

Por otra parte se ha postulado que el ensamblaje de la cápsula en *C. neoformans* depende de alguna manera de las moléculas transportadas en vesículas que pueden ser secretadas a través de la pared celular, en las que de diversos grupos han reportado que se transportan GXM, GXMGal, pigmentos, proteínas y lípidos [100,101].

3.1.2 Producción de melanina.

La melanina, es el segundo factor relativo. Es sintetizada por familias de enzima tipo Lacasa codificada por los genes *LAC1* y *LAC2*. La expresión de estos genes está regulada por la concentración de hierro, cobre y glucosa entre otros factores [102]. El pigmento se localiza en la pared celular ayudando a mantener su integridad de la pared celular y protegiendo a la levadura de la radiación solar y los radicales libres de oxígeno. La melanina inactiva los mecanismos de muerte intracelular por lo que protege al hongo frente a los oxidantes generados por las células del hospedero, contribuyendo a su capacidad de adaptarse como patógeno intracelular [90,103]. Además, se ha reportado que la melanina protege a *Cryptococcus* de los antifúngicos, incluyendo anfotericina B, caspofungina y los azoles [104,105].

La producción de melanina es igualmente inducible y su producción es afectada también, de manera importante por las condiciones del nicho donde se encuentre la levadura. Se sabe que en presencia de compuestos difenólicos exógenos como la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L- DOPA) *C. neoformans* produce eumelanina de color marrón a través de lacasas (Lac1 y Lac2). Se ha descrito que la regulación de este pigmento es realizada por las vías cAMP y HOG. De igual forma se ha descrito cuatro factores de transcripción *BZP4*, *USV101*, *HOB1* y *MBS1*, y las quinasas Gsk3 y Kic1 involucradas en esta producción. La lacasa es transportada por vesículas secretoras que se depositan como partículas esféricas dentro de la pared celular mediante el uso de quitina como molécula de anclaje o se secretan extracelularmente [101,106–109].

3.1.3 Crecimiento a 37°C.

La termotolerancia, es un rango distintivo de los hongos que son capaces de infectar animales homeotérmicos, por lo tanto la capacidad para crecer a temperatura fisiológica de 37 °C es un factor muy importante ya que le permite causar infección en mamíferos [110]. La razón principal por la cual el complejo de especies *C. neoformans* y *C. gattii* son patógenos exitosos entre las más de 30 especies de *Cryptococcus* es su capacidad para crecer a temperatura fisiológica. Las especies restantes de este género producen el polisacárido capsular con o sin melanina, pero no crecen o crecen pobremente a 37 °C [31].

3.1.4 Enzimas extracelulares.

Dentro de los cuatro eventos necesarios para establecer una micosis, se encuentra la capacidad de digerir y absorber el tejido, las enzimas extracelulares son las que orquestan esta parte.

1. La proteasa degrada proteínas del hospedero que incluyen colágeno, elastina, fibrinógeno, inmunoglobulinas y factores del complemento, entre otros, permitiendo al hongo sobrepasar y eludir las barreras del cuerpo, además de alimentarse para reproducirse y perpetuar la colonización [111].
2. Las fosfolipasas son enzimas que degradan fosfolípidos, contribuyen a la degradación de la membrana de las células del hospedero y por lo tanto a la lisis celular [90,101]. Durante la infección de *C. neoformans* se secreta una isoforma de fosfolipasa B (por el gen *PLB1*), la cual

mejora la supervivencia del hongo dentro del fagocito; además, se ha encontrado que *PBLI* tiene un papel importante en la diseminación extrapulmonar [112].

3. La ureasa (codificada por el gen *URA5*), está implicada de manera importante en la supervivencia dentro del fagosoma; ya que permite al hongo alterar los niveles de pH alcalinizando el medio y desactivando la acción de enzimas como las mieloperoxidasas y la acción oxidativa de los radicales libres de oxígeno, permitiendo la adaptación del hongo como patógeno intracelular [101,103,113].

3.1.5 *Switching fenotípico.*

La capacidad de cambio o switching fenotípico en *Cryptococcus* se define como una alteración reversible entre dos morfologías, mucoide y lisa, debido a las variaciones espontáneas en la expresión de diferentes genes. Se ha descrito que estos cambios se relaciona con aislamientos de mayor patogenicidad [114,115].

La primera detección de cambio fenotípico en *Cryptococcus* fue reportado por Fries y Casadevall en 1998 [115]. El cambio fenotípico siempre conduce a cambios en la virulencia, causando cambios en la cápsula o la morfología de la pared celular que se evidencian de forma macroscópica por observación directa de las colonias [116].

Este cambio le permite evadir el sistema inmune y adaptarse al ambiente del hospedero. Se ha descrito que la colonia mucoide es hipervirulenta [117]. En algunos estudios, también se han encontrado colonias lisas (con menor diámetro de cápsula) en cerebro de ratones infectados, indicando que un menor diámetro le permite a *C. neoformans* y *C. gattii* cruzar la barrera hematoencefálica [118,119].

3.1.6 *Pareja sexual.*

El tipo de apareamiento ha sido considerado un factor de virulencia desde el año 1992, en un experimento en un modelo murino, se estableció que las cepas MAT α eran más virulentas que las cepas MAT α [120]. En el único brote reportado en 1999 en animales y humanos en la isla de Vancouver (Canadá) fue causado por el serotipo B tipo molecular VGIIa y VGIIb, pareja sexual MAT α [121]. Además, en aislamientos clínicos y ambientales es más frecuente el reporte de pareja

sexual “ α ” que tipo “a”. También se ha descrito que el tipo de pareja sexual “ α ” está relacionada con procesos de división acelerados [45].

3.1.7 Cambios morfológicos en el tamaño total de la célula.

Recientemente se ha descrito un cambio morfológico característico de *Cryptococcus* que afecta el tamaño de la cápsula y el tamaño total de la célula incluyendo el cuerpo celular. Por lo tanto, durante la infección aparecen células que aumentan de manera global el tamaño, formando lo que se ha denominado células tipo titán o gigantes que pueden alcanzar tamaños que varía de 15 a 100 μm . *in vitro*, generalmente el tamaño de una célula de *C. neoformans* tiene un diámetro entre 4-9 μm [122]. Las características principales de este tipo de células es que son poliploides y la hipótesis que sugieren diversos autores es que se forman por un proceso de endoreduplicación. Se ha observado que en modelos murinos este tipo de células están presentes en el pulmón, donde el porcentaje de células gigantes es muy bajo (2-5%) entre las células recuperadas [119,122,123].

3.2 Respuesta inmune frente a la Criptococosis.

La interacción entre *C. neoformans* y el sistema inmune es muy compleja y ha sido ampliamente estudiada. Diversos estudios han determinado los mecanismos de infección de *Cryptococcus* y demuestran que la levadura tiene la capacidad de adherirse a diversas células del epitelio pulmonar. Diferentes mecanismos de la inmunidad innata interfieren con el establecimiento de una infección por *Cryptococcus* spp. En primer lugar, las barreras físicas como la piel y mucosas. Al ingresar a los pulmones, las células de *Cryptococcus* son reconocidas por las células inmunes innatas del hospedero como las células dendríticas, endoteliales y macrófagos alveolares. El papel de éstas es fagocitar a la levadura, además de presentar antígenos de *Cryptococcus* a las células T, induciendo la producción de citoquinas y quimiocinas e iniciando la respuesta inmune adaptativa. Los macrófagos alveolares y las células dendríticas juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune anti-criptocócica y unen el sistema inmune innato y adaptativo durante la infección por *C. neoformans*. Las células T CD4+ promueven la protección contra la infección por *Cryptococcus* promoviendo la respuesta inmunitaria Th1 [124].

Los pacientes en estado SIDA con recuento de células T CD4+ por debajo de 200 cc^3 son susceptibles a la infección. Se ha descrito una relación entre el desarrollo de una respuesta inmune

Th1, promovida por IL-12 e interferón gamma, y la protección frente a *Cryptococcus* [125,126]. En contraste, una respuesta Th2, basada en la producción de anticuerpos e inducida por IL-1, IL-10, IL-13, se ha asociado a la no protección frente a *Cryptococcus* [127].

El sistema complemento es importante en la respuesta inmune innata y un mediador clave de la fagocitosis de *Cryptococcus* [128,129]. La cápsula de la levadura activa el sistema del complemento, principalmente a través de la vía alternativa, lo que conduce al depósito de C3 en la cápsula fúngica [128].

3.3 Cryptococcus como patógeno intracelular facultativo y diseminación al sistema nervioso central.

Cryptococcus pertenece al grupo de patógenos que son capaces de evadir la muerte y proliferar intracelularmente, por lo que es considerado un patógeno oportunista intracelular. Una vez internalizado en el macrófago, se han observado varios fenómenos. En primer lugar, las células de la levadura comienzan a replicarse ocasionando agregaciones que conllevan la formación de vacuolas. Además, la levadura puede escapar de las células fagocíticas de diferentes maneras como una replicación intracelular masiva de las levaduras que puede resultar en la explosión del macrófago u otros mecanismos como la extrusión o vomocitosis que consiste en la salida de *Cryptococcus* de las células fagocíticas a través de un proceso similar a la exocitosis [130].

La capacidad para diseminarse y alojarse en el cerebro tras cruzar la barrera hematoencefálica es uno de los aspectos más importantes de la criptococosis [131]. Dentro del fagosoma se agrupan diversas células fúngicas que, al estar dentro del fagolisosoma, intervienen en un mecanismo denominado caballo de Troya, ya que estas células internalizadas no son detectadas por el sistema inmune y pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Posteriormente, las células son liberadas en el SNC. Además, la capacidad de replicación intrafagosómica también permite una infección hematogena [130]. Existe además otro mecanismo por el cual las levaduras pueden pasar al SNC, es un fenómeno de transcitosis donde las células adquieren morfología ovoide [132,133] (**figura 5**).

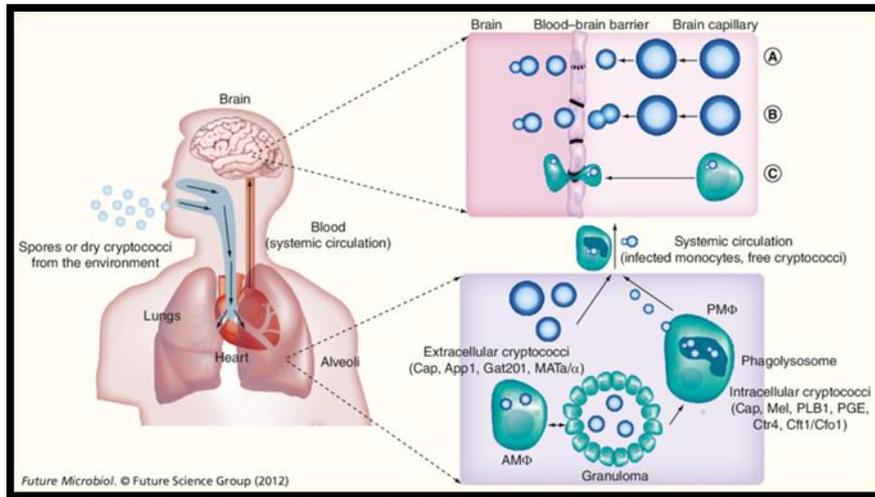


Figura 5. El modelo de diseminación de *Cryptococcus* del medio ambiente al cerebro humano. Figura tomada de Sabiiti W, *et al.*, 2012 [54].

4. Papel de los metales hierro y cobre en la criptococosis.

4.1 Papel del hierro y del cobre en el proceso patogénico de *Cryptococcus neoformans*.

Los metales de transición como el hierro y el cobre están involucrados en varios procesos biológicos por lo que constituyen un grupo esencial de minerales para la supervivencia de todos los organismos vivos. Los metales se encuentran regulados mediante mecanismos homeostáticos, se incorporan frecuentemente en metaloproteínas que incluyen metaloenzimas, proteínas de almacenamiento y factores de transcripción. Los papeles funcionales de los metales de transición en los sistemas biológicos pueden desglosarse en funciones no catalíticas, catálisis redox y no redox [134].

El hierro influye en la virulencia en hongos patógenos, numerosos estudios demuestran la relevancia de la adquisición de hierro en *Cryptococcus* spp para la infección sistémica exitosa influyendo en el tamaño capsular y en la producción enzimática [135–137]. El cobre es esencial para el crecimiento celular, pero el exceso de este elemento en el hongo puede ser tóxico. Adicionalmente han sido descritas proteínas con función en el metabolismo de ambos metales, así entre las proteínas de unión a cobre se incluyen los transportadores de adquisición de hierro, la superóxido dismutasa (*SOD*) y la citocromo C oxidasa [7].

4.1.1 Papel del hierro, en el proceso patogénico de *C. neoformans*.

El hierro es un cofactor en reacciones intracelulares de oxidación-reducción como la respiración mitocondrial, el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de ácidos nucleicos o regulación génica [135]. Aunque es muy abundante en el entorno es insoluble a pH fisiológico y bajo condiciones oxidativas, por lo que aparece como un recurso escaso con una baja biodisponibilidad [138]. El organismo debe almacenarlo para utilizarlo en reacciones biológicas; pero al mismo tiempo debe protegerse del efecto tóxico de sus radicales libres, ya que pueden penetrar en las membranas, dañar las mitocondrias, lesionar órganos vitales y participar en la patogénesis de diversas enfermedades, como endometriosis, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple entre otras [139,140]. Por otra parte, también se ha documentado que, en ambientes con alta biodisponibilidad de hierro, puede convertirse en un factor que promueva enfermedades infecciosas. Un escenario posible para esto lo constituyen los pacientes con VIH para meningitis, dado que es común que pacientes con VIH presenten anemia y el tratamiento es basado en suplementos férricos [141,142]. Los estados patológicos de sobrecarga férrica modifican esta delicada homeostasis y aumentan la disponibilidad de hierro libre en el organismo.

Con respecto a la relación de hierro y los mecanismos de patogenicidad en *Cryptococcus*, se ha descrito su influencia sobre la activación de genes capsulares, así como de enzimas tipo lacasa, entre otros factores de virulencia activados a través del factor metaloregulador *CIRI* [135,142–144]. Trabajos pioneros como los de Eric Jacobson, establecieron el marco genético y fisiológico de la adquisición del hierro por *C. neoformans* [145]. Estos trabajos analizaron una serie de expresión de genes (SAGE) empleados para evaluar la respuesta del hongo a la escasez del hierro, logrando identificar patrones generales de expresión genética así como funciones específicas relacionadas con la utilización del hierro, como su adquisición por la permeasa del hierro *CFTI* que es altamente expresada durante la infección [146,147].

Por lo anteriormente descrito se considera que los hongos han desarrollado mecanismos complejos de captación y almacenamiento que les permiten competir de forma exitosa por este elemento en el medio. En *Cryptococcus spp* se han descrito cuatro formas de captación:

- **Expresión de proteínas con actividad reductasa (permeasa y ferroxidasa (Cfo1, Cft1)).**

La reducción extracelular del hierro en estado férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) mediante la acción de enzimas localizadas en la pared fúngica constituye uno de los mecanismos empleados por

hongos levaduriformes. En presencia de bajas concentraciones de hierro estos hongos pueden expresar sistemas de transporte de alta afinidad dependientes de cobre (Ctr3) [8,137] (**figura 6a**).

- **Síntesis y secreción de sideróforos.** Los sideróforos (Sit1) son moléculas secretadas por la célula de bajo peso con actividad quelante del hierro. Actúan como un mecanismo de captación al que recurren algunos microorganismos en condiciones ambientales extremas. Una vez unidos al hierro, los sideróforos introducen este elemento en el interior de la célula mediante diversos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos [137,148] (**figura 6b**).
- **Enzimas con actividad hemooxigenasas (Hmx1).** Una gran parte de las reservas de hierro en los mamíferos se encuentran en forma de grupo hemo. Algunos hongos, han desarrollado sistemas enzimáticos con actividad homóloga a la de la hemooxigenasa humana, que son capaces de liberar el hierro de la hemoglobina tras la lisis eritrocitaria [149] (**figura 6c**).
- **Acidificación del medio en condiciones anaerobias.** Algunos hongos pueden obtener el hierro gracias a la formación de hidrogeniones libres los cuales desplazan al elemento de su unión con la transferrina sérica, permitiendo así su captación. El pH ácido induciría la liberación del hierro libre desde las proteínas transportadoras, favoreciendo el crecimiento fúngico [150,151] (**figura 6d**).

Una vez internalizado el hierro extracelular en estado férrico (Fe^{3+}) es oxidado mediante la acción de enzimas localizadas en la pared fúngica al estado ferroso (Fe^{2+}) por reductasas de hierro (familias de proteínas Fre), luego son importadas por un complejo de permeasas, Ftr y proteínas multicobre Fet que se unen entre si Ftr-Fet. Además, *C. neoformans* utiliza pequeñas moléculas de ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA), así como la melanina para reducir hierro [141]. La fenoloxidasasa regula la biosíntesis de melanina por los niveles de hierro. Se sabe que existen varios genes implicados en la producción de melanina que son requeridos para la absorción de hierro, como *LAC1*, *ATX1* y *CCC2* entre otros; además, genes implicados en la regulación transcripcional de hierro (*CIR1*), reducción de la absorción de hierro (*FRE4*) y la captación de Fe por medio de xeno-sideróforos son factores que influyen la formación de melanina [108,152]. Para *C. neoformans* se han caracterizado varias proteínas Fre importantes (Fre1-Fre7 y Fre201), principales permeasas y ferroxidasas. La expresión de los genes Fre está regulada por hierro y

cobre. De estas reductasas, Fre2 está implicada en la utilización de Fe hemo y ferritina y participa en la virulencia del hongo y Fre4 está asociada con la producción de melanina [137,150,151,153]. La función de Ccc1 es transportar intracelularmente el hierro en el citosol y este es almacenado y empleado cuando hay niveles bajos de hierro liberado por oxidasas (Fth1 y Fet5) en el espacio citosólico (**figura 6**).

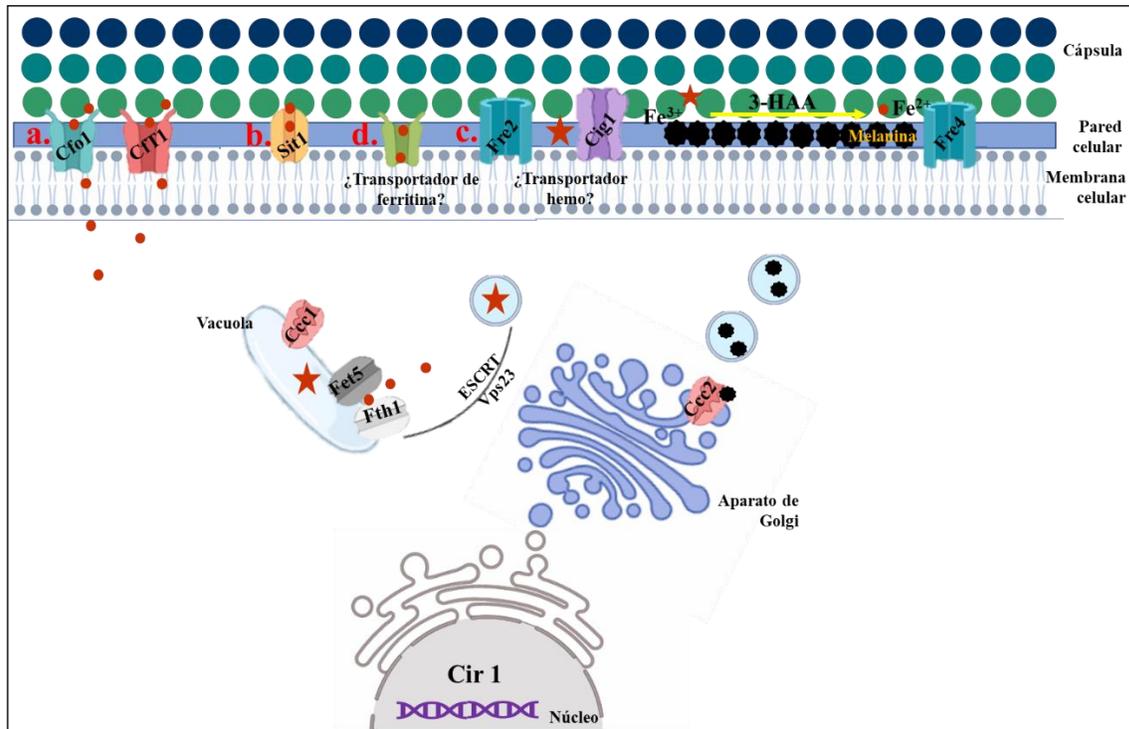


Figura 6. Mecanismos de captación de hierro en *C. neoformans*: a) proteínas de captación Oxido-reducción b) captación de hierro a través de sideróforos, c) captación de la hemoglobina y d) acidificación del medio. Figura tomada de Chen D, et al., 2014 [7] y modificada por el autor mediante el software Biorender.

Finalmente es importante explorar la influencia de hierro en la patogenicidad de esta levadura y la relación entre los niveles de este metal y la expresión de factores de virulencia como el polisacárido capsular y la producción del pigmento de melanina [102,154].

4.1.2 Papel del cobre en el proceso patogénico de *C. neoformans*.

El cobre como metal de transición está involucrado en reacciones redox en el organismo ya que gana y pierde electrones con facilidad, lo que también hace que se vuelva potencialmente

tóxico [8]. Participa en diversas funciones en el hospedero: es esencial para el sistema inmunológico, nervioso y cardiovascular [155].

El cobre se requiere para la supervivencia de células fúngicas patógenas y de las células de mamíferos anfitriones [156]. Estudios recientes muestran que el cobre tiene un papel importante en la virulencia de *C. neoformans*. Las funciones del cobre están relacionadas con la formación de melanina, la absorción de hierro, la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y la respiración; además, también se ha demostrado una relación directa entre el aumento de la concentración de cobre y el aumento del tamaño capsular [157].

Se han descritos dos vías de regulación relacionadas con los niveles de cobre en las que intervienen la permeasa Ctr1 y la fenoloxidasas Ctr4 [158]. *Cryptococcus* spp. al encontrarse con niveles altos de cobre en el hospedero activa la maquinaria de desintoxicación mediante las proteínas de membrana Cmt1 y Cmt2 [7,159]. El importador Ccc2 es una proteína conservada que permite la entrada de cobre a través de la hidrólisis de ATP, recibiendo cobre a través de la chaperona Atx1 por medio de la interacción directa proteína-proteína. Posteriormente, el cobre es almacenado en aparato de Golgi. En *C. neoformans* la eliminación de Atx1 o Ccc2 afecta significativamente la formación de melanina y potencialmente influye en la virulencia (**figura 7**) [7,158,160].

La función principal de superóxido dismutasa (SOD) es proteger a las células de anión superóxido generado endógenamente, que es un subproducto de la respiración aeróbica normal. SOD puede hacer un complejo con hierro, manganeso, cobre y zinc. Las SODs son metaloenzimas que desintoxican de los radicales de oxígeno a través de la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno [161]. Se ha observado que el complejo de SOD con Cu, Zn [160–162] ayuda a la homeostasis de *C. neoformans* para la formación capsular, melanización, apareamiento y una mayor resistencia a la fagocitosis [163]. Cabe resaltar que la absorción de cobre media la captación de hierro a través de transportadores dependientes de estos metales, en la cual están involucradas proteínas Fet3 [164].

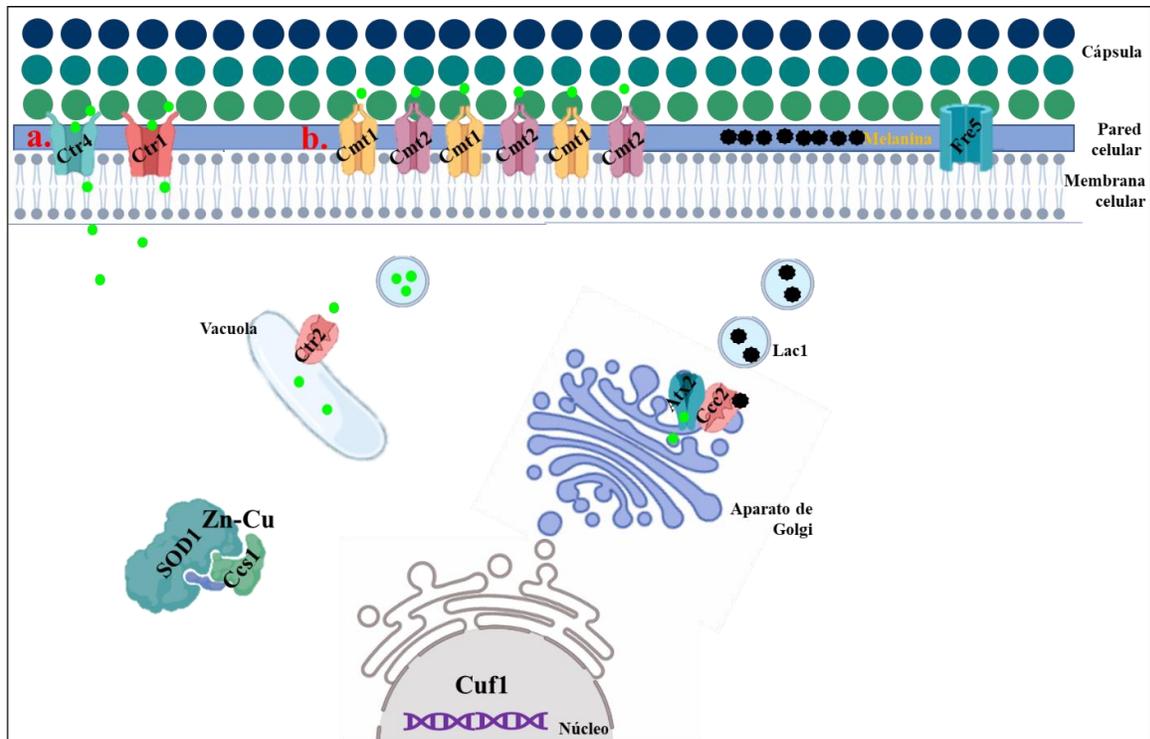


Figura 7. Modelo de adquisición de cobre en *C. neoformans* a) mecanismo de captación por permeasas y fenoloxidasas b) proteínas desintoxicación. Figura tomada de Chen D, et al., 2014 [7] y modificada por el autor mediante el software Biorender.

4.2 Papel del hierro en la respuesta inmune frente a la *Criptococosis*.

Los metales que son requeridos como micronutrientes son esenciales como núcleos en múltiples metaloenzimas como aceptores de electrones, en proceso fisiológicos claves en la función celular en múltiples sistemas como: el sistema inmunológico, el nervioso y el cardiovascular entre otros. Aproximadamente el 50% de las proteínas oxidorreductasas u otras proteínas de transferencia de electrones utilizan los metales hierro (Fe) y Cobre (Cu). Para prevenir la infección por microorganismo patógenos, los humanos, al igual que otros vertebrados, restringen el acceso a los metales esenciales o dirigen la toxicidad de estos metales contra los invasores patógenos. Este es un proceso denominado "inmunidad nutricional" [1].

El hierro es el metal de transición más abundante en el cuerpo humano. El cofactor hemo-Fe es importante para la respiración, así como varios procesos biosintéticos y metabólicos. Este metal se almacena intracelularmente unido a la proteína ferritina. Las proteínas de los macrófagos (como Nramp2) están implicadas en la susceptibilidad del hospedero a las enfermedades infecciosas y

participan en la absorción de hierro. Estas proteínas se localiza en la membrana fagosómica donde bombean hierro y magnesio, reduciendo aún más el acceso a estos metales de patógenos intracelulares que residen dentro de un fagosoma [165]. A pH fisiológico, el Fe^{2+} (ion ferroso) extracelular se oxida al Fe^{3+} (ion férrico) insoluble y se moviliza mediante la proteína transferrina sérica. El Fe^{3+} está limitado por la lactoferrina, una glicoproteína globular de la familia de la transferrina que está presente en secreciones tales como la leche materna, las lágrimas y la saliva, además está presente en los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares y por lo tanto, es un componente crucial de la respuesta innata de la mucosa a la infección [166].

4.3 Papel del cobre en la respuesta inmune frente a la Criptococosis.

El cobre también tiene un papel en la defensa innata. La acumulación de este metal en los sitios de infección se demostró por primera vez en las infecciones pulmonares de *M. tuberculosis*, donde se encontró que la resistencia a cobre es necesaria para su virulencia [167]. En el hospedero mamífero, los microorganismos se encuentran con el cobre dentro de los fagolisosomas de los macrófagos. El interferón gamma induce la expresión del transportador de cobre Ctr1, que absorbe activamente cobre del medio extracelular. Posteriormente, la proteína Atox1 envía el cobre a Atp7A, un transportador de cobre en la membrana fagolisosómica, lo que facilita la acumulación de cobre dentro de este compartimiento [168]. También se ha descrito que el cobre produce daño oxidativo produciendo radicales hidroxilo [168].

En resumen, la restricción del hospedero de los metales como cobre y hierro, así como su biodisponibilidad representa un aspecto fundamental en la interacción del hospedero con la levadura donde el sistema inmunitario sabe aprovechar el potencial tóxico de los metales en una batalla para contrarrestar la infección por *C. neoformans*.

5. Proteómica una herramienta para el estudio de hongos patógenos.

El objetivo de la proteómica es analizar los diferentes proteomas (o conjunto de proteínas de células o tejidos en unas condiciones determinadas) de un organismo. También puede comparar esos proteomas en diferentes momentos para resaltar las diferencias entre ellos, además, la proteómica complementa la genómica. Las células de un organismo multicelular tienen el mismo conjunto de genes, el conjunto de proteínas producidas es diferente y depende de la expresión

génica. Por tanto, el genoma es constante, pero el proteoma varía y es dinámico dentro de un organismo [169,170].

En las últimas dos décadas, los avances en el campo de la proteómica basada en espectrometría de masas (MS) han dado como resultado un aumento constante en la información sobre la dinámica de los procesos celulares, modificaciones e interacciones de las proteínas, entre muchos otros estudios proteómicos se han centrado en el desarrollo de antifúngicos y estudios de expresión de proteínas relacionadas con factores de virulencia [101,171–173]. Este tipo de aproximaciones proteómicas basadas en MS utilizan cromatografía líquida acoplada a MS *en tándem* (LC-MS/MS) para el análisis de las proteínas y se caracteriza por utilizar distintos flujos de trabajo (ver **figura 8**): a) *Bottom-up proteomics* que analiza proteínas intactas para la identificación y cuantificación de proteoformas únicas después de la separación de proteínas por tamaño y aislamiento de picos; b) *Top-down proteomics* que mide los péptidos obtenidos tras la digestión de las proteínas mediante enzimas proteolíticas para la identificación y cuantificación; c) Proteómica dirigida o *targeted proteomics* que mide un conjunto predefinido de péptidos para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas, y se asocia con el desarrollo de biomarcadores [174,175].

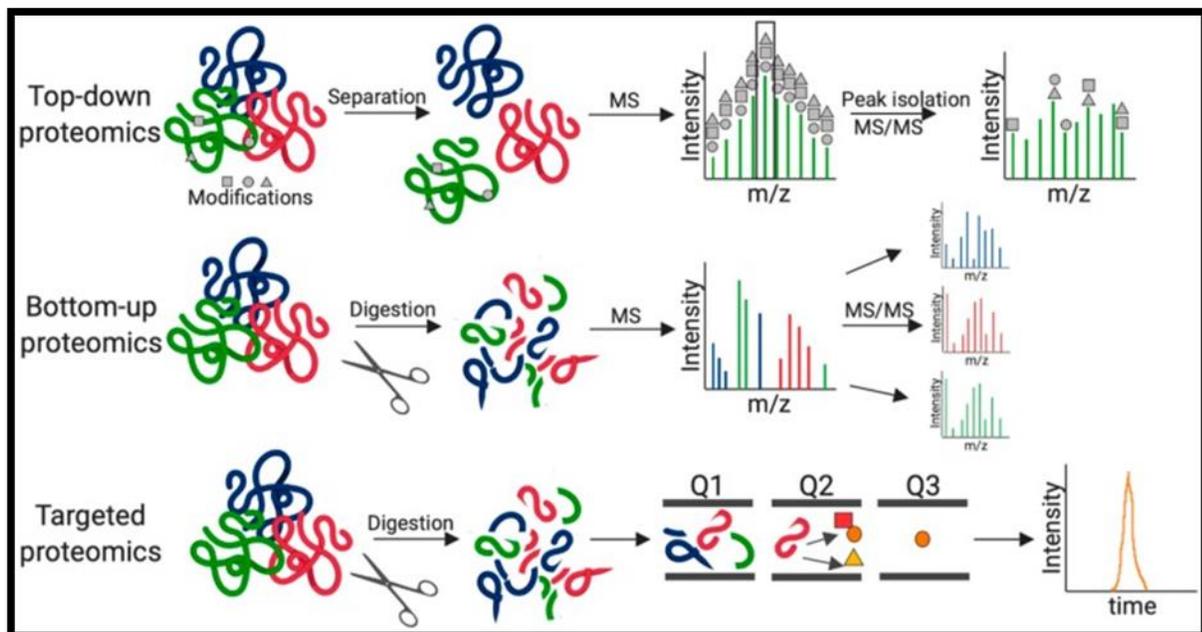


Figura 8. Flujos de trabajo de proteómica basados en proteómica basada en espectrometría de masas (MS). Tomado de [175].

La investigación en este campo permite obtener información valiosa a diferentes niveles de distintos sistemas fúngicos. Con distintas estrategias se señala que los análisis proteómicos permiten analizar: a) compartimentos celulares para obtener el perfil de proteoma total, incluyendo orgánulos, la pared celular, proteínas intracelulares y en *C. neoformans* hasta el polisacárido capsular b) el entorno extracelular para obtener el perfil del secretoma que incluye proteínas y péptidos secretados, así como vesículas liberadas activa o pasivamente por la célula, c) estados de supervivencia que incluyen la producción de esporas o células de levadura desecadas y la formación de biopelículas. Además, dependiendo del enfoque también es posible validar regiones codificantes de proteínas (anotación), identificar biomarcadores, determinar proteínas modificadas postraduccionalmente (p.e. fosforiladas), identificar interacciones proteínas-proteínas y ver cambios de abundancia [169,170,175].

Aunque son muchas las ventajas de la proteómica existen factores que determinan la calidad de los resultados obtenidos y estos deben ser tratados con diseños experimentales adecuados y buenas prácticas en laboratorio. En otras palabras, la elección del modelo experimental y el diseño estadístico, además de la preparación de la muestra son fundamentales para obtener resultados significativos y confiables[176–178]. Otras particularidades a tener en cuenta en este tipo de experimentos son: a) rango dinámico de la abundancia de las proteínas, b) el contenido de proteínas es distinto entre tipos celulares, c) la composición del proteoma puede variar como respuesta a diferentes estímulos, y d) dichas respuestas son diferenciales en tiempo y en espacio [179–182].

Las proteínas secretadas por el patógeno fúngico *C. neoformans* tiene funciones en varios aspectos de la fisiología celular y el estilo de vida, incluida la adquisición de metales, la remodelación de la pared celular, la señalización, la detección de quórum y la defensa contra otros organismos, además, pueden estar involucradas en la invasión y así obtener metales y modular la respuesta inmunitaria del hospedero, por lo tanto el estudio de proteínas son útiles para el diseño de nuevo blancos terapéuticos así como de vacunas [183–185].

6. Galleria mellonella, modelo invertebrado para evaluar la capacidad patogénica de cepas de C. neoformans.

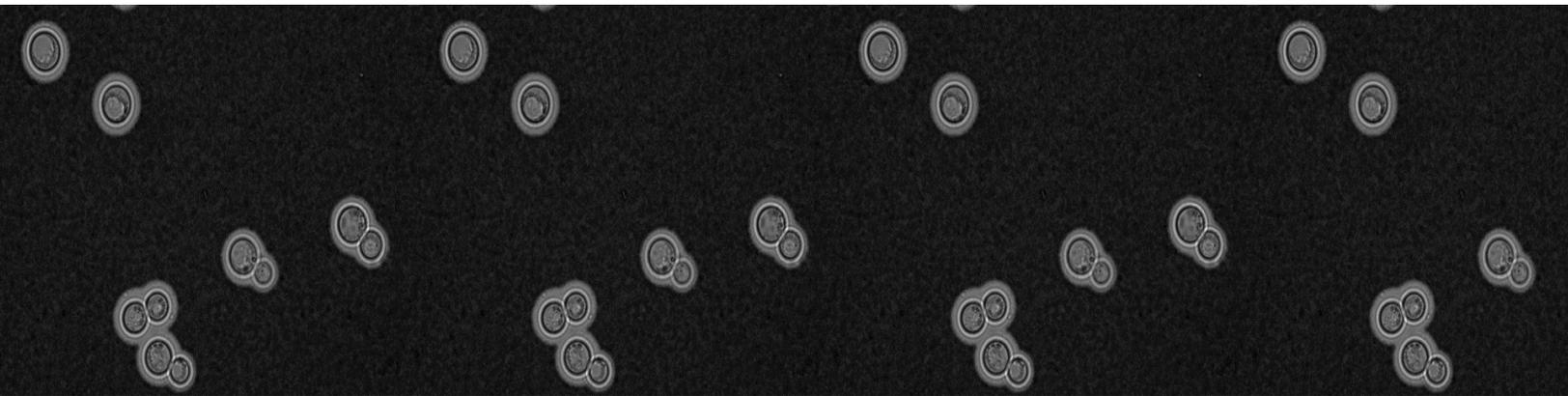
La virulencia de los patógenos humanos se ha estudiado clásicamente en mamíferos, siendo el ratón el modelo más utilizado. En los últimos años, se ha mostrado interés por el uso de otros

modelos alternativos no vertebrados como *G. mellonella*, debido a los costos y las implicaciones bioéticas que supone la experimentación con modelos mamíferos [186].

La larva de *G. mellonella*, que es un paso de la metamorfosis de una polilla perteneciente al orden lepidóptero, suborden Glossata y clado Ditrysia, se ha utilizado como modelo de patogenicidad para diversas especies de hongos patógenos como *C. neoformans*, *C. gattii*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides lutzii* [187–190].

En células de mamíferos la respuesta a la infección está compuesta por la respuesta inmune adaptativa e innata, pero en animales invertebrados solo existe respuesta innata y por ende no hay producción de inmunoglobulinas. Sin embargo, los invertebrados y específicamente los insectos poseen mecanismos de respuesta efectivos, mediados por la presencia de hemocitos con actividad fagocítica similar a la de macrófagos y neutrófilos presentes en la respuesta innata de mamíferos [188–191]. En el modelo de *G. mellonella*, las levaduras de *C. neoformans* al ser inoculadas en la larva son fagocitadas por parte de los hemocitos que representan la respuesta inmunitaria celular de *G. mellonella*.

Se ha observado cambios morfológicos en cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*, durante la infección en *G. mellonella* que incluyen el incremento en el tamaño de la cápsula [191]. La utilización de este modelo puede ayudar a entender los mecanismos que resultan en el desarrollo de la infección causada por *C. neoformans* y *C. gattii* [186,191–193]. Otra ventaja del uso de este modelo, radica en la facilidad de manejo en el laboratorio y la alta reproducibilidad mostrada con los modelos de mamíferos [186].



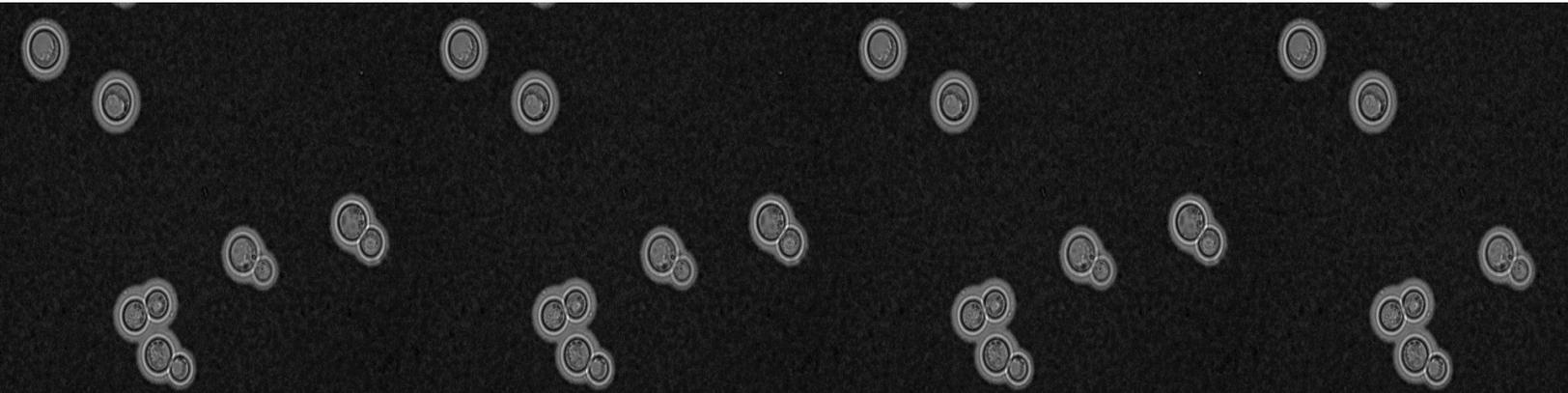
OBJETIVOS

1. Objetivo general

Caracterizar el genotipo, la virulencia, el proteoma y el efecto del hierro y del cobre sobre la modulación de la patogenicidad en 29 aislamientos clínicos colombianos de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*.

2. Objetivos específicos

- 2.1 Caracterizar el genotipo y determinar la variabilidad patogénica de 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, con aproximaciones experimentales que incluyen el modelo invertebrado *Galleria mellonella*, la medición de la cápsula, la melanina, la susceptibilidad antifúngica, y el estudio de polimorfismos de genes asociados al proceso patogénico.
- 2.2 Evaluar el efecto de hierro y cobre en la patogenicidad, el tamaño capsular y la producción de melanina en aislamientos clínicos de alta y baja patogenicidad de *C. neoformans* var. *grubii*.
- 2.3 Analizar los cambios proteómico inducidos por el hierro y el cobre y determinación de variantes genéticas en genes asociados con hierro y con cobre en dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* de baja y alta patogenicidad.



