



**Evaluación de la susceptibilidad antifúngica, caracterización proteómica y virulencia de aislamientos clínicos colombianos en *Cryptococcus neoformans***

**Ginneth Paola Gómez Ruíz**

Estudiante de Bacteriología

Trabajo de grado

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

Bacterióloga

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

**Bacteriología**

**Bogotá D.C., Colombia**

**2018**



**Evaluación de la susceptibilidad antifúngica, caracterización proteómica y virulencia de aislamientos clínicos colombianos en *Cryptococcus neoformans***

---

Directora

Claudia Marcela Parra Giraldo MSc, PhD

Profesor Departamento de Microbiología

Grupo de Enfermedades Infecciosas

Coordinador Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas

---

Par evaluador

Patricia Escandón Hernández

Profesor Especializado

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

ARTICULO 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

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

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la energía primaria (Dios)**

Por su constante compañía y ayuda que permitió que llegara hasta este punto con salud para lograr este importante objetivo en mi vida.

### **A mis padres y hermano**

Primero a mi madre por darme siempre la confianza, el amor y el apoyo incondicional sin importar las dificultades, segundo a mi padre porque a pesar de las adversidades económicas siempre luchó para que yo pudiera hacer realidad mis sueños y a mi hermano por permitirme su buena energía y cariño.

### **Al amor de mi vida: Andrés Acosta**

Quien con su amor y apoyo constante hizo que iniciara este bello camino de la academia y de la ciencia, su orgullo profundo hacia mí me inspiró aún más para que este trabajo fuera posible.

### **Directora Claudia Marcela Parra**

Porqué siempre confió en mí y me lanzo a el mundo de la investigación sin límites, “porque todo tiene solución y se puede hacer mientras estemos vivos” frase propia de ella que me dio fortaleza para mi formación académica y la vida. Muchas gracias por el enorme apoyo.

### **Mi guía Noria Vélez**

Por permitirme entrar en este proyecto tan interesante, por ser siempre mi guía con compromiso y entrega en los procesos, por enseñarme que la investigación es de sacrificios y que se logra bajo unos parámetros organizados.

### **Dra. Patricia Escandón**

Quien acepto ser mi par evaluador, por brindarme su apoyo y compromiso para que yo hiciera lo mejor de mi trabajo escrito.

### **Grupo de investigación de enfermedades infecciosas: división de micosis humanas y proteómica**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>5. MARCO TEORICO</b> .....	<b>29</b>
5.1 Historia de la taxonomía en <i>Cryptococcus sp</i> .....	15
5.2 Características de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> como patógenos humanos.....	16
5.3 Fisiopatología de la criptococosis .....	16
5.4 Factores de virulencia de <i>Cryptococcus</i> .....	21
5.5 Epidemiología .....	22
5.6 Diagnostico .....	22
5.7 Tratamiento .....	23
5.8 Susceptibilidad .....	28
5.9 <i>Galleria mellonella</i> como un sistema modelo para estudiar la patogénesis de <i>C. neoformans</i> .....	29
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
6.1 Objetivo general .....	30
6.2 Objetivos específicos .....	30
<b>7. PROPUESTA METODOLOGICA</b> .....	<b>36</b>
7.1 Determinar la actividad antifúngica in-vitro a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> .....	32
7.2 Determinar la capacidad patogénica de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> en <i>Galleria mellonella</i> . .....	¡Error! Marcador no definido.
7.3 Determinar la expresión de factores de virulencia de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> ¡Error! Marcador no definido.	
7.4. Comparar perfiles proteómicos citoplasmáticos globales de aislamientos susceptibles y resistentes a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> .....	36
<b>7. RESULTADOS</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>10. ANEXOS</b> .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

## LISTA DE IMAGENES

**Figura N°1.** Formas de adquirir la levadura: mecanismo de infección de *C. neoformans*.

**Figura N°2.** Capsula: *C. neoformans* teñida con tinta china en donde se observa su capsula en halo blanquecino.

**Figura N°3.** Escala de medición de la actividad de la enzima fenoloxidasa.

**Figura N°4.** Lectura de la MIC en micro placa según lineamientos de CLSI

**Figura N°5.** Análisis de supervivencia de 10 aislamientos clínicos comparables con cepas de alta y baja patogenicidad H99 y JEC21 respectivamente.

**Figura N°6.** Pareja sexual a ó  $\alpha$  en aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

**Figura N°7.** Lectura de la MIC en micro-placa según lineamientos de CLSI para Anfotericina B, Fluconazol y Voriconazol.

**Figura N° 8.** Análisis de supervivencia de 10 aislamientos clínicos comparables con cepas de alta y baja patogenicidad H99 y JEC21 respectivamente.

**Figura N° 9.** Pareja sexual a ó  $\alpha$  en aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

**Figura N° 10.** Actividad enzimática de aislamientos clínicos de *C. neoformans*: A: Proteasa y B: Fenoloxidasa (0.5), B1: Fenoloxidasa (1), B2: Fenoloxidasa (2), B3: Fenoloxidasa (3), B4: Fenoloxidasa (4).

**Figura N° 11.** Coloración de contraste con tinta china de capsulas de aislamientos clínicos de *C. neoformans* (80X). A: Gemación celular, B: tamaño celular pre-inoculación, C: Medidas de tamaño celular y capsular pre- inoculación, D: Morfología celular.

**Figura N° 12.** Hemocitos de *Galleria mellonella*. A. Plasmocitos. B. Enterocitoides. C. Células granulares. D. Levadura fagocitada por hemocito. E. Lisis celular. F. Formación de granuloma.

**Figura N° 13.** Visualización del espectro de masas de aislamientos sensibles y SDD a Fluconazol.

**Figura N° 14.** Gel de heatmap de aislamientos sensibles y SDD a fluconazol.

**Figura N° 15.** Dendograma de aislamientos sensibles y SDD a fluconazol.

**Figura N° 16.** Heatmap de los 29 aislamientos clínicos.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla N°1.** Test de susceptibilidad antifúngica por metodología CLCI vs EUCAST.

**Tabla N°2.** Puntos de corte para fluconazol, posaconazol y voriconazol en *C. neoformans*

**Tabla N°3.** Cepas control: cepa de alta virulencia H99 y baja virulencia (JEC21)

**Tabla N°4.** Concentraciones de antifúngicos Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B según estimación del CLSI para determinar la MIC.