METODOLOGÍA

1. Material biológico: características biológicas y epidemiológicas.

Se seleccionaron 29 aislamientos clínicos por medio de un muestreo estratificado por conveniencia de la colección de *Cryptococcus* del grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud en Colombia. Los aislamientos corresponden a *C. neoformans* var. *grubii* tipo molecular VNI según datos obtenidos por PCR Huella Digital y RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), el 89.6% (n=26) de los aislamientos fueron pareja sexual alfa y el 10.3% (n=3) restante fueron tipo de pareja sexual “a”, estos datos moleculares fueron suministrados por el Instituto Nacional de Salud.

Los aislamientos provenían de seis departamentos (Atlántico, Antioquia, Cauca, Meta, Norte de Santander y Valle). De los 29 aislamientos seleccionados solo 23 tenían la encuesta epidemiológica. El 73.9% correspondían al sexo masculino, el promedio de la edad fue 41 años (V. mín: 21 y V. máx: 72), el síntoma más común fue dolor de cabeza (87%), seguido de náuseas y vomito (65.2%) y fiebre (60.9%); y, en menor proporción confusión, alteración visual, tos y pérdida de peso. El 86.9% de los casos presentaban algún factor de riesgo, el más común fue VIH/SIDA+ (82.6%), de los cuales el 21.7% definió SIDA al momento de diagnosticarles la criptococosis, el 21.7% de los casos fallecieron (**anexo 1**).

Estos datos fueron suministrados por medio de la vigilancia pasiva voluntaria para el estudio de la criptococosis en el país, liderada por el laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS). Los datos se obtuvieron a través de la encuesta epidemiológica sobre la criptococosis, aprobada por el comité de ética del INS que es enviada junto con el aislamiento.

2. Microorganismos de referencia y medios de cultivo.

Las cepas utilizadas en este trabajo se encuentran descritas en el **anexo 2**. En todos los experimentos realizados se empleó la cepa de referencia *C. neoformans* var. *grubii* H99 [194] obtenida del cepario del Instituto Nacional de Salud en Colombia, caracterizada por ser una cepa de alta patogenicidad. La cepa *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 se utilizó para el ensayo *in vivo* en *G. mellonella* del primer objetivo, caracterizada por ser una cepa de baja patogenicidad.

Cada aislamiento ha sido mantenido a -80 °C se sembró en agar Sabouraud dextrosa (SDA) al 2% de glucosa a 35 °C durante 48 horas.

- ✓ Para evaluar el efecto de hierro y cobre en los aislamientos clínicos de *C. neoformans* se implementó el medio mínimo descrito por Vartivarin 1993 [154], brevemente: glucosa 5gr, L-asparagina 5gr, cloruro de calcio dihidratado 25gr, tiamina 0.4 mg, Sulfato de zinc heptahidratado 1.2 mg, cloruro de magnesio tetrahidratado 0.01 mg, sulfato de magnesio heptahidratado 80 mg, sodio molibdato 0.46 mg y ácido bórico 0.057 mg.
- ✓ Para evaluar la patogenicidad en *G. mellonella* las levaduras se incubaron en medio líquido de Sabouraud a 35 °C durante 48 horas.
- ✓ Para inducir el crecimiento capsular en *C. neoformans*, las células se incubaron en Sabouraud diluido al 10% con MOPS 50 mM, pH 7.3 a 37°C durante una noche.
- ✓ La inducción de células titán se realizó como lo describió Zaragoza O, et al [122], brevemente el medio de inducción de células titán (TCM) contiene, caldo Sabouraud al 5%, suero al 5% y azida 15 µM en MOPS 50 mM, pH 7.3.
- ✓ Para inducir la melanización de las levaduras, las células se inocularon en medio mínimo (glucosa 15 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 29.4 mM, glicina 13 mM y tiamina 3 µM, pH 5.5 ajustado con K₂HPO₄ 1M o ClH 1N) con o sin L-DOPA 0.2 mM (Sigma Aldrich) a 30°C. La melanización pudo observarse como colonias de color marrón oscuro.

3. Cinética de crecimiento.

Para la evaluación del efecto del hierro y el cobre sobre el crecimiento de la cepa control H99 se ajustó un inóculo de 2×10^5 UFC/mL en 3 mL de medio mínimo siguiendo las concentraciones para este medio descritas por Vartivarin 1993 [154], a continuación, se ajustaron concentraciones de 5, 50, 500 µM de hierro (FeCl₃.6H₂O) y 1,10, 500, 1000 µM de cobre (CuSO₄.5H₂O). De cada concentración, se sembraron 100 µl en placas de 96 pocillos y se añadieron 100 µl del inóculo ajustado. Luego, se realizaron curvas de crecimiento usando el sistema Bioscreen leyendo cada 30 minutos la O.D. a 600 nm durante 48 horas a 35 °C. se realizaron tres replicas biológicas.

4. Patogenicidad de *C. neoformans* en *G. mellonella*.

La determinación de la patogenicidad de los aislamientos clínicos se realizó como se describió por Mylonakis en el 2005 [186]. Brevemente, los aislamientos se cultivaron en caldo glucosado Sabouraud al 2% toda la noche a 35 °C y 110 rpm. Finalizado este tiempo se preparó suspensiones celulares de 1.5×10^8 células/mL utilizando una cámara Neubauer, posteriormente, se infectaron

10 µl de este inóculo en la última pro-pata izquierda en las larvas de *G. mellonella* utilizando una jeringa de insulina de 50U [191,192].

Para la determinación del efecto del hierro y el cobre en la patogenicidad tanto la cepa referencia (H99) como los aislamientos se cultivaron en caldo glucosado de Sabouraud al 2% a 35 °C con agitación (110 rpm) 15 horas. Transcurrido este tiempo, 5 mL de los cultivos se centrifugaron a 1300 rpm por 15 minutos y el pellet obtenido se lavó tres veces con PBS. De cada una de las cepas a ensayar se ajustó un inóculo a 1.5×10^8 células/mL utilizando una cámara Neubauer y se precultivaron en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de hierro (5, 50, 500 µM), cobre (1,10, 500, 1000 µM) a 35 °C con agitación (110 rpm) durante 15 horas. Finalizado este tiempo, los cultivos se lavaron con PBS y se prepararon nuevas suspensiones celulares de 1×10^7 células/mL utilizando una cámara Neubauer. Se infectaron 10 µl de este inóculo en la última pro-pata izquierda en las larvas de *G. mellonella*.

Para cada cepa y concentración evaluada se utilizaron 10 larvas y tres réplicas biológicas. Se realizó un seguimiento diario durante 15 días, registrando el número de larvas vivas y muertas. Los ensayos se validaron utilizando grupos de larvas: control absoluto (control de calidad de cada lote de larvas), desinfección (control de lavado con solución de hipoclorito), inoculación (control de inoculación con PBS, para evaluar el daño locomotor causada por la inoculación). Las larvas se obtuvieron de un criadero de Scientia (Cali- Colombia), se seleccionaron larvas en etapa tardía (quinta y sexta) con pesos entre 250 y 330 mg y una longitud de aproximadamente 2 cm.

5. Efecto del cambio del tamaño capsular pre y post inoculación en G. mellonella.

Los aislamientos se cultivaron en caldo glucosado Sabouraud al 2% overnight a 35 °C y 110 rpm, finalizado este tiempo se prepararon suspensiones celulares de 1.5×10^8 células/mL utilizando una cámara Neubauer, posteriormente, se infectaron 10 µl de este inóculo en la última pro-pata izquierda en las larvas de *G. mellonella* utilizando una jeringa de insulina de 50U. Para determinar el efecto del cambio del tamaño capsular pre y post inoculación en *G. mellonella*, se recuperaron las cepas de la larva después del ensayo de supervivencia, donde la media mortalidad indicó el día de sacrificio para las larvas. Cada larva muerta fue macerada y homogeneizada en 1 mL de PBS.

A continuación, se preparó un portaobjetos microscópico que contenía una gota de tinta china y una gota de cada cepa y se visualizó en un microscopio Zeiss Axiophot a 80x. Se midió el área

total de células y cápsulas (se midieron 50 células para cada aislamiento). El tamaño de la cápsula se definió como la diferencia entre el tamaño de la célula completa (célula de levadura + cápsula) y el tamaño del cuerpo celular (limitado por la pared celular).

6. Inducción del tamaño de la cápsula.

Las células de la levadura se cultivaron a 35 °C durante 24 horas y 110 rpm en medio mínimo a 50 µM de hierro (FeCl₃.6H₂O), 500 µM de cobre (CuSO₄.5H₂O) y su combinación. Finalizado este tiempo, los cultivos se lavaron con PBS y se prepararon suspensiones celulares a 10⁸ células/mL en medio inductor de cápsula (Sabouraud al 10% en MOPS 50 mM a pH 7.3), los cultivos se incubaron a 37 °C durante la noche con agitación [93]. A continuación, se realizó una tinción negativa con tinta china, se preparó un portaobjetos que contenía una gota de tinta china y una gota de cada aislamiento, se visualizó en un microscopio Leica DMI 3000B (Leica Microsystems). Las imágenes se adquirieron en campo claro con objetivos de 40x o 63x y se midió el tamaño de la cápsula y el cuerpo celular (delimitado por la pared celular) en 50 células utilizando el programa Fiji [195]. El tamaño de la cápsula se definió como la diferencia entre el tamaño de la célula completa (célula de levadura + cápsula) y el tamaño del cuerpo celular (limitado por la pared celular).

7. Inducción de células de Titán.

Este ensayo se realizó en el laboratorio del Doctor Oscar Zaragoza en el Instituto de Sanidad Carlos III (ISCIII) en Madrid-España. Se cultivaron células de levadura previamente en medio mínimo a 50 µM de hierro (FeCl₃.6H₂O), 500 µM de cobre (CuSO₄.5H₂O) y su combinación a 35 °C durante 24 horas y 110 rpm. Se indujo la formación de células tipo titán *in vitro* como se describe en el estudio de Zaragoza O y col [122]. Finalizado este tiempo, los cultivos se lavaron con PBS y se prepararon suspensiones celulares a 10⁴ y 10⁶ células/mL en medio de inducción de células titán (TCM). Finalmente 170 µL de estas suspensiones se colocaron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 18 horas a 37 °C en CO₂ al 5% culminado este tiempo se tomaron imágenes con un microscopio Leica DMI 3000B (Leica Microsystems) y se procesaron con el programa Fiji, se analizaron un total de 100 células por cada aislamiento y condición [195].

8. Producción de melanina.

Este ensayo, se realizó en el laboratorio del Doctor Oscar Zaragoza en el ISCIII. Las células de levadura se cultivaron en caldo glucosado de Sabouraud a 35 °C durante 48 horas. Finalizado este tiempo, los cultivos se lavaron con PBS y se prepararon suspensiones celulares a 2×10^6 células/mL y de este inóculo se realizaron tres diluciones seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000) en PBS. A continuación, se sembraron gotas de 5 μ L de cada dilución en medio de agar L-DOPA. Las placas se incubaron a 37 °C y se observaron diariamente durante 5 días, el análisis se realizó visualmente y se determinó el pigmento basado en una escala colorimétrica ver **figura 9**; se consideró alta pigmentación cuando el color de la colonia tenía un aspecto totalmente café y se asignó el puntaje más alto de 4, la pigmentación media vario entre el puntaje 3-2, y baja pigmentación entre 1-0.5, según la escala utilizada. Se evaluó la pigmentación de melanina en células sin precultivo con los metales y con precultivo a 50 μ M de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 500 μ M de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y su combinación.

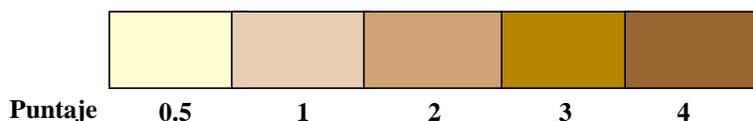


Figura 9. Escala de medición de la actividad del pigmento de melanina.

9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

La susceptibilidad antifúngica se evaluó mediante el método de microdilución en caldo de las directrices M27-A del NCCLS /CLSI (Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico). La MIC se determinó para dos azoles de uso común (fluconazol y voriconazol) y anfotericina B. Brevemente, los inóculos de la levadura se ajustaron mediante espectrofotometría a una concentración de 0.5×10^3 - 2.5×10^3 UFC/mL en medio RPMI 1640 medido, se agregó una alícuota de 0.1 mL a cada uno de los pocillos que contenían diferentes concentraciones del antifúngico. Las concentraciones finales variaron de 0.06 a 8 μ g/mL para voriconazol y anfotericina B y de 0.25 a 64 μ g/mL para fluconazol. Las placas se incubaron a 35°C, 150 rpm. Se utilizó un control positivo (pocillo libre de fármaco) y un control negativo (pocillo de caldo). Se realizó una valoración visual de las placas después de 72 horas. Se utilizaron *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controles de calidad. El criterio de interpretación para la susceptibilidad al

fluconazol fue publicado por el CLSI como ≤ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para anfotericina B y voriconazol, los aislamientos con MIC ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se consideraron susceptibles [196].

10. Extracción de proteínas citoplasmática.

La extracción de proteínas se realizó en la Unidad 1 del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) según el protocolo estandarizado en la Unidad de Proteómica de la UCM. Esta determinación se realizó en dos aislamientos clínicos los cuales fueron cultivados en 50 mL de caldo glucosado de Sabouraud a 30 °C y 110 rpm toda la noche. Finalizado este tiempo se ajustó un inóculo a 1.5×10^8 células/mL en 600 mL de medio mínimo y suplementado con la combinación de 50 μM de hierro y 500 μM de cobre. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 110 rpm toda la noche. Finalizado este tiempo se midió la densidad óptica de cada cultivo a 600 nm y se realizó un ensayo de viabilidad celular con yoduro de propidio.

Cada cultivo se centrifugo a 1300 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con PBS. El pellet obtenido se almaceno 15 horas a -20°C. Transcurrido este tiempo se resuspendió en buffer de lisis (200-400 μL) compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM DTT (ditiotretitol) e inhibidores de proteasas: 0.5mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluorida) y 1% de una mezcla de inhibidores de proteasas (PierceTM). Se añadió el mismo volumen de bolitas de vidrio de 0.4-0.6 mm de diámetro para romper mecánicamente las células en un dispositivo Fast-Prep (Bio101, Savant) aplicando pulsos de 20 segundos. Este paso se repitió hasta realizar 12 ciclos, enfriando los tubos eppendorf entre pulso y pulso durante 5 minutos en hielo.

Los eppendorfs con el extracto total se centrifugaron durante 60 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteína presente en las muestras siguiendo el método de Bradford. Brevemente se realizaron diluciones seriadas de una solución de BSA (seroalbúmina bovina) a una concentración conocida (2 mg/mL) para la recta patrón. La absorbancia se midió a 600 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 200c (Thermo Scientific). Los extractos de proteínas citoplásmicas se ajustaron a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en H₂O Milli-Q. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su preparación para el análisis proteómico. Se realizaron cuatro réplicas biológicas.

11. Preparación de proteínas para espectrometría de masas.

30 µg/mL de cada muestra se cargó en un gel concentrador (*stacking gel*) para su limpieza, antes de la digestión. El *stacking gel* es la parte superior de un gel SDS-PAGE discontinuo con una concentración de 4% de acrilamida que es seguida por otra parte de gel separador al 10%. La electroforesis se paró cuando el frente estaba a unos 3 mm del comienzo del gel separador. La banda de la muestra correspondiente a las proteínas sin separar se visualizó con tinción de Coomassie coloidal y se recortó para su posterior digestión con tripsina. Para ello, la banda que contenía el extracto proteico fue reducida con 10mM de DTT 10 mM a 56 °C durante 30 minutos, posteriormente se las muestras se alquilaron con 55 mM de Iodacetamida durante 20 minutos en la oscuridad. Finalmente, se añadió 1 µg de tripsina bovina recombinante de grado de secuenciación (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato de amonio 25 mM (pH 8.5) a cada muestra y se incubó durante la noche a 37 °C.

Los péptidos se extrajeron de cada una de las muestras con acetonitrilo (ACN) al 80%, TFA al 0.1% durante 15 minutos. Los péptidos obtenidos de cada digestión se secaron mediante centrifugación al vacío (SpeedVac, Savant), se reconstituyeron en 12 µL de ACN al 2%, ácido fórmico (AF) al 0.1%. Los péptidos se congelaron a -20 °C hasta el momento del análisis.

12. Análisis de proteínas LC-MSMS (Q-exactive HF).

El análisis de proteínas se realizó en la unidad de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. El análisis LC-MSMS de los péptidos se realizó mediante una columna de cromatografía líquida nano Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Scientific). Los péptidos se concentraron "en línea" mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna de protección Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific, 20 mm x 75 µm de ID, C18 de 3 µm de diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro) y se separaron en una fase reversa C18 Picofrit columna analítica (Thermo Scientific Easy Spray Column, PepMap RSLC C18 de 500 mm x 75 µm de ID, 2 µm de diámetro de partícula, tamaño de poro de 100Å) con punta de pulverización integrada, que funciona a un caudal de 250 nl/minuto. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente del 2% al 40% de tampón B en 240 minutos. Se utilizó, tampón A, 0.1% de AF en agua y tampón B, 0.1% de ácido fórmico en ACN.

La entrada de los péptidos se realizó mediante ionización por electrospray utilizando la punta integrada en la columna analítica. Los péptidos se detectaron con una resolución de 60.000 en modo MS de barrido completo en un rango de masas m/z de 350-2000 Da. Los datos MS/MS fueron adquiridos en modo de adquisición dependiente de la información (Data-dependent acquisition (DDA)) del MS. Así, en cada microscan se seleccionaron hasta 15 precursores con carga de 2+ a 6+, en función de su intensidad (threshold: 8×10^3), con exclusión dinámica de 27 segundos, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de ± 2 unidades de m/z , en un tiempo máximo de 120 ms para su fragmentación por HCD (High Collision Dissociation) con una energía de colisión Normalizada (nce) del 20 %. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo.

Los espectros de MS/MS adquiridos en las muestras se analizaron a través del software Proteome Discoverer 2.3 (Thermo Scientific) utilizando MASCOT como motor de búsqueda en la base de datos de *Cryptococcus neoformans* de 7430 secuencias [197]. Los parámetros utilizados en las búsquedas fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0.02 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos para tripsina permitidos, carbamidometilcisteína como modificación fija y como modificaciones variables: oxidación de metionina. El algoritmo del percolador se utilizó para estimar la tasa de falsos positivos y se filtró por un valor $q < 0.05$ para las proteínas identificadas con alta confianza [197].

13. Cuantificación relativa de las proteínas.

La cuantificación relativa de las proteínas a partir de los datos de espectrometría de masa se realizó mediante una estrategia sin marcaje, del inglés *free label*. Para el análisis de las cuatro condiciones se realizó una comparación de dos cepas respecto al medio de cultivo. El diseño de cuantificación es no pareado (*non-nested*) entre cada réplica.

El análisis de los espectros se realizó mediante el software Proteome Discoverer 2.3 (Thermo Scientific). Para determinar las abundancias de los péptidos y las proteínas identificadas se realiza un procesamiento que se inicia con la recalibración de las masas mediante una búsqueda rápida con Sequest HT contra la base de datos y en base a las identificaciones obtenidas, un alineamiento de los cromatogramas de todas las muestras con una tolerancia de hasta 10 minutos. Posteriormente se produce el alineamiento de los tiempos de retención entre las distintas muestras analizadas para

la cuantificación de los iones precursores, teniendo en cuenta los péptidos únicos y los péptidos razor (péptidos compartidos entre un grupo de proteínas) que estén presentes en al menos un 50% de las réplicas, sin tener en cuenta los péptidos modificados. Finalmente se normalizan la cantidad total de proteína entre las diferentes muestras utilizando la abundancia total de todos los péptidos.

Se realizaron comparaciones en los extractos obtenidos para cada aislamiento clínico entre las dos condiciones evaluadas (medio mínimo y medio mínimo suplementado con hierro y cobre). El diseño de cuantificación es no pareado (*non-nested*). Se normalizaron los datos para poder comparar la abundancia de las proteínas, se consiguió el factor de corrección adecuado para cada una de las muestras, de manera que la cantidad total de proteína sea la misma en todas.

La proporción de los péptidos se calcula como la mediana geométrica de la proporción de las diferentes réplicas biológicas. Finalmente, la proporción de proteínas fue calculada como la mediana de las proporciones del grupo de péptidos. Para evaluar si la abundancia de una proteína varía entre condiciones se realizó un análisis de la Varianza (ANOVA), para estimar la probabilidad de que estas medidas sean diferentes entre condiciones. Se consideró una diferencia significativa con un *p-value* menor a 0.05. Para determinar si una proteína se expresa de forma diferencial entre las condiciones se aplicaron filtros de la proporción de la variabilidad de abundancia, coeficiente de variación del ratio <30, el valor de *p-value* antes mencionado y *q-value* <0.05. Para validar proteínas que presentan la misma tendencia en el cambio, pero presentan una variabilidad mayor del 30% (entre ellas algunas proteínas que aparecen en una muestra y no en la otra u otras proteínas de interés) se filtra por el valor de *q-value* pero no se aplica el filtro del coeficiente de variación del ratio. El análisis de proteómica se realizó en la Unidad de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid España. Los datos están depositados en ProteomeXchange mediante el repositorio PRIDE con el número de acceso PXD021687.

Para el análisis de proteínas se utilizaron las siguientes bases de datos biológicas y herramientas bioinformáticas. El sitio web de *FungiDB* (<https://fungidb.org/fungidb>), *STRING* (<https://string-db.org>), *Revigo* (<http://revigo.irb.hr/>) y *KEGG* (<https://www.genome.jp/kegg/>) se utilizaron para el análisis de proteínas. Para la realización de diagramas de Venn se generó utilizando Jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr>).

14. Secuenciación del genoma y procesamiento de datos.

Se secuenciaron los 29 aislamientos clínicos. Para ello se cultivó cada aislamiento, que se almacenó a -80 °C desde la recolección, en agar Sabouraud dextrosa a 37 °C durante 48 horas. Al final de este tiempo, se inoculó una colonia en agar peptona dextrosa a 37 °C durante 24 horas. Se utilizaron 100 µL de células de levadura cultivadas para la extracción de ADN utilizando el UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc.), con el protocolo estándar recomendado por el fabricante. La integridad del ADN se comprobó en un gel de agarosa al 1% y se visualizó con tinción SYBR Safe DNA (Invitrogen).

La calidad y cantidad de ADN aislado se examinó y midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop2000 a una longitud de onda de 260/280 (Thermo Scientific) [34]. Posteriormente, se realizó la secuenciación de extremos de pares de 250 pb utilizando la plataforma Illumina HiSeq en Novogen Bioinformatics Technology Co., Ltd. (Beijing, China). Los datos de secuenciación sin procesar se evaluaron con FastQC v0.11.9 [198] y se identificaron y descartaron los contaminantes potenciales mapeando las lecturas de la secuencia sin procesar contra el genoma de referencia H99 de *C. neoformans* var. *grubii* (acceso al ensamblaje RefSeq: GCF_000149245.1) con Bowtie2 ver. 2.3.5.1 [199], y una búsqueda BLASTn [200] contra la base de datos completa de bacterias y hongos RefSeq (descargada el 20 de abril de 2020) con un valor electrónico mínimo de 10e-12 usando BLAST⁺ 2.10.0⁺ [200]. Finalmente, las secuencias se filtraron de los adaptadores de Illumina, las bases de baja calidad (con un umbral mínimo de puntuación Phred de 20) y se eliminaron las secuencias de lectura cortas (<50 pb) usando fastp ver. 0.2 [201]. Los datos de la secuencia sin procesar se depositaron en el archivo de lectura de secuencias de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), con el número de identificación de bioproyecto PRJNA669191.

15. Identificación y análisis de variantes genéticas.

La variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* se estudió llamando y evaluando variantes genéticas con la plataforma de experiencia de secuenciación de nueva generación -NGSEP ver. 4.0.1 [202,203]. NGSEP realiza una detección y un genotipado precisos de variantes de un solo nucleótido (SNP), inserciones/deleciones pequeñas y grandes (InDels), repeticiones cortas en tándem (STR), inversiones y variantes de número de copias (CNV).

Para este estudio se consideraron variantes genéticas que mapean exclusivamente con los genes relacionados con la cápsula y la melanina.

Inicialmente, se mapearon las lecturas de secuencias procesadas para cada aislamiento clínico con el genoma de referencia H99 utilizando el módulo ReadsAligner NGSEP, a continuación se mapearon de acuerdo con su ubicación en el genoma de referencia con Picard Tools [204]. A continuación, se utilizó el Módulo NGSEP MultisampleVariantsDetector para calcular variantes genéticas para múltiples muestras; se ejecutó este módulo con los argumentos -psp, -embeddedSNVs, -ploidy 1, -maxAlnsPerStartPos 30, -maxBaseQS 30 y -minQuality 20.

El módulo VCFAnnotate NGSEP se utilizó para la anotación de variantes, utilizando la anotación del genoma de referencia H99 y el módulo VCFFilter NGSEP para filtrar variantes genéticas con los argumentos -fi, -fir, -m 1, -q 30 y -minRD 3. Se filtraron las variantes genéticas correspondientes a estados multi-alélicos y o sitios heterocigotos.

El impacto funcional de las variantes genéticas (SNP/InDels) se clasificó en las siguientes cuatro categorías de impacto funcional: alto (variante de cambio de marco, variante deceptor de empalme, variante de donante de empalme, comienzo perdido, límite ganado límite perdido), moderada (delección e inserción y variante de sentido erróneo), baja (variante de región de empalme y variante sinónima) y modificador (variantes: 3'UTR, 5'UTR, transcripción aguas abajo, intrón y transcripción aguas arriba).

Las matrices de distancias genéticas se calcularon con el módulo VCFDistanceMatrixCalculator NGSEP que emplea el algoritmo básico IBS (identidad por estado). Las inferencias sobre las diferencias genómicas entre los aislamientos clínicos se establecieron mediante la agrupación de vecinos de unión construyendo un dendrograma con el módulo NeighborJoining NGSEP. Los árboles se visualizaron y editaron con Dendroscope ver.3.7.2 [205]. Finalmente, las relaciones genéticas entre los aislamientos clínicos también se examinaron en base a un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando el paquete R SNPRelate ver. 1.12.2 [206]. Se estableció el argumento ld.threshold en 0.99 de la función snpgdsLDpruning, lo que reduce el número de variantes en un 40% de media.

Para explorar si las variantes genómicas identificadas (SNP e InDels) para cada aislamiento clínico están asociadas con la producción del factor de virulencia a estudiar, como la biosíntesis de cápsulas y la producción de melanina, se probó si las proporciones de una variable nominal (por ejemplo, estados bialélicos) son diferentes entre los valores (por ejemplo, grupos de tamaño de cápsula) utilizando la prueba exacta de independencia de Fisher o la prueba exacta de Fisher por pares post-hoc. Posteriormente, se recuperaron los genes asociados con factores de virulencia en *C. neoformans* en PHI-base, la base de datos de factores de virulencia en Fungal Pathogens - DFVF, Victors y estudios publicados anteriormente. Por último, las variantes genéticas detectadas en el análisis genómicos y asociadas con la producción de factores de virulencia y presentes en el conjunto de datos de factores de virulencia se analizaron y se contextualizaron utilizando *FungiDB*, bases de datos de factores de virulencia y otros recursos bioinformáticos para su anotación funcional.

Se identificaron variantes genéticas del tipo SNP (polimorfismo de nucleótido único) e InDels (inserción/delección) para un amplio conjunto de genes asociados con la regulación del hierro y el cobre en *C. neoformans*, así como otros genes asociados con la organización de la cápsula y biosíntesis de melanina.

16. Tipificación de secuencias de múltilocus (MLST).

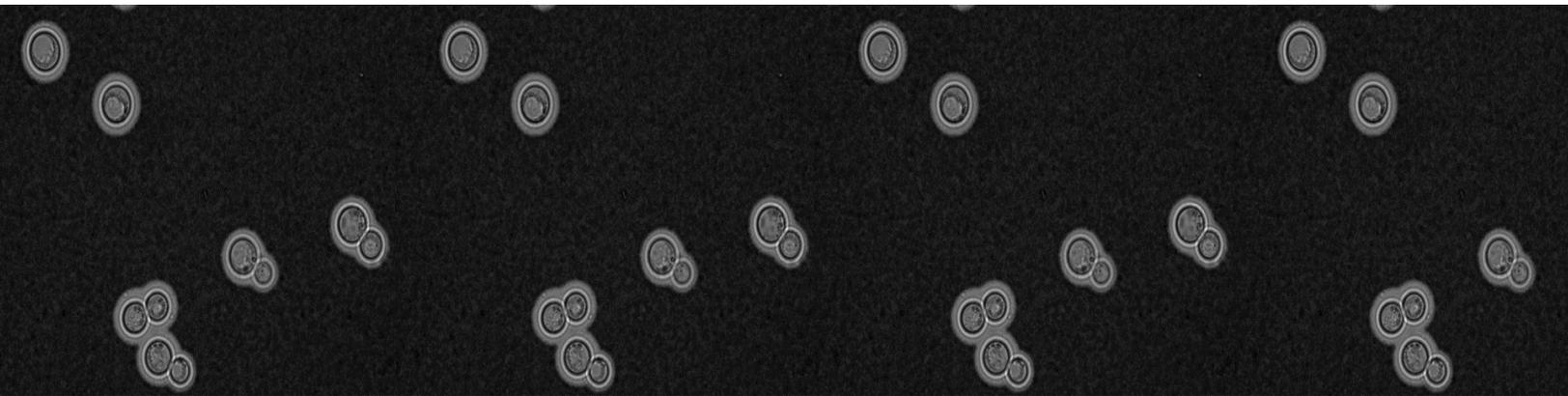
La tipificación de secuencias de múltilocus se realizó de según el consenso de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM) para el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* [44]. Las secuencias alélicas de todos los loci MLST se recuperaron de los archivos *contigs.fasta* provenientes de la secuenciación completa (conjunto de genes codificadores de proteínas) para cada aislamiento clínico. Los loci utilizados fueron: *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* y *IGS1*. La identificación del tipo de alelo y la secuencia tipo, se realizó mediante alineación por pares utilizando el algoritmo de identificación polifásica de BioLMICS implementados en la base de datos ISHAM *C. neoformans* MLST (<http://mlst.mycologylab.org>). Los perfiles alélicos recuperados determinaron los tipos de secuencia correspondientes.

La diversidad genética de los aislamientos se determinó mediante el software DnaSP v5; esta variabilidad se extrajo de secuencias concatenadas de los aislamientos, para detectar niveles de polimorfismo genético. La distribución se determinó calculando la diversidad de haplotipos

(genes), la diversidad de nucleótidos (π) (el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias) y los índices θ (por sitio, como indicador de la tasa de mutación por sitio de nucleótidos por generación), calculado a partir de Eta (h) (el número total de mutaciones y "S", el número de sitios segregantes polimórficos) [207].

17. Análisis estadísticos.

Para las variables numéricas se desarrolló mediante medidas de tendencia central y para las variables categóricas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Para los análisis estadísticos se utilizaron el software GraphPad Prism 5 o el software Stata ver 11.1. Los resultados se compararon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) aplicando la prueba de homogeneidad de varianza de Levene y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para el análisis de supervivencia se utilizó la prueba de Kaplan-Meier y las diferencias en la supervivencia se evaluaron usando la prueba Log-rank (Mantel-Cox) y las diferencias de tamaños de las células fueron analizadas mediante la prueba t de Student. La significancia estadística se resalta con asteriscos en las figuras de la siguiente manera: $p > 0.05$, no significativa (ns); $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p > 0.0001$ (****).



RESULTADOS

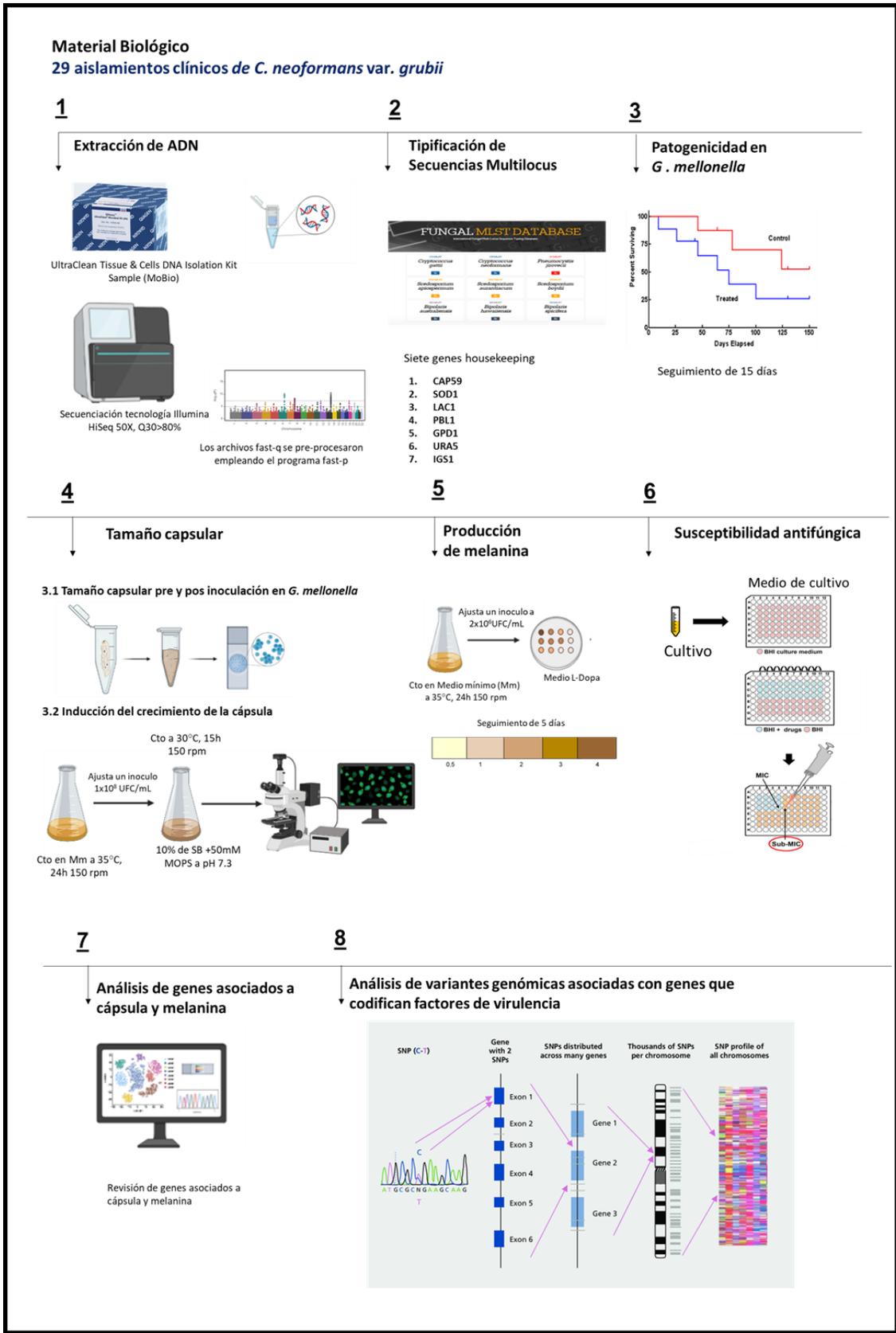


Figura 10. Desarrollo metodológico primer objetivo.

1. Caracterización de 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*: tipificación, estudio de la patogenicidad, principales factores de virulencia y polimorfismos de genes relacionados.

1.1. Identificación de las secuencias tipo de los aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.

Se seleccionaron 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* tipo molecular VNI del cepario del Instituto Nacional de Salud en Colombia, los aislamientos provenían de siete ciudades. Mediante MLST se identificó la secuencia tipo (ST) de los aislamientos teniendo en cuenta el consenso de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM) para el complejo de especies *C. neoformans*/*C. gattii* [25].

En los 29 aislamientos se identificaron 11 ST y dos tipos moleculares (TM): VNI y VNII (**tabla 2**). Respecto a este último, el aislamiento H0058-I-3589 caracterizado como ST100 y TM VNII, estaba anteriormente clasificado mediante PCR Huella Digital como VNI. La distribución de las frecuencias relativas de los perfiles alélicos estuvo dominada por la ST69 con 9 de 29 aislamientos (frec. =0.3103), seguida de las ST2, ST95 y ST377, cada uno de estas con 4 de 29 aislamientos (frec. =0.1379 c/u, respectivamente). Las secuencias tipo menos frecuentes fueron la ST5 con 2 aislamientos (frec. =0.069) y ST6, ST23, ST63, ST77, ST100 y ST298 con un aislamiento respectivamente (frec. =0.0345). La relación genética de los aislamientos estudiados *C. neoformans* se muestra en la **figura 11 y anexo 2**. Se calculó el índice de diversidad entre los 29 aislamientos de *C. neoformans* var *grubii*, el número de haplotipos fue de 10, el índice de diversidad de nucleótidos fue de 0.860, el número de sitios polimórficos fue de 70, la diversidad de nucleótidos 0.00311 y los índices θ de 0.00443.

Tabla 2. Perfiles alélicos MLST para 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. En gris se observa el aislamiento tipo molecular VNII.

Aislamientos	ST	Secuencia tipo alélica							TM
		<i>CAP59</i>	<i>GPD1</i>	<i>IGS1</i>	<i>LAC1</i>	<i>PLB1</i>	<i>SOD1</i>	<i>URA5</i>	
H00558-I-1959	77	1	1	25	3	2	1	1	VNI
H00558-I-2257	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2503	63	7	1	1	18	1	1	1	VNI
H00558-I-2527	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2583	377	1	5	71	18	4	1	1	VNI
H00558-I-2619	377	1	5	71	18	4	1	1	VNI
H00558-I-2641	2	7	1	1	1	1	1	2	VNI
H00558-I-2642	377	1	5	71	18	4	1	1	VNI
H00558-I-2643	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2672	2	7	1	1	1	1	1	2	VNI
H00558-I-2677	95	1	23	25	3	4	1	1	VNI
H00558-I-2713	95	1	23	25	3	4	1	1	VNI
H00558-I-2720	2	7	1	1	1	1	1	2	VNI
H00558-I-2725	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2746	5	1	3	1	5	2	1	1	VNI
H00558-I-2779	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2806	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2807	23	7	1	1	2	1	1	2	VNI
H00558-I-2808	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-2881	298	1	3	34	5	2	1	1	VNI
H00558-I-2926	95	1	23	25	3	4	1	1	VNI
H00558-I-2950	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-3097	95	1	23	25	3	4	1	1	VNI
H00558-I-3102	377	1	5	71	18	4	1	1	VNI
H00558-I-3104	5	1	3	1	5	2	1	1	VNI
H00558-I-3279	69	7	5	1	3	3	1	1	VNI
H00558-I-3463	6	1	1	1	3	2	1	5	VNI
H00558-I-3589	100	2	9	51	8	11	12	4	VNII
H00558-I-3746	2	7	1	1	1	1	1	2	VNI

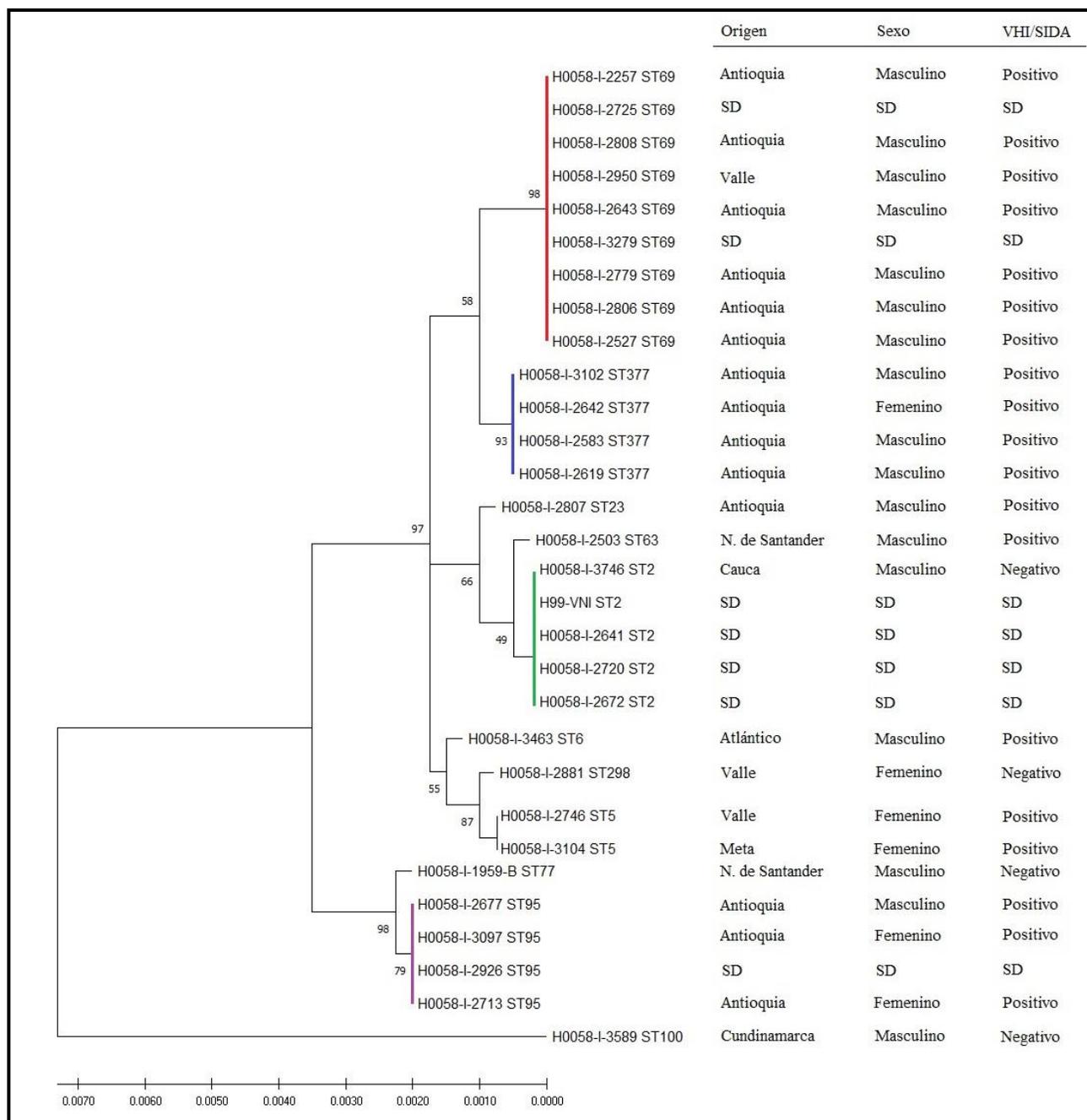


Figura 11. Agrupamiento jerárquico en 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, basado en el perfil alélico de MLST. En la Figura se presenta la relación entre las secuencias tipo (ST) de los aislamientos clínicos. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo Jukes-Cantor, utilizando secuencias de nucleótidos concatenados de 7 loci. Los valores de Bootstrap se muestran para cada rama (1000 repeticiones). El porcentaje de asociación de agrupamiento se muestra junto a las ramas. A la derecha de la imagen se describen las variables clínicas más representativas. Las secuencias tipo más frecuentes se resaltan en colores. SD: Sin dato.

1.2 Determinación de la patogenicidad en *G. mellonella*.

Con el fin de determinar el perfil de patogenicidad de aislamientos clínicos de *C. neoformans* en *G. mellonella*, se utilizaron controles con alta (H99) y baja (JEC21) patogenicidad [208]. La determinación de alta o baja patogenicidad se hizo con la velocidad que la cepa inducía la muerte de las larvas. En la cepa H99, la muerte promedio ocurrió tres días después de la infección y en la cepa JEC21 a los siete días. La muerte promedio de los 29 aislamientos ocurrió a los siete días después de la infección. Al comparar las curvas de supervivencia y los tiempos de supervivencia promedio, se determinó que 7 de los 29 aislamientos presentaron baja patogenicidad con una mediana de supervivencia de 6 a 7 días ($p < 0.0001$), 10 de 29 intermedia con una mediana de supervivencia de 4 a 5 días y 12 de 29 alta patogenicidad con una mediana de supervivencia de 2 a 3 días ($p < 0.0001$) (**figura 12 y tabla 3**), estos resultados corresponden a tres replicas biológicas. Se analizó la relación de la patogenicidad en *G. mellonella* con los resultados previos en MLST y las variables demográficas.

Patogenicidad - MLST: los 7 aislamientos con baja patogenicidad se agruparon en cuatro ST, los 10 aislamientos con patogenicidad intermedia se agruparon en siete ST y los 12 aislamientos con alta patogenicidad se agruparon en siete ST (**figura 12**). La mortalidad en las larvas para el ST69 vario de 3 a 7 días post-infección, para el ST2 entre 2 a 6 días, el ST95 de 3 a 6 días y para el ST377 de 3 a 5 días. Teniendo en cuenta los aislamientos que presentaron baja y alta patogenicidad, no se observó relación entre las secuencias tipo que agrupaban más de un aislamiento con los resultados obtenidos en el modelo invertebrado.

Patogenicidad - datos demográficos: los aislamientos categorizados con baja patogenicidad todos provenían de Antioquia, de pacientes VIH/SIDA positivo y de estos el 42.8% de pacientes del sexo masculino. Los aislamientos categorizados con patogenicidad intermedia provenían de cuatro departamentos (Antioquia, Cundinamarca, Cauca y Norte de Santander), de estos el 40% de pacientes VIH/SIDA positivo y el 60% provenían del sexo masculino. Finalmente, los aislamientos categorizados con alta patogenicidad también tenían su origen en de cuatro departamentos (Antioquia, Atlántico, Meta y Valle), el 91.6% se obtuvieron de pacientes VIH/SIDA positivo y el 66.6% de pacientes del sexo masculino (**anexo 2**).

Tabla 3. Clasificación de la patogenicidad de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, según resultados obtenidos en el modelo invertebrado *G. mellonella* y cepas de referencia con alta (H99) y baja (JEC21) patogenicidad.

Patogenicidad	Aislamientos H0058-I-	Media mortalidad	Log-rank (Mantel-Cox)			
			H99		JEC21	
			P-value	IC	P-value	IC
Baja	2257	6	***	-0.1743 to 1.031	0.0385	0.4118 to 1.588
	2641	6	***	-0.1743 to 1.031	0.0163	0.4118 to 1.588
	2725	6	***	-0.1743 to 1.031	0.0569	0.4118 to 1.588
	2807	6	***	-0.1743 to 1.031	0.0332	0.4118 to 1.588
	2926	6	***	-0.1743 to 1.031	0.0299	0.4118 to 1.588
	3097	6	***	-0.1743 to 1.031	0.1001	0.4118 to 1.588
	3279	7	***	-0.1413 to 1.064	**	0.5809 to 1.752
Intermedia	1959-B	5	***	-0.1029 to 1.103	**	0.5785 to 1.755
	2503	4	***	-0.002860 to 1.203	***	0.8118 to 1.988
	2527	5	***	-0.1029 to 1.103	**	0.5785 to 1.755
	2642	5	***	-0.06790 to 1.068	***	0.6112 to 1.722
	2672	5	***	-0.1029 to 1.103	**	0.5785 to 1.755
	2713	4	***	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	2806	5	***	-0.1029 to 1.103	**	0.5785 to 1.755
	2808	5	***	-0.1029 to 1.103	***	0.5785 to 1.755
	3589	5	***	-0.06790 to 1.068	**	0.6112 to 1.722
	3746	5	***	-0.05203 to 1.143	**	0.6896 to 1.856
Alta	2583	3	**	0.3971 to 1.603	***	1.745 to 2.921
	2619	3	***	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	2643	3	***	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	2677	3	**	0.3971 to 1.603	***	1.745 to 2.921
	2720	2	0.1452	0.3971 to 1.603	***	1.745 to 2.921
	2746	2	0.7267	0.3971 to 1.603	***	1.745 to 2.921
	2779	3	**	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	2881	3	**	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	2950	3	***	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	3102	3	***	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	3104	3	***	0.1471 to 1.353	***	1.162 to 2.338
	3463	3	***	0.1498 to 1.350	***	1.164 to 2.336

p <0.05 (*); p <0.01 (**); p <0.001 (***); p > 0.0001 (****). IC: intervalo de confianza

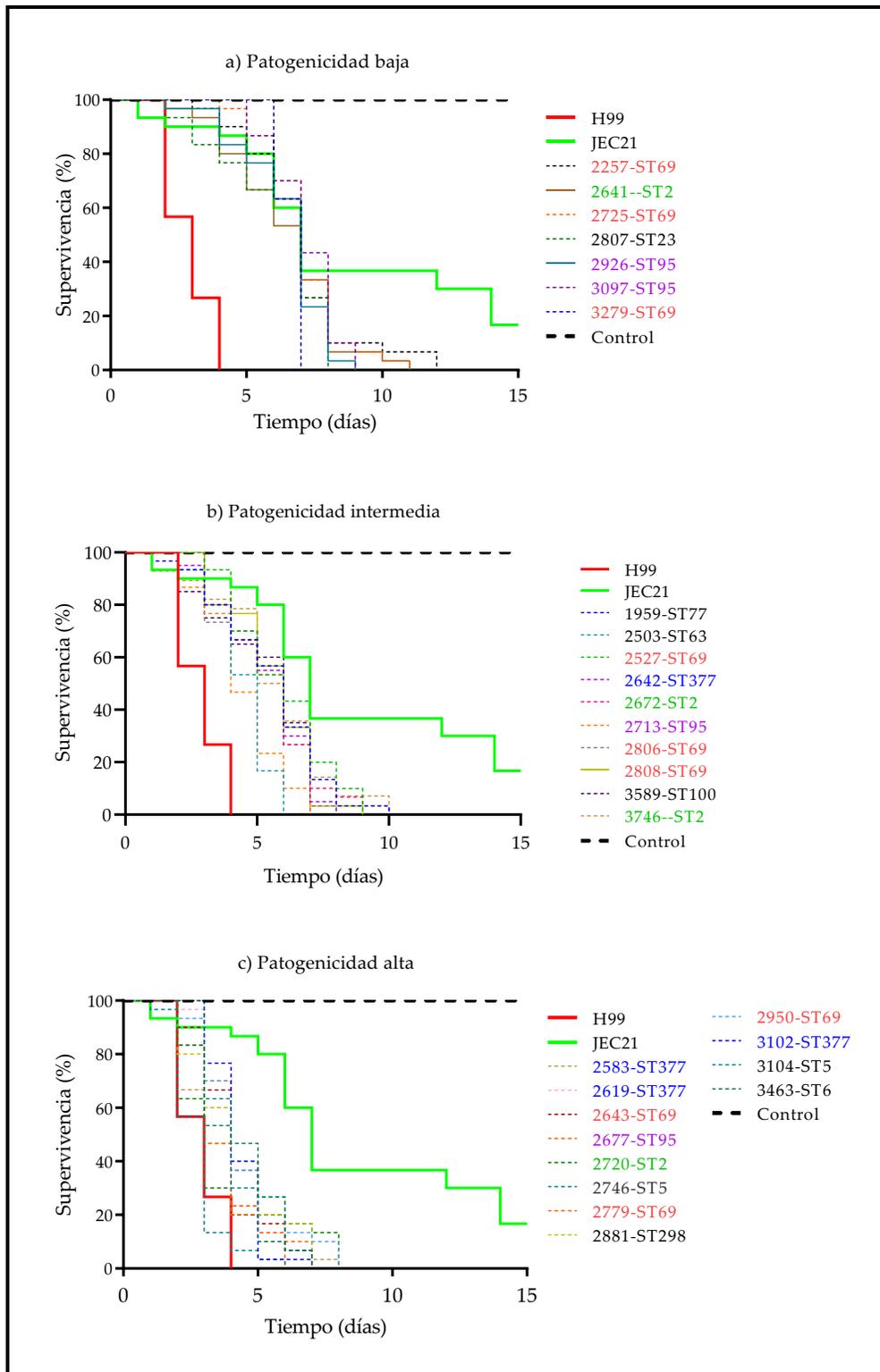


Figura 12. Curvas de supervivencia de los 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* con a) baja, b) intermedia y c) alta patogenicidad en *G. mellonella*. Los ST más frecuentes se observan en color verde (ST2), rojo (ST69), morado (ST95) y azul (ST377).

1.3 Determinación de la variación del tamaño capsular utilizando el modelo invertebrado *G. mellonella*.

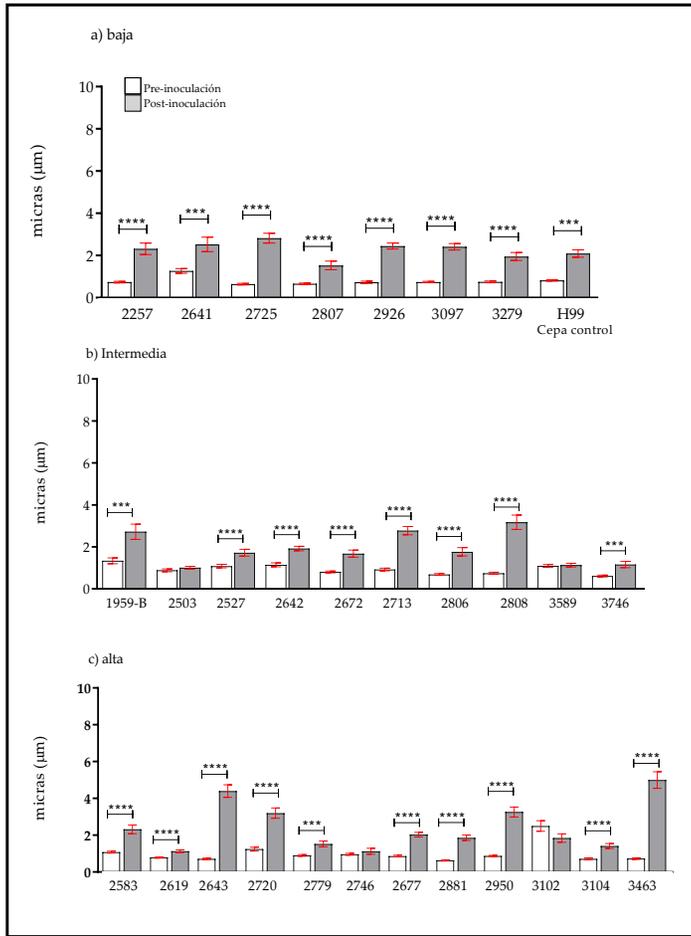
El crecimiento de la cápsula se ha descrito durante la interacción de *Cryptococcus* con hospederos mamíferos. La levadura interactúa con hospederos ambientales, y es importante ya que se piensa que estos encuentros le han permitido adquirir los rasgos necesarios para causar infección en mamíferos. Se estudió el cambio morfológico de la cápsula durante la infección en el lepidóptero *G. mellonella*. Para determinar el tamaño capsular post-inoculación, se recuperó la levadura en el día en que 50% de la población estaba viva.

Para los 29 aislamientos evaluados, el promedio de la cápsula en las levaduras antes de su inoculación fue de 0.93 μm ($\sigma = 0.365$) y en post-inoculación fue de 2.21 μm ($\sigma = 0.954$). En general, en 25 de 29 aislamientos se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño capsular ($p < 0.0001$), estos resultados corresponden a tres replicas biológicas. A continuación, se analizó la posible relación de la variación del tamaño capsular tras la inoculación en *G. mellonella* con los resultados previos de patogenicidad y MLST (**anexo 2**).

Tamaño capsular - patogenicidad: al comparar los aislamientos categorizados con baja y alta patogenicidad de acuerdo con los resultados obtenidos en *G. mellonella*, se observó que el tamaño de la cápsula aumentó después de que la levadura pasara por la larva. Se observó un mayor aumento de la cápsula en los aislamientos con baja patogenicidad (1.49 μm , $\sigma = 0.423$), seguido del grupo con alta patogenicidad (1.42 μm , $\sigma = 1.272$) (**figura 13 a**). No se observó una asociación estadísticamente significativa entre el tamaño capsular pre y post inducción en *G. mellonella* y los resultados obtenidos en patogenicidad ($p = 0.965$) y los ST ($p = 0.216$).

Tamaño capsular - MLST: al analizar la relación de los tamaños capsulares con las ST más frecuentes, se observó que los ST2, ST69 y ST95 presentaron mayor aumento del tamaño capsular (1.158, 1.755 y 1.601 μm respectivamente) en comparación con los aislamientos agrupados en el ST377 que presentaron menor cambio (0.425 μm) (**figura 14**).

a. Tamaño capsular pre y post-inoculación en *G. mellonella*



b. Inducción del crecimiento de la cápsula

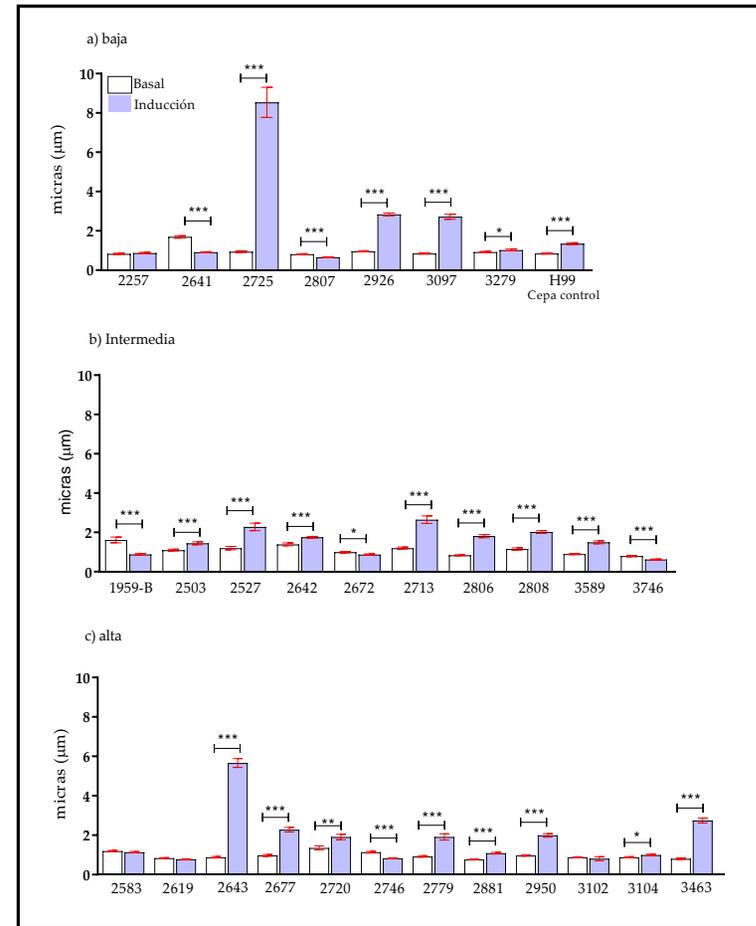


Figura 13. Tamaño capsular en 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. A la izquierda se muestran los resultados obtenidos del tamaño capsular pre y post-inoculación en *G. mellonella* y a la derecha los resultados obtenidos en la inducción del crecimiento de la cápsula en MOPS.

p < 0.05 (*); p < 0.01 (**); p < 0.001 (***); p > 0.0001 (****).

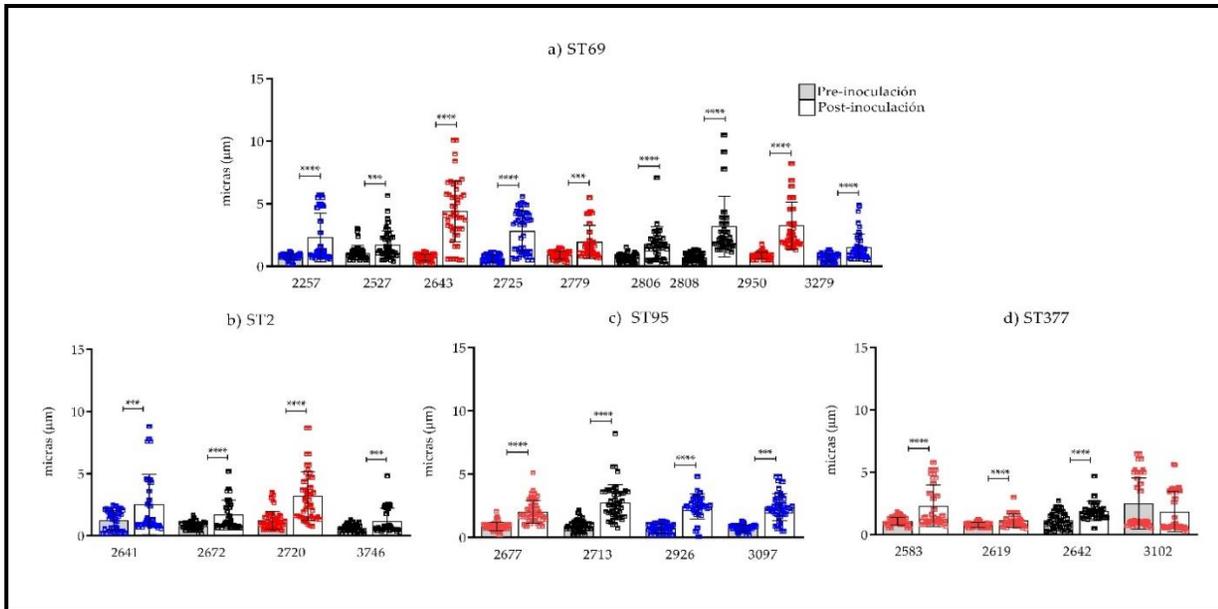


Figura 14. Distribución del tamaño capsular pre y post inoculación en *G. mellonella* de 21 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* agrupados en las secuencias tipo más frecuentes a) ST69, b) ST2, c) ST95 y d) ST377. Los aislamientos se agruparon según a patogenicidad: azul (baja) negro (intermedia) y rojo (alta). $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); $p > 0.0001$ (****).

1.4 Inducción del crecimiento capsular en MOPS.

Se indujo *in vitro* el crecimiento de la cápsula mediante MOPS (ver materiales y métodos). Se observó que en 22 aislamientos las cápsulas aumentaron significativamente respecto a las condiciones basales ($p < 0.0001$) siendo el promedio de la cápsula de los 29 aislamientos en condiciones basales de $1.03 \mu\text{m}$ ($\sigma = 0.240$) y en condiciones de inducción de $1.91 \mu\text{m}$ ($\sigma = 1.681$), estos resultados corresponden a tres replicas biológicas. Igual que con las anteriores características fenotípicas estudiadas, a continuación, se estudió la relación de la inducción del crecimiento capsular con la patogenicidad y los perfiles de MLST (**anexo 2**).

Inducción capsular - patogenicidad: en general en los aislamientos con baja patogenicidad se observaron cápsulas de mayor tamaño ($1.730 \mu\text{m}$ de promedio) respecto a los de alta ($0.630 \mu\text{m}$) y de intermedia ($0.498 \mu\text{m}$) patogenicidad. (**figura 13b**). En cuatro aislamientos se observaron los mayores tamaños capsulares, siendo dos y dos aislamientos den alta y baja patogenicidad respectivamente (**figura 15**). El aislamiento que presento mayor crecimiento de la cápsula fue el 2725 categorizado con baja patogenicidad. En promedio la cápsula en condiciones basales fue de

0.94 μm y en condiciones de inducción fue de 8.54 μm ($\sigma = 5.421$). Por otra parte, en los aislamientos 2257, 2503, 2583, 2619 y 3102 no se observó aumento en el tamaño capsular (figura 13b).

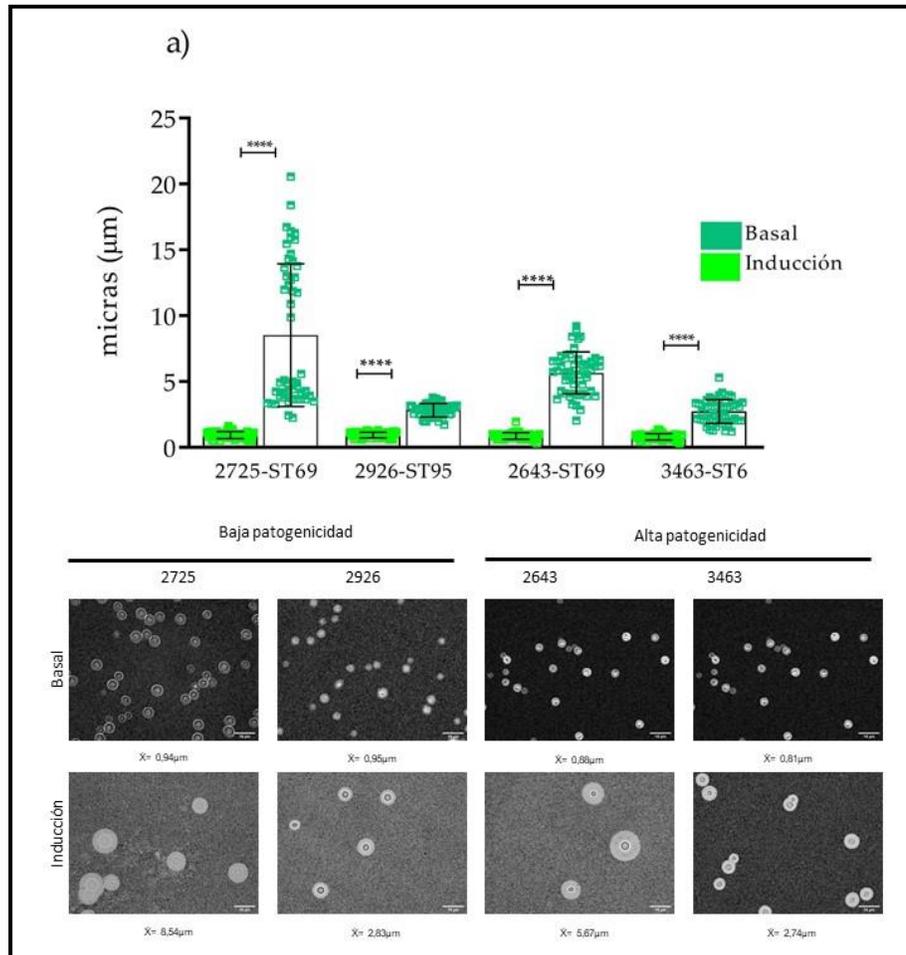


Figura 15. Aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* que presentaron mayor cambio en la inducción de la cápsula. $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); $p > 0.0001$ (****).

Inducción capsular - MLST: al analizar los tamaños capsulares con las ST más frecuentes, se observó que los ST69 y ST95 presentaron en promedio un mayor aumento en el tamaño capsular de 1.938 y 1.624 μm respectivamente. En cuanto a los aislamientos pertenecientes al ST2 y ST377 se observó un cambio en menor proporción, de 0.347 y 0.425 μm respectivamente. Se encontró asociación estadísticamente significativa ($p > 0.002$) entre las ST más frecuentes (ST2, 69, 97 y 377) y la inducción del crecimiento capsular en MOPS. Por otro lado, al comparar los tamaños capsulares de las ST más frecuentes en el ensayo pre y post inoculación en *G. mellonella*,

observaron resultados similares a los obtenidos en la inducción con MOPS con los ST69, ST95 y ST377. Por el contrario, los resultados obtenidos para ST2 difieren, ya que el promedio obtenido del tamaño capsular en el modelo invertebrado fue de 1.158 μm y en MOPS de 0.347 μm . En estos resultados no se observó asociación estadísticamente significativa entre la inducción del crecimiento capsular y los resultados obtenidos en patogenicidad ($p= 0.890$) y el tamaño capsular pre y post- inoculación en *G. mellonella* ($p= 0.283$).

1.5 Pigmentación de melanina.

La pigmentación de melanina se analizó por medio de una escala visual (ver materiales y métodos). El 41.3% de los aislamientos presentó baja pigmentación de melanina, el 20.6% media y el 37.9% alta pigmentación, estos resultados corresponden a tres replicas biológicas. Se analizó si existía relación entre los resultados de melanina y los resultados de patogenicidad, MLST y tamaño capsular (**figura 16, anexo 2**).

Pigmentación - patogenicidad: de los 7 aislamientos categorizados con baja patogenicidad se observaron 3 con baja pigmentación, 2 intermedia y 2 con alta pigmentación. También dentro de los aislamientos de alta patogenicidad se incluían aislamientos con todos los niveles de pigmentación, 4 de baja, 3 de intermedia y 5 de alta. Como era de esperar, con estos datos, al analizar la clasificación de patogenicidad con la producción del pigmento de melanina no se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre los aislamientos más o menos patógenos y con mayor o menor pigmentación.

Pigmentación - MLST: en las ST más frecuentes se observó que los aislamientos pertenecientes a los ST69 y ST95 presentaron mayor pigmentación; por otro lado, el ST2 se caracterizó por presentar baja pigmentación, y finalmente en los aislamientos del ST377 no se detectó una relación tan clara ya que se observó baja y alta pigmentación.

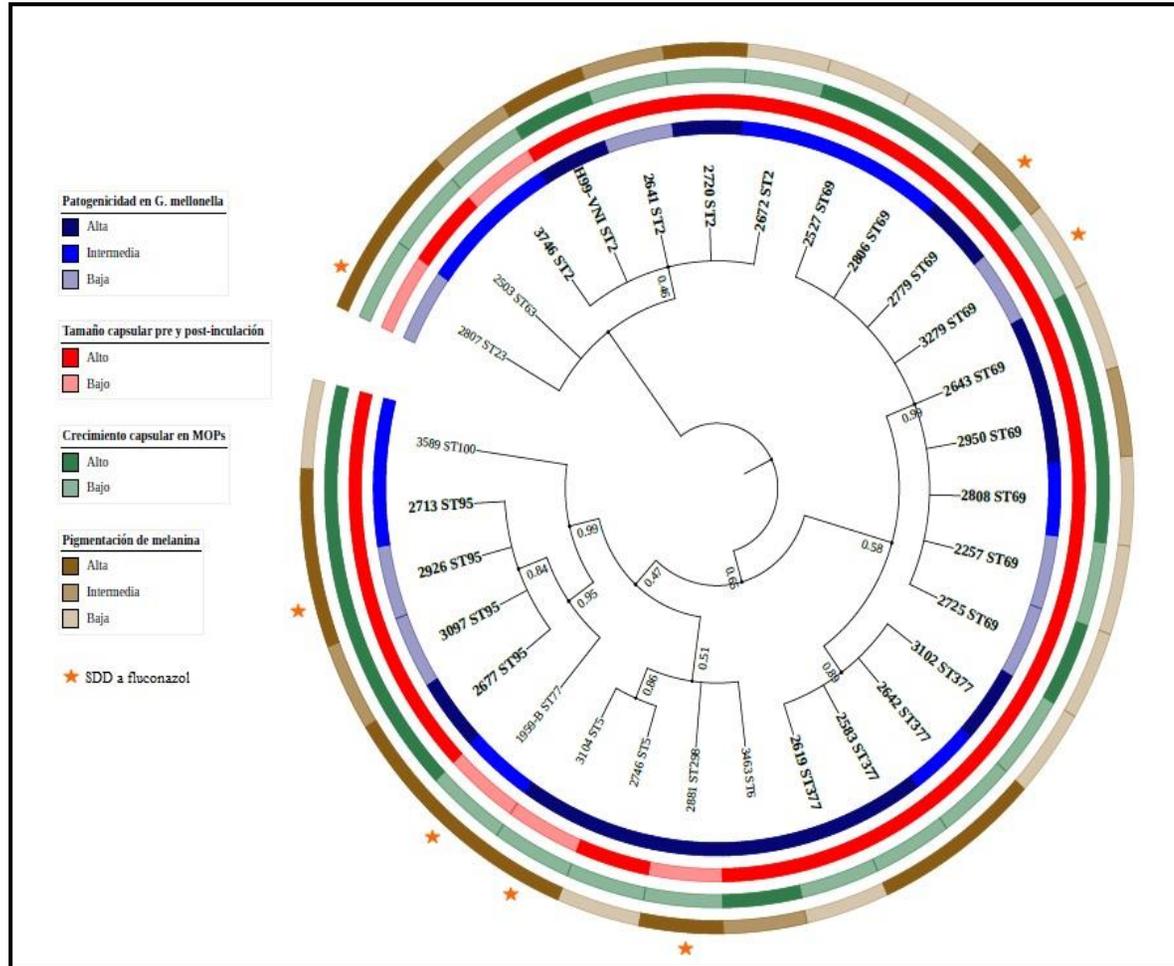


Figura 16. Resumen de los principales resultados obtenidos en 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. Análisis filogenético, patogenicidad en *G. mellonella*, tamaño capsular y pigmentación de melanina. La historia evolutiva se derivó utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor utilizando secuencias de nucleótidos concatenados de 7 loci. Los valores de Bootstrap se muestran para cada rama (1000 repeticiones).

Pigmentación - tamaño capsular: en 12 aislamientos que presentaron baja pigmentación en melanina, se observó en todos capsulas aumentadas en el ensayo de variación del tamaño de capsular en *G. mellonella*. Sin embargo, en 6 de 12 aislamientos con baja pigmentación, no se observó aumento capsular en la inducción del crecimiento de la cápsula en MOPS. En los 11 aislamientos con alta pigmentación de melanina, en los dos ensayos realizados de tamaño capsular, se observó aumento de la cápsula en 8 aislamientos.

En conclusión, no se observó asociación estadísticamente significativa, entre la pigmentación de melanina y los resultados obtenidos en los en las ST (p= 0.207), patogenicidad (p= 0.494), inducción capsular en MOPS (p= 0.638) y tamaño capsular pre y post inducción en *G. mellonella* (p=0.070) (**figura 16**).

1.6 Determinación de la susceptibilidad a anfotericina B, fluconazol y voriconazol.

El 100% de los aislamientos fueron sensibles a anfotericina B y voriconazol. Para fluconazol el 75.8% de los aislamientos presentaron sensibilidad (MIC≤1-8µg/mL) y el 24.2% restantes fueron dosis dependiente (SDD) (MIC≥16-32µg/mL) (**figura 16 y 17, anexo 2**), estos resultados corresponden a tres replicas biológicas. Los resultados de la susceptibilidad no se relacionaron con las variables clínicas, además, en la mayoría de los casos no se disponía de datos del esquema de tratamiento.

	µg/mL									
Antifúngico	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.15	0.06	0.03
a) Anfotericina B	0	0	0	0	8	20	0	0	0	1
b) Voriconazol	0	0	0	0	1	6	2	5	11	4

	µg/mL									
Antifúngico	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12
c) Fluconazol	0	2	5	5	11	5	1	0	0	0

R	SDD	S
---	-----	---

Figura 17. Resultados de susceptibilidad para a) anfotericina B, b) voriconazol y c) fluconazol de los 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. R: resistente SDD: sensible dosis dependiente, S: sensible. En la gráfica se indica el número de aislamientos cuya MIC es la correspondiente a cada concentración de antifúngico.

Con respecto a la relación de los datos de sensibilidad antifúngica y los fenotipos estudiados anteriormente, los resultados obtenidos de los 7 aislamientos SDD al fluconazol pertenecían a 6 ST. Los aislamientos que fueron SDD a fluconazol se distribuyeron en todas las categorías de patogenicidad; tres aislamientos con baja patogenicidad (2807, 2926 y 3279), uno con patogenicidad intermedia (1959) y en tres categorizados con alta patogenicidad (2779, 2881 y 3104). Además, de los 7 aislamientos SDDs al fluconazol 4 presentaron capsulas aumentadas en el ensayo capsular pre y post inoculación en *G. mellonella*, 5 se relacionaron con capsulas pequeñas en la inducción del crecimiento de la cápsula en MOPS y en 5 presentaron alta pigmentación de melanina.

1.7 Análisis de componentes principales (PCA).

Con los datos obtenidos en los ensayos fenotípicos, (**figura 16**), se realizó un análisis de componentes principales, con el objetivo de determinar si hay relación entre la patogenicidad y los factores de virulencia. Para este análisis se utilizaron las variables de patogenicidad, resultados de la cápsula (determinación del tamaño capsular pre y post *G. mellonella*, inducción capsular en MOPS y el delta del cambio), y los resultados obtenidos en la pigmentación de melanina.

La mayor contribución de las variables para la primera dimensión correspondió al delta del tamaño capsular inducido por MOPS, seguido por las variables correspondiente tanto a inducción *in vitro* en MOPS como en el modelo *in vivo* post-inoculación en *G. mellonella* (**figura 18**). De forma similar, la variable correspondiente a los grupos propuestos para discriminar los aislamientos en alto o bajo cambio del tamaño capsular presentó una alta contribución en esta dimensión (ver halo azul en la **figura 18**). Por otra parte, en la segunda dimensión calculada presentaron una mayor contribución las variables correspondientes a la mediana del tamaño inicial de la cápsula, tanto en el modelo *in vivo* pre-inoculación en *G. mellonella* como la capsula basal *in vitro* en MOPS. El porcentaje de la varianza de los datos para las primeras dimensiones fue del 54.1% y 24.5%. Considerando la variación explicada para cada uno de las dimensiones y la contribución de las variables, el análisis sugiere que las variables que miden la modulación del cambio en el tamaño capsular son las más representativas; por esta razón, los aislamientos pueden ser separados en dos grupos, aquellos con un alto o un bajo cambio en el tamaño capsular, además agruparon la mayoría de aislamientos clasificados como de alta patogenicidad, independientemente del método empleado para su evaluación, es decir, MOPS o el modelo *G. mellonella* (**figura 16, anexo 2**).

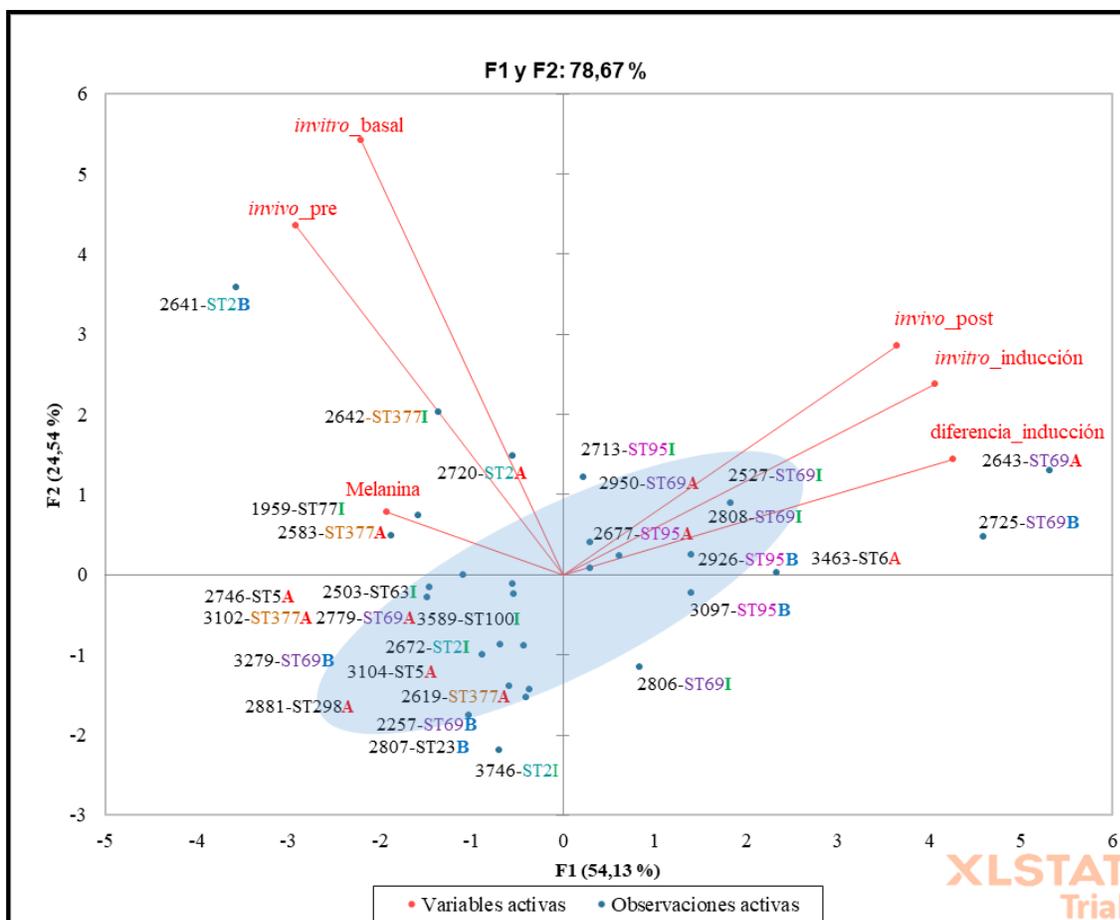


Figura 18. Coordenadas calculadas para cada aislamiento y su pertenencia a las categorías propuestas. Se observa una correlación positiva, la variable que más peso tiene en el análisis es la diferencia del tamaño capsular en la inducción en MOPS. Las letras en color corresponden a: (B) baja, (I) intermedia y (A) alta patogenicidad, los ST más frecuente se observan resaltados en color. En el halo azul se observa la modulación del tamaño capsular.

1.8 Determinación de variantes genéticas asociadas a genes involucrados en cápsula y producción de melanina.

A través de una revisión sistemática realizada en los recursos bioinformáticos de Phidias (<http://www.phidias.us/victors/>), Database of virulence factors in fungal pathogens (<http://sysbio.unl.edu/DFVF/>), Pathogen host interactions (<http://www.phi-base.org/index.jsp>) y complementada por rastreo bibliográfico, se buscaron genes asociados con factores de virulencia en *C. neoformans*. Se identificaron 322 genes relacionados con cápsula, melanina y patogenicidad (anexo 3). Las lecturas o reads obtenidas de la secuenciación completa de cada aislamiento se

mapearon contra el genoma de referencia H99 empleando el módulo ReadsAligner del programa NGSEP v4. La anotación de las variantes se realizó empleando la anotación del genoma de referencia, para lo cual se implementó el módulo VCFAnnotate de NGSEP v4. Finalmente, se filtraron únicamente las variantes genómicas asociadas a los 322 genes; con el objetivo de discriminar aquellas que tienen una mayor probabilidad de impactar la actividad y/o función de las proteínas correspondientes, las variantes resultantes fueron adicionalmente filtradas por su ubicación en regiones predichas como dominios funcionales empleando la anotación funcional recuperada para el genoma de referencia con InterProScan.

Con el objetivo de caracterizar la variación presente entre los aislamientos clínicos, se identificaron los polimorfismos en un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms – SNP) y las inserciones o deleciones (INDELs) presentes en los 322 genes revisados por literatura y bases de datos que están asociados a patogenicidad en *C. neoformans* de los genomas de cada aislamiento contra el genoma de la cepa de referencia (H99). Se identificaron un total de 5.031 variantes bialélicas de tipo SNPs e InDels y 21 multialélicas; estas últimas fueron descartadas. Esta identificación se realizó en 28 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* (MT VNI). De este análisis se descartó el aislamiento H0058-I-3589 debido a que pertenecía al TM VNII.

Del total de variantes 313 correspondieron a InDels y 4.718 a SNPs. De ellas, 20 fueron anotadas como variantes de alto impacto, 964 de impacto moderado, 1.729 de bajo impacto y 2.318 modificadoras (ver materiales y métodos). Las variantes se seleccionaron de acuerdo con su ubicación en sitios predichos como regiones o dominios funcionales, 496 variantes no sinónimas fueron consideradas para análisis posteriores.

Se recopilaron estas 496 variantes no sinónimas de los 322 genes relacionados a factores de virulencia, a continuación, se realizó un análisis de componentes principales, con el objetivo de determinar las variantes con mayor contribución a la variabilidad genética observada entre los aislamientos clínicos. Se calcularon los valores de carga (*loading values*) para seleccionar las variantes con mayor contribución para los tres primeros componentes principales. La anotación de los genes identificados se realizó empleando la base de datos *FungiDB* (<http://fungidb.org/>).