**Tabla N°5.** Cepas control en susceptibilidad antifúngica.

**Tabla N° 6.** Interpretación de susceptibilidad según CLSI

**Tabla N° 7.** Condiciones de amplificación, PCR sexual “*alfa (α)*” y “*a*”.

**Tabla N° 8.** Manifestaciones clínicas, factores de riesgo y condición de egreso de casos de Criptococosis.

**Tabla N° 9.** Tamaño capsular y celular en aislamientos clínicos de *C. neoformans*, datos de promedio pre-inoculación y pos-inoculación.

**Tabla N° 10.** Información general de los 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans*, según los factores de patogenicidad evaluados

**Tabla N° 11.** Controles usados según metodología.

## 1. RESUMEN

Estudios han demostrado diferentes características fenotípicas relacionadas con la virulencia de *Cryptococcus neoformans*, revelando su importancia en la patogenicidad. El propósito de nuestra investigación fue evaluar la relación entre la susceptibilidad o resistencia a antifúngicos a través de los lineamientos de CLSI con la técnica de microdilución y la capacidad patogénica de aislamientos clínicos de *C. neoformans* en el modelo invertebrado de *Galleria mellonella*. Para lo cual fueron seleccionados 29 aislamientos clínicos, según el desenlace clínico y origen geográfico del paciente.

En la evaluación de la patogenicidad se emplearon controles de alta (H99) y baja (JEC21) patogenicidad, se determinó el tamaño capsular antes y después de la inoculación, así como la capacidad fagocítica, la actividad enzimática, el tipo de pareja sexual, y la susceptibilidad a Anfotericina B, Voriconazol y Fluconazol mediante los lineamientos del CLSI.

El 100% de los aislamientos fueron sensibles a Anfotericina B y a Voriconazol. El 6.8% SSD a **fluconazol** (MIC  $\geq$ 16- 32 $\mu$ g/ml) y el 92,4% fueron sensibles a Fluconazol. La mortalidad en *G. mellonella* fue de 8 días ( $p < 0,05$ ); de los 29 aislamientos 5 presentaron una media de supervivencia de 2 y 3 días comparados con H99 ( $p < 0,01$ ). El promedio del porcentaje de fagocitosis fue de 22% (Valor máximo 76% y Valor mínimo 3%), el tamaño celular y capsular posterior a la inoculación con *C. neoformans* aumento 2.84  $\mu$ m. La actividad enzimática fue del 41.3% en proteasas; y 37.9% fenoloxidasa. El 97.3% de los aislamientos clínicos fueron pareja sexual tipo *alfa*.

No se encontró relación entre las características fenotípicas específica y la susceptibilidad antifúngica en la determinación de un perfil de alta o de baja patogenicidad. Los aislamientos clínicos que fueron SDD a Fluconazol presentaron una alta y baja mortalidad en *G. mellonella*. Al determinar los perfiles proteómicos citoplasmáticos de los aislamientos clínicos SDD y sensibles comparados con el perfil de patogenicidad mostraron una distribución diferencial en su relación carga/ masa y una diversidad en la expresión de sus perfiles proteómicos, lo cual indica la no relación entre ellos, quizás por factores como; origen de la muestra, lugar demográfico, tiempo de la enfermedad, entre otros.

**En conclusión, no se encontró una relación entre los perfiles fenotípicos, proteómicos con la susceptibilidad antifúngica de los aislamientos clínicos colombianos de *C. neoformans*.**

## 2. INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis oportunista que afecta principalmente a pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)(1), el agente etiológico está clasificado en dos especies, *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, se subdivide en diferentes serotipos según sus variables antigénicas en la capsula: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D), *C. gattii* (serotipo B y C) y el híbrido intra- especie AD y los híbridos inter-especie AB y BD(2). La criptococosis es un grave problema de salud especialmente por sus tasas de prevalencia en pacientes con VIH que varían del 4,2% en países desarrollados a más del 17% en países africanos (3). En Colombia, esta micosis es una causa importante de hospitalización reportando una tasa de incidencia de 0,23 casos por 100.000 en la población general y ha aumentado 1.1 casos por 1000.000 habitantes en pacientes con SIDA(4).

La patogénesis de la criptococosis se asocia a múltiples factores de virulencia, como la cápsula, la producción de melanina y el tipo de apareamiento. El polisacárido capsular contiene un alto porcentaje de glucuronoxilomanano (GXM), lo que impide la fagocitosis y la migración de leucocitos, generando supresión de la proliferación de linfocitos T. La producción de melanina evita la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) por macrófagos, siendo éste necesario para generar una respuesta inmune celular protectora (5). La reproducción sexual es regulada por un locus de tipo de apareamiento único con dos alelos alternativos, MAT $\alpha$  o MAT $\alpha$ , pero la reproducción parece ser limitada por apareamientos raros con el mismo tipo de pareja sexual(6). Las cepas de tipo sexual  $\alpha$  tienden a ser más virulentos ya que generalmente se encuentra en aislamientos clínicos y porque favorece procesos de división celular (7). El hecho de que el tipo de apareamiento  $\alpha$  es predominante entre los aislados ambientales y clínicos de *Cryptococcus* sp independientemente del serotipo, se plantea la cuestión de su relación con la patogenicidad (6).

Los modelos murinos siguen siendo la referencia para los estudios de virulencia. Sin embargo, debido a consideraciones éticas y los altos costos asociados con su uso, el interés en los modelos invertebrados ha aumentado (8). El estado larvario de la polilla *Galleria mellonella*, ha sido utilizado para estudiar la virulencia y la respuesta antifúngica en varios hongos entre esos *Cryptococcus* sp. Algunas de las ventajas de este modelo invertebrado son los siguientes: (i) el mantenimiento de las larvas se puede hacer en un amplio rango de temperaturas (25-37° C), (ii) modelo de infección solo requiere la inyección directa de un tamaño de inóculo exacto, (iii) registro de mortalidad es fácil para abordar y (iv) algunos de los factores de virulencia requeridos para infecciones micóticas en mamíferos también se han encontrado en *G. mellonella* (9).