El porcentaje de la varianza explicada por el primer componente fue 38%, para el segundo componente del 27%, mientras que para el tercer componente fue del 13%. Estos componentes

explican el 78% de la variación observada a nivel genético para los 322 genes. Así mismo, los aislamientos se agruparon en 4 clústeres, dentro de los cuales se puede discriminar los aislamientos por ST (**figura 19**). Un total de 157 variantes fueron filtradas por la contribución a los componentes principales, de las cuales 52 contribuyeron en mayor proporción al primer componente, 64 variantes al segundo componente y 41 variantes al tercer componente principal. Estas variantes estuvieron presentes en 86 genes de los 322 genes bajo estudio (**anexo 4**).

Con el objetivo de determinar las variantes genómicas asociadas a los grupos de aislamientos propuestos para tamaño capsular (alto y bajo), pigmentación de melanina (alto, intermedio y bajo) y patogenicidad (alto, intermedio y bajo), se realizó una prueba exacta de Fisher empleando la función `fisher.test` en R para evaluar la hipótesis de independencia entre los genotipos y su pertenencia a los grupos fenotípicos. Todos los valores p (p -value) se ajustaron por múltiples comparaciones entre genes y se filtraron con un valor de significancia de 0.05.

Un total de 48 variantes no sinónimas estuvieron asociadas a los grupos fenotípicos propuestos, de las cuales, 18 se asociaron con los fenotipos de tamaño capsular, 29 con los fenotipos de producción de melanina, y uno con los fenotipos de patogenicidad (**anexo 5**). Estas variantes se cruzaron con aquellas obtenidas por el análisis de componentes principales, con el objetivo de establecer aquellas variantes que consistentemente pueden ser asociadas con fenotipos a través de diferentes aproximaciones estadísticas.

Los 39 genes que agruparon las 48 variantes no sinónimas identificadas se muestran en la tabla 4, se identificaron cuatro genes relacionados con el término GO de patogenicidad (*PMT4*, *IPK1*, *IRK3* y *CNAG_05005*), cuatro genes relacionados con la organización en la estructura de encapsulación externa (*OVA1*, *ROM2*, *PTP1* y *CNAG_04753*) y tres con el proceso biosintético y metabólico de melanina (*SER202*, *NUP75* y *PBX2*). Los SNPs asociados a codones de parada de estos 39 se ubicaron en 9 genes de ellos y se muestran en la **tabla 4**. Con respecto a las secuencias tipo, el ST69 presentó características específicas en los genes *IRK3* y *PBX2*, además de en todos los genes relacionados con cápsula. Esta secuencia tipo se caracterizó por presentar aislamientos relacionados con baja producción de melanina, alta producción de la cápsula y patogenicidad variada entre los 9 aislamientos clasificados en la ST69. En las secuencias tipo más frecuentes se observaron características particulares, tanto en los factores de virulencia evaluados como en los SNPs asociados a genes de capsula y melanina. No se observó un patrón entre los resultados

obtenidos en patogenicidad en *G. mellonella*, y las secuencias tipo, tamaño capsular, pigmentación de melanina y variantes sin sentido evaluadas.

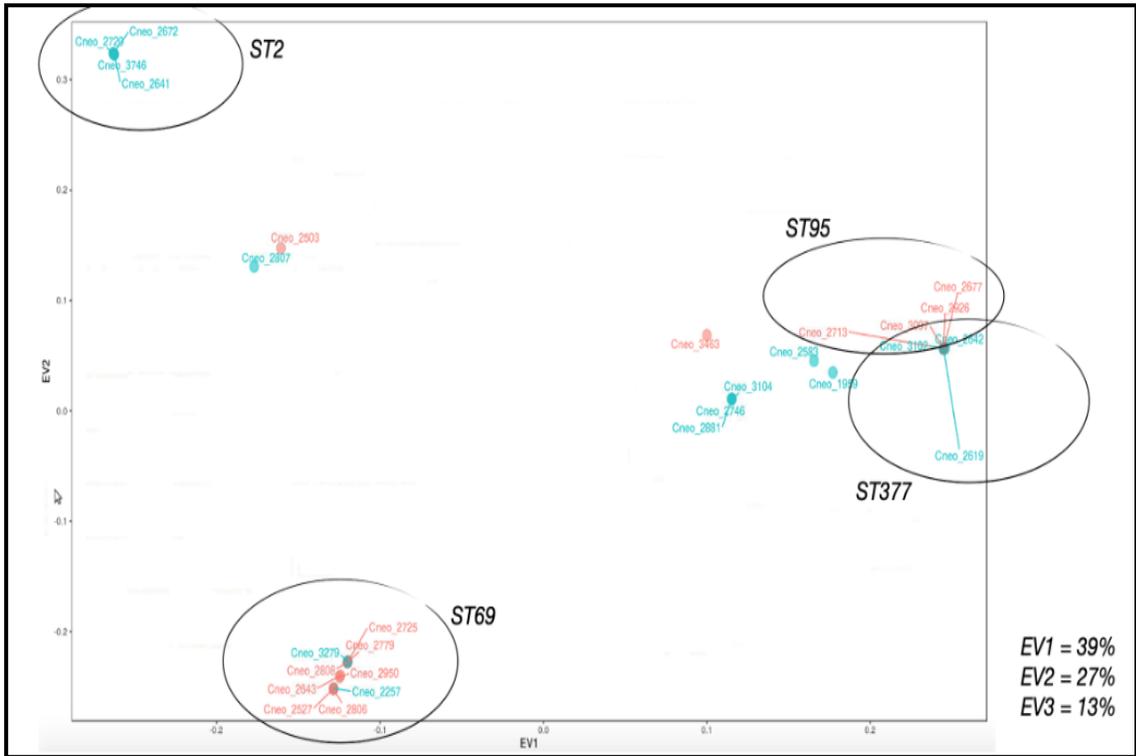


Figura 19. Análisis de componentes principales empleando las variantes genómicas de 322 genes relacionados a cápsula, melanina y patogenicidad. En la figura se observan las coordenadas para cada uno de los aislamientos, así como la pertenencia a los grupos propuestos por cambio en el tamaño capsular (rojo, aislamientos con alto cambio; azul, con bajo cambio). Se resaltan los grupos o clústeres que se forman.

Tabla 4. Descripción de los SNPs de 39 genes relacionados con los principales factores de virulencia en *C. neoformans* var. *grubii*, identificados a través del análisis de componentes principales y la prueba de asociación.

ID del gen	Nombre del gen o simbolo	Mutación	Descripción	UniProt ID	SNPs no sinónimos	SNPs con codones de parada	SNPs sinónimos	SNPs totales
CNAG_00178		R425C	DNA repair protein REV1	J9VI80	141	0	76	272
CNAG_00315		V89I	HHE domain-containing protein	J9VIQ1	19	0	30	91
CNAG_00389		S30N	mitochondrial protein	J9VE00	24	0	47	93
CNAG_00815	SIT1	Y152S	MFS transporter, SIT family, siderophore-iron:H symporter	J9VHU4	23	1	73	213
CNAG_03684		A122T	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 10	J9VKP8	53	1	53	189
CNAG_03849	ASG1	D44N	nuclear protein	J9VNS6	47	0	91	229
CNAG_03917	NUP75	R655H	nuclear pore complex protein Nup85	J9VGC3	102	0	85	233
CNAG_03048	IRK3	Q149R	Gluconokinase	J9VGW6	17	0	18	124
CNAG_02860	EBG1	S192N	endo-1,3(4)-beta-glucanase	J9VK64	35	0	30	191
CNAG_02771		D330N	DNA repair and recombination protein RAD54B	J9VKI0	90	0	81	301
CNAG_06929		L240I	IQ domain-containing GTPase activating protein	J9VL62	55	0	82	291
CNAG_05005	ATG1	S311P	ULK/ULK protein kinase	J9VRC4	58	1	101	306
CNAG_01294	IPK1	V360I	inositol-pentakisphosphate 2-kinase	J9VKS8	43	0	28	485
CNAG_01283	CAP5	RQ600SQ	beta-1,2-xylosyltransferase	J9VQG6	69	1	47	187
CNAG_01063		I1359V	WD-repeat protein mip1	J9VLF3	42	0	106	213
CNAG_01040		D122G	carboxypeptidase D	J9VKV6	61	1	52	194
CNAG_00996	PMT4	A501T	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase	J9VNY5	52	0	97	204
CNAG_02283		A96E	Glucoamylase	J9VSG1	15	0	6	49
CNAG_02217	CHS7	F619L	Chitin synthase	J9VMX7	84	3	91	436
CNAG_02133	SOL3	G128E	6-phosphogluconolactonase	J9VQJ2	14	0	28	76
CNAG_02048	PUT5	T302I	Proline dehydrogenase	J9VQT3	52	0	50	162
CNAG_03138	CUL3	R287L	ubiquitin-protein ligase	J9VUS5	85	0	60	222
CNAG_03187		E152G	Protoporphyrinogen oxidase	J9VV12	56	0	51	149
CNAG_03188	SET202	Q402K	histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 specific	J9VXK7	39	0	46	152
CNAG_03406	SPP101	P256L	compass component spp1	J9VVI6	95	0	53	222
CNAG_03433		V226A	endo alpha-1,4 polygalactosaminidase precursor	J9VQA1	75	0	29	229
CNAG_03555		R100P	acylglycerone-phosphate reductase	J9VXX9	23	0	24	109
CNAG_04119	ROM2	L1121V	rho guanyl-nucleotide exchange factor	J9VTV9	70	0	124	257
CNAG_04380		N271H	peptidase	J9VUL8,T2BPC	110	0	114	322
CNAG_04753		V189I	Gluconolactonase	J9VXY3	38	0	24	181
CNAG_04609		A106T	argonaute	J9VW13	33	3	82	308
CNAG_01584		E163G	hydrolase	J9VYQ7	20	0	26	149
CNAG_01631		A597G	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	J9VWP6	72	0	72	311
CNAG_01868		D46N	protein KTI12	J9VZ10	23	0	24	79
CNAG_02008	OVA1	NA62KA	nuclear protein	J9VZU0	31	0	38	122
CNAG_06382		S378P	beta-transducin repeat containing protein	J9W363	76	1	45	176
CNAG_05562	PBX2	D253G	parallel beta-helix repeat protein	J9W1W2	37	0	37	110
CNAG_05607		L417S	cytoplasmic protein	J9W473	57	2	46	141
CNAG_05662	PTP1	L435M	Polyol transporter protein 1	J9VXU6	30	0	58	161

2. Estudio del efecto del hierro y el cobre en determinantes de virulencia y en la patogenicidad de dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.

Se escogieron dos aislamientos para el estudio del efecto de 50 μ M de hierro y 500 μ M de cobre ya que eran los más extremos en la capacidad de inducir la muerte de las larvas de *G. mellonella*. La selección se basó en los resultados obtenidos del objetivo 1. En la **tabla 5** se puede observar las principales características fenotípicas del aislamiento H0058-I-2807 de baja patogenicidad y H0058-I-3102 de alta patogenicidad. La cepa H99 se utilizó como referencia.

Tabla 5. Características fenotípicas de dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.

		Id aislamiento	
		H0058-I-2807	H0058-I-3102
Mortalidad en <i>G. mellonella</i>	ST	23	377
	Media mortalidad	6	3
	Interpretación	Baja	Alta
Efecto de la cápsula pre y pos inoculación en <i>G. mellonella</i>	pre	0.68	1.09
	post	0.72	0.77
	Interpretación	Baja	Alta
Inducción de cápsula en MOPS	Basal	0.819	0,921
	Inducción	0.636	0.707
	Interpretación	Baja	Baja
Producción de Melanina en medio L-Dopa	Escala de color		
	Puntaje	4	1
	Interpretación	Alto	Bajo
Test de susceptibilidad CLSI			
Anfotericina B	MIC-50	0.5	0.5
	Interpretación	S	S
Fluconazol	MIC-50	32	2
	Interpretación	SDD	S
Voriconazol	MIC-50	1	0.03
	Interpretación	S	S
Genes cápsula y melanina	SNPs	11.56	44.264

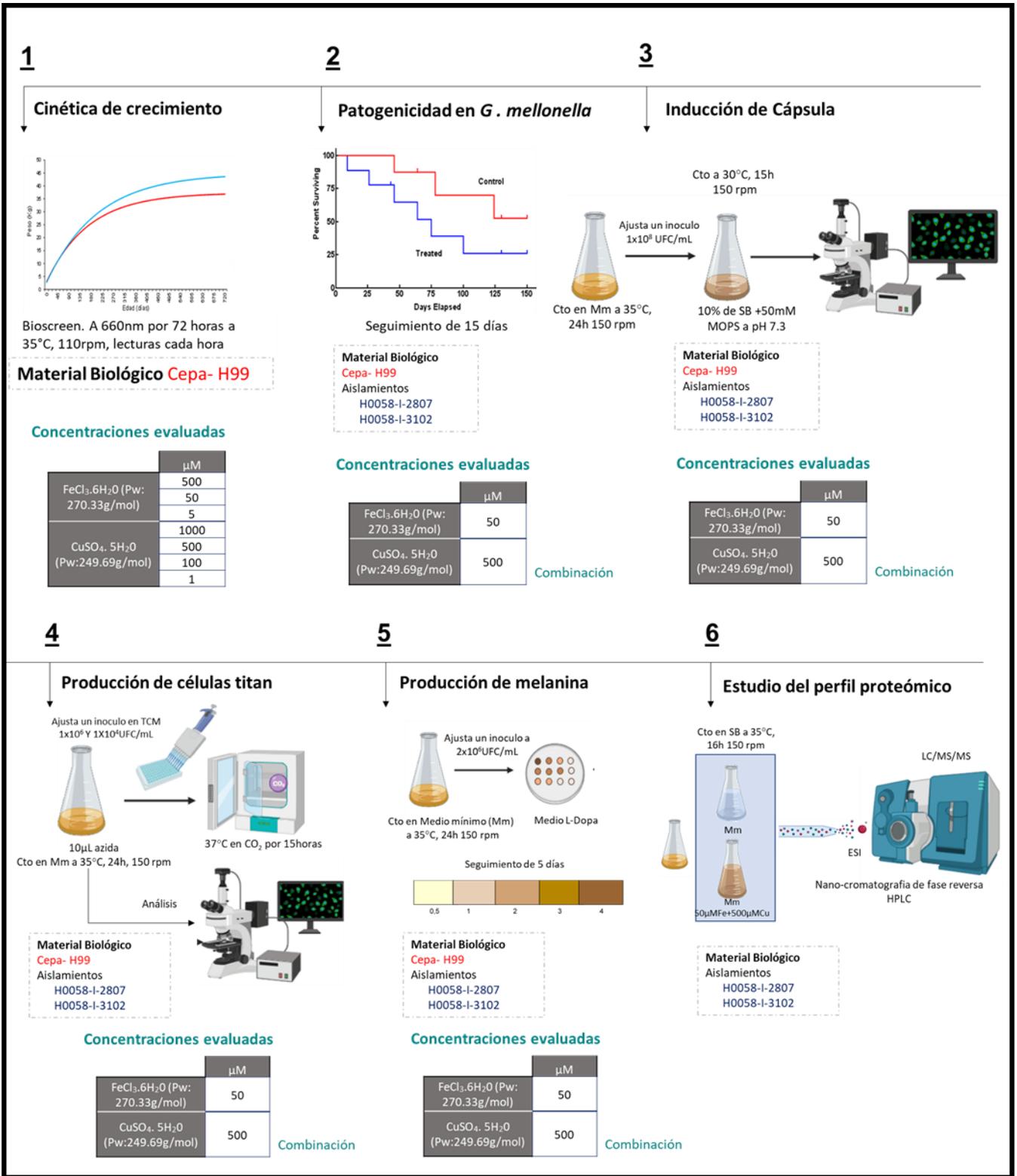


Figura 20. Desarrollo metodológico 2 y 3 objetivo.

Objetivo 2: Evaluar el efecto de hierro y cobre en la patogenicidad, el tamaño capsular y la producción de melanina en aislamientos clínicos de alta y baja patogenicidad de *C. neoformans* var. *grubii*.

2.1. Evaluación de curva de crecimiento de la cepa H99 en diferentes condiciones de precultivo con hierro y cobre.

Antes de analizar el efecto del hierro y el cobre en la patogenicidad en aislamientos clínicos de *C. neoformans*, se evaluó el efecto de la incubación de las células en cuatro concentraciones de hierro y cuatro de cobre en la cepa de referencia H99. Se observó que en las concentraciones de 5 y 50 μM de hierro y 1, 100, 500 y 1000 μM de cobre, el hongo conservó su cinética de crecimiento similar a la del medio sin metal, mientras que a concentraciones de hierro mayores (500 y 1000 μM) no creció (**figura 21**).

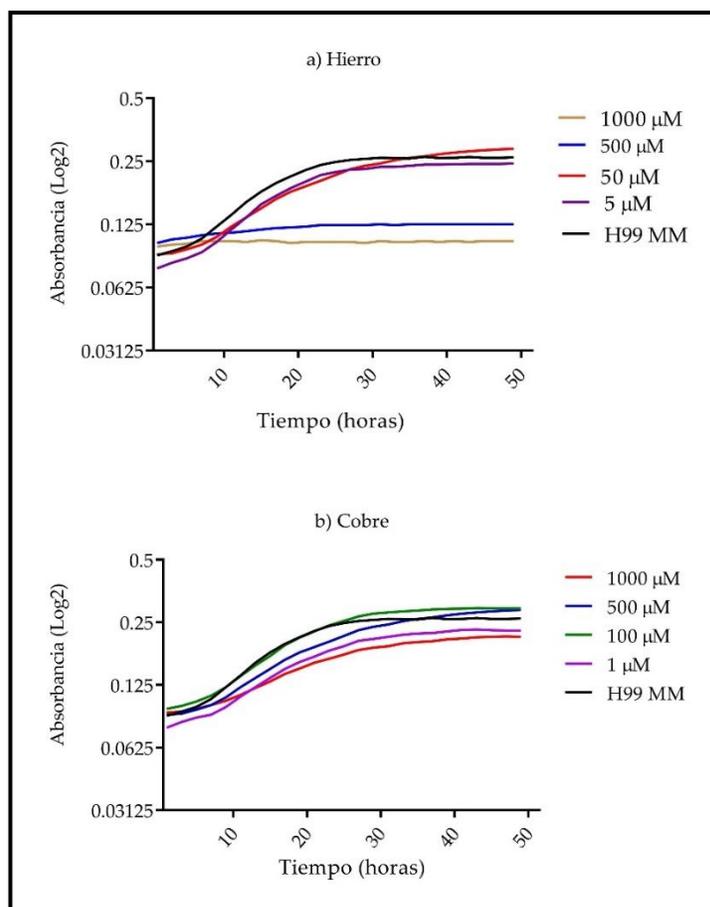


Figura 21. Curva de crecimiento de la cepa H99 a diferentes concentraciones de a) hierro y b) cobre.

2.2. Evaluación de la capacidad patogénica de la cepa H99 en diferentes condiciones de precultivo con hierro y cobre.

A continuación, se evaluó el impacto en la modulación de la capacidad patogénica de H99 de diferentes concentraciones de hierro (5 y 50 μM) y cobre (1, 100, 500 y 1000 μM) en el modelo *G. mellonella*. En los 15 días de seguimiento se observó que, el precultivo con 50 μM de hierro aumentó la patogenicidad de manera significativa en la cepa H99 (p 0.017) en comparación con las células expuestas a las demás condiciones y sin el precultivo con hierro. Para el día 7 después de la infección la mortalidad fue del 50% en el estado basal (sin metal) y del 90% en 50 μM de hierro. En las concentraciones de 5 μM , no se detectó una variación significativa de la supervivencia, aunque se observó un retraso en la muerte de algunas de las larvas (**figura 22a, 22d**).

En el precultivo con 1, 100 y 500 μM de cobre la patogenicidad aumentó significativamente en comparación con la cepa sin precultivo con el metal. La mortalidad fue del 71.2% en el estado basal (sin metal) y de 90.1%, 83.1% y 91.6% al día 9 post infección para 1, 100 y 500 μM respectivamente. En la concentración de 1000 μM la variación no fue significativa. (**figura 22b- d**).

Adicionalmente se evaluó el efecto en la patogenicidad al combinar los dos metales. Se realizó una pre-incubación con 50+500 μM de hierro y cobre respectivamente, ya que en dichas concentraciones se había observado el mayor aumento de la mortalidad (**figura 22c-d**). Se observó un deceso rápido en las larvas en los primeros 7 días, después la mortalidad se desacelera comportándose de manera similar a la cepa sin precultivo con metales o incluso retrasando la muerte.

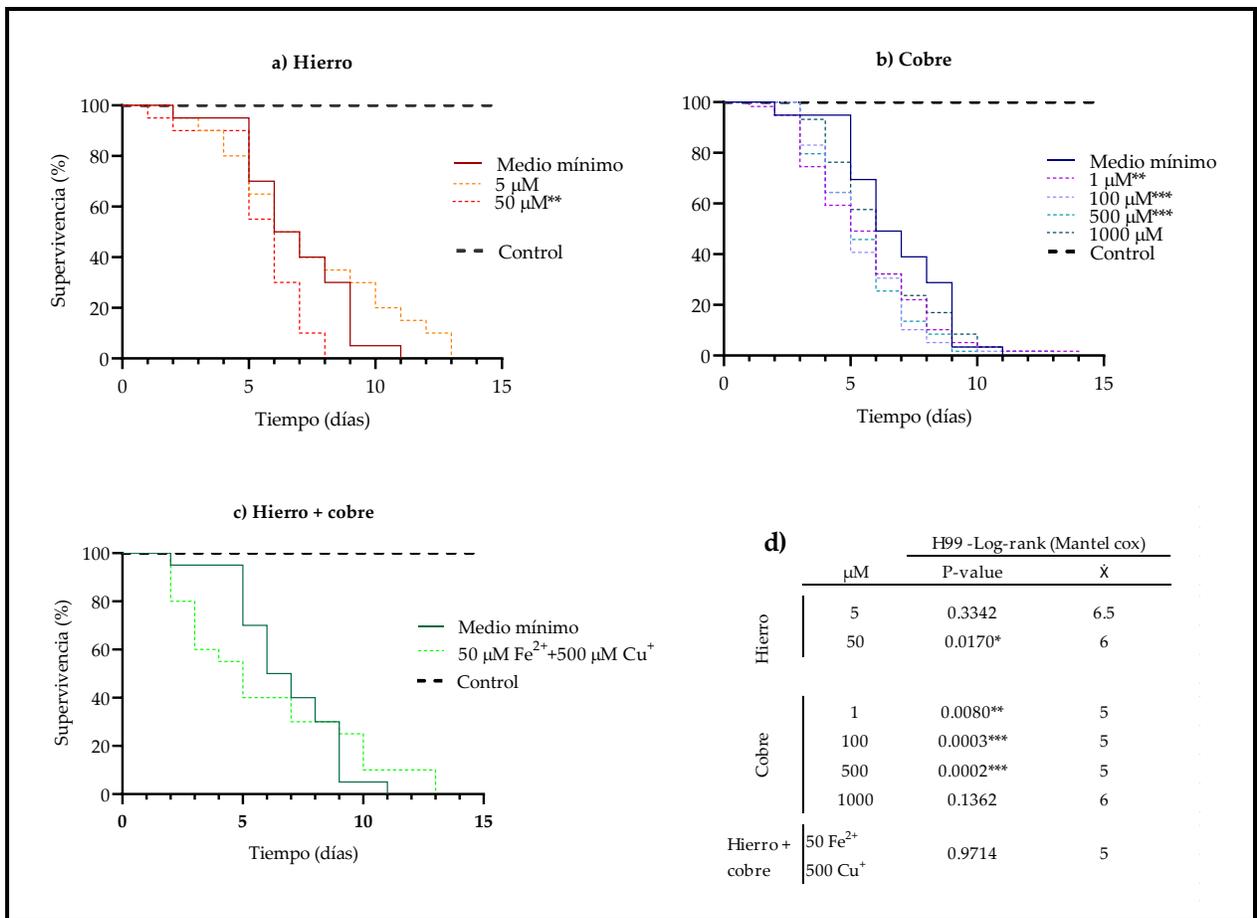


Figura 22. Efecto de a) hierro y b) cobre y c) la combinación en la patogenicidad de H99 en *G. mellonella*
 d) la tabla muestra los resultados de la prueba estadística evaluada en condiciones de precultivo con metales. $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); $p > 0.0001$ (****).

2.3 Efecto del precultivo con hierro y cobre en la capacidad patogénica en H0058-I 2807 y H0058-I-3102, aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.

Como se indica anteriormente, se seleccionaron los aislamientos H0058-I-2807 y H0058-I-3102 y se determinó el efecto del precultivo de 50 μM hierro, 500 μM de cobre y su combinación en su capacidad patogénica. Sin el precultivo con los metales la media de supervivencia del aislamiento 2807 fue de siete días post-infección y en el aislamiento 3102 de cuatro días (**figura 23**). A continuación, se evaluó el efecto del precultivo en medio mínimo suplementado con 50 μM de hierro, 500 μM de cobre y su combinación durante 12 horas. En el aislamiento 2807, en la combinación de los metales fue en la única condición en la que se detectó un aumento significativo en la patogenicidad (**figura 24 a, c**), en el aislamiento 3102, se observó un aumento

en la patogenicidad tanto en el precultivo con cada uno de los metales como en combinación (figura 24b-c). En conclusión, el precultivo con 50+500 μM de hierro y cobre respectivamente, aumentó la patogenicidad en ambos aislamientos comparado con el estado basal (sin metal).

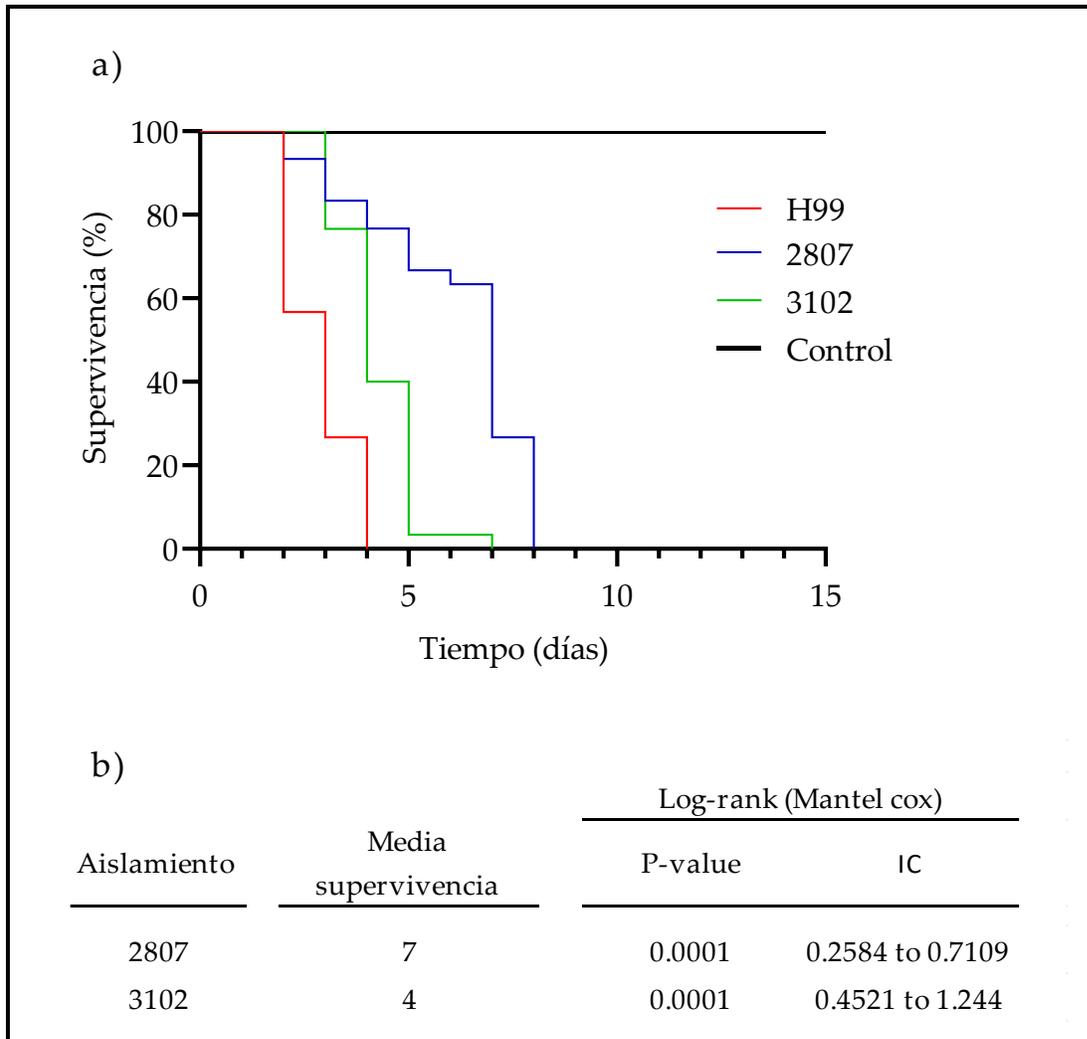


Figura 23. a) Curva de supervivencia de dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* b) la tabla muestra los resultados estadísticos de los aislamientos evaluados.

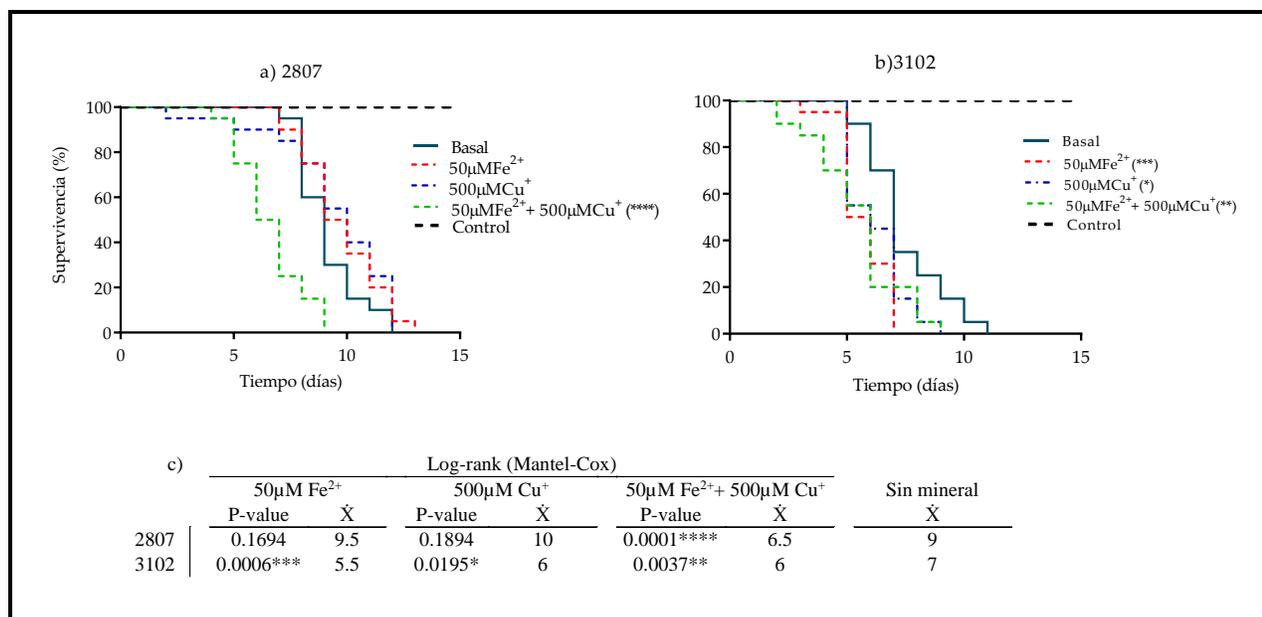


Figura 24. Efecto de hierro, cobre y la combinación en la patogenicidad de dos aislamientos clínicos de *C. neoformans var grubii*. a) 2807 y b) 3102, c) resultados de la prueba estadística de supervivencia se observa el efecto del precultivo de 50 μM de hierro, 500 μM de cobre y su combinación en *G. mellonella*, (\bar{X} =promedio). $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p > 0.0001$ (****).

2.4 Efecto de hierro, cobre y su combinación en la modulación del tamaño capsular en H0058-I-2807 y H0058-I-3102.

Ya que el precultivo con 50 μM hierro, 500 μM cobre y su combinación, indujo cambios significativos en la patogenicidad de los aislamientos clínicos en larvas de *G. mellonella*, a continuación, se evaluó el efecto de estos metales en distintos factores de virulencia, empezando por el tamaño capsular. Tanto en H99 como los aislamientos clínicos mostraron un aumento del tamaño capsular después del precultivo con los metales (**figura 25a y b**).

Se utilizó medio Sabouraud suplementado con MOPS para evaluar el efecto de 50 μM de hierro y 500 de cobre y su combinación en la cepa control H99 y en dos aislamientos clínicos, para este ensayo se realizaron seis cultivos: 1) en condiciones basales es decir sin inducción de la cápsula en MOPS y sin metales, 2) inducción con MOPS, 3) crecimiento en medio mínimo más MOPS, 4) precultivo en la combinación de 50 μM de hierro más MOPS, 5) precultivo con 500 μM de cobre más MOPS y 6) precultivo con 50 μM de hierro, 500 μM de cobre más MOPS.

En la cepa H99, el medio mínimo correspondió al estímulo que mayor efecto tuvo en la inducción capsular con una diferencia hasta de 3.1 μm , seguido de hierro (2.5 μm), la combinación de los metales (1.7 μm) y cobre (1.4 μm) y comparado con la cepa sin inducción con MOPS y sin el precultivo con los metales a esta condición se denominó basal. El tamaño del cuerpo celular fue similar en las condiciones de medio mínimo, hierro, cobre y la combinación, en todos los casos aumento con respecto a la condición basal e inducción con MOPS ($p < 0.0001$) (figura 25 b).

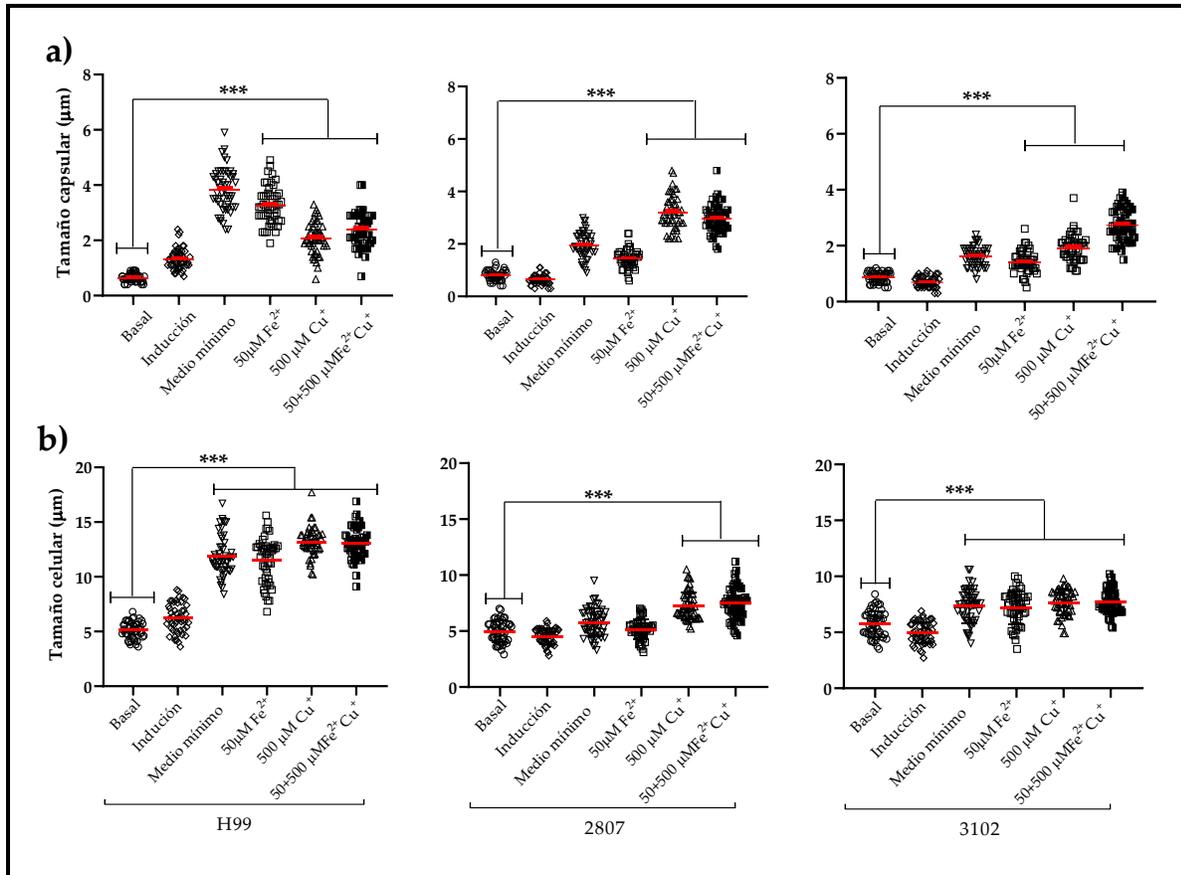


Figura 25. Distribución del a) tamaño capsular y b) celular de H99, 2807 y 3102. Se evaluó diferentes condiciones, basal (crecimiento de células sin inducción con MOPS y sin el precultivo con los metales), inducción con MOPS (sin precultivo con los metales), medio mínimo (crecimiento celular en MOPS más medio mínimo sin metales), 50 μM hierro, 500 μM cobre y su combinación (crecimiento en MOPS más precultivo con las diferentes concentraciones de metales evaluados). $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p > 0.0001$ (****).

Los aislamientos clínicos presentaron una dinámica diferente a la cepa H99. El tamaño de la cápsula en el aislamiento 2807 fue mayor en 500 μM de cobre con una diferencia de 2.2 μm comparado con las demás condiciones, seguido de la combinación de los metales en 2.1 μm . En el aislamiento 3102, el aumento de la cápsula fue mayor en la combinación de los metales con una diferencia de 1.8 μm comparado con las demás condiciones, seguido del precultivo con 500 μM de cobre (1.0 μm) (**figura 25a**).

De manera general se puede decir que el precultivo con medio mínimo y los metales, se observó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con la condición basal y la inducción con MOPS ($p>0.002$). En los aislamientos clínicos el mayor cambio se observó en el precultivo con cobre y en la combinación. En todos estos experimentos también se determinó el tamaño del cuerpo celular y el aumento de la cápsula no se relacionó con un aumento del cuerpo celular para los aislamientos clínicos (**figura 25b**) (**figura 26**).

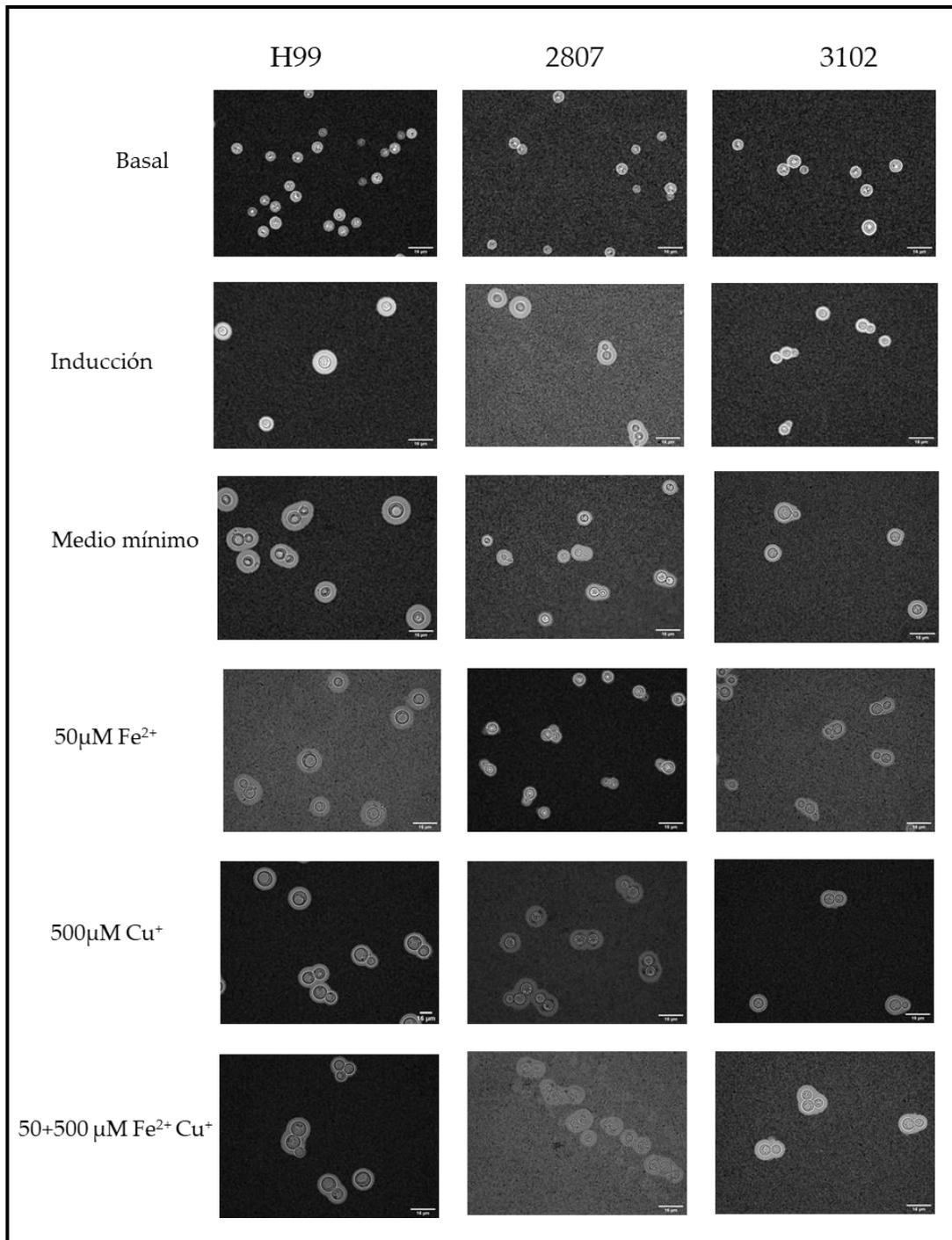


Figura 26. Inducción de la capsula en medio MOPS de *C. neoformans* var. *grubii* en la cepa H99 y en dos aislamientos clínicos (2807 y 3102). Se evaluó diferentes condiciones, basal (crecimiento de células sin inducción con MOPS y sin el precultivo con los metales), inducción con MOPS (sin precultivo con los metales), medio mínimo (crecimiento celular en MOPS más medio mínimo sin metales), 50 µM hierro, 500 µM cobre y su combinación (crecimiento en MOPS más precultivo con las diferentes concentraciones de metales evaluados).