El tratamiento actual de la criptococosis se basa en la administración inicial de Anfotericina B con Flucitosina, seguida de una fase de consolidación con fluconazol. Este esquema terapéutico ha tenido éxito en la disminución de la mortalidad de un 14-25% a tan solo el 6% y recaídas de 17-24% a 2-4% (10). Muchas alternativas de tratamiento se basan en el uso de fluconazol administrado como un medicamento único o como terapia de combinación (11) (12). El éxito de estas terapias, así como del tratamiento de mantenimiento con fluconazol, podría estar en riesgo por la aparición

de cepas resistentes, cuya prevalencia es del 20% en algunas regiones del mundo (13). Sin embargo, las implicaciones de esta resistencia no se han elucidado por completo debido a los resultados discordantes encontrados en los estudios publicados (14).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criptococcosis es una micosis sistémica importante causada por dos agentes patógenos, *C. neoformans* y *C. gattii*, son hongos patógenos estrechamente relacionados por causar neumonía y meningitis, el cual se adquiere por la inhalación de los propágulos (pequeñas células encapsuladas) presentes en el ambiente. Son un riesgo significativo de enfermedad infecciosa global en pacientes que presentan algún tipo de inmunocompromiso en lo que respecta a *C. neoformans* y en pacientes inmunocompetentes para *C. gattii* (15).

La especie *C. neoformans* posee dos variedades, *grubii* y *neoformans* serotipos A y D respectivamente y la especie *C. gattii* serotipos B y C, esta clasificación corresponde a la especificidad antigénica del polisacárido capsular (2) (16). Según datos epidemiológicos han demostrado diferencias en la distribución geográfica de las dos especies de *Cryptococcus* reconocidas como patógenos humanos, donde *C. neoformans* se encuentra en todo el mundo y causa la mayoría de las infecciones criptocócicas en personas con inmunidad disminuida (principalmente pacientes con SIDA, personas sometidas a terapias inmunosupresoras y aquellos con trastornos linfoproliferativos), lo que resulta en diversas complicaciones neurológicas, *C. neoformans* es aislado de excretas de aves, especialmente de la paloma común (*Columbia livia*) (17), a diferencia de *C. gattii*, que es más prevalente en regiones tropicales y subtropicales donde su hábitat se encuentra relacionada con el árbol *Eucaliptus canaldulensis* entre otros y causa del 70% al 80% de las infecciones criptocócicas en hospedadores inmunocompetentes (18), aunque en la última década se ha recuperado en zonas tembladas como Vancouver y la zona Norte del pacífico en Norte América (19).

La criptococcosis es una de las enfermedades más prevalentes en pacientes con el VIH, por lo general se inicia una infección pulmonar, evolucionando a una infección diseminada ocasionando lesiones principalmente en el sistema nervioso central (SNC) donde ocasiona meningitis criptocócica (20). Según el Centro para el control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC) en el 2017 a nivel mundial, se estima que hay 220,000 nuevos casos de meningitis criptocócica que ocurren cada año, lo que resulta en 181,000 muertes. Aunque la disponibilidad generalizada de terapia antirretroviral (TAR) en pacientes con VIH-SIDA de países desarrollados ha ayudado a reducir las infecciones causadas por *Cryptococcus*, en países en vía de desarrollo el acceso a la atención médica es limitado y la terapia antirretroviral es escasa (21).

En Colombia en el periodo 2006 al 2010 la tasa de incidencia anual de criptococcosis en la población general fue de  $2.4 \times 10^6$  habitantes mientras que en pacientes con SIDA fue de  $3.3 \times 10^3$  habitantes siendo la cuarta causa de muerte en estos pacientes en el país, sin embargo, un estudio del 2016 informo que en pacientes con VIH- SIDA aumento la incidencia un 1.1 de casos por 100.000 habitantes (4) Aunque en Colombia la criptococcosis no requiere notificación obligatoria, estos informes revelan su importancia de salud pública. El problema en Colombia actualmente es que, aunque la terapia antirretroviral tiene avances, la criptococcosis se está diagnosticando de

manera no oportuna al igual que en otros países (22)(23). Sin embargo, si el diagnóstico es hecho tempranamente y los clínicos se adhieren a los principios básicos de las guías de manejo de la criptococosis y si la enfermedad es controlada, entonces puede ser manejada con éxito en la gran mayoría de los pacientes. A pesar del tratamiento óptimo, la letalidad hospitalaria por esta micosis es alta en los países con recursos limitados, con cifras superiores al 40% (49,2% en Colombia)(24).

En el 2012 un estudio indico a nivel global la identificación de aislamiento tanto clínicos como ambientales de la especie *Cryptococcus*, donde en América del Sur, el 53% se informó en Brasil, el 22% en Colombia, 15% en Argentina, y un porcentaje menor en otros países; colocando a Colombia en el segundo país con mayores aislamientos de esta levadura (25).

Esta infección se asocia a una alta mortalidad y existe falla terapéutica relacionada a cepas resistentes y sus factores fenotípicos, sin embargo, hay pocos estudios de sensibilidad publicados en cepas de origen clínico, hasta la fecha son orientativos debido a la dificultad de estandarizar los puntos de corte. El fracaso terapéutico se asocia con la resistencia de la levadura, las condiciones clínicas del paciente y la farmacocinética del antifúngico. En Colombia se han realizado pocas investigaciones de susceptibilidad en aislamientos clínicos sin embargo, hay reportes de aislamientos con fenotipo de resistencia en la encuesta nacional liderada por el grupo de criptococosis colombiana con el Instituto Nacional de Salud (23) (24).

En la actualidad se dispone de metodologías estandarizadas, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y Subcommittee on Antifungal Susceptibility (AFST) Testing del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), establecen puntos de corte epidemiológicos, relacionan criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos (26). Aunque ambos estándares son similares, presentan diferencias en varios aspectos en la metodología para evaluar susceptibilidad de levaduras como *Cryptococcus* sp y el tiempo de incubación (26). Aunque existan estas dos posibilidades para el control de la susceptibilidad de *Cryptococcus* sp en el país no se implementa de manera rutinaria; siendo esto un problema para el seguimiento y tratamiento de las afecciones por dicha levadura.

En los últimos años, se ha venido estudiando el nivel de expresión de ácidos nucleicos donde estudios previos han demostrado la prevalencia del tipo sexual alfa ( $\alpha$ ) en aislamientos clínicos, asociándose con una mayor virulencia y resistencia a antifúngicos, mediante distintas técnicas como PCR o microarrays. Sin embargo, muchos estudios han demostrado una pobre correlación entre ácidos nucleicos y los niveles de expresión de proteínas para la correlación de la resistencia o susceptibilidad a antifúngicos. Un estudio típico de proteómica se basa en una serie de técnicas y herramientas para la extracción y separación de los componentes del proteoma y técnicas para la interpretación de los resultados. Estas técnicas proteómicas como por ejemplo espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight) particularmente útil para la obtención de la “huella peptídica” (PMF), se han venido aplicando fundamentalmente a tres tipos de estudios. En primer lugar, se han venido desarrollando estudios que permitan el conocimiento general del proteoma de un organismo y la identificación de los mismos a gran escala(27). Otro tipo de aplicación son aquellas técnicas de proteómica de expresión, en la que identifican aquellas proteínas que muestran una aparición o cambio de expresión al comparar dos estados fisiológicos, patológicos o metabólicos definidos, pudiendo así determinar las proteínas implicadas en estos procesos. Por último, se han venido estudiando las relaciones entre

proteínas, determinando así un mapa celular de las interacciones proteína-proteína. Los ejemplos obtenidos con la levadura *S. cerevisiae* han demostrado la complejidad de estas relaciones, así como la utilidad de establecerlas para extrapolar las funciones posibles de aquellas otras proteínas de la que aún se desconoce su papel, (28)(29) como es el caso de *C.neoformans* donde se desconoce una caracterización proteómica y su relación con la resistencia y/ o susceptibilidad antifúngica.

Por otro lado, se han descrito diferentes características fenotípicas relacionadas con la virulencia de *C. neoformans* que han demostrado su importancia en la patogenicidad. Entre ellas están el polisacárido capsular, el crecimiento a temperaturas fisiológicas, las actividades enzimáticas ureasa, proteasas, fosfolipasa, y la acumulación de melanina, inducida por la enzima fenoloxidasa, entre otras (30). Sin embargo, aún no han realizado estudios en modelos animales que permitan relacionar la afinidad de diferentes aislamientos clínicos por un hospedero determinado y que determinen diferencias entre las características fenotípicas con respecto a su virulencia.

### Pregunta de Investigación

¿Hay relación entre los perfiles de susceptibilidad a Fluconazol, Anfotericina B y Voriconazol con respecto a la capacidad patogénica y perfiles proteómicos citoplasmáticos de aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans*?

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad criptocócica por lo general conduce a una infección pulmonar primaria. El hongo puede permanecer latente durante largos periodos de tiempo sin causar infección, aunque cuando existe un inmunocompromiso por parte del hospedero puede iniciar la patología. Tras la diseminación, el patógeno oportunista muestra un tropismo particular por el sistema nervioso central (SNC), que con frecuencia causa meningitis. *C. neoformans* generalmente afecta a individuos inmunocomprometidos especialmente en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), aunque se han informado algunos casos en individuos sin inmunodeficiencia subyacente aparente (1).

El tratamiento de la meningitis criptocócica ocurre en tres etapas: inducción, consolidación y mantenimiento. La terapia de inducción recomendada consiste en Anfotericina B más Flucitosina, mientras que Fluconazol es considerado el agente óptimo tanto para las fases de consolidación y mantenimiento, como en profilaxis. Dadas las altas tasas de mortalidad de los pacientes que reciben tratamiento para la meningitis criptocócica a más de 600,000 muertes anuales (31).

Los factores del hospedero juegan un papel muy importante en la respuesta al tratamiento. Por otra parte, la susceptibilidad *in-vitro* no siempre predice el éxito del tratamiento y no siempre la resistencia *in-vitro* se asocia a falla en el tratamiento. Esto ha dificultado el establecimiento de puntos de corte. En relación a la lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) algunos de los métodos son cualitativos, dependiendo de la experiencia del operador(26). Por ello es importante el uso de métodos estandarizados que permitan, en gran medida, disminuir la generación de resultados erróneos; al igual el uso de puntos de corte validados de acuerdo a cada metodología (26).

Hay estudios que han demostrado diferentes características fenotípicas relacionadas con la virulencia de *C. neoformans* que han revelado su importancia en la patogenicidad. De acuerdo con estos antecedentes, se busca determinar fenotípicamente y genotípicamente la expresión de algunos factores de virulencia en aislamientos clínicos de las especies antes descritas, para poder establecer con mayor claridad las variantes del comportamiento biológico de *C. neoformans* en el hospedero dependiendo de sus factores de virulencia y a su vez con la resistencia a antifúngicos.

En la literatura científica colombiana son pocos los datos disponibles sobre la sensibilidad antifúngica, por lo que, frente al creciente aumento de la resistencia a los antifúngicos, se hace necesario comenzar a recopilar datos propios frente este patógeno oportunista, lo que puede llegar ser una herramienta efectiva para predecir el resultado del tratamiento, evolución clínica y, por lo tanto, poder guiar las decisiones de prescripción clínica. Por ello es importante hacer una caracterización proteómica citoplasmática y correlacionarla con las pruebas *in-vitro* de aislamientos clínicos, junto la identificación fenotípica de factores de virulencia y poder determinar si hay una estrecha relación entre ellas.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Historia de la taxonomía en *Cryptococcus sp.*

En 1894, el patólogo Otto Busse y el cirujano Abraham Buschke describieron por primera vez esta levadura como un patógeno humano cuando aislaron un organismo similar a *Saccharomyces* de una infección ósea en una mujer joven (32). Más tarde ese año, Francesco Sanfelice informó el aislamiento de la fermentación del zumo de melocotón de una levadura similar, que denominó *Saccharomyces neoformans* debido a su forma de colonia única. Finalmente, en 1901, Jean-Paul Vuillemin cambió el nombre del organismo a *Cryptococcus neoformans* porque no producía ascosporas, que es una característica definitoria del género *Saccharomyces*(32).

En *C. neoformans* se ha observado consistentemente con sus gruesas paredes celulares y su extensa cápsula. Durante mediados del siglo XX, los antisueros de conejo se utilizaron para definir los serotipos de la cápsula (A a D) una categorización que más tarde fue refinada por análisis de secuencias de ADN, la ecología, la epidemiología, y la patología. La clasificación actual define dos especies: *C. neoformans*, que abarca variedad *grubii* (serotipo A) y variedad *neoformans* (serotipo D) y *C. gattii* (serotipos B y C). Las dos especies también se dividen en ocho tipos moleculares principales: VNI y VNII (var. *grubii*), VNIV (var. *neoformans*), VNIII (híbridos AD) y VGI - VGIV ( *C. gattii*) (16) (33) . En la actualidad, el agente etiológico se clasifica **en dos complejos de especies: complejo *Cryptococcus neoformans* y complejo *Cryptococcus gattii***, con dos especies y varios híbridos: *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D, *C. gattii*, serotipos B y C y los híbridos AD, BD, AA y AB (34)(35).