2.5 Efecto en la producción de células tipo titán en H0058-I 2807 y H0058-I-3102.

Las células tipo titán son el segundo cambio morfológicos más importante en *C. neoformans* durante la interacción con el hospedero, el aumento de tamaño en las células se produce tanto en la cápsula y cuerpo celular.

Se utilizó el medio TCM para inducir las células tipo titán y para evaluar el efecto de 50 μM de hierro y 500 de cobre y su combinación en la cepa control H99 y en dos aislamientos clínicos seleccionados. Para este ensayo se realizaron seis cultivos: 1) en condiciones basales es decir en Sabouraud y sin metales, 2) producción de células tipo titán en medio TCM, 3) crecimiento en medio mínimo más TCM, 4) precultivo en la combinación de 50 μM de hierro más TCM, 5) precultivo con 500 μM de cobre más TCM y 6) precultivo con 50 μM de hierro, 500 μM de cobre más medio TCM.

En la cepa H99 en el precultivo con 50 μM de hierro se observó la mayor producción de células tipo titán en las que el cuerpo celular varió de 11.9 a 26.5 μm ($\sigma=2.3$). Esto significó un aumento de 3.3 veces comparado con el diámetro del cuerpo celular de las células de la cepa sin inducción con TCM y sin el precultivo con los metales. A esta última condición la denominados basal y en ella donde el cuerpo celular vario de 4.4 a 7.7 μm ($\sigma=0.8$). En la cepa H99 se observaron células tipo titán con mayor diámetro en las condiciones con medio mínimo y en los metales comparado con la inducción realizada normalmente en medio TCM. En la combinación con metales se observaron células heterogéneas en las que el diámetro celular osciló entre 4.6 y 27.7 μm ($\sigma=6.2$) (**figura 27**).

Al realizar la inducción de los aislamientos clínicos en TCM no se observó producción de células tipo titán. Cuando se realizó el precultivo de las células con cobre y la combinación con hierro, sorprendentemente se observó que los aislamientos produjeron células tipo titán (**figura 27**). El diámetro celular en la inducción con TCM (sin precultivo con los metales) en el aislamiento 2807 fue de 4.2 a 13.8 μm ($\sigma=2.1$) y en 3102 de 4.3 a 14.6 μm ($\sigma=2.3$). En precultivo con cobre aumento el diámetro celular entre 4.4 y 20.8 μm y en la combinación en 4.5 y 19.4 μm en promedio para los dos aislamientos.

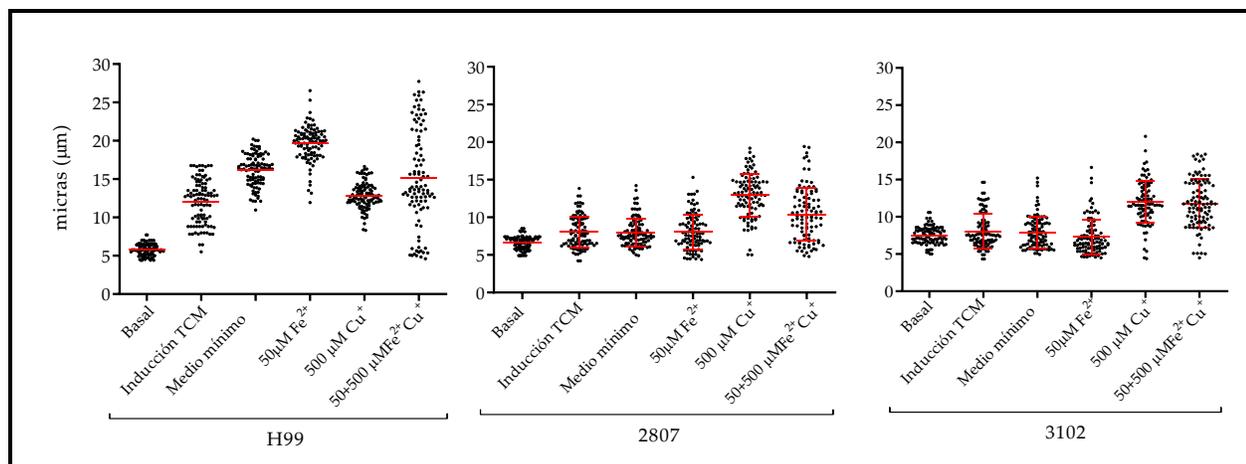


Figura 27. Inducción de células tipo titán en cepas H99, 2807 y 3102. Se evaluó diferentes condiciones, basal (crecimiento de células sin TCM y sin el precultivo con los metales), inducción con TCM (sin precultivo con los metales), medio mínimo (TCM más medio mínimo sin metales), 50 µM hierro, 500 µM cobre y su combinación (TCM más precultivo con las diferentes concentraciones de metales evaluados).

2.6 Efecto en la producción de melanina en H0058-I 2807 y H0058-I-3102.

El estudio de la producción de melanina se realizó como se observa en la **figura 28** en medio L-DOPA, en la cepa H99 y en dos aislamientos clínicos se realizó seguimiento diario durante cinco días para este ensayo. Al evaluar la producción de melanina, en la cepa H99, desde el día dos en la combinación de los metales se observó un aumento de este pigmento comparado con la condición sin precultivo con los metales.

En condiciones de precultivo con 500 µM cobre y en combinación con hierro, la pigmentación de melanina se aceleró en comparación con el estado basal en los aislamientos clínicos, comparando con el precultivo con medio mínimo. En general la combinación de los metales fue la condición de mayor síntesis de este pigmento se observó (**figura 28**).

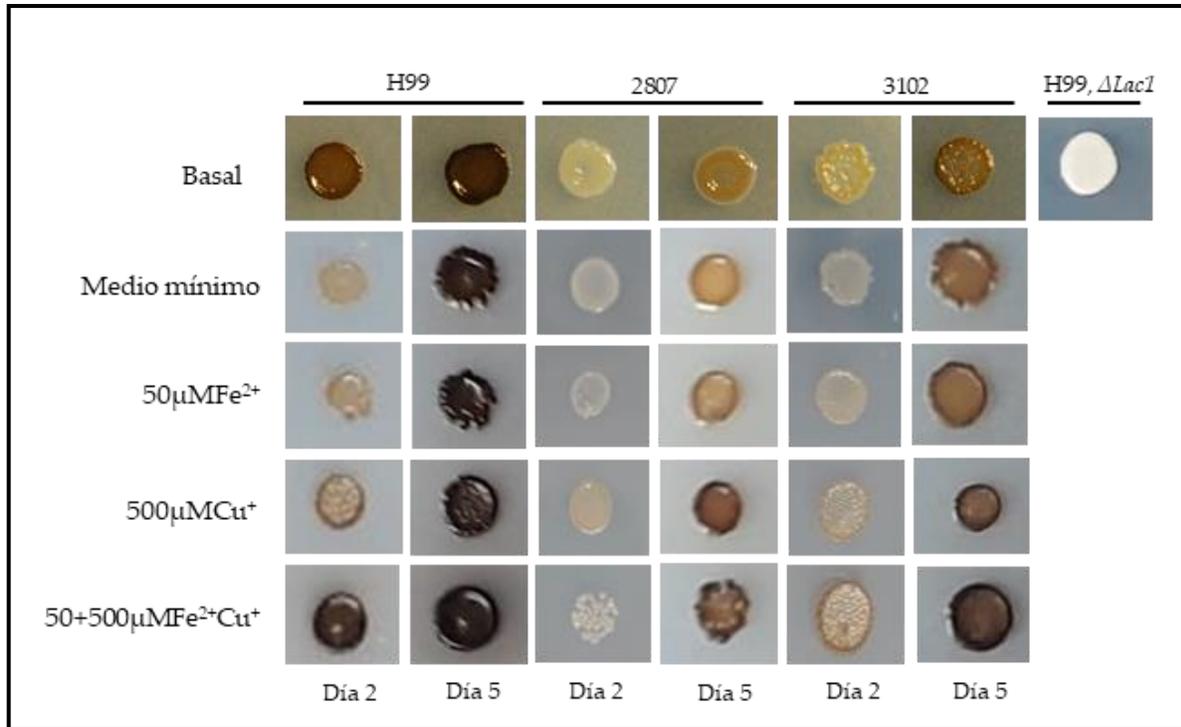


Figura 28. Pigmentación de melanina en medio L-Dopa de *C. neoformans* var. *grubii* (H99, 2807 y 3102). Se evaluó diferentes condiciones, basal (sin el precultivo con los metales), medio mínimo (precultivo con medio mínimo sin metales), 50 μ M hierro, 500 μ M cobre y su combinación (precultivo con las diferentes concentraciones de metales evaluados).

Objetivo 3: Análisis proteómico de los cambios inducidos por el hierro y el cobre y determinación de variantes genéticas en genes asociados con hierro y con cobre en dos aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii de baja y alta patogenicidad.

3. Estudio proteómico del efecto del precultivo de la combinación de 50µM de hierro y 500 µM de cobre en H0058-I 2807 y H0058-I-3102, aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii.

3.1 Análisis global del efecto del precultivo en la combinación de hierro y cobre.

En los experimentos anteriores se describió que la combinación de hierro y cobre representó la condición en la que los aislamientos clínicos presentaron una mayor modulación en la expresión de factores de virulencia. Para obtener información tanto sobre los cambios globales en la abundancia de proteínas como sobre los cambios en proteínas implicadas en los rasgos de virulencia inducidos por la combinación de 50 µM hierro más 500 µM de cobre, se realizó un análisis proteómico de extractos citoplasmáticos de los aislamientos clínicos.

Para la extracción de proteínas para el estudio de expresión diferencial se ajustó cada aislamiento a 1.5×10^8 células/mL en 600 mL de medio mínimo y suplementado con la combinación de 50 µM hierro más 500 µM de cobre a 30 °C y 110 rpm *overnight*. El análisis de proteínas se realizó mediante LC-MS/MS con una columna de cromatografía líquida nano Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive HF* (Thermo Scientific) y sin marcaje de las muestras. Se realizaron cuatro replicas por cada aislamiento y cada condición.

En la condición donde se realizó el precultivo con la combinación de 50+500 µM de hierro y cobre se identificaron 1.484 y 1.549 proteínas para el aislamiento 2807 y 3102 respectivamente. En la condición con medio mínimo se identificaron 1.291 y 1.273 en el aislamiento 2807 y 3102 respectivamente. Se analizaron las proteínas que diferían entre cada aislamiento y por cada condición: 147 proteínas eran específicas en la condición de 50+500 µM de hierro y cobre para los dos aislamientos (**anexo 6**) y 45 en medio mínimo. El conjunto de proteínas comunes en las dos condiciones y para los dos aislamientos fue de 1.008 (**figura 29**).

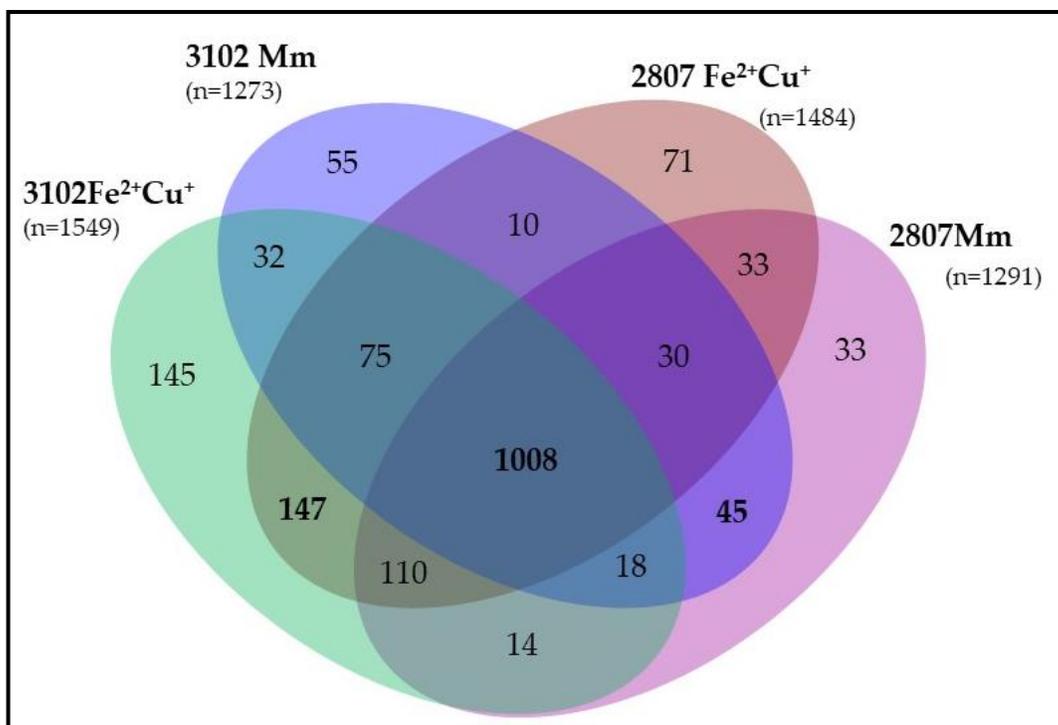


Figura 29. Diagrama de Venn de proteínas identificadas que difieren entre cada aislamiento y por condición. Los dos aislamientos clínicos pre-cultivados en combinación con 50 μM de Fe^{2+} y 500 μM de Cu^{+} y medio mínimo (Mm).

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) en *FungiDB*. En el enriquecimiento en procesos biológicos (PB) en el precultivo con 50 μM de hierro más 500 μM de cobre se identificaron 1.484 proteínas para el aislamiento 2807 y 1.549 proteínas en 3102. Los PB comunes se relacionaron con: tráfico vesicular, metabolismo del ARNt, síntesis de vitaminas, transporte transmembrana de cationes y aniones. En la condición de precultivo con medio mínimo fue común para los dos aislamientos el enriquecimiento en proteínas relacionadas con la producción de lípidos, fosforilación de fosfatidil-inositol, actividad exportadora de protones y actividad exopeptidasa de serina. Estas observaciones muestran una diferencia clara en los procesos biológicos inducidos en cada una de las condiciones estudiadas (**anexo 7**).

En el abordaje cuantitativo sin marcaje o *free label*, se comparó cada condición (Precultivo medio mínimo versus precultivo con hierro y cobre) en cada aislamiento. La selección de las proteínas con tendencia al cambio se basó en las que presentaron una variabilidad menor del 30%, un $q\text{ value} < 0.05$ y un $\text{Log}_2\text{ Fold change} \geq 2$. este filtro se realizó para las dos condiciones. Dentro

de las proteínas seleccionadas, la relación de abundancia fue entre -6.64 y 6.64. Las proteínas diferenciales en el aislamiento 2807 considerando el ratio $Fe^{2+}/Cu^+/Mm$ fueron 130 (88 aumentaron y 42 disminuyeron su abundancia, respectivamente) y en el aislamiento 3102, fueron 198 (149 aumentaron y 49 disminuyeron su abundancia, respectivamente) (**figura 30a**) (**anexo 8**). Para entender los mecanismos compartidos entre los aislamientos inducidos por el precultivo en la combinación de los metales, se analizaron las 49 proteínas comunes entre los dos aislamientos: 30 con mayor abundancia, 14 con menor y 5 con diferente cambio según el aislamiento (**figura 30b**).

Los términos GO obtenidos del análisis de las 30 proteínas que aumentaron en la condición de precultivo con 50+500 μ M de hierro y cobre, se relacionaron con el complejo heterotramérico adaptador de membrana de clatrina, así como con procesos relacionados con la biosíntesis de melanina, las actividades ureasa u hidrolasa, respuesta al calor, concentraciones de sal y estrés osmótico (**figura 31a, 32**). Las proteínas que disminuyeron su abundancia y fueron común entre los dos aislamientos (n=14) se relacionaron con términos GO de transporte transmembrana, respuesta y actividad a los iones metálicos, como la importación de hierro férrico, ión cobre y potasio (**figura 31b, 33**).

Cinco proteínas estaban reguladas diferencialmente entre los dos aislamientos (**ver figura 30b**), dos proteínas aumentaron en el aislamiento 2807: 1) histona arginina metiltransferasa Carm1 y 2) fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y tres disminuyeron en 3102: 1) proteína desoxifusina sintasa 2) el transportador de proteína alfa de subunidad Sec61 y 3) la proteína transmembrana involucrada en el transporte de fosfato inorgánico (Pho88).

La herramienta STRING se utilizó para visualizar las interacciones proteína-proteína predichas y el mapeo KEGG - recurso de base de datos BlastKOALA para el análisis de interacción de red. Las 30 proteínas que aumentaron en común en los dos aislamientos se relacionaron en el metabolismo de purinas, degradación de xileno, síntesis de vernolato III, fotorespiración, síntesis de fructosa, biosíntesis de glutatión, biosíntesis de lipoxinas, entre otros (**figura 32, anexo 9**). Las 14 proteínas que disminuyeron y fueron comunes entre los dos aislamientos se relacionaron con la degradación de D-malato, degradación de fosfatidilglicerol, entre otros (**figura 33, anexo 9**).

3.2 Análisis individual de los cambios proteómicos inducidos por hierro y cobre.

A continuación, se realizó un análisis independiente de cada los aislamientos. Se analizaron las proteínas que tenían una abundancia diferencial utilizando los parámetros antes mencionados (**ver figura 30a**). El análisis mediante GO de las 56 proteínas que aumentaron en el aislamiento 2807 mostró un enriquecimiento en procesos de traducción de la señal de la proteína Rho, traducción de la señal de la proteína Ras, proceso biosintético de la coenzima A y regulación de procesos biosintético de lípidos, entre otros (**anexo 10-libro 1**). Las 25 proteínas que disminuyeron se relacionaron a procesos biosintético de biotina, proceso biosintético de NADP, catabólico del beta-glucano y esporulación sexual, entre otros (**anexo 10-libro 2**). En el aislamiento 3102 el análisis de las 116 proteínas que aumentaron mostró un enriquecimiento en proteínas relacionadas con el proceso metabólico UDP-D- xilosa, proceso catabólico de disacáridos, proceso metabólico de trehalosa, ensamblaje del complejo spliceosoma, respuesta celular al estrés químico, respuesta celular al estrés oxidativo y translocación a lípidos, entre otros (**anexo 10-libro 3**). Las 33 proteínas que disminuyeron se relacionaron con importación de iones cobre, transporte de membrana de aniones, proceso catabólico de compuestos de azufre, transporte de iones de calcio, señalización TOR y el transporte transmembrana de piruvato mitocondrial, entre otros (**anexo 10-libro 4**).

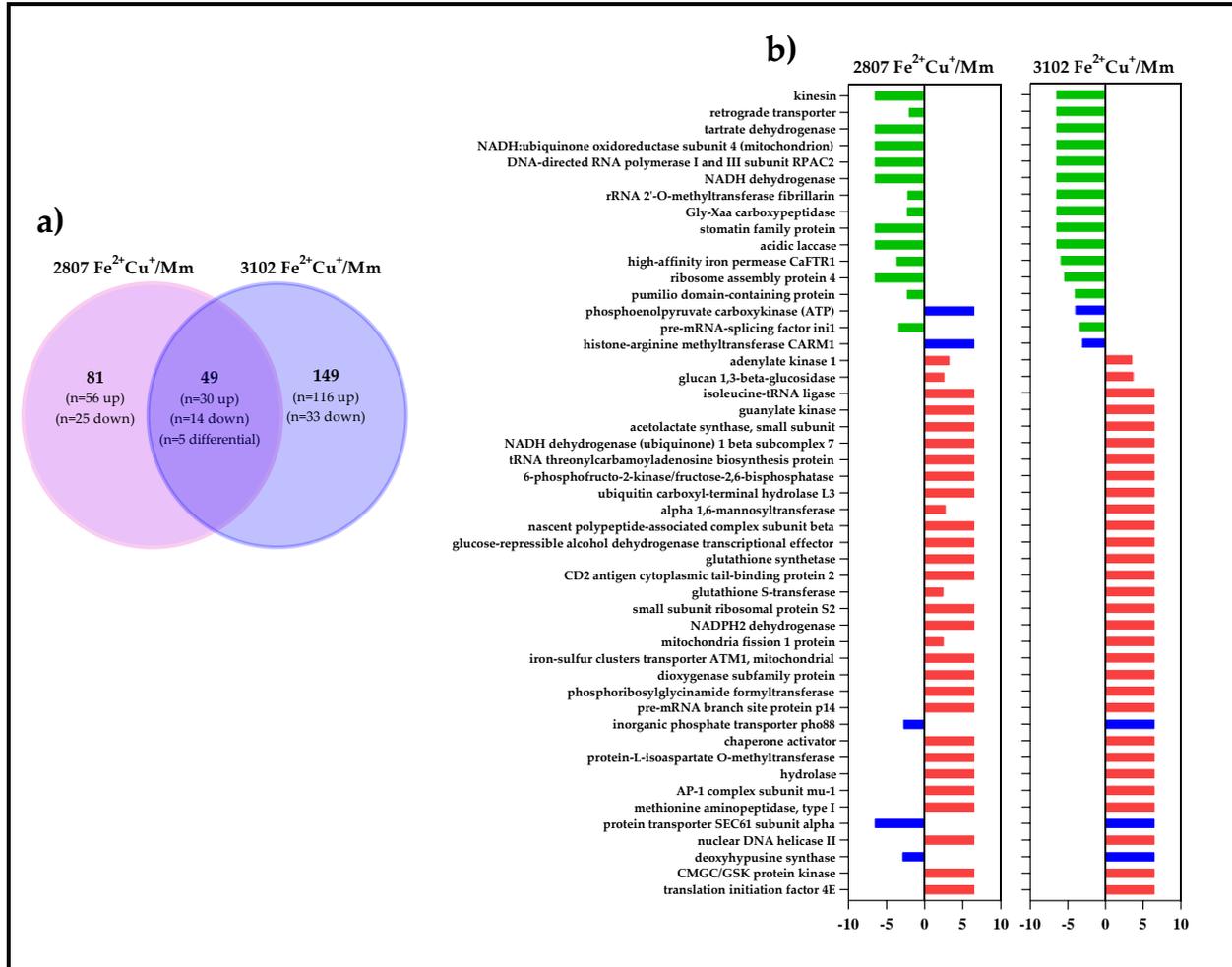


Figura 30. a) El diagrama de Ven indica las 49 proteínas comunes de los dos aislamientos clínicos pre-cultivados en la combinación 50+500 μM de hierro y cobre respectivamente. b) expresión diferencial (proteínas que aumentaron y disminuyeron) de proteínas identificadas en ambos aislados clínicos de *C. neoformans* var *grubii*. En rojo se observan las proteínas que aumentaron, en verde las que disminuyeron y en azul las que presentaron una abundancia diferencial entre los dos aislamientos.

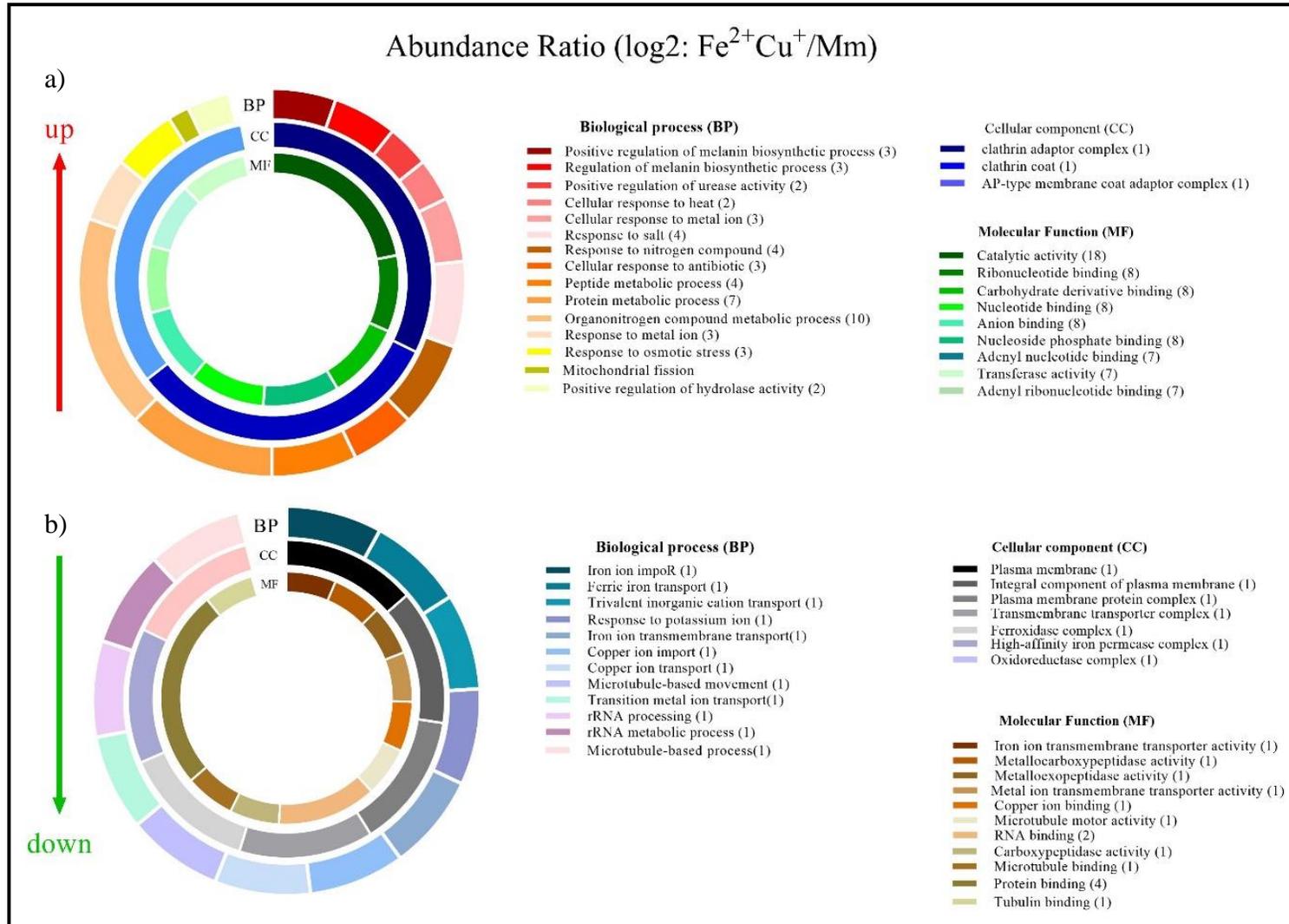
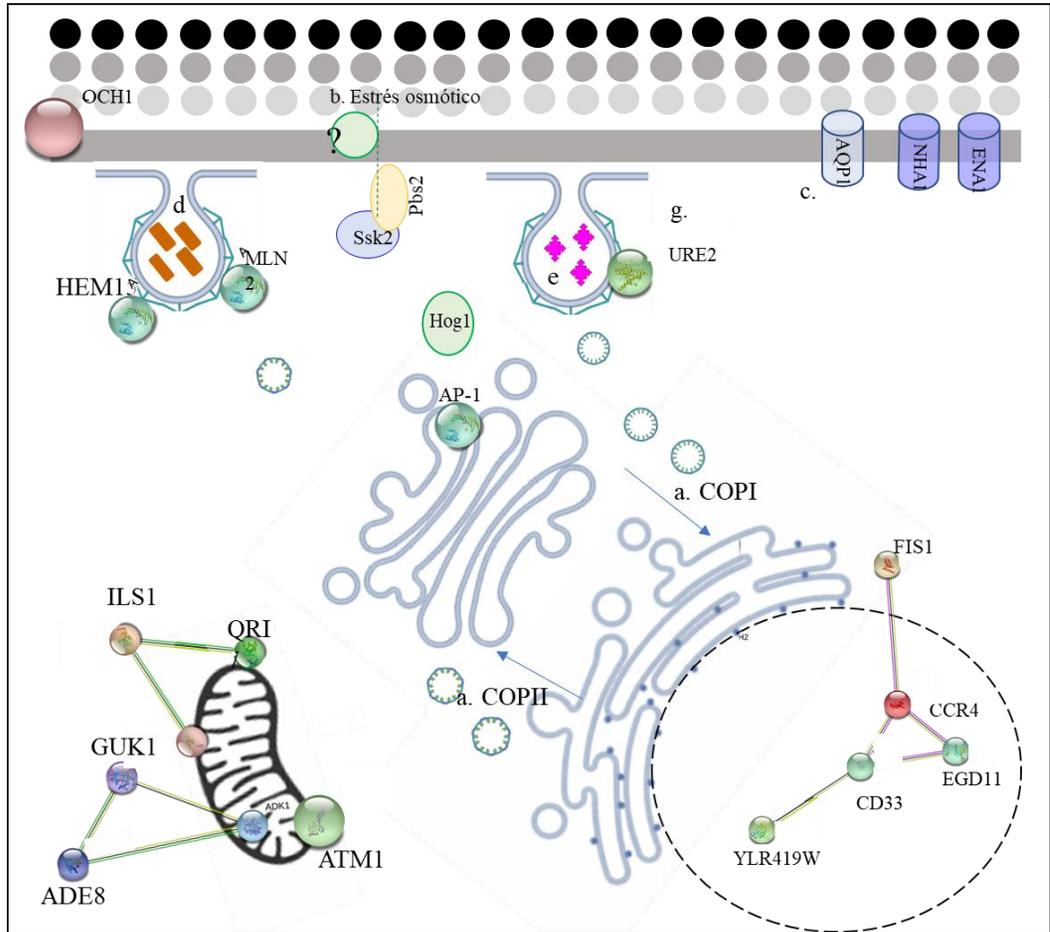
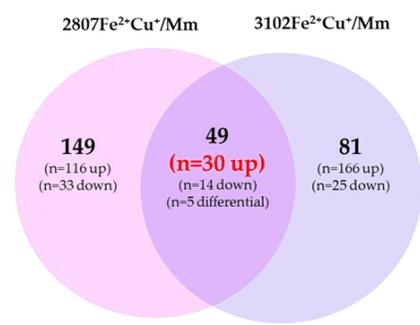


Figura 31. Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos, celulares y moleculares de proteínas que aumentaron, disminuyeron y con abundancia significativa en dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.



Análisis de interacción

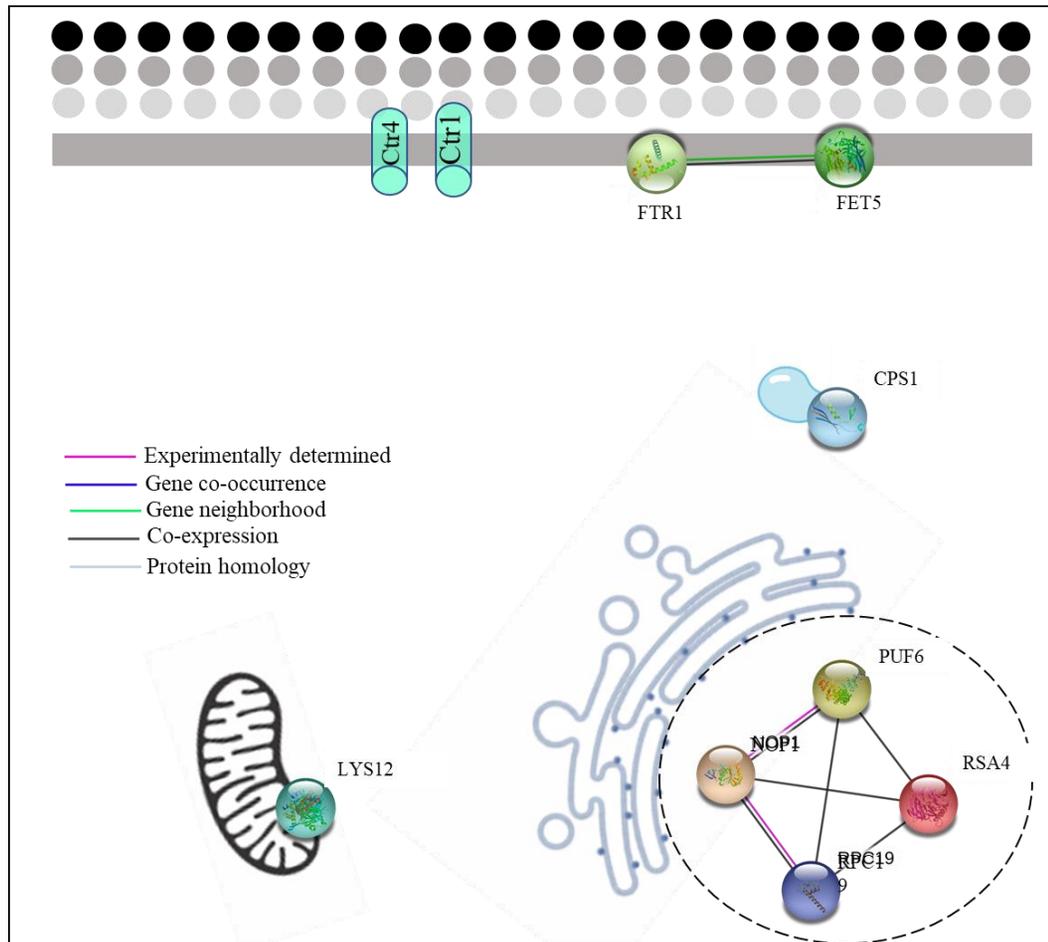


Precultivo con 50+500 μM DE Fe²⁺Cu⁺

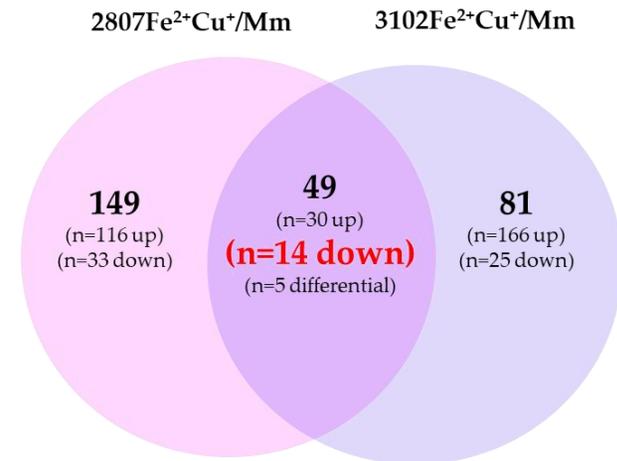
- a. Transporte de vesículas (COPI, COPII y Clatrina).
- b. Respuesta a estrés osmótico.
- c. Respuesta a calor.
- d. Regulación del proceso biosintético de melanina.
- e. Regulación positiva de la actividad de la ureasa.
- f. Respuesta al ion metálico y a sales

- Experimentally determined
- Gene co-occurrence
- Gene neighborhood
- Co-expression
- Protein homology

Figura 32. Análisis de interacción de las 30 proteínas que aumentaron en los dos aislamientos clínicos H0058-I-2807 y H0058-I-3102. Resultados obtenidos en KEEG, STRING y Fungi DB.



Análisis de interacción



Medio mínimo

- Transporte de membrana.
- Respuesta y actividad a los iones metálicos
- Respuesta a bajas concentraciones de nitrógeno.
- Síntesis de lisina
- Procesamiento de RNA
- Biosíntesis de ribosoma requerido para la maduración

Figura 33. Análisis de interacción de las 14 proteínas que disminuyeron en los dos aislamientos clínicos H0058-I-2807 y H0058-I-3102. Resultados obtenidos en KEEG, STRING y Fungi DB.

En el análisis de interacciones proteicas en el aislamiento 2807 en las proteínas que aumentaron se observó que se relacionaron con biosíntesis de L-tirosina III, prolina, coenzima A, supervía de glucolisis y ruta del piruvato entre otras: Las proteínas que disminuyeron se relacionaron con biosíntesis de diacilglicerol, cisteína, trealosa y biosíntesis de biotina entre otras (**anexo 11-libro 1**). Para el aislamiento 3102 en las proteínas que aumentaron se relacionaron con el metabolismo de butanoato, biosíntesis de tirosina, biosíntesis de hemo I y de glicina entre otras. Las proteínas que disminuyeron se relacionaron con respiración aeróbica I y II, oxidación de hierro, biosíntesis de L- glutamato y asimilación de aminoácidos, entre otras (**anexo 11-libro 2**).

3.3 Perfiles de proteínas relacionadas con la biosíntesis de cápsula, melanina y otros factores de virulencia en respuesta al estímulo de la combinación de hierro y cobre.

Se realizó una búsqueda de las proteínas en cada condición y por casa aislamiento que se relacionaran con los principales factores de virulencia cápsula, melanina y patogenicidad, para esto se identificaron las proteínas que estaba enriquecidas con procesos biológicos de estos factores de virulencia antes mencionados como los términos *GO:0048023*, *GO:0045230*, *GO:0042438*, *GO:0006582*, *GO:0048023*, *GO:0009405*, *GO:0045229* y *GO:0009405*

De este modo se comprobó que se habían identificado 205 proteínas tanto relacionadas con la expresión de los principales factores de virulencia, como son cápsula, melanina como otras proteínas relacionadas con patogenicidad (**figura 34**). Todas ellas podrían contribuir a explicar los fenotipos observados de los aislamientos pre-cultivados en la combinación 50+500 μM de hierro y cobre. En la combinación de hierro y cobre comunes en los dos aislamientos se identificaron 16 proteínas. Estas están relacionadas con el transporte citosólico (Ctr2) y endosomal (proteína Vps35), con procesos biosintéticos de regulación de la cápsula (Gsk3 y Chk1), biosíntesis de pigmento (Mln2 y Hem15), síntesis de pared (Och1), entre otros procesos biológicos. Además, se identificaron proteínas únicas en cada aislamiento y condición que permiten evidenciar diferentes estrategias de expresión de factores de virulencia (**anexo 12**).

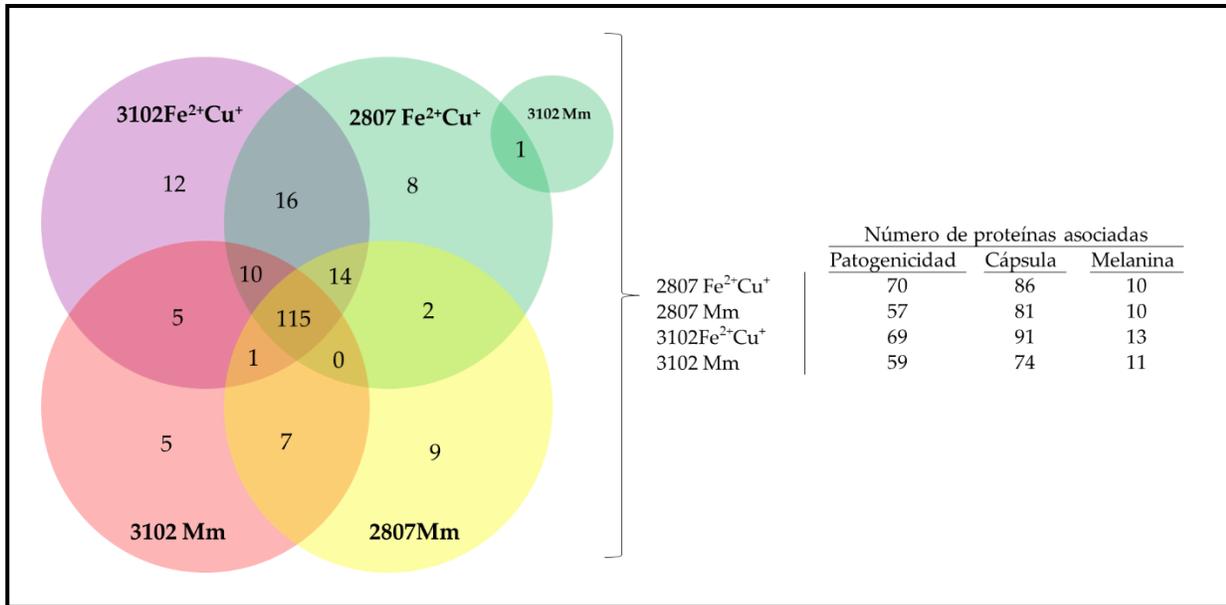


Figura 34. Diagrama de Venn de proteínas relacionadas con los factores de virulencia que difieren entre cada aislamiento y por condición. Los dos aislamientos clínicos pre-cultivados en combinación con 50 μM de Fe^{2+} y 500 μM de Cu^{+} y medio mínimo (Mm).

En el aislamiento 2807 tras el precultivo con hierro y cobre se identificaron ocho proteínas exclusivas relacionadas con la patogenicidad. Estas estaban implicadas en organización de cromatina (Rpd304), respiración celular (succinyl-CoA synthetase beta subunit), transportador de carbohidratos (Ptp1, con identificador CNAG_06064), proteína quinasa serina/treonina implicada en patogenicidad (Ypk1), entre otros procesos biológicos (**anexo 12**). En las mismas condiciones se identificaron 12 proteínas exclusivas del aislamiento 3102 relacionadas con la biosíntesis de cápsula y melanina (Cap2, Kre61, Ssd1, Mbf1), transportador (Afr1) o integridad de la pared celular (Mpk1) entre otros procesos biológicos (**anexo 12**).