Este último sistema permite una tipificación genética más precisa, que es particularmente importante en la clasificación de híbridos diploides o aneuploides inter e intra varietales que se han recuperado en el laboratorio y en el medio ambiente (34) . Los genomas de *C. neoformans* y *C. gattii* divergieron hace más de 34 millones de años, produciendo especies con marcadas diferencias ecológicas y patológicas. *C. neoformans* se encuentra en todo el mundo, se asocia con excrementos de aves (en particular el de las palomas) y causa la gran mayoría de las infecciones humanas. Por el contrario, *C. gattii* se ha encontrado históricamente en regiones tropicales y subtropicales asociadas con diversas especies de árboles, especialmente y es responsable de menos enfermedades humanas (33).

### 5.2 Características de *C. neoformans* y *C. gattii* como patógenos humanos

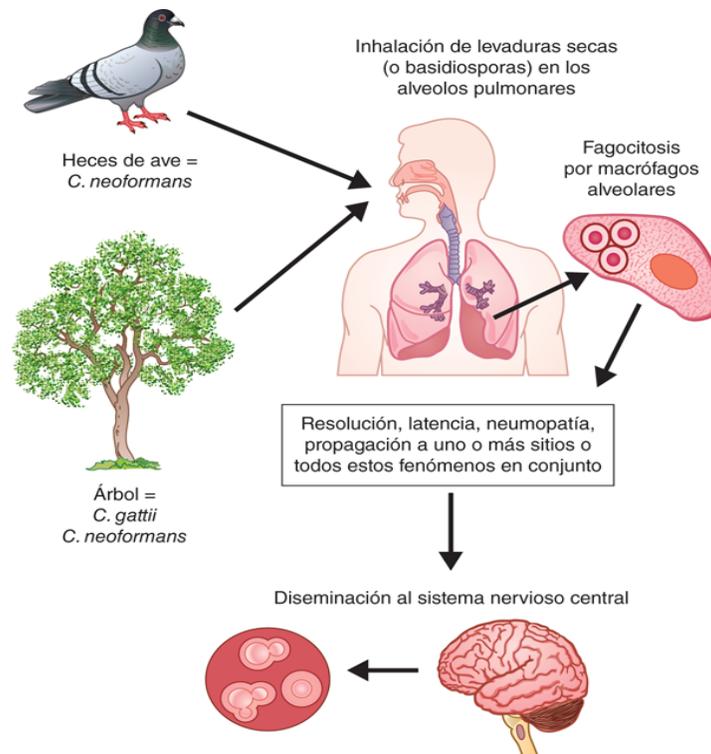
*C. neoformans* y *C. gattii* son levaduras de forma esférica, ovoide y a veces de forma alargada con gemación unipolar o multipolar. Crecen a 37°C y no forman pseudomicelio. En su fase anamorfa *Cryptococcus sp* es una levadura redonda u oval (4-6µm), rodeada con una cápsula polisacárida de tamaño variable. Los aislamientos de fuentes ambientales, son por lo general pequeños (4µm) con cápsulas reducidas mientras que en los de origen clínico sucede lo contrario (≥ 30µm) (32).

Basado en las diferencias antigénicas de la capsula se identificaron cinco serotipos: A, B, C, D y AD (36). Entre los factores de patogenicidad de *Cryptococcus* se encuentra la cápsula, la capacidad de adherencia y las proteínas con actividad enzimática como las proteasas, las fosfolipasas, las fenoxilasas y las ureasas.

### 5.3 Fisiopatología de la criptococosis

*Cryptococcus sp* causa infección en humanos, sobre todo en quienes tienen la inmunidad celular alterada (37). El hongo ingresa al organismo principalmente por la inhalación de esporas (Figura N° 1) (87), la infección pulmonar es usualmente asintomática o puede resultar en una neumonía auto limitada que se puede resolver en algunas semanas o meses aún en ausencia de tratamiento (37). Posteriormente se puede diseminar por vía hematogena al sistema nervioso central, hueso, próstata y la piel. La meningitis o las lesiones focales cerebrales constituyen el cuadro clínico más típico. La respuesta del organismo ante la infección depende principalmente de la inmunidad celular (1). A continuación, se describen las principales manifestaciones clínicas de la criptococosis.

**Figura N°1.** Formas de adquirir la levadura: mecanismo de infección de *C. neoformans* (el hongo ingresa principalmente por vía inhalatoria, las fuentes más conocidas son las heces de palomas u otras aves, *C. gattii* está asociado a eucaliptos de la variedad *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*); entre otros. Luego las esporas se alojan en los alveolos diseminándose posteriormente en el sistema nervioso central (32).



Fuente: Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner: *Microbiología médica*, 26e: www.accessmedicina.com  
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

## Características clínicas

Pulmonar: Las manifestaciones pulmonares abarcan un amplio espectro que va desde hallazgos radiológicos asintomáticos hasta trastornos respiratorios agudos. El tracto respiratorio es la puerta de entrada más común, presentándose como nódulos, infiltrados lobulares, intersticiales, patrón miliar, masas endobronquiales y cavitaciones. La forma localizada pulmonar puede afectar a personas inmunocompetentes o inmunosuprimidas siendo poco frecuente en las primeras. Esta patología no presenta signos y síntomas diagnóstico específicos, en la mayoría de los casos suele ser asintomática. Suele presentarse con fiebre, tos, disnea, dolor pleural (32).

Sistema nervioso central: Estudios en ratones demuestran que *C. neoformans* cruza la barrera hematoencefálica por migración transcelular a través del endotelio cerebral y posteriormente prolifera en el espacio subaracnoideo. Los pacientes pueden presentar meningitis o meningoencefalitis, que se pueden presentar de manera aguda, subaguda o crónica. Por esta razón frente a un paciente VIH positivo con fiebre, sin foco clínico o escasas manifestaciones clínicas, uno de los planteamientos diagnósticos es la meningoencefalitis por *C. neoformans* (38). En estos pacientes el líquido cefalorraquídeo (LCR) presenta alteraciones inespecíficas y la presión de apertura está elevada con frecuencia, lo que sugiere una lesión expansiva intracraneal de crecimiento lento (20).

No se ha establecido con total claridad la razón por la cual *C. neoformans* tiene un gran tropismo por el sistema nervioso central. Se cree que escapa al sistema inmunitario del huésped en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ya que la fracción C3 del complemento no se fija sobre la levadura como ocurre en el caso del suero (17).

Piel: La criptococosis cutánea puede ser primaria o secundaria, la criptococosis cutánea primaria (CCP) ha sido definida en la literatura como la identificación del *Cryptococcus* en la biopsia o el cultivo de la piel en ausencia de enfermedad diseminada. La criptococosis cutánea secundaria (CCS) se presenta por diseminación hematogena del hongo a la piel, lo que ocurre entre el 10-20% de los casos. La criptococosis primaria ocurre usualmente en áreas de trauma previo como una lesión por un cuerpo extraño o la mordedura de algún animal. Las personas con hobbies u ocupaciones que las exponen a lesionarse en áreas donde existen excrementos de palomas o detritus de árboles tienen mayor probabilidad de presentar la enfermedad. Las lesiones por *Cryptococcus* son muy variables e incluyen máculas, pápulas tipo molusco contagioso, pústulas y lesiones simuladoras de herpes (simple y zoster), equimosis, púrpura palpable y lesiones simuladoras de sarcoma de Kaposi, nódulos subcutáneos, úlceras tipo pioderma gangrenoso, lesiones granulomatosas, abscesos y lesiones pseudotumorales, lesiones de tipo rinofima y celulitis (17).

Ocular: Más del 50% de pacientes con neurocriptococosis presentan manifestaciones neurooftalmológicas siendo la más frecuente el papiledema secundario a la meningitis. Sólo un 5% de las meningitis se asocian a afectación intraocular, por lo que la coroiditis es infrecuente. La coroiditis suele ser multifocal y bilateral con lesiones numulares blanco amarillentas de tamaño variable la cual suele asociar papiledema (17).

Otros: *C. neoformans* puede afectar la próstata la cual es considerada como un reservorio importante en el hombre. No obstante, *C. neoformans* puede llegar a cualquier parte del cuerpo durante el proceso de diseminación hematogena con manifestaciones propias de cada localización (17).

#### 5.4 Factores de virulencia de *Cryptococcus sp.*

**Melanina:** Lacasa -fenol oxidasa es una enzima que se requiere para la producción de melanina la cual tiene un papel en la virulencia fúngica, así como la supervivencia en el medio ambiente. Se reportó que la lacasa, enzima que requiere de fenol oxidasa; está altamente asociada con el tropismo a SNC de *C. neoformans*, permitiendo el acceso a los sustratos fenólicos como las catecolaminas del hospedero en mecanismos de invasión al sistema nerviosos central(39)(40).

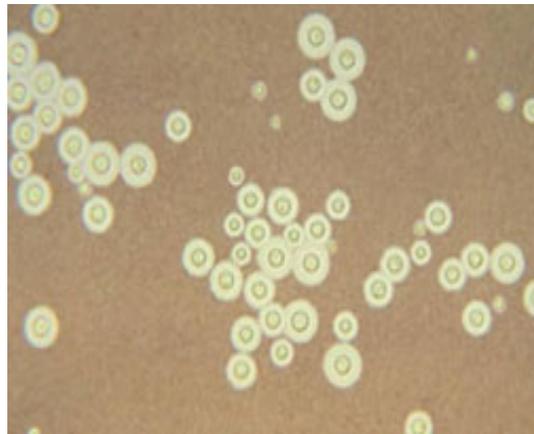
La melanina es un factor de virulencia bien establecido en *C. neoformans* que, además de proteger la levadura de una variedad de tensiones ambientales y del hospedero, influye en la susceptibilidad de muchas especies de hongos a los agentes antifúngicos. Esta actúa como un antioxidante, que protege al hongo de la destrucción intracelular por las células fagocíticas. Además, la melanina evita la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) por los macrófagos, y éste es necesario para generar una respuesta inmune celular protectora. Hay abundantes pruebas que la melanización aumenta la resistencia de *C. neoformans* a Anfotericina B (AMB), y algunas investigaciones sugieren que también afecta la susceptibilidad de Fluconazol (FLC) (41). *C. neoformans* activa la melanina en los tejidos del hospedero, presumiblemente mediante la captación de precursores fenólicos como L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L- DOPA). Estos sustratos, que se convierten en melanina por *C. neoformans* (lacasa)(42).

Varios estudios han demostrado que *C. neoformans* cuando expresa melanina puede soportar concentraciones más altas de Anfotericina B. Las pruebas tradicionales de susceptibilidad antifúngica de la Unión Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, (AFST-EUCAST) no puede detectar diferencias entre células melanizadas y no melanizadas, pero los ensayos de mortalidad pueden utilizarse para evaluar los efectos de la melanización en la susceptibilidad al fármaco (42). Los resultados de ensayos han demostrado repetidamente que siguen siendo viables células significativamente más melanizadas que no melanizadas después de la incubación con diversas concentraciones de AMB. Esta observación sigue siendo válida, ya sea que las células no estén melanizadas debido a la incubación sin L- DOPA o a través de la deficiencia de lacasa (42). Aunque el grado en que las células melanizadas superan a las células no melanizadas parece diferir según la cepa y la concentración del fármaco. Casi todos los estudios mostraron al menos una diferencia de 2 veces, con muchos ensayos que muestran números 6 veces mayores de células melanizadas supervivientes. Esto sugiere que el efecto práctico de la melanización en la susceptibilidad de AMB *in vivo* es probable que sea considerable (41).

La actividad de lacasa *in-vitro* de cepas de *C. neoformans* aisladas de casos de meningitis criptocócica asociada al VIH han tenido una relación significativamente negativa con la tasa de eliminación de hongos de pacientes humanos durante la terapia antifúngica basada en AMB. Dado que la melanina es un factor de virulencia responsable de la protección contra la fagocitosis y la

muerte por macrófagos, entre otras defensas del huésped, es posible que la relación inversa entre la actividad de la caspasa y el aclaramiento ocurra independientemente de cualquier efecto sobre la actividad de AMB. No obstante, estos resultados son consistentes con la noción de que la melanización puede aumentar la resistencia de *C. neoformans* a AMB y que al no tener en cuenta los efectos de la melanización, CLSI AFST se vuelve menos efectiva para evaluar con precisión la probabilidad de una cepa de ser eliminada por AMB (31).

**Cápsula:** El factor de virulencia mejor estudiado de *Cryptococcus* sp es su cápsula de (Figura N°2). Está constituida principalmente por dos grandes polisacáridos, glucuronoxilomanano (GXM) y glucuronoxilomanogalactano (GXMGal); ambos implicados en la virulencia y por polisacáridos como xilosa, manosa y ácido glucurónico, que determinan el deterioro en la fagocitosis. Esta estructura dinámica, puede crecer hasta varias veces el diámetro de la célula en grosor, es única entre los patógenos fúngicos. Las células que carecen de esta estructura son a virulentas y se ha demostrado que la cápsula, así como el polisacárido, inhiben la fagocitosis de la levadura y otras respuestas inmunitarias del huésped. El polisacárido capsular intravascular soluble impide la migración de leucocitos en el sitio de inflamación aguda o crónica, causado por neutrófilos y linfocitos que desprenden de la superficie L-selectina e inducen respuesta inmune; esa inmunidad es de baja regulación (43).