En medio mínimo exclusivamente se identificaron transportadores de hierro y cobre (Cft1, Cfo1) en los dos aislamientos. Además, en el aislamiento 2807 en esta condición se identificaron las proteínas Cmt1 y Pbx2 relacionadas con la organización de la cápsula, Rtf1 con la producción de melanina y la proteína Vps41 que está relacionada con respuesta a niveles de nutrientes y hambre. En el aislamiento 3102 se observaron proteínas de respuesta a pH alcalino Ena1, transportador de carbohidratos Gmt1, transportador de cobre Cccc2, entre otras (**anexo 12**).

Posteriormente, se seleccionaron las proteínas con abundancia diferencial y relacionadas con los principales factores de virulencia de *C. neoformans* en los aislamientos clínicos. Como se muestra en la **figura 35a** se identificaron 8 proteínas comunes entre los dos aislamientos de estas cuatro aumentaron (Och1, Gsk3, Ccr4, CNAG_06336) tres disminuyeron (Cfo1, Cft1 y CNAG_00682-t26_1) y una abundancia diferente entre los dos aislamientos (Pck1) (**anexo13**).

A continuación, se indagó qué proteínas relacionadas con los principales factores de virulencia eran exclusivas entre cada aislamiento. En la **figura 35b** se observan 14 proteínas del aislamiento 2807 Fe²⁺Cu⁺/Mm, 9 proteínas aumentaron y 5 disminuyeron. En el enriquecimiento de GO de las proteínas que aumentaron se observó procesos relacionados con la biosíntesis de esfingolípidos, regulación de lípidos, desacetilación de histonas entre otros, las proteínas que disminuyeron se relacionaron con procesos metabólicos de la N-acetilglucosamina y procesos biológicos antes mencionados exclusivos para este aislamiento (**anexo 13**). En el aislamiento 3102 Fe²⁺Cu⁺/Mm, se identificaron 19 proteínas (ver **figura 35c**) de las cuales 14 aumentaron y 5 disminuyeron. Los principales términos GO de las proteínas que aumentaron se relacionaron a la organización de la cápsula externa (Cck1, Uxs1, Mpk1 y Cdc50), asimilación de hierro (Cdc50), biosíntesis de melanina (Cck1, Mbf1 y Mln2), proteínas relacionadas en patogenicidad, las proteínas que disminuyeron se relacionaron con procesos biológicos antes mencionados como el transporte de iones (**anexo 13**).

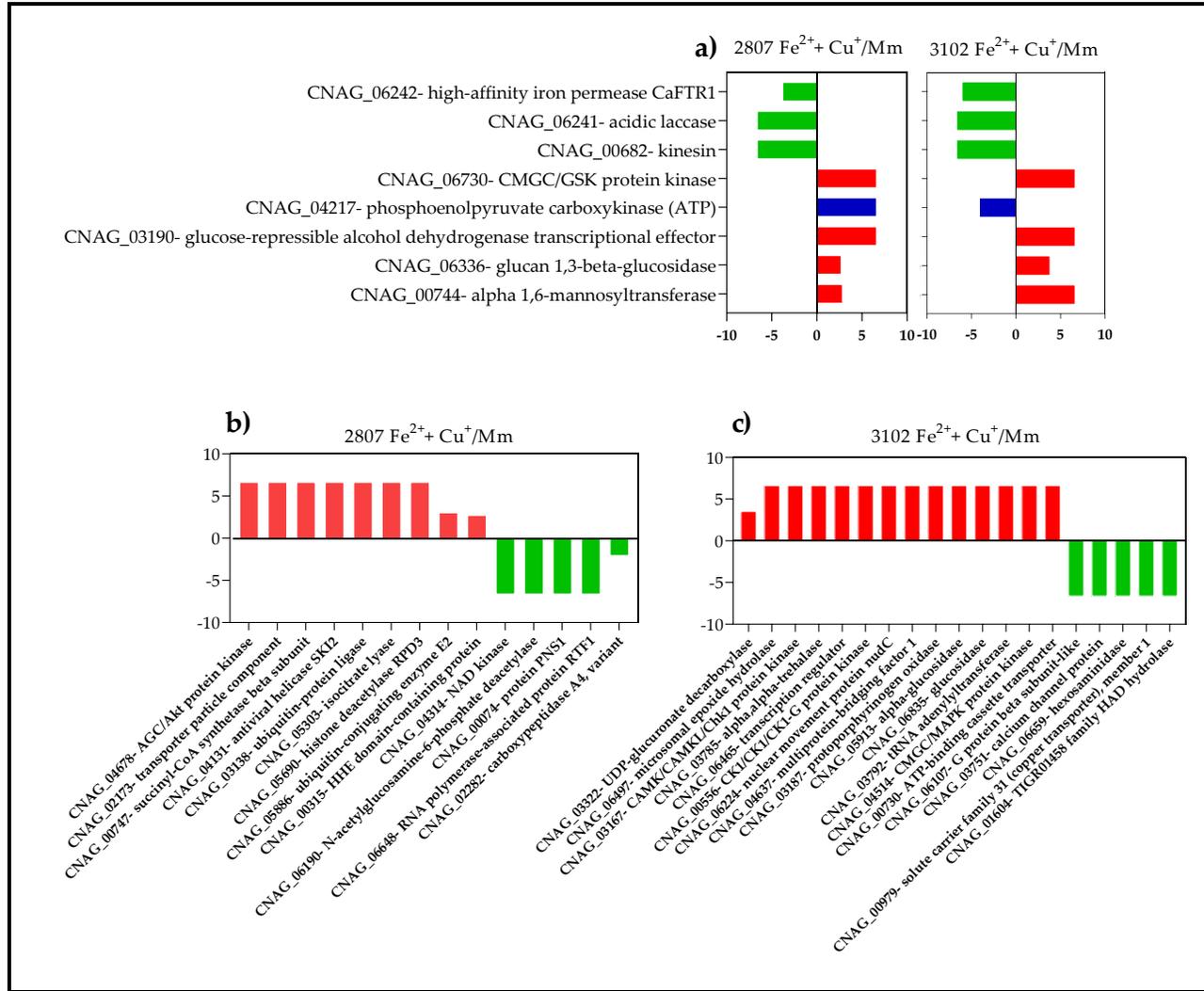


Figura 35. Abundancia relativa de proteínas que aumentaron y disminuyeron relacionadas con la cápsula y melanina en *C. neoformans* var. *grubii*. a) proteínas comunes entre los dos aislamientos, b) proteínas exclusivas de 2807 Fe²⁺ Cu⁺/Mm y c) 3102 Fe²⁺ Cu⁺/Mm. En rojo se observan las proteínas que aumentaron, en verde las que disminuyeron y en azul las que presentaron una abundancia diferencial entre los dos aislamientos.

4. Efecto de la combinación de 50+500 μM de hierro y cobre respectivamente en la patogenicidad de ocho aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* en el modelo *G. mellonella*.

Dado el interés de los resultados encontrados en el análisis de la patogenicidad de dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* al cultivar las células de la levadura con 50 μM hierro, 500 μM cobre y en combinación, a continuación, se indagó si este efecto era general en los aislamientos clínicos. Para su estudio, se evaluaron otros 8 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, estos aislamientos se seleccionaron del objetivo 1.

Los aislamientos presentaron diferentes perfiles de patogenicidad basalmente (sin precultivo con los metales) en el modelo invertebrado (**figura 36, tabla 6**), la mortalidad media en condiciones basales fue de 8.5 días después de la infección, en condiciones de precultivo con 50 μM de hierro fue de 7 días post-infección, con 500 μM de cobre a los 8 días y en la combinación de los metales de 6.1 días. Como se muestra en la **tabla 6**, la patogenicidad aumentó significativamente en 6/8 aislamientos con la combinación de 50 +500 μM de hierro y cobre respectivamente, los aislamientos que no presentaron un aumento en la patogenicidad fueron el 3097 y 2881.

Tabla 6. Efecto en la patogenicidad de ocho aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* en precultivo de 50 μM de hierro, 500 μM de cobre y en combinación en *G. mellonella*, la tabla muestra los resultados de la prueba estadística de los aislamientos evaluados en condiciones de precultivo de metales. $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p > 0.0001$ (****).

Aislamiento	Log-rank (Mantel cox)						Basal
	50 μM Fe ²⁺		500 μM Cu ⁺		50 μM Fe ²⁺ 500 μM Cu ⁺		
	P-value	\bar{X}	P-value	\bar{X}	P-value	\bar{X}	
2257-ST69	****	9.5	0.2899	7	*	6	7.5
2643-ST69	*	6	0.1305	6.5	***	4	7.5
2677-ST95	0.385	6	**	6	**	5	6.5
2881-ST298	0.1548	11.5	*	12	0.1939	8.5	10.5
2926-ST95	0.671	9	***	8	**	7.5	10
3097-ST95	0.4108	7	*	6	0.732	7	7
3279-ST69	0.5361	11.5	0.4284	10	***	9	13.5
3463-ST6	*	7.5	****	7	****	6	9.5

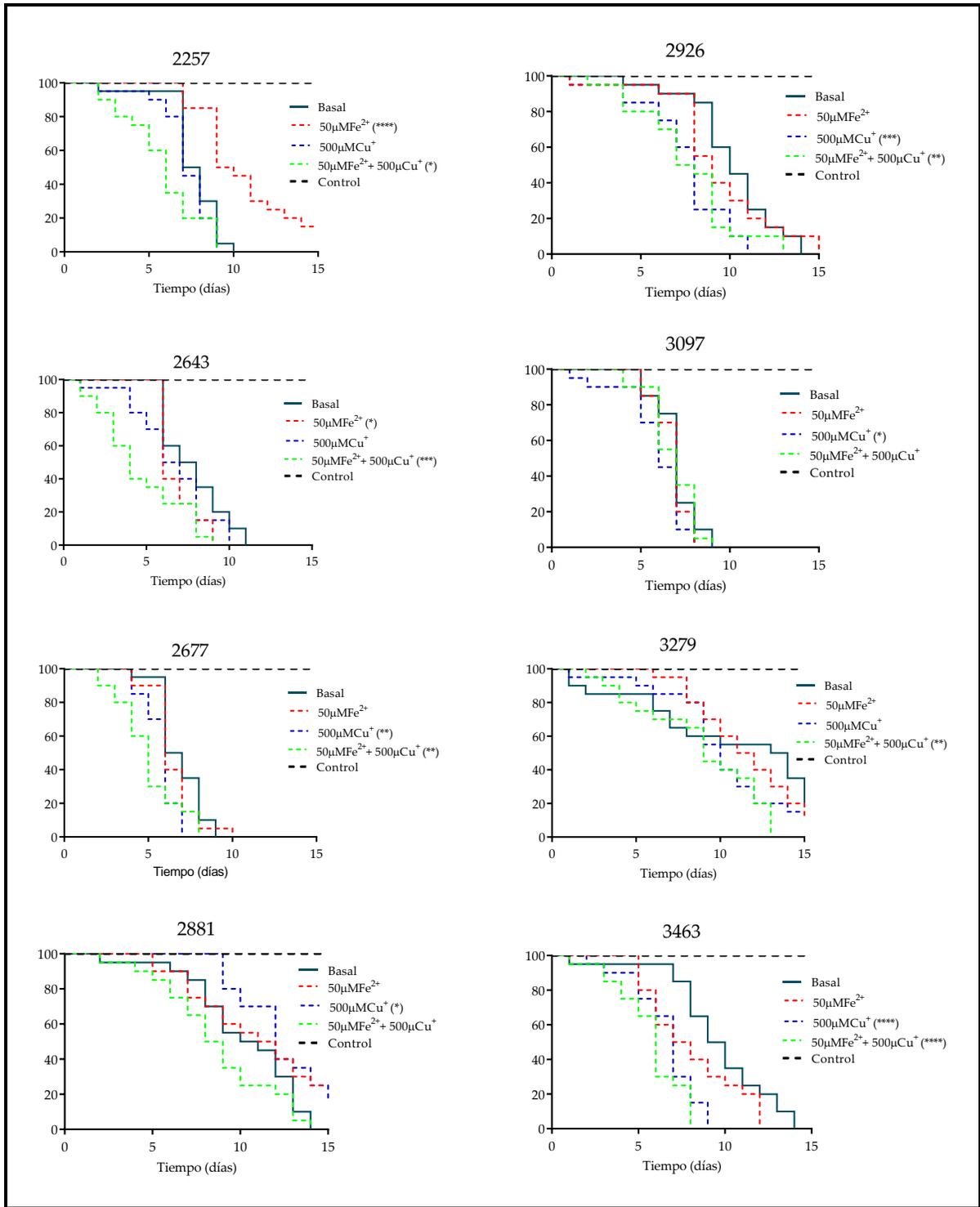


Figura 36. Efecto de 50 µM de hierro, 500 µM de cobre y su combinación sobre la patogenicidad de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p > 0.0001$ (****).

5 Determinación de variantes genéticas asociadas a genes involucrados en hierro y cobre.

5.1 Análisis de las variantes no sinónimas de los aislamientos clínicos H0058-I 2807 y H0058-I-3102.

Con el objetivo de caracterizar los polimorfismos de genes asociados a hierro y cobre presentes en los aislamientos H0058-I-2807 y H0058-I-3102, se identificaron los SNPs presentes en los genomas contra el genoma de la cepa de referencia H99. Se seleccionó estos aislamientos puesto que tenían el perfil proteómico, además, de presentar diferencias en la patogenicidad en *G. mellonella* y en los factores de virulencia evaluados. La metodología implementada fue la utilizada en la sección 1.8, se utilizaron los mismos recursos bioinformáticos, pero en esta ocasión se realizó con genes asociados con hierro y cobre y que estuvieran relacionados con patogenicidad en *C. neoformans*. Se identificaron 77 genes para hierro y 49 para cobre (**anexo 14**).

En la **tabla 7** se observan las variantes identificadas en los dos aislamientos comparadas con el genoma de referencia. Solo se seleccionaron las variantes sin sentido para realizar el análisis de polimorfismos, puesto que es un tipo de mutación puntual que provoca la aparición de un codón sin sentido en el ARNm transcrito lo que conduce a la producción de un producto proteico truncado, incompleto y por lo general no funcional. En los genes relacionados con la homeostasis de hierro *CFO1*, *CFT1*, *SIT1*, los dos aislamientos fueron comparables con el genoma de referencia. Sin embargo, se observaron variantes no sinónimas en el aislamiento 3102 para el factor transcripcional metaloregulador *CIR1* y en los genes que codifican para proteínas Fre. En genes relacionados con cobre se observó que los transportadores de membrana *CTR1* y *CTR4* en los dos aislamientos fueron comparables con el genoma de referencia, pero se observaron variantes no sinónimas en el aislamiento 3102 en las proteínas de desintoxicación Cmt1, Cmt2 y en el factor transcripcional metaloregulador *CUF1*. En este último gen se identificaron 4 SNPs.

Se realizó el análisis para las 49 proteínas que habían mostrado variaciones de abundancia en los dos aislamientos con el precultivo con 50+500 μ M de hierro y cobres (ver **figura 30a**). Se identificó un total de 222 SNPs y 32 INDELS (**figure 37a-b**), en la **tabla 8** se describe las proteínas que presentaron variaciones en su abundancia y que además se identificaron variantes no sinónimas. Brevemente se identificaron 14 variantes sin sentido de las cuales 11 se relacionaron con proteínas que aumentaron y dos disminuyeron y una con una abundancia diferencial, cinco

genes presentaron más de una variante sin sentido (CNAG_07372, CNAG_04110, CNAG_06199, CNAG_00682 y CNAG_03675). En el aislamiento 3102, las variantes sin sentido se identificaron en genes de respuesta a estrés, biosíntesis de melanina, actividad ureasa y transporte mediado por vesículas (**figura 37c**).

Tabla 7. Descripción de variantes identificadas en dos aislamientos clínicos.

Descripción de variantes	2807			3102		
	Similitud-H99	variante	Total	Similitud-H99	variante	Total
Variante 3' UTR	31	8	39	122	55	177
Variante 5' UTR	35	7	42	105	76	181
variante de transcripción descendente	22	0	22	42	31	73
Variante de intrón	52	4	56	136	98	234
Variante sin sentido	78	6	84	239	179	418
Variante de donante de empalme	0	0	0	0	1	1
Variante de transcripción corriente arriba	74	2	76	180	172	352
Total	292	27	319	824	612	1436

Tabla 8. Proteínas con abundancia diferencial identificadas en dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* e identificación de variantes no sinónimas. En gris se observan el cambio de variante por gen. En rojo las proteínas que aumentaron y en azul las que disminuyeron. El recuadro verde indica más de una variante de tipo silenciosa identificada en un gen.

ID_Gen	Posición	Genoma de referencia	Variante	Abundancia Ratio (log2: Fe ²⁺ Cu ⁺ /Mm)				Descripción
				2807	3102	2807	3102	
CNAG_00305	784848	A	G	A	G	6,64	6,64	chaperone activator
CNAG_07372	1581287	A	C	A	C	6,64	6,64	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
	1582581	A	G	G	G	6,64	6,64	
	1582677	A	G	A	G	6,64	6,64	
CNAG_03837	970049	C	T	C	T	6,64	6,64	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
CNAG_03238	415554	C	T	C	T	6,64	6,64	dioxygenase subfamily protein
CNAG_03317	634982	A	T	A	T	6,64	6,64	AP-1 complex subunit mu-1
CNAG_04110	29404	A	G	G	G	2,58	6,64	glutathione S-transferase
	29983	C	A	A	C	2,58	6,64	
CNAG_04313	539615	G	T	G	T	6,64	6,64	NADPH2 dehydrogenase
CNAG_01833	1034762	A	G	A	G	6,64	6,64	translation initiation factor 4E
CNAG_02007	1516848	T	C	C	T	3,36	3,67	adenylate kinase 1
CNAG_06199	594742	A	G	A	G	6,64	6,64	nuclear DNA helicase II
	595333	G	T	G	T	6,64	6,64	
	596068	A	C	A	C	6,64	6,64	
	597389	C	A	C	A	6,64	6,64	
	599576	C	T	C	T	6,64	6,64	
CNAG_06441	492265	T	C	T	C	6,64	6,64	isoleucine-tRNA ligase
CNAG_04822	308306	A	C	A	C	-3,01	6,64	deoxyhypusine synthase
CNAG_00682	1775166	G	A	A	G	-6,64	-6,64	kinesin
	1776190	T	A	T	A	-6,64	-6,64	
	1777076	T	G	T	G	-6,64	-6,64	
	1777837	C	T	C	T	-6,64	-6,64	
CNAG_03675	506172	G	C	G	C	-2,42	-4,19	pumilio domain-containing protein
	506802	C	A	A	C	-2,42	-4,19	
	507547	C	T	C	T	-2,42	-4,19	
	907525	T	C	T	C	-2,42	-6,64	
	908125	C	T	C	T	-2,42	-6,64	

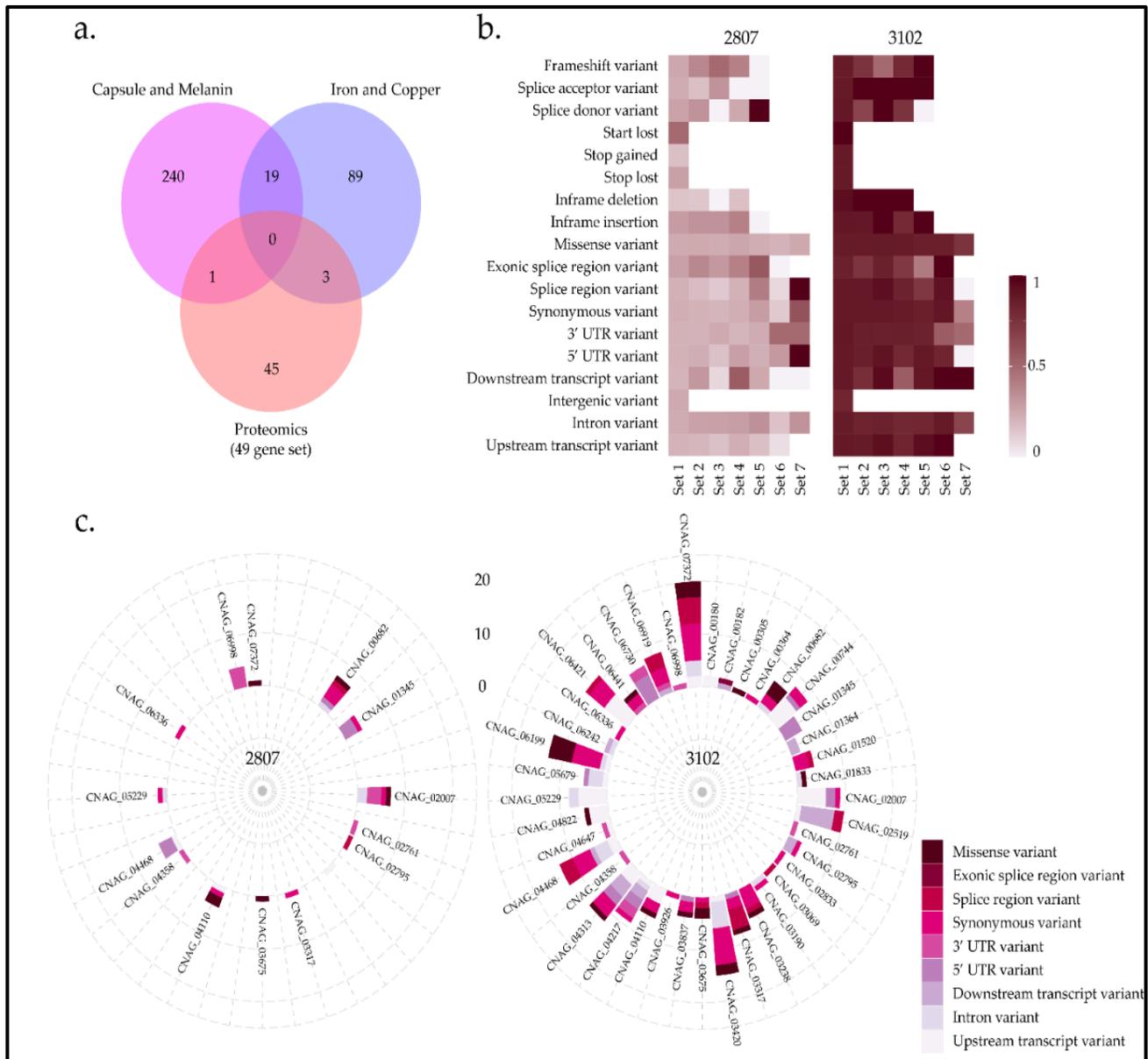


Figura 37. Análisis de SNPs en 49 proteínas en común en dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. a) Diagrama de Venn de polimorfismos de genes asociados a hierro, cobre, cápsula y melanina b) porcentaje de mutaciones para cada tipo de variante c) variantes para el conjunto de genes para cada aislamiento.

5.2. Análisis de los cambios de codificación no sinónimos de las variantes SNPs en 10 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.

Dado el interés de los resultados en el análisis de la patogenicidad en los aislamientos clínicos de *C. neoformans* al cultivar las células de la levadura con 50 μ M hierro, 500 μ M cobre y en combinación. A continuación, se buscó las variantes sin sentido en genes asociados a hierro y cobre en ocho aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

En 8 aislamientos clínicos los cuales fueron pre-cultivados con 50 μ M hierro, 500 μ M cobre y su combinación. En la **tabla 9** se indican las características evaluadas de cada uno de los aislamientos (ver resultados del punto 7.1). Brevemente en estos aislamientos se identificaron seis secuencias tipo. El ST69 se caracterizó por presentar una baja producción de melanina en estado basal (sin inducción con metales), el ST95 presento cápsulas grandes y una alta pigmentación de melanina; en las dos ST aumentó la patogenicidad al pre-cultivar a los aislamientos en la combinación de 50 μ M hierro y 500 μ M cobre (ver **figura 38**).

A continuación, se identificaron los genes relacionados con la adquisición de hierro y cobre como lo son las permeasas de membrana, transportadores citosólicos, metaloreguladores. En la **figura 38**, se puede observar los genes asociados con cobre. En general, la maquinaria de adquisición de cobre fue similar en los diez aislamientos, se observó que el ST95 y ST377 comparten los mismos SNPs en 6 genes (CNAG_05114, CNAG_06668, CNAG_00306, CNAG_06205, CNAG_06208, CNAG_06424), el ST69 fue el único aislamiento que presento un SNPs en el transportador citosólico *CTR2*.

En los genes asociados con hierro, se observó que los aislamientos pertenecientes al ST69 presentaron más variantes no sinónimas en genes como *SITI* (sideróforo), *ATMI* (transportador mitocondrial) y *PKA1* (principal subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico). En los aislamientos pertenecientes al ST95 presentaron un patrón similar al ST377, en las dos STs se identificaron SNPs relacionados al factor de ensamblaje del de hierro-Azufre citosólico (*NARI*) y un transportador tipo ABC (CNAG_05616) (**figura 38**).

Tabla 9. Resumen de los resultados en diez aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* de secuencia tipo, efecto en la patogenicidad en precultivo con hierro, cobre y su combinación, inducción de la cápsula en MOPS y producción de melanina (sin precultivo con metales).

ST	Aislamiento	Efecto en la patogenicidad de <i>C. neoformans</i> en <i>G. mellonella</i> ,				Inducción de la cápsula en MOPS	Producción de Melanina
		Medio mínimo	50µM Fe ²⁺	500µM Cu ⁺	50µM Fe ²⁺ +500µM Cu ⁺		
ST69	H0058-I-2257	7.5	9.5	7	6	Baja	Baja
ST69	H0058-I-2643	7.5	6	6.5	4	Alta	Baja
ST69	H0058-I-3279	13.5	11.5	10	9	Baja	Baja
ST95	H0058-I-2677	6.5	6	6	5	Alta	Alta
ST95	H0058-I-2926	10	9	8	7.5	Alta	Alta
ST95	H0058-I-3097	7	7	6	7	Alta	Media
ST23	H0058-I-2807	9	9.5	10	6.5	Baja	Alta
ST6	H0058-I-3463	9.5	7.5	7	6	Alta	Media
ST298	H0058-I-2881	10.5	11.5	12	8.5	Baja	Alta
ST377	H0058-I-3102	7	5.5	6	6	Baja	Baja

Se señala en grises cada una de las secuencias tipo (ST).

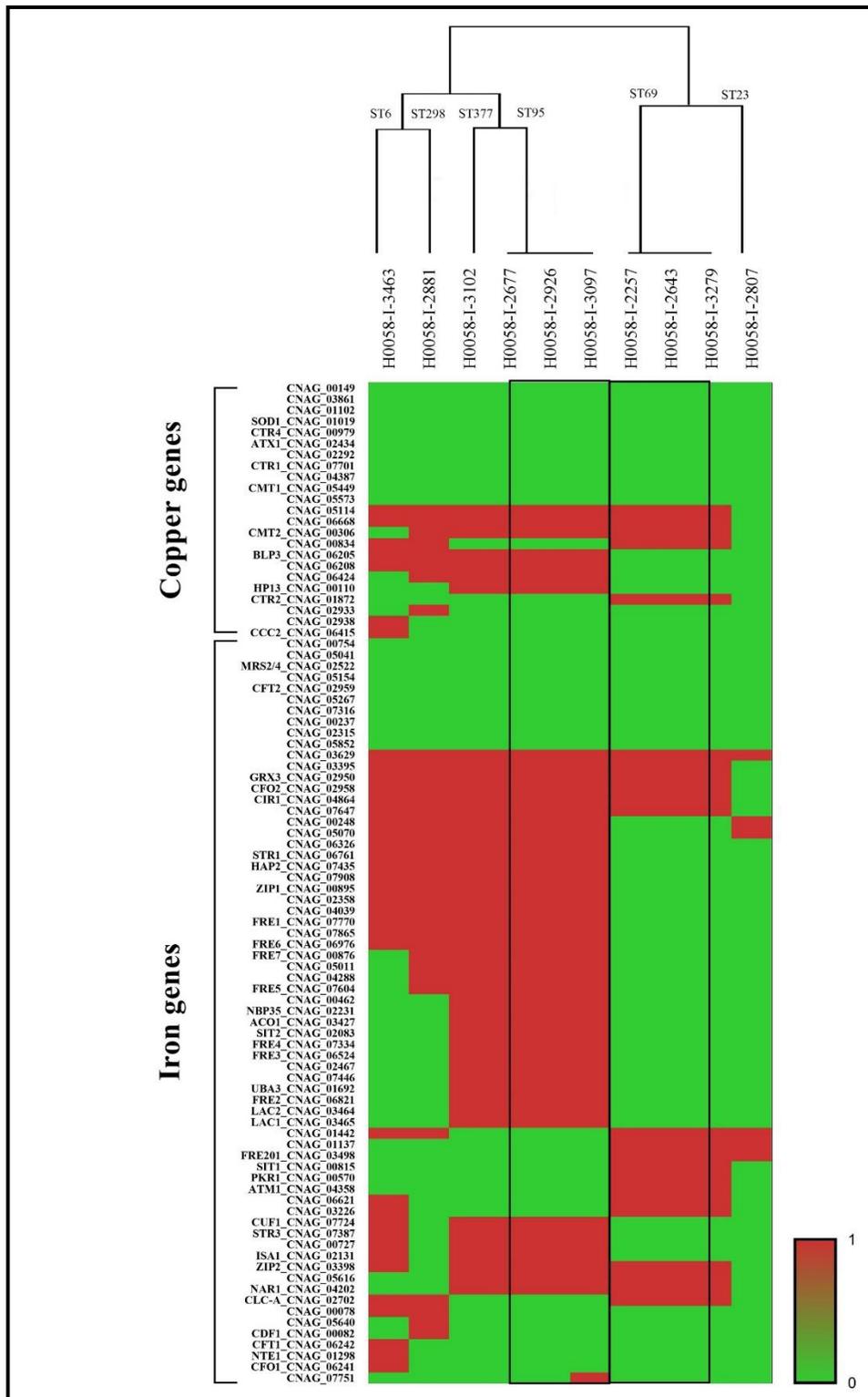
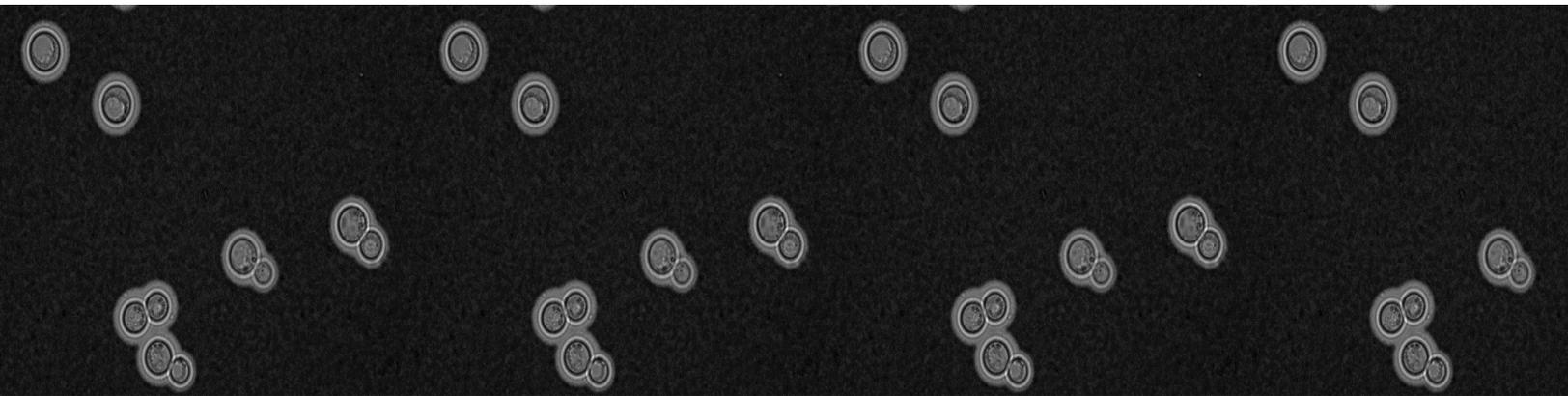


Figura 38. Análisis de SNPs en 57 genes relacionados a cobre y hierro en 10 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. El color verde indica la ocurrencia con el genoma de referencia (H99) y en rojo la variante silenciosa (SNPs)



DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis es caracterizar el genotipo, virulencia, proteoma, y el efecto del hierro y el cobre sobre la modulación de la patogenicidad en 29 aislamientos clínicos colombianos de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. Para ello se caracterizó el genotipo utilizando el esquema de MLST, propuesto por ISHAM, y se determinó la variabilidad patogénica de aislamientos clínicos con el uso del modelo invertebrado *G. mellonella*, la medición del tamaño de la cápsula, la producción de melanina y las variantes no sinónimas de genes asociados al proceso patogénico. Posteriormente, se evaluó el efecto de el hierro y el cobre en la patogenicidad, el tamaño capsular, la producción de melanina y se identificaron las variantes no sinónimas de genes relacionados con los metales antes mencionados en dos aislamientos clínicos, uno de alta y otro de baja patogenicidad. Finalmente, mediante el análisis proteómico de los cambios inducidos por la combinación del hierro y el cobre, condición en la cual se observó un mayor cambio en la patogenicidad se encontraron, entre otras, proteínas que funcionalmente estaban relacionadas con el proceso patogénico.

1. Diversidad genotípica en un grupo de aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii mediante tipificación por MLST.

Se evaluó el genotipo de 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* de origen colombiano mediante tipificación por MLST. Se identificó una alta variabilidad con 11 secuencias tipo, de las cuales tres, ST95, ST298 y ST377, no se habían reportado en aislamientos clínicos colombianos [209]. Además, se identificaron cuatro tipos de secuencia de alta frecuencia reportados globalmente en aislamientos clínicos, a saber, ST2, ST69, ST93 y ST377. Los resultados de este estudio son similares a la investigación realizada en México por Beale A, y col, al encontrar altos niveles de diversidad de secuencias tipo. Los investigadores describieron una alta diversidad genotípica debido a que reportaron 50 tipos de secuencias en 230 aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii*. Además, entre las secuencias tipo con mayor frecuencia descritas por el autor se encuentran dos de las cuales se identificaron con mayor frecuencia en la presente investigación, ST69 y ST93 [210]. También es de señalar que en un estudio italiano de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, el ST69 fue el segundo más prevalente [211]. Por el contrario en estudios en Indonesia y Kuwait esta secuencia se ha reportado con poca frecuencia [212]. En cuanto al ST93, este es uno de los tipos moleculares más frecuentes en países como China, India, Indonesia, Sudáfrica, Uganda, Tailandia y Brasil, entre otros [213–215]. Por ejemplo en Brasil es

considerado uno de los genotipos más prevalentes de cepas oportunistas que afectan a pacientes inmunosuprimidos en el norte de este país [216]. Otro de los ST más frecuentes en este estudio fue el ST2, que presenta como características relevantes que la cepa H99 hace parte de este tipo de secuencia y en Colombia se ha detectado esporádicamente en aislamientos clínicos [209]. Asimismo, ST2 ha sido reportado con baja frecuencia en otros países como África, Argentina, Estados Unidos y Brasil, sin embargo en Alemania hay una alta prevalencia de este ST [27,210,217].

En el estudio más reciente realizado por el Grupo de Estudio Latinoamericano de Criptococosis recopilaron 41 secuencias tipo de los datos públicos disponibles de *C. neoformans*. Las secuencias tipo más frecuentes incluían ST2, ST5, ST23, ST77 y ST93 entre cepas clínicas, ambientales y veterinarias [218]. Esto es comparable con la presente investigación al reportar alta frecuencia en la ST2 y ST93, estos ST se han relacionado genéticamente y se agrupan en clados cercanos a las ST de aislamientos africanos y asiáticos [210,212].

2. La patogenicidad es independiente a la diversidad genotípica en un grupo de aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii.

Las larvas de la polilla de cera *G. mellonella* constituyen un modelo invertebrado ampliamente utilizado para estudios *in vivo* de patogenicidad y virulencia de *Cryptococcus*, en los que la levadura es capaz de proliferar en el hemocele de la oruga [186,191,219]. Este invertebrado y en general los insectos tienen poderosos mecanismos inmunes innatos que incluyen la presencia de hemocitos con actividad fagocítica, que en algunos aspectos se asemejan a la actividad de los macrófagos y neutrófilos del sistema inmunológico innato de organismos mamíferos [186,220].

Los ensayos de patogenicidad realizados en *G. mellonella* en este estudio mostraron que entre los 29 aislamientos se presentaron diferentes perfiles dependiendo del tiempo de muerte de las larvas: los aislamientos de alta patogenicidad mataron en un rango de 2 a 3 días, los de intermedio de 4 a 5 días y los de baja en más de 6 días. Doce aislamientos se clasificaron como de alta patogenicidad, diez de intermedia y siete de baja. La clasificación se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en relación a la cepa de referencia H99, considerada una cepa de alta patogenicidad [208]. Por lo tanto, se concluyó que existe una alta variabilidad entre los aislamientos en su capacidad patogénica y además que esta no asoció con las variables demográficas clínicas

como sexo, edad, origen geográfico de los pacientes en los cuales se recuperó el hongo y tampoco con el resultado obtenido de las secuencias tipo. Este tipo de aproximaciones se ha realizado en varias investigaciones en las que este modelo permite diferenciar aislamientos más o menos patogénicos [191]. Uno de estos es el estudio de Sudáfrica, en el cual observaron heterogeneidad en la patogenicidad aislamientos clínicos; sin embargo, esto no se relacionó con el desenlace de los pacientes [221]. Quizás las diferencias patogénicas entre los aislamientos obedezcan a las condiciones ambientales en que el hongo crece, el modelo utilizado y a las condiciones propias del hospedero.

3. Clasificación de aislamientos patógenos de C. neoformans var. grubii a partir de los principales factores de virulencia: cápsula y melanina.

La cápsula y la melanina contribuyen a la patogenicidad del complejo de especies causantes de la criptococosis. Diversos estudios han propuesto que la interacción con predadores ambientales como las amebas ha supuesto una presión selectiva en esta levadura, que ha conllevado el desarrollo de características que le permiten estar preparada para ambientes extremos, tener una mejor adaptación y por lo tanto, tener una ventaja durante la infección en mamíferos [222].

Teniendo en cuenta que la cápsula es el primer componente que interactúa con el sistema inmunológico, su naturaleza dinámica contribuye a la virulencia al evadir las defensas inmunitarias en el hospedero [99]. En este trabajo, se evaluó el tamaño capsular utilizando dos aproximaciones: a) pre y post-inoculación en el modelo *G. mellonella* y b) inducción de la cápsula en MOPS. Se observaron cápsulas significativamente mayores después de que el hongo fue inoculado en la larva, lo que concuerda con los reportes sobre la infección en mamíferos y en este invertebrado, que muestran que los factores de virulencia son inducibles en el proceso de infección en respuesta a la defensa inmunitaria [191]. La inducción de cápsula *in vitro* se ha descrito utilizando varias aproximaciones, una de ellas es el uso del medio MOPS 50 mM pH 7.3, donde el crecimiento de la cápsula se ve favorecido por un pH alcalino [93]. En este medio se observaron resultados similares a los obtenidos en el modelo invertebrado en el aumento de la cápsula. Por tanto, se comprobó que el medir el cambio de la cápsula *in vivo* o *in vitro* son aproximaciones equiparables. El cambio del tamaño capsular visto en las dos metodologías podría estar relacionada con las características propias del hospedero o del ambiente en el cual se encuentre la levadura. De hecho, se ha reportado que cambios de condiciones ambientales como CO₂, pH y suero inducen el aumento

capsular, como también, concentraciones bajas de hierro y altas de cobre inducen el mismo fenotipo [94,223].

Evaluar la cantidad de melanina en aislamientos clínicos de *C. neoformans* permite diferenciar cepas con mayor capacidad de producir este pigmento [224–228]. Varios estudios proponen que las cepas que no son capaces de producir melanina presentan una reducción significativa en la virulencia [229,230]. En la presente investigación los perfiles de patogenicidad de los aislamientos clínicos no se relacionaron con la pigmentación de melanina: doce se clasificaron como de baja pigmentación, seis de intermedia y once de alta. Renney H, y col [231] sugieren que la velocidad de melanización podría ser más importante que la cantidad final de melanina dado que la melanización protege a las células contra los mecanismos inmunitarios y las células que se melanizan antes tendrían una ventaja de supervivencia. Sabiiti W, y col [232], demostraron que la melanina secretada ayuda a la supervivencia de la levadura en el líquido cefalorraquídeo, pero cuando analizaron la cantidad de melanina producida no establecieron una correlación estadísticamente significativa. Por lo cual, evaluar la velocidad de melanización y no la cantidad final podría asociarse con los perfiles de patogenicidad.

4. Identificación de variantes no sinónimas asociadas a genes de cápsula y de melanina que influyen en la patogenicidad.

En la presente investigación, tras la secuenciación del genoma completo de los 29 aislamientos clínicos, se analizó la correlación fenotípica de aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* con variantes no sinónimas de genes relacionados con los principales factores de virulencia y que influyen en su patogenicidad. Se determinaron 48 variantes no sinónimas asociadas a los fenotipos observados (indicados en la **figura 16**) ubicadas en los dominios funcionales predichos para 39 genes. Algunas de estas se encuentran en genes relacionados con el polisacárido capsular y la síntesis de melanina (*PTP1*, *PMT4*, *IPK1*, *PBX2*, *OVA1* y *ROM2*). Además, estos genes presentan importantes funciones como el crecimiento, el mantenimiento de la pared celular, la secreción de vesículas extracelulares o la respuesta a estrés. Por lo tanto, sería interesante ahondar en el estudio de las consecuencias a nivel de secuencia y función de proteína producidos por las variaciones genotípicas detectadas, ya que de esta forma se podría valorar su relevancia en los fenotipos observados en cada uno de los aislamientos en relación con la patogenicidad. A continuación, se comenta la relación de cada uno estos genes con la patogenicidad en *C. neoformans*.