**Figura N°2.** Capsula: *C. neoformans* teñida con tinta china en donde se observa su capsula en halo blanquecino. Imagen sacada de: Centro de control y prevención de enfermedades. Biblioteca de salud publica (PHIL)Microbiol. 2016;7(MAR):1-16.

Las condiciones de cultivo estándar de laboratorio, incluido el crecimiento en RPMI, generalmente producen células de *C. neoformans* con cápsulas relativamente pequeñas. Los mecanismos por los cuales se logra la expansión de la cápsula dentro del huésped aún no se han dilucidado por completo, pero varios factores afectan el tamaño de la cápsula, incluida la concentración de CO<sub>2</sub>, concentración de nutrientes, pH, disponibilidad de hierro. Concentración de Mg<sup>2+</sup>, presencia de ciertos fosfolípidos y presión osmótica (44) (45).

**Pareja sexual:** Existen dos estados de reproducción sexual; los cuales son *Fillobasidiella neoformans* var *neoformans* que se deriva de *C. neoformans* y *Fillobasidiella neoformans* var *bacillispora* que

se deriva de *C. gattii*. El hongo se comporta como heterotálico, encontrándose dos tipos de aislamientos en la naturaleza la variedad “ $\alpha$ ” y la “a”; donde más del 95% de los aislamientos clínicos corresponden a la variedad  $\alpha$  (18).

Estado anamorfo. La reproducción asexual representa el estado anamórfico, el cual está caracterizado por la producción de células levaduriformes gemantes (propágulos asexuales), que típicamente desarrollan una gran cápsula compuesta por polisacáridos. El arreglo de los componentes capsulares determina alguno de los cuatro serotipos de la levadura: A, B, C ó D. Las levaduras son redondas (4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro) o en ocasiones ovaladas y excepcionalmente formadoras de pseudomicelio. Tanto las levaduras madre, como los blastoconidios se caracterizan por la presencia de cápsula (46).

-Estado Teleomorfo. El estado sexual del hongo está caracterizado por la producción de basidiosporas (propágulos sexuales). *Filobasidiella neoformans* es el Teleomorfo de *C. neoformans* y *F. bacillispora*, lo es de *C. gattii*. El género *Filobasidiella* es un basidiomiceto, con dos tipos sexuales: "a" y "alfa" caracterizados por tener el micelio hialino, consistente en hifas dicarióticas y un basidio alargado, portando basidiosporas sésiles y en cadena (gemación basípeta) (7).

La reproducción sexual es regulada por un locus de tipo de apareamiento único con dos alelos alternativos, *MATa* o *MAT $\alpha$* , pero la reproducción sexual parece ser limitada por encuentros aparentemente raros con los tipos de pareja sexual. Además, hay recombinación por fusión celular del mismo sexo o autodiploidización (endoreplicación) que produce haploides o diploides progenies recombinantes.

La mayoría de las cepas de serotipo AD son heterocigotas en el lugar geométrico de apareamiento, presentando dos apareamientos opuestos tipo alelos,  $\alpha\text{ADa}$  o  $\text{aAD}\alpha$ . Aunque, el alelo *MATa* entre los aislados del serotipo A es raro, es común en híbridos AD. Los híbridos  $\alpha\text{AD}\alpha$  naturales que surgieron por fusión entre dos células  $\alpha$  de diferentes serotipos se han informado en África meridional y los Estados Unidos. Además, se ha informado que un pequeño porcentaje de cepas de AD son homocigotas en el locus de apareamiento, presentando solo un alelo (47).

Crecimiento a 37°C: Se ha demostrado que las cepas de *C. neoformans* tienen temperaturas de crecimiento óptimas y máximas de 32 y 40 ° C respectivamente. También crece a temperatura corporal de los mamíferos. Sin embargo, dentro de las diversas variedades de *C. neoformans* la tolerancia a la alta temperatura en realidad puede variar. Por ejemplo, cuando se estudia el crecimiento de un gran número de cepas, parece que cepas de *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) generalmente tienen una mejor tolerancia a la temperatura alta que *C. neoformans* var. *neoformans* (30).

Enzimas extracelulares: Otro factor que ha sido implicado en la virulencia es la producción de manitol, que se correlaciona con una mayor resistencia al estrés osmótico, térmico y oxidativo. También se han sugerido superóxido dismutasa, proteasas y fosfolipasas como factores de virulencia criptocócica (48).

Proteasas: La producción de proteasa está implicada en la patogenicidad de los hongos oportunistas. Existe un gran número de publicaciones en las cuales se examina la producción de estas enzimas hidrolíticas. Entre los hongos, dos ejemplos notables son *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Se cree que las proteasas están vinculadas a la virulencia microbiana mediante la destrucción de los

tejidos del huésped y a su vez realizan proteólisis de proteínas inmunológicamente importantes, como anticuerpos y complemento (49). La producción de proteasas juega un papel importante en la degradación tisular del hospedero, favoreciendo la invasión del parénquima pulmonar a partir del espacio alveolar, siendo así un determinante en la patogenicidad (48).

Fosfolipasas: La enzima secretada, fosfolipasa B (Plb1), se concentra en la pared celular, pero no se conoce su función allí. Es un determinante de la virulencia criptocócica establecido siendo este el receptor que facilita la invasión del tejido pulmonar hidrolizando fosfolípidos en membranas celulares de mamíferos y surfactante pulmonar, adicionalmente es esencial para la diseminación hematogena de la infección (50). Existe evidencia de que la Plb1 criptocócica se une covalentemente a los  $\beta$ -glucanos en la pared celular porque se libera de las paredes celulares de *C. neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae* que expresan Plb1 criptocócica heteróloga, mediante el tratamiento con  $\beta$ -1,3 glucanasa fúngica (51). Esto plantea la posibilidad de que la Plb1 criptocócica sirva de funciones duales en la célula criptocócica, es decir, que esté involucrada en la homeostasis de la membrana y la remodelación y en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Ambas funciones contribuirían a la supervivencia de los hongos en el medio ambiente y el huésped mamífero. Además, Plb1 secretado, que facilita la invasión tisular, puede derivarse directamente de la pared celular(50).

Ureasa: La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de urea a amoníaco y carbamato. En condiciones fisiológicas, esta reacción puede provocar un aumento del pH. La ureasa parece ser un componente del fenotipo de virulencia criptocócica compuesta para invadir el sistema nervioso central (SNC) (52).