El gen codificante de la proteína transportadora de poliol *PTP1* (con identificador CNA_05662 o su sinónimo *ITR4*) está implicado en funciones como la proliferación, diferenciación celular, muerte celular programada y respuestas al estrés [233,234]. En la presente investigación se identificaron variantes no sinónimas en los aislamientos pertenecientes a las ST63, ST69, ST77, ST93 y ST377. Este resultado concuerda con lo reportado por Nielsen y col, al encontrar variantes del gen *PTP1* en aislamientos de la ST93 en 38 aislamientos clínicos de *C. neoformans* en Uganda. En dicho trabajo, se analizaron 652 polimorfismos que eran variables entre los genomas de los aislamientos que se agruparon en el ST93. Mediante regresión logística y análisis de componentes principales identificaron 40 genes, entre ellos el *PTP1*, gen que estaba sobre-expresado en el entorno intracelular de amebas y macrófagos murinos. La hipótesis que plantean los autores es que este gen puede estar asociado con la supervivencia humana y la respuesta inmunológica [235].

La alteración del gen *PMT4* que codifica la proteína dolichil-fosfato-manosa-manosiltransferasa en *C. neoformans* produce efectos en la virulencia, inhibe crecimiento a 39 °C y aumenta sensibilidad a anfotericina B [173]. Se identificó la variante de este gen en cuatro aislamientos pertenecientes a las ST5, ST77 y ST298, los cuales presentaron capsulas pequeñas. Las cepas mutantes en este gen presentan defectos morfológicos y alteraciones de la pared celular, posiblemente debidos a cambios en la composición y síntesis de glucanos [236]. La proteína O- manosiltransferasas (proteínas Pmt) desempeña un papel importante en la secreción, localización y función de muchas proteínas de pared celular implicadas en la síntesis de sus componentes como el glucano así como en la integridad de la pared celular y la morfogénesis [237].

El gen *PBX2* que codifica la proteína de repetición de beta-hélice paralela que actúa en la remodelación de la pared celular para mantener la morfología celular y la disponibilidad de precursores para otros procesos sintéticos de glicanos [238]. Se identificó la variante de este gen en los aislamientos pertenecientes al ST69, los cuales presentan en su mayoría capsulas grandes y poca pigmentación de melanina. Su ausencia afecta el crecimiento de la pared celular y la cápsula. Además, se ha observado en modelos murinos que la ausencia de este gen da como resultado cambios en la superficie que inducen a que se produzca mayor fagocitosis [239].

Las inositol polifosfato quinasas (*IPK*) representan objetivos para el diseño de fármacos antifúngicos. Las *IPK* convierten el producto de trifosfato de inositol (IP3) en pirofosfatos de inositol (PP-IP5/IP7) [240]. Se identificó la variante de *IPK1* en 14 aislamientos pertenecientes a las ST5, ST6, ST63, ST77, ST95, ST298 y ST377, los cuales en su mayoría se agruparon en aislamientos con alta patogenicidad. En análisis de mutantes de delección en *IPK1* indicó que este gen es esencial para la patogenicidad. Los mutantes que no producen pirofosfatos de inositol, exhiben un crecimiento atenuado, integridad de la pared celular comprometida y producción reducida de melanina y ureasa [240].

El gen *OVA1* codifica proteínas de unión a lípidos y desempeña un papel en el transporte de vesículas [241,242]. Kronstad y col, sugieren la hipótesis de que *OVA1*, está implicada en la unión de lípidos, la inhibición de las serina proteasas y la regulación de componentes de señalización como las proteínas G heterotriméricas [243,244]. Se identificó la variante de este gen en los aislamientos pertenecientes al ST69. Hu y col., en el 2007 observaron que Ova1 desempeña un papel regulador en el tráfico de proteínas y polisacáridos a la superficie celular de *C. neoformans*, como un componente de vesículas secretoras. Los autores concluyen que Ova1 porta un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que puede servir para unir la proteína a la membrana celular o a los β -1,6-glucanos en la pared celular [244].

El gen *ROM2* que codifica el factor de intercambio de Rho guanil-nucleótido está involucrado en el crecimiento a 37 °C, el apareamiento, el mantenimiento de la estabilidad de la pared celular bajo presiones osmóticas, participa en la organización de actina y microtúbulos y se asocia con la virulencia de *C. neoformans* en ratones [245]. Los mutantes en este gen presentan, además de defectos en el apareamiento y crecimiento a temperatura elevada, daños en la pared celular (ya que existe una deficiencia de (1,3) β -d glucano) [246]. Este efecto está relacionado con que Rom2 interviene en la activación de la GTPasa Rho1 que a su vez activa la proteína quinasa Pkc1 involucrada en la integridad celular [247,248] Se identificó la variante de este gen en 20 aislamientos pertenecientes a las ST6, ST23, ST69, ST77, ST95 y ST377, los cuales en su mayoría se caracterizaron por presentar capsulas grandes. Sería interesante profundizar más en este punto para conocer si existe alguna relación entre la variante de *ROM2* detectada, este fenotipo capsular y la pared celular de estos aislamientos clínicos.

Por otra parte, se identificaron 9 genes que presentan codones de parada, por lo que la proteína resultante puede ser incompleta y normalmente no funcional. Además, curiosamente 9 aislamientos pertenecientes al ST69 presentaron en 7 genes de las 9 variantes no sinónimas relacionadas con codones de parada. Se identificó este tipo de mutaciones en los genes *SIT1*, *ATG1*, *CAP5*, *CHS7*, *CNAG_03684*, *CNAG_01040*, *CNAG_04609*, *CNAG_06382* y *CNAG_05607*. Las mutaciones en algunos de estos genes influyen en la expresión de factores de virulencia. Este es el caso de *SIT1* que es necesario para que el hierro se una al sideróforo, por lo tanto, para el crecimiento de la levadura en ambientes con baja disponibilidad de hierro. También se han descrito que los mutantes *SIT1*, tienen defectos en la pared celular y baja producción de melanina [141]. El gen *ATG1* que codifica para una proteína quinasa se ha relacionado con procesos de autofagia; además, la delección de este gen altera la composición y estructura ensamblada de la cápsula [249]. Las delecciones de *CHS7*, un regulador de la quitinasa III, tiene importancia para la virulencia de patógenos fúngicos como *C. albicans*, *C. neoformans* ya que los mutantes exhiben alteraciones morfológicas [107,250].

Al analizar las variantes no sinónimas según las secuencias tipo identificadas se observó que los aislamientos que pertenecen al ST69 presentaron más SNPs que los aislamientos de las otras secuencias tipo frecuentes (ST2, ST95 y ST377). Los aislamientos del ST69 fueron los únicos que presentaron un cambio de nucleótido en 19 genes incluyendo *SIT1*, *EBG1*, *CAP5*, *SOL3*, *AGO1*, *OVA1*, *CHS7*, *IRK3* y *SPP101* (ver anexo 5). Además, ST69 se caracterizó por presentar en la mayoría de los aislamientos baja producción de melanina y cápsulas grandes. Mukaremera y col, en el 2019 [251], proponen que los estudios *in vivo* con cepas clínicas evolutivamente y estrechamente relacionadas, como las de secuencias tipo idénticas, deben combinarse con análisis genómicos para identificar genes nuevos que son críticos *in vivo*. Los autores demostraron que las infecciones con cepas de *C. neoformans* del mismo tipo de secuencia por MLST podrían tener diferentes resultados clínicos y fenotípicos. Además, concluyen que ningún factor de virulencia *in vitro* por sí solo explica las diferencias *in vivo*. Otras investigaciones afirman que pueden existir una relación entre la secuencia tipo y el resultado clínico. Los resultados obtenidos están en concordancia con estos estudios [252,253].

En un análisis global de las principales variantes no sinónimas identificadas en genes asociados a virulencia y patogenicidad en aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* se describió que

es interesante estudiar más detenidamente las consecuencias genéticas y función de estas proteínas para poder relacionarlas con las diferencias en rasgos fenotípicos y virulencia que se ha detectado en estos aislamientos. Se demostró que es complejo comprender las relaciones entre la diversidad genotípica, la patogenicidad y los factores de virulencia.

5. Efecto del cultivo con hierro y cobre en la patogenicidad y en los principales factores de virulencia en aislamientos clínicos de C. neoformans var grubii.

Los metales son esenciales para los distintos procesos metabólicos de las células eucariotas, sin embargo, el exceso de estos puede actuar de manera tóxica [7]. En este trabajo se comprobó que en altas concentraciones de hierro (100 μM) se inhibe el crecimiento de *C. neoformans*. Kronstad J y col, describieron que concentraciones mayores de 100 μM de hierro inhiben el crecimiento de esta levadura, lo que concuerda con los resultados obtenidos [153,254]. Los resultados también indican que esta levadura es capaz de crecer con 500 μM de cobre. Una posible explicación del porque la levadura pudo crecer en niveles elevados de cobre podría estar relacionada a la expresión de proteínas de desintoxicación Cmt1 y Cmt2 (metaloproteínas ricas en cisteína, que tiene la capacidad de unirse a metales pesados como el zinc y cobre) [255,256]. Raja y col, demostraron que esta levadura secuestra con avidez el cobre de su entorno y tiene la capacidad de acumular una alta cantidad de este metal [257]. Además, Williamson y col, encontraron una mayor expresión de *CMT1* y *CMT2* en una cepa mutante *ctr4Δ* incubada en un medio con alto contenido de cobre. En esa investigación concluyeron que *Ctr4*, *Cuf1* y las metalotioneínas *Cmt* pueden estar actuando juntas para regular la toxicidad del cobre cuando *C. neoformans* se encuentra en un ambiente con altos niveles de este metal [258].

La adquisición de estos metales en un ambiente normal se puede realizar simultáneamente y esto depende de los requerimientos de la célula. Se conocen bien los mecanismos de entrada de estos metales a la célula y se ha documentado que el cobre puede resultar particularmente importante durante la patogénesis fúngica porque la homeostasis de este metal también afecta al hierro a través de un requerimiento de cobre por el transportador de hierro de alta afinidad *Fet3* [254]. Basándose en este conocimiento se decidió combinar 50+500 μM de hierro y cobre, respectivamente, y evaluar el efecto de los dos metales, tanto separados como en combinación, en la patogenicidad en *G. mellonella* y en los principales rasgos de virulencia. Se observó que los pre-cultivos con 50 μM de hierro y en 500 μM de cobre aumentaron la mortalidad en *G. mellonella*, y

al combinar estos dos metales se aumentó significativamente la mortalidad en el modelo invertebrado en 9/10 aislamientos, lo que se podría explicar por la necesidad de cobre de Fet3. Además, es de destacar que esta tesis es la primera investigación que aborda el estudio del impacto de la combinación hierro y cobre en la patogenicidad en *G. mellonella*.

Estudios previos en *C. neoformans* han demostrado que el precultivo con hierro y cobre afecta la patogenicidad en modelos murinos y que dichos metales están involucrados en la expresión de factores de virulencia. Se sabe que la interrupción de factores metaloreguladores de hierro y cobre (*CIR1* y *CUF1*), así como de sus permeasas, da como resultados alteraciones en la patogenicidad [135,160]. Kronstad y col, describieron la avirulencia del mutante *cir1Δ* en ratones, así como la pérdida de producción de la cápsula y el aumento de la producción de lacasa. Estos estudios fueron claves para determinar que el hierro afecta el crecimiento de la cápsula y el pigmento de melanina [142]. Además, el efecto de cobre está relacionado con la pigmentación de melanina [259], y la carencia o baja producción de permeasas o metaloreguladores de cobre afectan la diseminación y expresión de factores de virulencia. Thiele D y col, determinaron que las cepas mutantes que carecen de las proteínas Cmt o que expresan variantes de Cmts defectuosas para cobre exhiben una virulencia atenuada como bajo crecimiento de la cápsula y una colonización pulmonar reducida [260]. Además, los mutantes *ctr1Δ*, *ctr4Δ* y *cuf1Δ* tienen deficiencia de absorción de cobre y muestran defectos de crecimiento en condiciones de hierro y *ctr1Δ* y *ctr4Δ* una reducción en la producción de melanina en agar L-Dopa [261].

Al pre-cultivar los aislamientos clínicos en presencia de estos metales se observaron rasgos fenotípicos relacionados con los efectos descritos. Al comparar el efecto de los metales en cada uno de los rasgos de virulencia evaluado se observó, en todos los casos, que existe un impacto estadísticamente significativo en el precultivo con cobre en aislamientos clínicos de *C. neoformans*, además de un impacto mayor al usar la combinación con hierro. Aunque se realizó la extracción de proteínas totales, no se logró identificar las metalotioneínas Cmt1 y Cmt2, por lo que no nos es posible saber si estas aumentan o disminuyen en presencia de la concentración de cobre empleada. Una posible explicación de que no se hayan identificado estas proteínas es que estas se encuentran ancladas a la pared celular y la metodología de extracción utilizada no favorece la identificación de este tipo de proteínas. Los resultados obtenidos podrían indicar que las metalotioneínas pueden estar desempeñando un papel de desintoxicación con la concentración de

500 μM de cobre y por esta razón se observaron cápsulas aumentadas y mayor pigmentación de melanina.

En conclusión, los resultados obtenidos con los aislamientos clínicos de distinto grado de patogenicidad y virulencia analizadas en este trabajo concuerdan con lo descrito por diversos autores al observar cambios fenotípicos al pre-cultivar a *C. neoformans* con hierro o cobre. La presencia de estos metales favorece el aumento capsular, la pigmentación de melanina. Además, en concordancia con nuestros resultados, recientemente se ha comprobado que estos metales están involucrados en la producción de células titán [102,123,154,262].

6. Efecto del cultivo con hierro y cobre en el proteoma de dos aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.

En el análisis proteómico de dos aislamientos cultivados en la combinación de hierro y cobre se identificaron proteínas que aumentaron su abundancia y que están relacionadas entre otros procesos con el estrés celular, tráfico vesicular (Ap-1, Vps35), estructura de la pared celular (Och1, Ccr4, Gsk3), biosíntesis de pigmento (Hem15, Mln2), reparación de ADN (Chk1), transporte de proteínas (Mms2), SUMOilación (Uba2) y un transportador mitocondrial (Atm1). Por lo tanto, la presencia del precultivo con los metales influye sobre la función de proteínas que están involucradas en la patogenicidad y cuya relación se comenta a continuación.

Respecto al tráfico vesicular, la adaptina Ap-1 es un componente importante de las vesículas que transportan complejos ligando-receptor desde la membrana plasmática o desde la red trans-Golgi a los lisosomas. En levaduras, esta proteína es necesaria para la respuesta transcripcional al estrés oxidativo [263]. En *C. neoformans* se han descrito los mecanismos reguladores de Yap1, una proteína similar Ap-1, que desempeñan funciones evolutivamente conservadas como sensor redox en las respuestas al estrés oxidativo en eucariotas y que promueve la resistencia celular a metabolitos celulares tóxicos producidos durante la glucólisis. La delección de *YAP1* redujo la carga fúngica en ratones y potenció factores de virulencia como melanina y urea [264]. Vps35 forma parte del complejo de carga selectiva caracterizado por Vps26p, Vps29 y Vps35. Éste último es el componente central más importante del complejo mediador de la recuperación de endosomas a trans Golgi en levaduras [265,266]. La delección de este gen en H99 permitió comprobar que es un componente crítico para el complejo de núcleo de reconocimiento de carga [267]. Estos datos

podrían indicar que el aumento del tráfico vesicular es importante para que *C. neoformans* importe los metales del medio extracelular y pueda utilizarlos en su beneficio.

Entre las proteínas relacionadas con la síntesis de la pared celular, la proteína α 1,6-manosiltransferasa Och1 (implicada en la biosíntesis de cadena externa de N-glicanos) afecta la patogenicidad en *C. neoformans* y es prescindible para la virulencia, induce cambios estructurales en la pared celular y afecta la exposición de patrones moleculares asociados a patógenos [268,269]. En especies de *Candida* la pérdida de esta proteína tiene efectos similares [270,271]. Por otra parte, la exoribonucleasa Ccr4-NOT regula la integridad de la pared celular, susceptibilidad a los fármacos antifúngicos y adaptación a la temperatura del hospedero [272]. El complejo Ccr4-NOT es un regulador eucariota conservado, sin embargo, en *Aspergillus* y *Cryptococcus* la proteína es específica, lo que lo convierte en un candidato interesante para el desarrollo de fármacos [273].

Otras proteínas con potencial para convertirse en diana para nuevos agentes antifúngicos son los inhibidores de la quinasa tipo II que tienen efectos inhibidores sobre Gsk3 [274]. En *C. neoformans*, la glucógeno sintasa quinasa Gsk3 está involucrada en la regulación de esteroides, la detección de oxígeno, la sensibilidad al CoCl y la virulencia [275,276]. El aumento de Gsk3 detectado en este trabajo en condiciones de precultivo con la combinación de hierro y cobre, unido a que tras el crecimiento en esas mismas condiciones se observó un aumento de la virulencia de la levadura, están en concordancia con dicha implicación de esta proteína en la virulencia.

El aumento de las proteínas detectadas Hem15 y Atm1 se han relacionado con el precultivo de hierro. La enzima ferroquelatasa (Hem15) la producen los hongos en respuesta a la luz como un medio para reducir su exposición a la fotosensibilización a través de acciones mediadas por la luz sobre las porfirinas y está implicada en la producción de melanina [277]. El transportador Atm1 tipo ABC, codifica los transportadores de amonio y está regulado directamente por Cir1 [38]. Se ha descrito que a niveles elevados de cobre, se activa la expresión del gen *ATM1* y que la delección de este gen da como resultado un defecto en el crecimiento en condiciones de estrés por cobre y patogenicidad disminuida en ratones [278].

En presencia del precultivo con la combinación de hierro y cobre también se detectó un aumento de proteínas que están relacionadas con procesos de reparación ADN, ciclo celular y diferenciación, como la quinasa Chk1 involucrada en la respuesta al daño del ADN. La delección

de *CHK1* hace que las células sean altamente susceptibles al estrés por daño del ADN y aumenta la susceptibilidad a ciertos fármacos como la anfotericina B [279].

También se detectó un incremento de la abundancia de proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas como Uba2 y Mms2. Éstas pertenecen al complejo heterodimérico que activa la proteína SUMO, la cual interviene en el proceso de la modificación post-traducciona denominad SUMOilación; lo que indica que en el precultivo en la combinación de hierro puede haber un aumento de este tipo de modificaciones en las proteínas [280,281]. Estas participan en varios procesos metabólicos de eucariotas, como la biogénesis de ribosoma, regulación del tipo de apareamiento, control del ciclo celular, vía de reparación post-replicación, entre otras respuestas [282].

Además de las proteínas que varían su abundancia en los aislamientos analizados comentadas hasta el momento, para cada aislamiento clínico evaluado en precultivo con la combinación de hierro y cobre se detectaron proteínas exclusivas relacionadas con los principales factores de virulencia, y que posiblemente pueden contribuir al aumento de la patogenicidad observado en el modelo *in vivo*.

En el precultivo con los metales en el aislamiento de baja virulencia 2807 se identificaron 14 proteínas; de estas, tres (Rpd304, Ypk1 y Ptp1) se han propuesto como posibles blancos terapéuticos. La histona desacetilasa Rpd304 cataliza la eliminación de grupos acetilo, lo que conduce a la condensación de la cromatina y la represión transcripcional. En *C. neoformans* las mutaciones en los genes de las histonas implicadas en acetilación/desacetilación causan defectos en la cápsula y en el crecimiento y algunos autores sugieren que la remodelación de cromatina podría estar involucrada en la regulación de la virulencia en este hongo [283–285]. La quinasa Ypk1 está relacionada con las cascadas de señalización dependientes de Tor y está involucrado en la síntesis de esfingolípidos. También está implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Se ha descrito que la eliminación de *YPK1* produce una reducción de la virulencia y exhibe defectos de crecimiento, particularmente a altas temperaturas [286,287]. La proteína tirosina fosfatasa también denominada Ptp1 (con identificador CNAG_06064) es prescindible para la regulación de MAPK. Tae Lenn y col, caracterizaron las funciones de Ptp1 en *C. neoformans* encontrando que es inducible por estrés. Estos autores concluyen que las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) podrían explotarse como nuevos objetivos antimicóticos [288].

Por otro lado, en el precultivo con los metales en el aislamiento más virulento (3102) se detectaron 19 proteínas exclusivas en esta condición. De estas algunas se relacionaron con resistencia antifúngicos, crecimiento a altas temperaturas, integridad de la pared celular y producción de melanina. Una de ellas, la proteína quinasa Mpk1 es responsable de la integridad celular en respuesta a temperaturas elevadas. Además, la fosforilación de Mpk1 es inducida en respuesta a perturbaciones de la biosíntesis de la pared celular por los fármacos antifúngicos y las cepas mutantes que carecen de Mpk1 atenúan su virulencia en modelos murinos [289]. Las vías de la MAP quinasa y calcineurina Mpk1/Slt2 controlan la integridad de la pared celular y promueven la remodelación de la pared celular en condiciones de estrés [290].

Otra de estas proteínas es la proteína de unión ATP Afr1. Se ha demostrado que Afr1 en *C. neoformans* está involucrada en la resistencia *in vitro* al fluconazol e influye en la virulencia [291]. En una investigación reciente se proporcionó la primera evidencia de que la regulación del gen *AFR1* afecta la interacción de *C. neoformans*-microglía, lo que agrega información sobre la complejidad de la virulencia criptocócica y su vínculo con la resistencia a los azoles [292]. Finalmente, para este aislamiento se identificó una de las proteínas requeridas para producción de melanina, Mbf1, un coactivador transcripcional. El mutante de Mbf1 retrasa la melanización y muestran defectos de crecimiento y de apareamiento. Walton y col, propone que en *C. neoformans*, Mbf1 y Snf5 pueden funcionar juntos para regular la transcripción de *LAC1* en condiciones que inducen melanina [293].

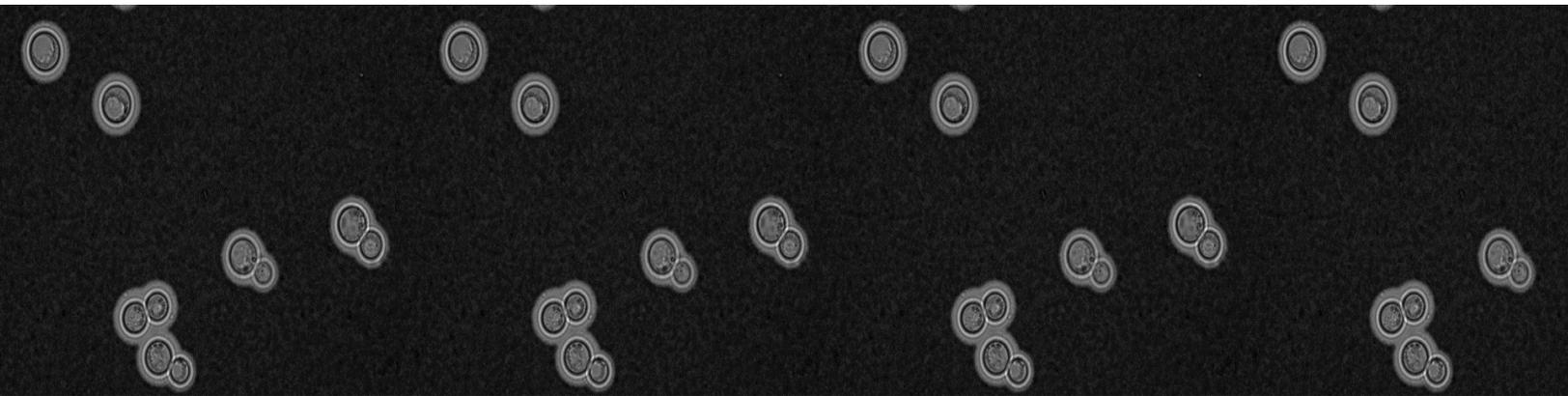
Como se explica anteriormente, al pre-cultivar las cepas con hierro y cobre se detectaron proteínas que pueden estar relacionadas con el aumento de la patogenicidad: sin embargo, el por qué están relacionadas con determinado aislamiento no está claro. Por otro lado, no se encontraron investigaciones que relacionen estas proteínas con precultivo de hierro y/o cobre. Además, es curioso que entre las proteínas exclusivas de una u otro aislamiento haya tantas quinasas y fosfatasa, por lo cual se sugiere realizar estudios para investigarlo y así comprobar si existe una relación directa o no. Por ejemplo, será interesante construir mutantes en estas proteínas y analizar si son, o no, más sensibles a altas concentraciones de estos metales.

Es interesante resaltar que el marcado aumento de la patogenicidad puede explicarse en parte por los resultados que indican que existe un vínculo entre el pre-cultivo en combinación de hierro y cobre y cambios en proteínas asociadas a la cápsula, melanina, pared celular y tráfico vesicular.

Sin embargo, para comprender mejor este proceso y sus mecanismos moleculares en detalle es necesario continuar explorando la dinámica de los metales en la patogenicidad y virulencia en esta levadura. También sería de gran interés incluir en estas investigaciones diversos estímulos que encuentran la levadura en los diferentes ambientes donde interactúa con el hospedero.

C. neoformans vive en diferentes nichos ambientales, como en la naturaleza o durante la infección, por lo tanto, esto da como resultado diferentes requerimientos en su fase de crecimiento. La competencia por metales como el hierro y el cobre entre patógenos oportunistas y hospederos mamíferos es un aspecto crítico para favorecer o no el desarrollo del proceso infeccioso. La sobrecarga de hierro y/o cobre debido a predisposición genética, intervención directa o indirecta, o al estado nutricional aumentan el riesgo de infección por *C. neoformans*. Barluzzi y col, demostraron que la sobrecarga de hierro exagera la meningoencefalitis en un modelo de criptococosis en ratones [136].

Teniendo en cuenta que *C. neoformans* es el principal agente etiológico de la criptococosis en personas inmunocomprometidas (95.6% *C. neoformans* var. *grubii*) es importante que, basados en los resultados de este estudio, en el cual se presentó un marcado aumento de la patogenicidad en aislamientos clínicos con el precultivo de 50 μ M hierro y con 500 μ M cobre y su combinación, se implementen el control de las concentraciones adecuadas en el manejo de cuadros anémicos como por ejemplo en pacientes con VIH/SIDA, con el fin de prevenir en gran parte estas infecciones oportunistas. Además de postular esta nueva estrategia para cambiar esta infección, el comprender el papel complejo que tienen estos metales en esta levadura también ha permitido identificar posibles dianas de fármacos antifúngicos.

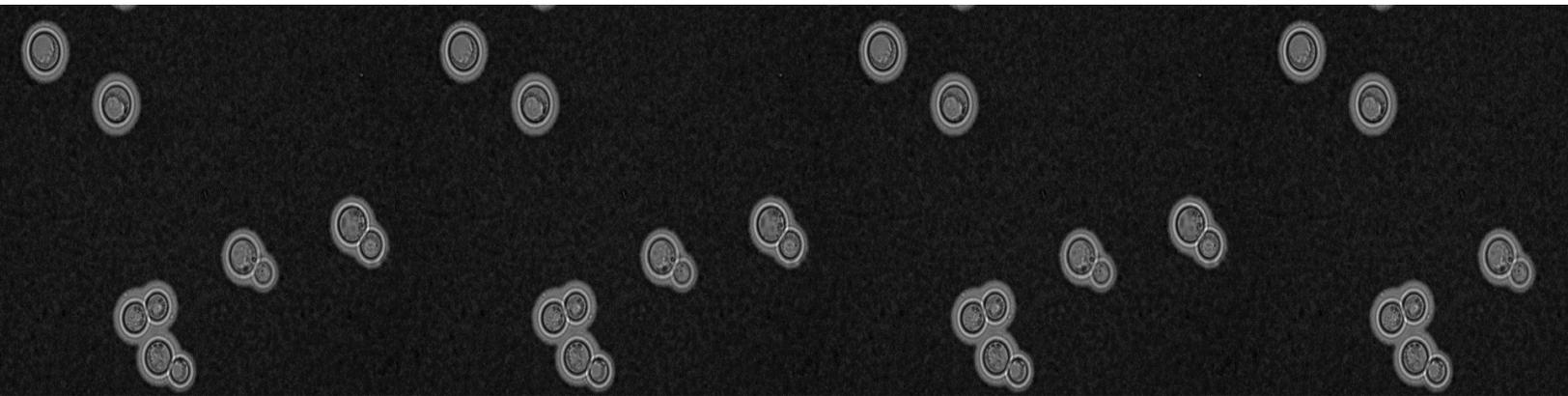


CONCLUSIONES

1. Los aislamientos clínicos colombianos de *C. neoformans* var. *grubii* analizados presentaron diferencias en su capacidad patogénica, la cual es multifactorial y susceptible de ser modulada por la biodisponibilidad de metales como el hierro y el cobre en el ambiente.
2. La patogenicidad y los factores de virulencia evaluados no se asociaron con una secuencia tipo específica en aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, se observó la combinación de caracteres individuales que reflejan diferentes perfiles fenotípicos para cada aislamiento.
3. El análisis de componentes principales sugiere que es factible diferenciar aislamientos más o menos patógenos midiendo el incremento del tamaño capsular, independientemente del método empleado para su inducción.
4. El ST69 fue el más frecuente en los aislamientos clínicos. Los aislamientos que presentan esta secuencia tipo se caracterizaron por presentar alta patogenicidad, capsulas pequeñas y en la mayoría de ellos baja producción de melanina. Además, se identificaron siete genes con codones de parada únicos para esta secuencia tipo.
5. Esta es la primera investigación en proporcionar conocimiento del efecto de la combinación de 50 μM hierro y 500 μM cobre en la patogenicidad y los principales factores de virulencia de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*.
6. La respuesta frente a estímulos de hierro y cobre posee dinámicas diferentes entre la cepa H99 y los aislamientos clínicos. En la cepa H99 el precultivo especialmente con hierro induce la cápsula y está relacionado con la producción de células tipo titán. En los aislamientos clínicos, el precultivo con cobre y su combinación con hierro significó el mayor impacto de cambio en cada rasgo de virulencia evaluado. Los aislamientos pasaron de ser menos a más patógenos, aumentaron su cápsula con respecto al estado basal y precultivo con hierro, produjeron células tipo titán y aumentó la pigmentación de melanina.
7. La patogenicidad aumentó en los aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* con respecto a su estado basal al pre-cultivarlos en la combinación de 50 μM hierro y 500 μM

cobre. Sin embargo, al analizar las STs, en general no existió una relación con su capacidad patogénica en precultivo con estos metales y las distintas ST.

8. Los cambios proteómicos producidos en *C. neoformans* var. *grubii* tras el precultivo con la combinación de 50 μM de hierro y 500 μM de cobre se caracterizaron por un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con respuesta a estrés oxidativo, integridad de pared celular, tráfico vesicular, cápsula y melanina.
9. Se identificaron proteínas exclusivas de interés para futuros tratamientos para cada aislamiento clínico evaluado: 1) para el aislamiento de baja patogenicidad, proteínas que se han propuesto como posibles blancos terapéuticos como Rpd304, Ypk1 y Ptp1 y 2) para el aislamiento de alta patogenicidad, proteínas relacionadas con resistencia antifúngica como MpK1 y Afr1.



REFERENCIAS

1. Crawford, A.; Wilson, D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*, doi:10.1093/femsyr/fov071.
2. Zaragoza, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence* **2019**, *10*, 490–501.
3. Potrykus, J.; Ballou, E.R.; Childers, D.S.; Brown, A. Conflicting Interests in the Pathogen-Host Tug of War: Fungal Micronutrient Scavenging Versus Mammalian Nutritional Immunity. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, 2–5, doi:10.1371/journal.ppat.1003910.
4. Ene, I. V.; Brunke, S.; Brown, A.; Hube, B. Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a019695, doi:10.1101/cshperspect.a019695.
5. Mesquita, M.; Teixeira, F.M.; Schalcher, T.R.; Thielli, M.; Magalhães, F.; Valério, E.S.; *et al.* Cryptococcosis , A Risk for Immunocompromised and Immunocompetent Individuals. **2013**, 9–17.
6. Escandón, P.; Bedout, C. De; Lizarazo, J.; Agudelo, C.I. Cryptococcosis in Colombia : Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomedica* **2012**, *32*, 386–96.
7. Ding, C.; Festa, R.A.; Sun, T.; Wang, Z. Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens. *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 10–23, doi:10.1111/mmi.12653.
8. Askith, C.; Kaplan, J. Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem Sci* **1998**, *23*, 135–8.
9. Bahn, Y.; Jung, K. Stress Signaling Pathways for the Pathogenicity of *Cryptococcus*. *ASM* **2013**, *12*, 1564–1577, doi:10.1128/EC.00218-13.
10. Gatti, F.; Eeckels, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol.* **1950**, *50*, 689–93.
11. Barnett, J. A history of research on yeasts 14: 1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast* **2010**, *27*, 875–904, doi:10.1002/yea.
12. Curtis, F. Contribution a l'étude de la saccharomycose humaine. *Ann. Inst. Pasteur* **1896**, *10*, 449–468.
13. Benham, R. Cryptococci - their identification by morphology and by serology. *J Infect Dis* **1935**, *57*, 255–274.
14. Emmons, C. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol* **1951**, *62*, 685–690.
15. Kwon-Chung, K.J. A New Genus, *Filobasidiella*, the Perfect State of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **1975**, *67*, 1197, doi:10.2307/3758842.
16. Park, B.J.; Wannemuehler, K.A.; Marston, B.J.; Govender, N.; Pappas, P.G. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **2009**, *23*, 525–530.
17. Stephen, C.; Lester, S.; Black, W.; Fyfe, M. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J* **2002**, *43*, 792–94.
18. Kwon-Chung, K.J.; Bennett, J.E.; Wickes, B.L.; Meyer, W.; Cuomo, C.A.; Wollenburg, K.R.; *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* **2017**, *2*, 1–7.
19. Chen, S.; Brownlee, A. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common

molecular type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. *J Infect Dis* **1996**, *173*, 754.

20. Meyer, W.; Marszewska, K.; Amirmostofina, M.; Igreja, R.; Hardtke, C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1790–1799.
21. Sorell, T.; Chen, S.; Ruma, P.; Meyer, W.; Pfeiffer T.; Ellis D.; *et al.* Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol* **1996**, *34*, 1253–1260.
22. Boekhout, T.; Theelen, B.; Diaz, M.; Meyer, W.; Fell, J.; Hop, W.; *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Mycobiology* **2001**, *147*, 891–907.
23. Meyer, W.; Castañeda, A.; Jackson, S.; Huynh M.; Castañeda E. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* **2003**, *9*, 189–195.
24. Latouche, A.; Huynh, M.; Sorrell, T.; Meyer, W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 2080–2086.
25. Meyer, W.; Aanensen, D.; Boekhout, T.; Cogliati, M.; Diaz, M.; Esposito, M.; *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* **2009**, *47*, 561–570.
26. Bovers, M.; Hagen, F.; Kuramae, E.E.; Hoogveld, H.L.; Dromer, F.; St-Germain, G.; *et al.* AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1105–8, doi:10.3201/eid1407.080122.
27. Litvintseva, A.; Thakur, R.; Vilgalys, R.; Mitchell, T. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* **2006**, *172*, 2223–2238.
28. Kwon-Chung K.J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **1975**, *67*, 1197–1200.
29. Hagen, F.; Khayhan, K.; Theelen, B.; Kolecka, A.; Polacheck, I.; Sionov, E.; *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii* /*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* **2015**, *78*, 16–48.
30. Danesi, P.; Falcaro, C.; Schmetzman, L.; Monteiro, L.; Krockenberger, M.; Malik, R. *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. *J. Fungi* **2021**, *7*, 29.
31. Kwon-Chung, K.J.; Fraser, J.A.; Doering, T.L.; Wang, Z.; Janbon, G. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2014**, *4*, 1–27.
32. Loftus, B.; Fung, E.; Roncaglia, P.; Rowley, D.; Amedeo, P. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science (80-.)*. **2005**, *307*, 1321–24.
33. Janbon, G.; Ormerod, K.L.; Paulet, D.; Byrnes, E. J. Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004261.
34. Rhodes, J.; Desjardins, C.; Sykes, S.M.; Beale, M.A.; Vanhove, M. Tracing genetic exchange and biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the global population level. *Genetics* **2017**,

207, 327–46.

35. Desnos-Ollivier, M.; Patel, S.; Raoux-Barbot, D.; Heitman, J.; Dromer, F. F. Cryptococcosis Study Group Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation. *mBio*. **2015**, *6*, e00311.
36. Cuomo, C.; Rhodes, J.; Desjardins, C. Advances in *Cryptococcus* genomics: insights into the evolution of pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2018**, *113*, e170473.
37. Kwon-Chung, K.J.; Varma, A. Do major species concept supports one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* **2006**, *6*, 574–587.
38. Lee, R.; Chow, E.; Morrow, C.; Djordjevic, J.; Fraser, J. Nitrogen Metabolite Repression of Metabolism and Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*. **2011**, *188*, 309–323.
39. Won-Chung K.J.; Polacheck, I.; Bennett, J. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* **1982**, *15*, 535–37.
40. Halliday, C.; Carter, D. Clonal Reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. *J Clin Microbiol* **2003**, *41*, 703–711.
41. Lin, X.; Heitman, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 69–105, doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102.
42. Ene, L.; Bennett, R. The cryptic sexual strategies of human fungal pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **2014**, *12*, 401–16.
43. Alspaugh, J.A.; Davidson, R.C.; Hetman, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Contrib Microbiol.* **2000**, *5*, 217–38.
44. Halliday, C.L.; Bui, T.; Krockenberger, M.; Malik, R.; Ellis, D.H.; Carter, D.A. Presence of α and \mathbf{a} mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2920–2926.
45. Nielsen, K.; Cox, G.M.; Wang, P.; Toffaletti, D.L.; Perfect, J.R. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic \mathbf{a} and α isolates. *Infect Immun* **2003**, *71*, 4831–4841.
46. Viviani, M.; Cogliati, M.; Esposito, M.; Lemmer K.; Tintelnot K.; Colom M.; *et al.* Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS* **2006**, *6*, 614–619.
47. Kidd, S.E.; Bach P.J.; Hingston, A.O.; Mak, S.; Chow, Y.; MacDougall, L.; Kronstad, J.W. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis.* **2007**, *13*, 51–7.
48. Hagen, F.; Boekhout, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia* **2010**, *170*, 209–11.
49. Grover, N.; Nawange, S. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopatho* **2007**, *164*, 159–170.
50. Callejas, A.; Ordoñez, N.; Rodriguez, M.; Castañeda, E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol* **1998**, *36*, 341–344.

51. Soares, M.C.B.; Paula, C.R.; Dias, A.L.T.; Caseiro, M.M.; Da Costa, S.O.P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2005**, *47*, 31–36, doi:/S0036-46652005000100006.
52. Idnurm, A.; Bahn, Y.S.; Nielsen, K.; Lin, X. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 753–64.
53. Charlier, C.; Chretien, F.; Baudrimont, M.; Mordelet, E.; Lortholary, O.; Dromer, F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood brain barrier. *Am. J Pathol* **2005**.
54. Sabiiti, C.; May, R. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Futur. Microbiol.* **2012**, *7*, 1297–1313.
55. Brizendine, K.; Baddley, J.; Pappas P. Pulmonary Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* **2011**, *32*, 727–734.
56. Neuville, S.; Dromer, F.; Morin, O.; Dupont, B.; Ronin, O.; Lortholary O. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. *Clin Infect Dis* **2003**, *36*, 519–523.
57. Neofytos, D.; Fishman, J.A.; Horn, D.; Anaissie, E.; Chang, CH. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* **2010**, *12*, 220–22.
58. Husain, S.; Wagener, MM.; Singh, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. *Emerg Infect Dis* **2001**, *7*, 375–81.
59. Phillips, P.; Galanis, E.; MacDougall, L.; Chong, M.Y.; Balshaw, R. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. *Clin Infect Dis* **2015**, *60*, 1368–76.
60. Mitchell, D.H.; Sorrell, T.C.; Allworth, A.M.; Heath, C.H.; McGregor, A.R. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis* **1995**, *20*, 611–16.
61. Mofenson, L.; Oleske, J.; Serchuck, L.; Van-Dyke, R.; Wilfert, C. Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children, recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR* **2004**, *53*, 1–63.
62. Lizarazo, J.; Linares, M.; Bedout, C. De; Restrepo, Á.; Agudelo, C.I.; Castañeda, E.; *et al.* Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica* **2007**, *27*, 94–109, doi:10.7705/biomedica.v27i1.236.
63. Rajasingham, R.; Smith, RM.; Park, BJ.; Jarvis, JN.; Govender, NP.; Chiller, TM.; *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* **2017**, *17*, 873–881.
64. Hakim, J.; Gangaidzo, I.; Heyderman, R.; Mielke J, Mushangi M.; Taziwa A. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *AIDS* **2000**, *14*, 1401–1407.
65. Holmes, C.; Losina, E.; Walensky, R.; Yazdanpanah, Y. Review of human immunodeficiency virus type 1-related opportunistic infections in sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* **2003**, *36*, 652–662.
66. Mirza, S.; Phelan, M.; Rimland, D.; Graviss E.; Hamill R.; Brandt M.; *et al.* The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992–2000. *J Infect Dis* **2003**, *36*, 789–794.

67. Jarvis, J.; Meintjes, G.; Harrison, T. Outcomes of cryptococcal meningitis in antiretroviral naive and experienced patients in South Africa. *J Infect* **2010**, *60*, 496–498.
68. Escandon, P.; Lizarazo, J.; Agudelo, C.; Castañeda, E. Cryptococcosis in Colombia: Compilation and Analysis of Data from Laboratory-Based Surveillance. *Open Access J. Fungi* **2018**, *4*, 32.
69. Meiring, S.; Quan, V.; Cohen, C.; Dawood, H.; Karstaedt, A. A comparison of cases of paediatric-onset and adult-onset cryptococcosis detected through population-based surveillance, 2005–2007. *Wolters Kluwer Heal.* **2012**, *26*, 2307–2314.
70. Lizarazo, J.; Escandón, P.; Agudelo, C.I.; Castañeda, E. Cryptococcosis in Colombian children and literature review. *Mem Ins Oswaldo Cruz* **2014**, *109*, 797–804, doi:10.1590/0074-0276130537.
71. Cogliati, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo)*. **2013**, *2013*, 67213,23.
72. Vélez, N.; Escandón, P. Distribution and association between environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in bogotá-Colombia, 2012-2015. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, doi:10.1590/0074-02760160201.
73. Mora, D.; Pedrosa, A.; Rodrigues, V.; Leite, M.; Trilles L.; Santos, M, *et al.* Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* **2010**, *48*, 561–569.
74. Trilles, L.; Lazéra, S.; Wanke, B.; Vasconcelos, R.; Martins, N. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 455–462.
75. Badiee, P.; Hashemizadeh, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* **2014**, *139*, 2 195-204.
76. Springer, D.; Chaturvedi, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emer Infect Dis* **2010**, *16*, 104–20.
77. Walraven, C.J.; Gerstein, W.; Hardison, S.E.; Wormley, F. Fatal disseminated *Cryptococcus gattii* infection in New Mexico. *PLoS One* **2011**, *6*, e28625.
78. Chowdhary, A.; Prakash, A.; Randhawa, H.S.; Kathuria, S. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. *Mycoses* **2013**, *56*, 222–228.
79. Litvintseva, A.; Thakur, R.; Reller, L. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* **2005**, *192*, 888–892.
80. Farrer, R.; Chang, M.; Dorp, L.; Yang, D.; Shea, T.; Sewell, T. A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezian Miombo Woodlands. *MBio* **2019**, *10*, e02306-19.
81. Guidelines for The Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children. *World Heal. Organ.* **2018**.
82. Castañeda, E. A protocol for the study and management of patients with cryptococcosis. *Infectio* **2012**, *16*, 123–125.
83. Chandener, J.; Adou-Bryn, K.D.; Douchet, C.; Sar, B.; Kombila, M.; Swinne, D.; *et al.* In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* from Africa and Cambodia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *23*, 506–508,

doi:10.1007/s10096-004-1136-2.

84. Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Boyken, L.; Hollis, R.J.; Rice, C.; Tendolkar, S.; et al . In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *48*, 201–205, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.008.
85. Pfaller, M.A.; Castanheira, M.; Diekema, D.J.; Messer, S.A.; Jones, R.N. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *71*, 252–259, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.07.007.
86. Espinel-Ingroff, A.; Aller, A.I.; Canton, E.; Castañón-Olivares, L.R.; Chowdhary, A.; Cordoba, S.; et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: An international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5898–5906, doi:10.1128/AAC.01115-12.
87. Casadevall, A.; Pirofski, L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* **1999**, *67*, 3703–13.
88. Casadevall, A.; Pirofski, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* **2001**, *184*, 337–44.
89. Köhler, J.; Hube, B.; Puccia, R.; Casadevall A Fungi that Infect Humans. *Microbiol Spectr* . **2017**, *5*, FUNK-0014-2016.
90. Casadevall, A.; Steenbergen, J.; Nosanchuck J. Ready made virulence and “dual use” virulence factors in pathogenic environmental fungi-the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* **2003**, *6*, 332–337.
91. Sánchez, A.; Escandón, P.; Castañeda, E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Rev Iberoam Micol* **2008**, *25*, 145–149.
92. McFadden, D.; Fries, B.; Wang F.; Casadevall A. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **2007**, *6*, 1464–1473.
93. Zaragoza, O.; Casadevall, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* **2004**, *6*, 10–15.
94. Bose I, Reese A, Ory J, Janbon G, D.T. A Yeast under Cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **2003**, *2*, 655–663.
95. Chang, Y.C.; Kwon-Chung, K.J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **1998**, *66*, 2230–2236.
96. Kozel, T. R.; Levitz, S. M.; Dromer, F.; Gates, M. A.; Thorkildson, P.; Janbon, G. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O acetylation or xylosyl side chains. *Infect Immun* **2003**, *71*, 2868–75.
97. Moyrand, F.; Chang, Y.C.; Himmelreich, U.; Kwon-Chung, K. J.; Janbon, G. Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot Cell* **2004**, *3*, 1513–24.
98. Janbon, G.; Himmelreich, U.; Moyrand, F.; Improvisi, L.; Dromer, F. Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Mol*

Microbiol **2001**, *42*, 453–67.

99. O'Meara, T.; Alspaugh, J. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. *Clin Microbiol Rev* **2012**, *25*, 387–408.
100. Casadevall, A.; Nosanchuk, J.D.; Williamson, P.; Rodrigues, M.L. Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol* **17**, **2009**, *17*, 158–62.
101. Rodrigues, M.L.; Nakayasu E.S.; Oliveira, D.L.; Nimrichter, L.; Nosanchuk J.D. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **2008**, *7*, 58–67.
102. Gomez, B.L.; Nosanchuk, J. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* **2003**, *16*, 91–96.
103. Huffnagle G. Chen B, Curtis, J, Donald M, Trieter R, T.G. Down regulation of the afferent phase of T cell mediated pulmonary inflammation and immunity by high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* **1995**, *155*, 3507–3516.
104. Martinez, L.R.; Casadevall, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50*, 1021–33
105. Ikeda, R.; Sugita, T.; Jacobson, E.S. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol* **2003**, *47*, 271–277.
106. Lee, D.; Jang, E.; Lee, M.; Kim, S.; Lee, Y.; Lee, K. Unraveling Melanin Biosynthesis and Signaling Networks in *Cryptococcus neoformans*. *MBio* **2019**, *10*, e02267-19.
107. Banks, I.R.; Specht, C.A.; Donlin, M.J.; Gerik, K.J.; Levitz, S.M. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **2005**, *4*, 1902–12.
108. Walton, F.; Heitman J.; Idnurm A. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 1381–96.
109. Rosas, A.L.; Nosanchuk, J.D.; Feldmesser, M.; Cox, G.M.; McDade, H.C. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun* **2000**, *68*, 2845–53.
110. Kronstad, J.; Saikia, S.; Nielson, E.D.; Kretschmer, M.; Jung, W.; Hu, G.; Geddes, J.M.H. *et al.* Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: Integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11*, 109–118, doi:10.1128/EC.05273-11.
111. Chen, S.C.; Muller, M.; Zhou, J.Z.; Wright, L.C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J. Infect. Dis* **1997**, 414–420.
112. Cox, G.M.; McDade, H.C.; Chen, S.C.; Tucker, S.C.; Gottfredsson, M. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* **2001**, *39*, 166–175.
113. Perfect J. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2005**, *45*, 395–404.
114. D'Souza C.; Heitman, J. It infects me, it infects me not: Phenotypic switching in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 1577–1578.
115. Fries, B.; Casadevall, A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. *J Infect Dis* **1998**, *178*, 1761–1766
116. Hamilton, A.; Goodley, J. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **1995**, *3*, 295–299.

117. Jain, N.; Fries, B. Phenotypic Switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia* **2008**, *166*, 181–88.
118. Mandal, P.; Banerjee, U.; Casadevall, A. Dual infections with pigmented and albino strains of *Cryptococcus neoformans* in patients with or without human immunodeficiency virus infection in India. *J Clin Microbiol* **2005**, *43*, 4766–72.
119. Okagaki, L.H.; Wang, Y.; Ballou, E.R.; O’Meara, T.R.; Bahn, Y.S.; Alspaugh, J.A.; *et al.* Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10*, 1306–1316.
120. Chen, S.; Sorrell T. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin Infect Dis* **2000**, *3*, 499–50.
121. Kidd, S.E.; Hagen, F.; Tschärke, R.L.; Huynh, M.; Bartlett, K.H.; Fyfe, M, *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *PNAS* **2004**, *101*, 17258–63.
122. Zaragoza, O.; Nielsen, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol.* **2013**, *16*, 409–413.
123. Trevijano-Contador, N.; Haroldo, C.; García-Rodas, R.; Suélen, R.; Llorente, I.; Zaballos, Á.; *et al.* *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. *Plos pathogens* **2018** *14*, e1007007.
124. Mukaremera, L.; Nielsen, K. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. *J fungi* **2017**, *3*.
125. Koguchi, Y.; Kawakami, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int Rev Immunol* **2002**, *21*, 423–38.
126. Zhang, Y.; Wang, F.; Tompkins, K.C.; McNamara, A.; Jain, A.V.; Moore, B.B.; *et al.* Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol* **2009**, *175*, 2489–2500.
127. Mueller, U.; Stenzel, W.; Kother, G.; Werner, C.; Blessing, M.; *et al.* IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **2007**, *179*, 5367–77.
128. Diamond R.D.; May, J.E.; Kane, M.A.; Frank, M.M. The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* **1974**, *112*, 2260–70.
129. Zaragoza, O.; Taborda, C.P.; Casadevall, A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol* **2003**, *33*, 1957–67.
130. Alvarez, M.; Casadevall, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol.* **2006**, *7*, 2161–5.
131. Dromer, F.; Levitz, S.M. Invasion of *Cryptococcus* into the central nervous system, In *Cryptococcus*. From human to model yeast. *Washingt. ASM* **2011**, 464–471.
132. Kiem, V.; Thamb, R.; Uhriga, J.; Thompson, G.; Pombejraa, S.; Jamklanga, M. Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* Requires a Secreted Fungal Metalloprotease. *MBio* **2014**, *3*, e01101-14.

133. Levitz S. *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular? *Send to Trends Microbiol* **2001**, *9*, 417–8.
134. Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, G.L. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1205–1218.
135. Jung, W.H. and Kronstad J. Iron influences the abundance of the iron regulatory protein Cir1 in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *FEBS Lett* **2011**, *585*, 3342–7.
136. Barluzzi, R.; Saleppico, S.; Nocentini, A.; Boelaert, J.; Neglia, R.; Bistoni, F. Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. *J Neuroimmunol* **2002**, *132*, 140–6.
137. Saikia, S.; Oliveira, D.; Hu, G.; Kronstad, J. Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **2014**, *82*, 839–850.
138. Scapellato, P.G.; Palumbo, A.; Valle, S. Improvement of anemia induced by parvovirus B19 in a patient with AIDS after combined antiretroviral therapy. *Mayo Clin Proc* **2000**, *75*, 215–6.
139. Cherayil, B. Iron and immunity: immunological consequences of iron deficiency and overload. *Arch Immunol Ther Exp* **2010**, *58*, 407–15.
140. Cherayil, B.J.; Ellenbogen, S.; Shanmugan, N., Iron and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* **2011**, *27*, 523–8.
141. Tangen, K.L.; Jung, W.H.; Sham, A.P.; Lian, T. The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **2007**, *153*, 29–41.
142. Jung, W.; Sham, A.; White, R.; Kronstad J. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol* **2006**, *4*, 410.
143. Perfect, J. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. *J Clin Invest* **2014**, *125*, 1893–1895.
144. Lian, T.; Simmer, M.I.; D’Souza, C.A.; Steen, B.R.; Zuyderduyn, S.D.; Jones, S.J.M.; *et al.* Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1452–1472, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04474.x.
145. J Jacobsen, H.; Donahue, J. Computational study of iron bis(dithiolene) complexes: redox non-innocent ligands and antiferromagnetic coupling. *Inorg Chem* **2008**, *47*, 10037–45.
146. Tseng, H.K. Identification of genes from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* related to transmigration into the central nervous system. *PLoS One* **2012**, *7*, 45083
147. Goulart, L. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection. *Med Mycol* **2010**, *48*, 932–41.
148. Johnson, L. Iron and siderophores in fungal?host interactions. *Mycol. Res.* **2008**, *112*, 170–183, doi:10.1016/j.mycres.2007.11.012.
149. Cowart, R. Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Arch Biochem Biophys* **2002**, *400*, 273–81.
150. Raimondi, S. Enoate reductases from non conventional yeasts: bioconversion, cloning, and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **2010**, *156*, 279–85.
151. Jung, W.H.; Kronstad, J. The iron-responsive, GATA-type transcription factor Cir1 influences

mating in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cells* **2011**, *31*, 73–7.

152. Balhara, M.; Chaudhary, R.; Ruhil, S.; Singh, B.; Dahiya, N.; Parmar, V.S.; *et al.* Siderophores; iron scavengers: the novel & promising targets for pathogen specific antifungal therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 1477–1489, doi:10.1080/14728222.2016.1254196.
153. Brigitte, C.; Tianshun, L.; 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*, 1339–1347.
154. Vartivarian, S.E.; Anaissie, E.J.; Cowart, R.E.; Sprigg, H.A.; Tingler, M.J.; Jacobson, E.S.; Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* **1993**, *167*, 186–190.
155. Turlund, J. Copper nutriture, bioavailability, and the influence of dietary factors. *J Am Diet Assoc* **1988**, *88*, 303–8.
156. Rees, E.M.; Thiele, D.J. From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol* **2004**, *7*, 175–84.
157. Jiang, N.; Sun, N.; Xiao, D.; Pan, J.; Wang, Y.; Zhu, X. A Copper-Responsive Factor Gene Cuf1 Is Required For Copper Induction Of Laccase In *Cryptococcus neoformans*. *FemsMicrobiolLett* **2012**, *296*, 84–90.
158. Ding, C.; Festa, R.A.; Chen, Y.L.; Espart, A.; Palacios, O.; Espin, J. *Cryptococcus neoformans* Copper Detoxification Machinery Is Critical For Fungal Virulence. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 265–276.
159. O’ Meara, T.R.; Xu, W.; Selving, K.M.; O’ meara, M.J.; Mitchell, A.P.; Alspaugh, J. The *Cryptococcus neoformans* Rim101 Transcription Factor Directly Regulates Genes Required For Adaptation To The Host. *Mol CellBiol* **2014**, *34*, 673–684.
160. Waterman, S.; Hacham, M.; Hu, G.; Zhu, X.; Park, YD. Role of a *CUF1/CTR4* copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **2007**, *117*, 794–802.
161. Warnes, S.L.; Green, S.M.; Michels, H.T.; Keevil, C. Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs. *Appl Env. Microbiol* **2010**, *76*, 5390–401.
162. Steenbergen, J.; Casadeval, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* **2003**, *5*, 667–675.
163. Chun, C.D.; Madhani, H.D. Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogens *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* **2010**, *5*.
164. Zaragoza, O. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* **2008**, *10*, 2043–57.
165. Jabado, N.; Jankowski, A.; Dougaparsad, S.; Picard, V.; Grinstein, S. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med.* **2000**, *192*, 1237–48.
166. Schaible, U.E.; Collins, H.L.; Priem, F. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1507–1513.

167. Wolschendorf, F.; Ackart, D.; Shrestha, TB.; Hascall-Dove, L.; Nolan, S, Lamichhane G.; *et al.* Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011**, *108*, 1261–6.
168. Kim, H.W.; Chan, Q.; Afton, S.E.; Caruso, J.A.; Lai, B.; Weintraub N.L.; *et al.* Human macrophage ATP7A is localized in the trans-Golgi apparatus, controls intracellular copper levels, and mediates macrophage responses to dermal wounds. *Inflammation* **2012**, *35*, 167–75.
169. Sinchaikul, S.; Hongsachart, P.; Sriyam, S.; Tantipai boonwong, P.; Phutrakul, S.; Chen, S. Current proteomic analysis and post-translational modifications of biomarkers in human lung cancer materials. *Chang Gung Med. J.* *31*, 417–30.
170. Fu-Jun, L.; Shao-Hua, J.; Xiao-Fang, S. Differential proteomic analysis of pathway biomarkers in human breast cancer by integrated bioinformatics. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 1097–1103, doi:10.3892/ol.2012.881.
171. Aebersold, R.; Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. **2016**, *537*, 347–355.
172. Mann, M.; Kulak, N.A.; Nagaraj, N. The Coming age of complete, accurate, and Ubiquitous Proteomes. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 583–590.
173. Olson, G.M.; Fox, D.S.; Wang, P.; Alspaugh, J.A. Role of protein O-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. **2007**, *6*, 222–34.
174. Thompson, A.; Schäfer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; *et al.* Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895–1904.
175. Ball, B.; Bermas, A.; Carruthers-Lay, D.; McAlister, J. Mass Spectrometry-Based Proteomics of Fungal Pathogenesis, Host–Fungal Interactions, and Antifungal Development. *J Fungi (Basel)*. **2019**, *5*, 52.
176. Sandberg, A.; Branca, R.M.; Lehtio, J.; Forshed, J. Quantitative accuracy in mass spectrometry based proteomics of complex samples: The impact of labeling and precursor interference. *J. Proteomics* **2014**, *96*, 133–144, doi:10.1016/j.jprot.2013.10.035.
177. Tanca, A.; Pagnozzi, D.; Burrai, G.P.; Polinas, M.; Uzzau, S.; Antuofermo, E.; Addis, M.F. Comparability of differential proteomics data generated from paired archival fresh-frozen and formalin-fixed samples by GeLC-MS/MS and spectral counting. *J. Proteomics* **2012**, *77*, 561–576, doi:10.1016/j.jprot.2012.09.033.
178. Nielsen, M.L.; Savitski, M.M.; Zubarev, R.A. Extent of Modifications in Human Proteome Samples and Their Effect on Dynamic Range of Analysis in Shotgun Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 2384–2391, doi:10.1074/mcp.M600248-MCP200.
179. Zhang, Y.; Li, N.; Brown, P.W.; Ozer, J.S.; Lai, Y. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1715–1724, doi:10.1002/rcm.5026.
180. Christin, C.; Bischoff, R.; Horvatovich, P. Data processing pipelines for comprehensive profiling of proteomics samples by label-free LC-MS for biomarker discovery. *Talanta* **2011**, *83*, 1209–1224, doi:10.1016/j.talanta.2010.10.029.
181. Ping, P.; Vondriska, T.M.; Creighton, C.J.; Gandhi, T.; Yang, Z.; Menon, R.; *et al.* A functional annotation of subproteomes in human plasma. *Proteomics* **2005**, *5*, 3506–3519, doi:10.1002/pmic.200500140.

182. Rao, S.P.; Wassell, R.; Shaw, M.A.; Sharma, K. Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **2007**, *292*.
183. Girard, V.; Dieryckx, C.; Job, D. Secretomes: the fungal strike force. *Proteomics* **2013**, *13*, 597–608.
184. Bouws, H.; Wattenberg, A.; Zorn, H. Fungal secretomes-nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, *80*, 381–388
185. Chen, L.C.; Pirofski, L.A.; Casadevall, A. Extracellular proteins of *Cryptococcus neoformans* and host antibody response. *Infect Immun* **1997**, *65*, 2599–2605..
186. Mylonakis, E.; Moreno, R.; Khoury, J.; Idnurm, A.; Heitman J. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 3842–3850..
187. Brennan, M.; Thomas, D.; Whiteway, M. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larv. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2002**, *34*, 153–157.
188. Mesa, A.; Forastiero, A.; Bernal, L.; Cuenca, M.; Mellado, E.; Zaragoza, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol* **2013**, *51*, 164–472.
189. García, R.; Casadevall, A.; Rodríguez, J.; Cuenca, M.; Zaragoza, O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* **2011**, *6*, e24485.
190. Thomaz, L.; Garcia-Rodas, R.; Guimaraes, A.; Taborda, C.; Zaragoz, O. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence* **2013**, *4*, 139–146
191. Firacative C, Shuyao D, Meyer, W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* **2014**, *9*, e1050576.
192. Fuchs, B.B.; O'Brien, E.; Khoury J.B. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **2010**, *1*, 475–482.
193. Cook, S.; McArthur, J. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* **2013**, *4*, 350–353.
194. Perfect, J.R.; Lang, S.D.; Durack, D.T. Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol* **1980**, *101*, 177–94.
195. Schindelin, R.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676..
196. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27-A3. NCCLS USA, 2010.
197. Nagarajha, L.; Kaviyil, J.; Sehar, R.; Muthusamy, B.; Puttamallesh, V.; Subbannayya T.; *et al.* Proteogenomic analysis of pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* using high resolution mass spectrometry. *Clin. Proteomics* **2014**, *11*.
198. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data 2010 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
199. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–9, doi:10.1038/nmeth.1923.

200. Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 421, doi:10.1186/1471-2105-10-421.
201. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890, doi:10.1093/bioinformatics/bty560.
202. Tello, D.; Gil, J.; Loaiza, C.D.; Riascos, J.J.; Cardozo, N.; Duitama, J. NGSEP3: accurate variant calling across species and sequencing protocols. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 4716–4723, doi:10.1093/bioinformatics/btz275.
203. Duitama, J.; Quintero, J.C.; Cruz, D.F.; Quintero, C.; Hubmann, G.; Foulquié-Moreno, M.R.; *et al.* An integrated framework for discovery and genotyping of genomic variants from high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e44, doi:10.1093/nar/gkt1381.
204. Broad Institute Picard toolkit 2019 (<https://www.broadinstitute.org>).
205. Huson, D.H.; Scornavacca, C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* **2012**, *61*, 1061–7, doi:10.1093/sysbio/sys062.
206. Zheng, X.; Levine, D.; Shen, J.; Gogarten, S.M.; Laurie, C.; Weir, B.S. A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3326–8, doi:10.1093/bioinformatics/bts606.
207. Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: un software para el análisis integral de datos de polimorfismo de ADN. *Bioinformática* **2009**, *25*, 1451–2.
208. Arras, D.M.; Ormerod, K.; Erpf, P.; Espinosa, M.; Carpenter, A.; Blundell, R.; *et al.* Convergent microevolution of *Cryptococcus neoformans* hypervirulence in the laboratory and the clinic. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17918.
209. Vélez, N.; Escandó, P. Multilocus sequence typing (MLST) of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in six departments of Colombia reveals high genetic diversity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2020**, *53*, e20190422.
210. Beale, M.A.; Sabiiti, W.; Robertson, E.J.; Fuentes-Cabrejo, K.M.; O’Hanlon, S.J. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, *9*, 1–18.
211. Cogliati, M.; Zamfirova, R.; Tortorano, A.; Viviani, M. Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates. *Med. Mycol.* **2013**, *51*, 499–506.
212. Khayhan, K.; Hagen, F.; Pan, W.; Simwami, S.; Fisher, M. Geographically Structured Populations of *Cryptococcus neoformans* Variety *grubii* in Asia Correlate with HIV Status and Show a Clonal Population Structure. *PLoS One* **2013**, *8*, e72222.
213. Simwami, S.; Khayhan, K.; Henk, D.; Aanensen, D.; Boekhout, T.; Hagen, F.; *et al.* Low diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus sequence types from Thailand are consistent with an ancestral African origin. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e10001343.
214. Dou, H.T.; Xu, Y.C.; Wang, H.Z. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2015**, *34*, 753–62.
215. Wiesner, D.L.; Moskalenko, O.; Corcoran, J.M.; McDonald, T.; Rolfes, M.A. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. *MBio* **2012**, *3*

216. Silva, D.; Santana, K.; Silva, C.; Fernandes, L.; Beserra, S. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. *PLoS One* **2018**, *13*, e0197841.
217. Sanchini, A.; Smith, I.M.; Sedlacek, L.; Schwarz, R.; Tintelnot, K. Molecular typing of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected in Germany from 2004 to 2010. *Med Microbiol Immunol* **2014**, *203*, 333–40.
218. Firacative, C.; Meyer, W.; Castañeda, E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Latin America: A map of Molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. *J Fungi* **2021**, *7*, 282.
219. Velez, N.; Alvarado, M.; Parra-giraldo, C.M.; Sanchez-Quitian, A.; Escandón, P.; Castañeda, E. Genotypic diversity is independent of pathogenicity in Colombian strains of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in *Galleria mellonella*. *Fungi* **2018**, *44*.
220. Brivio, M.F.; Mastore, M.; Nappi, A. A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Dev Comp Immunol* **2010**, *34*, 991–98.
221. Naicker, S.; Magobo, R.; Maphanga, T.; Firacative, C.; Schalkwyk, E.; Monroy-Nieto, J.; *et al.* Genotype, antifungal susceptibility, and virulence of clinical South African *Cryptococcus neoformans* strains from national surveillance, 2005–2009. *J Fungi* **2021**, *7*, 338.
222. McFadden, D.C.; Casadevall, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* **2001**, *39 Suppl 1*, 19–30.
223. Helsel, M.; White, E.; Razvi, S.; Alies, B. Chemical and functional properties of metal chelators that mobilize copper to elicit fungal killing of *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics* **2017**, *1*, 69–81.
224. Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *50*, 3519–28.
225. Van Duin, D.; Casadevall, A.; Nosanchuk, J. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3394–3400.
226. Cordero, R.; Robert, V.; Cardiani, G.; Arince, E.; Thon, S.; Casadevall, A.; *et al.* Impact of yeast pigmentation on heat capture and latitudinal distribution. *Curr Biol.* **2018**, *28*, 2657–64.
227. Noverr M.C.; Williamson P.R.,; Fajardo, R.; Huffnagle, G. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect Immun* **2004**, *72*, 1693–1699.
228. Mednick, A.J.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun.* **2005**, *73*, 2012–19.
229. Kwon-Chung, K.J.; Polacheck, I. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J Bacteriol* **1982**, *150*, 1414–21.
230. Salas, S.D.; Bennett, J.E. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* **1996**, *184*, 377–86.
231. Renney, H.; Oliveira, G.; Oliveira, F.; Melo, K.; Pereira, C.; Melgaco, E.; *et al.* Faster *Cryptococcus* melanization increases virulence in experimental and human cryptococcosis. *bioRxiv* **2020**, DOI: 10.1101/2020.07.29.222794.
232. Sabiiti, W.; Robertson, E.; Beale, M.; Johnston, S.; Brouwer, A.; Loyse, A.; *et al.* Efficient

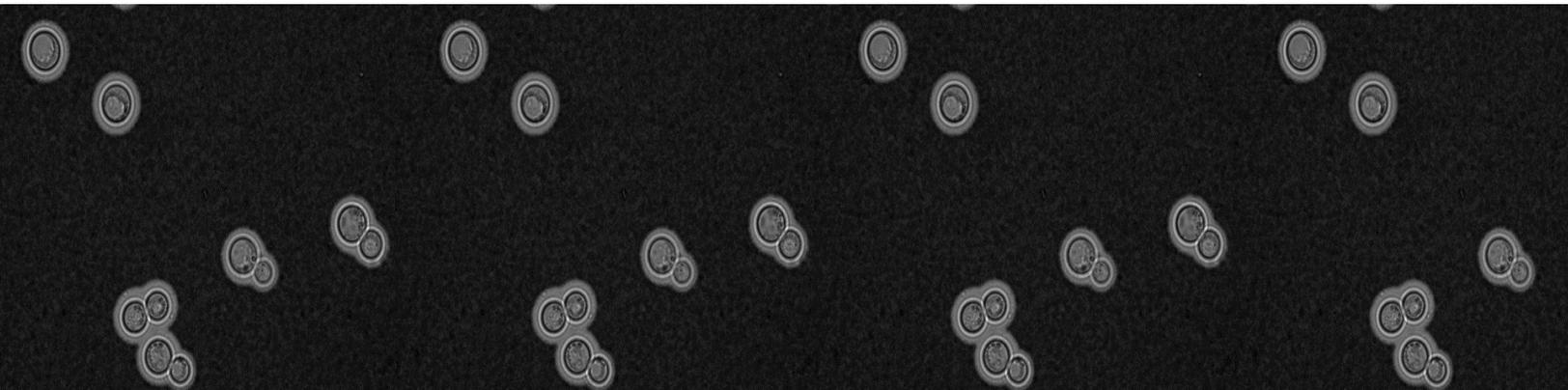
- phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 2000–8.
233. Johnson GL.; Lappadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. **2002**, *298*, 1911–12.
 234. Saito, H.; Tetabayashi, K. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* **2004**, *136*, 267–272.
 235. Gerstein, A.; Jackson, K.; McDonald, T.; Wang, Y.; Benjamin, D.; Bohjanen, A.; *et al.* Identification of Pathogen Genomic Differences That Impact Human Immune Response and Disease during *Cryptococcus neoformans* Infection. *MBio*. **2019**, *10*, e01440-19.
 236. Sven, D.; Willger, J.; Ernst, J.; Alspaugh, A. Characterization of the PMT Gene Family in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*. **2009**, *4*, e6321.
 237. Perfect, J.; Casadevall, A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* **2002**, *16*, 837–74.
 238. Kumar, P.; Heiss, C.; Santiago-Tirado, F.; Black, I.; Azadi, P. Pbx Proteins in *Cryptococcus neoformans* Cell Wall Remodeling and Capsule Assembly. *Eukaryot Cell*. **2014**, *13*, 560–71.
 239. Liu, O.; Kelly, M.; Chow, E.; Madhani, H.D. Parallel β -Helix Proteins Required for Accurate Capsule Polysaccharide Synthesis and Virulence in the Yeast *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 630–40.
 240. Li, C.; Lev, S.; Saiardi, A.; Desmarini, D.; Sorrell, T.; Djordjevic, J. Identification of a major IP5 kinase in *Cryptococcus neoformans* confirms that *PP-IP5/IP7*, not *IP6*, is essential for virulence. *Sci Rep* **2016**, *1*, 23927.
 241. Xu, Y.; Ridgway, N.; McMaster, C. Novel members of the human oxysterol-binding protein family bind phospholipids and regulate vesicle transport. *J Biol Chem*. **2001**, *276*, 18407–414.
 242. Huang, C.; Nong, SH.; Mansour, MK.; Specht, C.A. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infect Immun*. **2002**, *70*, 5485–93.
 243. Krosiak, T.; Koch, T.; Kahl, E. Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem*. **2001**, *276*, 39772–778.
 244. Hu, G.; Steen, B.; Lian, T.; Sham, A.; Tam, N.; Tangen, K.; *et al.* Transcriptional Regulation by Protein Kinase A in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*. **2007**, *3*, e42.
 245. Fuchs, B.; Tang, R.; Mylonakis E. The Temperature-Sensitive Role of *Cryptococcus neoformans* ROM2 in Cell Morphogenesis. *PLoS One*. **2007**, *2*, e368.
 246. Fuchs, B.; Tegos, G.; Hamblin, M. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Photodynamic Inactivation Is Associated with Cell Wall Integrity. *Antimicrob Agents Chemother*. **2007**, *51*, 2929–36.
 247. Laret, S.; Gatti, X.; Doignon, F.; Thoraval, D. The Rgd1p Rho GTPase-Activating Protein and the Mid2p Cell Wall Sensor Are Required at Low pH for Protein Kinase C Pathway Activation and Cell Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. **2005**, *4*, 1375–86.
 248. Etienne-Manneville, S.; Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **2002**, *420*, 629–35.
 249. Ding, H.; Caza, M.; Dong, Y.; Arif, A.; Horianopoulos, L. ATG Genes Influence the Virulence of *Cryptococcus neoformans* through Contributions beyond Core Autophagy Functions. *Infect Immun*.

2018, 86, PMC6105877.

250. Sanz, M.; Carrano, L.; Jimenez, C.; Candiani, G.; Trilla, J.; Duran, A. *Candida albicans* strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* **2005**, *151*, 2623–36.
251. Mukaremera, L.; McDonald, T.; Nielsen, J.; Molenaar, C.; Akampurira, A.; Schutz, C.; *et al.* The mouse inhalation model of *Cryptococcus neoformans* infection recapitulates strain virulence in Humans and Shows that closely related strains can possess differential virulence. *Infect Immun.* **2019**, *87*, e00046-19.
252. Andrade-Silva, L.E.; Ferreira-Paim, K.; Ferreira, T.B.; Vilas-Boas, A.; Mora, D.J.; Manzato, M.; *et al.* Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *PLoS One* **2018**, *13*, e0193237.
253. Day, J.N.; Qihui, S.; Thanh, L.T.; Trieu, P.H.; Van, A.D.; Thu, N.H.; *et al.* Comparative genomics of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* associated with meningitis in HIV infected and uninfected patients in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis* **2017**, *11*, e0005628.
254. Jung, W.; Sham, A.; Lian, T.; Singh, A.; Kosman, D. Iron Source Preference and Regulation of Iron Uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **2008**, *4*, e45.
255. Balamurugan, K.; Schaffner, W. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1763*, 737–46.
256. Ingavale, S.S.; ChangYun, C.; Hyeseung, L.; McClelland, C.M. Importance of Mitochondria in Survival of *Cryptococcus neoformans* Under Low Oxygen Conditions and Tolerance to Cobalt Chloride. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000155.
257. Raja, M. R.; Waterman, S. R.; Qiu, J.; Bleher, R.; Williamson, P. R. and Copper , A. Hyperaccumulation Phenotype Correlates with Pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics* **2014**, *5*, 363–371.
258. Waterman, S.R.; Park, Y.D.; Raja, M.; Qiu, J.; Hammoud, D.A.; O'halloran, T. Role of Ctr4 in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *MBio.* **2012**, *3*, e00285-12.
259. Mauch, R.M.; Cunha, V.C.; Diaz, A. The copper interference with the melanogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2013**, *55*, 177–20.
260. Ding, C.; Festa, R.A.; Chen, Y.L.; Espart, A.; Palacios, O.; Espín, J.; *et al.* *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. *Cell Host Microbe.* **2014**, *13*, 265–276.
261. Ding, C.; Yin, J.; Medina, E.M.; Fitzpatrick, D.A.; Higgins, D.G. The Cu regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99: Cuf1 activates distinct genes in response to both Cu excess and deficiency. *Mol Microbiol.* **2011**, *81*, 1560–1576.
262. Ding, C.; Festa, R.A.; Sun, T.S. Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens. *Mol Microbiol* **2014**, *93*, 10–23.
263. Toone, W.M.; Morgan, B.A. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* **2001**, *20*, 2336–46.
264. So, Y.S.; Maeng, S.; Yang, D.H.; Hyelim, K.; Kyung-Tae, L.; Seong-Ryong, Y.; *et al.* Regulatory Mechanism of the Atypical AP-1-Like Transcription Factor Yap1 in *Cryptococcus neoformans*. *mSphere.* **2019**, *4*, e00785-19.

265. Norwood, S.J.; Shaw, D.J.; Cowieson, N.P.; Owen, D.J.; Teasdale, R.D. Assembly and solution structure of the core retromer protein complex. *Traffic* **2011**, *12*, 56–71.
266. Nothwehr, S.F.; Ha, S.A.; Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 297–310.
267. Jin, J.; Tae, K.; Hong, J.; Lee, D.; Jang, E.; Choi, Y. Genome-wide functional analysis of phosphatases in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Commun* **2020**, *24*, 4212.
268. Park, J.N.; Lee, D.J.; Kwon, O.; Oh, D.B.; Bahn, Y.S. Unraveling unique structure and biosynthesis pathway of N-linked glycans in human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* by glycomics analysis. *Biol Chem* **2012**, *287*, 19501–1951.
269. Thak, E.J.; Lee, S.B.; Xu-Vanpala, S.; Lee, D.J.; Chung, S.Y.; Bahn, Y.S.; *et al.* Core N-Glycan Structures Are Critical for the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* by Modulating Host Cell Death. *MBio* **2020**, *11*, e00711-20.
270. West, L.; Lowman, D.W.; Mora-Montes, H.M.; Grubb, S.; Murdoch, C.; Thornhill, M.H.; *et al.* Differential virulence of *Candida glabrata* glycosylation mutants. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 22006–22018.
271. Bai, C.; Xu, X.L.; Chan, F.Y.; Lee, R.T. MNN5 encodes an iron-regulated alpha-1,2-mannosyltransferase important for protein glycosylation, cell wall integrity, morphogenesis, and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2006**, *5*, 238–247.
272. Havel, V.E.; Wool, N.K.; Ayad, D.; Downey, K.M.; Wilson, C. Ccr4 promotes resolution of the endoplasmic reticulum stress response during host temperature adaptation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **2010**, *10*, 895–901.
273. Panepinto, J.C; Heinz, E.; Traven, A. The cellular roles of Ccr4-NOT in model and pathogenic fungi—implications for fungal virulence. *Front Genet.* **2013**, *4*, 302 doi: 10.3389/fgene.2013.00302.
274. Grütter, C.; Simard, J.R; Mayer-Wrangowski, S.C.; Schreier, P.H.; Pérez-Martín J.; Richters, A.; *et al.* Targeting *GSK3* from *Ustilago maydis*: Type-II Kinase Inhibitors as Potential Antifungals. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1257–67.
275. Raghov, R.; Yellaturu, C.; Deng, X.; Park, E.A.; Elam M.B. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **2008**, *19*, 65–73.
276. Chang, Y.C.; Ingavale, S.S.; Bien, C.; Espenshade, P.; Kwon-Chung, KJ. Conservation of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein Pathway and Its Pathobiological Importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 1770–79.
277. Kauppinen, R. Porphyrias. *Lancet* **2005**, *365*, 241–252.
278. Garcia-Santamarina, S.; Uzarska, M.A.; Festa, R.A.; Roland, L. *Cryptococcus neoformans* Iron-Sulfur Protein Biogenesis Machinery Is a Novel Layer of Protection against Cu Stress. *MBio* **2017**, *8*, e01742-17.
279. Jung, K.W.; Lee, Y.; Huh, E.Y.; Lee, S.C.; Lim, S.; Bahn, Y.S. Rad53- and Chk1-Dependent DNA Damage Response Pathways Cooperatively Promote Fungal Pathogenesis and Modulate Antifungal Drug Susceptibility. *mBio.* **2019**, *10*, e01726-18.
280. Sahu, M.S.; Patra, S.; Kumar, K.; Kaur, R. SUMOylation in Human Pathogenic Fungi: Role in Physiology and Virulence. *J Fungi (Basel).* **2020**, *6*, 32 doi: 10.3390/jof6010032.
281. Zamudio, J.; Peña, M.; Riesgo-Escovar, J.R. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico

- de los organismos. *Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.* **2012**, *15*, 135–141.
282. Broomfield, S.; Chow, B.L.; Xiao, W. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**, *95*, 5678–83.
 283. O’Meara, T.R.; Hay, C.; Price, M.S.; Giles, S. *Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host. *Eukaryot. Cell* **2010**, 1193–202 PMID:20581290.
 284. Haynes, B.C.; Skowyra, M.L.; Spencer, S.J.; Gish, S.R.; Williams, M.; Held, E.P.; *et al.* Toward an Integrated Model of Capsule Regulation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1002411.
 285. Thiagalingam, S.; Cheng, K.H.; Lee, H.J.; Mineva, N.; Thiagalingam, A. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann NY Acad Sci* **2003**, *983*, 84-100 PMID:12724214.
 286. Lee, K.T.; So, Y.S.; Yang, D.H.; Jung, K.W.; Choi, J.; Lee, D.G.; *et al.* Systematic functional analysis of kinases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12766 DOI: 10.1038/ncomms12766.
 287. Roelants, F.M.; Torrance, P.D.; Bezman, N.; Thorner, J.. Pkh1 and Pkh2 Differentially Phosphorylate and Activate Ypk1 and Ykr2 and Define Protein Kinase Modules Required for Maintenance of Cell Wall Integrity. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 3005–28.
 288. Lee, K.T.; Byun, H.J.; Jung, K.W.; Hong, J.; Cheong, E.; Bahn, Y.S. Distinct and Redundant Roles of Protein Tyrosine Phosphatases Ptp1 and Ptp2 in Governing the Differentiation and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* **2014**, *13*, 796–812.
 289. Kraus, P.R.; Fox, D.S.; Cox, G.M.; Heitman, J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol Microbiol.* **2003**, *48*, 1377–87.
 290. Cabib, E.; Roh, D.H.; Schmidt, M.; Crotti, L.B.; Varma, A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* **2001**, *276*, 19679–82.
 291. Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Sorda, M.; Torelli, R.; Fiori, B.; Santangelo, R.; *et al.* Role of AFR1, an ABC Transporter-Encoding Gene, in the In Vivo Response to Fluconazole and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* **2006**, *74*, 1352–59.
 292. Orsi, C.F.; Colombari, B.; Ardizzoni, A.; Peppoloni, S.; Neglia, R.; Posteraro, B.; *et al.* The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. *FEMS Yeast Res* **2009**, *9*, 301–10.
 293. Walton, F.J.; Idnurm, A; Heitman, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *MolMicrobiol.* **2005**, *57*, 1381–96.



ANEXOS

Anexo 1. Variables demográficas de aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*

<i>C. neoformans</i>		
Características	n=23	%
Sexo		
Masculino	17	73,9
Femenino	6	26,1
Signos clínicos		
Dolor de cabeza	20	87,0
Fiebre	14	60,9
Náuseas y vomito	15	65,2
Confusión	9	39,1
Signos meníngeos	4	17,4
Alteración visual	5	21,7
Convulsión	5	21,7
Tos	5	21,7
Pérdida de peso	1	4,3
Factores de Riesgo		
VIH/SIDA+	19	82,6
Síndrome de Evans	1	4,3
Sin dato	3	13,0
Condición		
Vivo	3	13,0
Muerto	5	21,7

Anexo 2. Resultados de ensayos de patogenicidad, capsula, melanina, susceptibilidad, MLST y variables demográficas de 29 aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii. (ver archivo Excel)

Anexo 3. Lista de 322 genes asociados a patogenicidad, cápsula y melanina en C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)

Anexo 4. SNPs identificados en 29 aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)

Anexo 5. Variantes genómicas asociadas a los grupos fenotípicos propuestos y secuencias tipo (ver archivo Excel)

Anexo 6. Proteínas identificadas en dos aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)

Anexo 7. Gene Ontology de procesos biológicos (ver archivo Excel)

Anexo 8. Proteínas con abundancia diferencial en dos aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)

Anexo 9. Principales rutas metabólicas identificadas tras el precultivo con la combinación de hierro y cobre comunes en dos aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)

Anexo 10. Enriquecimiento biológico en aislamientos clínicos pre-cultivados con medio mínimo y suplementados con la combinación de 50 μ M de hierro más 500 μ M de cobre (ver archivo Excel)

Anexo 11. Principales rutas metabólicas identificadas en dos aislamientos clínicos de C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)

Anexo 12. proteínas relacionadas con la biosíntesis de cápsula, melanina y otros factores de virulencia en respuesta al estímulo de la combinación de hierro y cobre (ver archivo Excel).

Anexo 13. Abundancia relativa relacionada con proteínas reguladas up y down de la cápsula y melanina C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel).

Anexo 14. Identificación de genes asociados a hierro y cobre en C. neoformans var. grubii (ver archivo Excel)