## 5.5 Epidemiología

En todo el mundo, *C. neoformans* y *C. gattii* causan infecciones con un estimado de un millón de casos de meningitis criptocócica por año entre personas con VIH/SIDA, lo que resulta en casi 625,000 muertes (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, CDC, Atlanta, EE. UU), aunque *C. gattii* tenga una incidencia significativamente más baja (25). La incidencia de la criptococosis aumentó con el inicio del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en la década de 1980. Tras la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARGA) desde mediados de 1990, su frecuencia comenzó a disminuir en los países desarrollados (6).

La mayor carga de la enfermedad ocurre en África subsahariana, donde se estima la mortalidad del 50% al 70%. En los Estados Unidos y otros países desarrollados, la criptococosis está disminuyendo entre personas con VIH/SIDA debido a la disponibilidad de activos terapia antirretroviral, y, en la actualidad, la mortalidad está alrededor 12% (CDC, Atlanta, EE. UU.)(6). Estudios genéticos demuestran que los brotes ocurridos en la costa occidental de Canadá y EE.UU. fueron producidos principalmente por el genotipo AFLP5/VGII, a su vez estos aislamientos presentan tres linajes clonales distintos que han sido designados como VGIIa, VGIIb y VGIIc(33). Estos genotipos ocasionan mayor letalidad en los animales de experimentación, a su vez, muestran valores de concentración inhibitoria mínima más elevados frente a diversos antifúngicos. Desde finales de 1990 hasta la actualidad cerca de 300 personas han sido afectadas las cuales presentan por lo general cuadros clínicos más característicos y con pobre respuesta al tratamiento (53).

En Centroamérica y Sudamérica un estudio realizado en el 2010 reportó de 10,548 aislamientos de la especie *Cryptococcus* sp el 53% se informó de Brasil, el 22% de Colombia, 15% de Argentina, y un porcentaje menor de otros países. Se aisló un total de 8,590 (81%) cepas de fuentes clínicas y 1.958 (19%) del medio ambiente y fuentes veterinarias, de las cuales se detectaron aislamientos de *C. neoformans* en palomas y otras aves excretas, suelo, polvo y viviendas contaminadas y de *C. gattii* del árbol de eucalipto, almendro, árbol kassod, rosa, *Caesalpinia peltophoroides* y *Anadenanthera peregrino*, donde *C. neoformans* fue reconocido en 6.665 y *C. gattii* en 1.464 aislamientos. El análisis combinado de los datos de tipado molecular informados de Brasil (1,439 aislamientos) mostro que todos los tipos, a excepción de VGIV, están representados en este país. En la mayoría de los aislados en Brasil pertenecen al tipo molecular VNI, seguido de VGII, mientras que VNII, VNIV, VGI y VGIII ocurrieron en un nivel inferior pero similar porcentaje. Dos aislamientos de VNIII, así como un VNI/VGII híbrido también fueron reportados(6).

En Colombia (542 aislamientos), encontrándose una prevalencia de tipos moleculares similar a la observada en Brasil, a excepción de VGIII, que se produjo en un mayor porcentaje de VNII, VGI y VGIV, así como VNIV, que fue reconocida solo en un aislado. Los híbridos VNIII AD parecen estar ausentes en Colombia(6). Aunque en Colombia la criptococosis no requiere notificación obligatoria, una serie de informes revelan su importancia en el país (4). En el año 1997, una encuesta nacional centrada en la criptococosis se diseñó con el objetivo de identificar las características demográficas de la población colombiana, los factores de riesgo implicados, los ensayos de laboratorio empleados para el diagnóstico, los agentes etiológicos involucrados, y el tratamiento inicial dado a los pacientes(23). Recientemente, se realizó una actualización del cuestionario, donde según los resultados del programa nacional de vigilancia para los años 2006-2010 en Colombia la mayoría de los pacientes (76,6%) eran hombres y 74,9% fueron entre los 21 y los 50 años. La infección por VIH fue el factor de riesgo más prevalente con un (83,5%), la criptococosis se definió en pacientes con SIDA en un 23% de los casos. La incidencia anual promedio en la población general fue de 2,4 por un millón de habitantes mientras que, en pacientes con SIDA, aumentó a 3,3 por 1.000 de habitantes. 6(23). La tasa media de incidencia de la criptococosis por año en la población general era calculada usando como denominador el número total (43,926,034) de habitantes de Colombia para el año 2008. (23). En 474 encuestas se informaron manifestaciones clínicas; donde las más ocasionales fueron; cefalea (84,5%), fiebre (63,4%), náuseas y vómito (57,5%), alteraciones mentales (46,3%), signos meníngeos (33%), tos (26,4%) y alteraciones visuales (24,5%). La neurocriptococosis se reportó en un 81,8% de los casos(23).

## 5.6 Diagnóstico

El diagnóstico microbiológico de la criptococosis se basa en el aislamiento de la levadura, examen microscópico directo de la muestra, así como la realización de pruebas bioquímicas y serológicas (32). El diagnóstico se realiza, habitualmente, mediante la observación del agente causal en el examen directo con tinta china, que puede realizarse a partir de exudado, esputo o tejido cerebral. Si se trata de LCR u orina, la muestra debe centrifugarse inicialmente. El hongo puede ser observado en preparaciones en fresco mediante montaje con tinta china diluida en solución salina o a la observación con microscopio contraste de fase, habiéndose tomado una muestra de 3 a 5 ml de líquido cefalorraquídeo (LCR). Con esta preparación se observa la presencia de células esféricas, rodeadas por un gran halo claro que corresponde a la cápsula, esta no se colorea con la tinta y semeja un espacio claro; donde ocasionalmente hay pseudofilamentos (32). El diagnóstico de la

forma cutánea requiere de la visualización del hongo por medio de la escarificación de las lesiones o la toma de biopsia(54).

El método de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina de conejo anti-polisacárido capsular de *C. neoformans* se puede realizar tanto en suero como en LCR, con fines diagnósticos y de monitoreo de la terapia. Tiene una sensibilidad cercana al 95% y una especificidad entre 93 y 100%(55).

### **Cultivos**

El cultivo apropiado cuando la levadura proveniente de sangre y líquido cefalorraquídeo debe ser en Agar Saboraud con antibióticos como el cloranfenicol, no debe usarse la cicloheximida porque inhibe algunas cepas del hongo. La temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C aunque también crecen a 25°C. Produce colonias lisas de textura mucosa y coloración blanco cremosa. *C. neoformans* se desarrolla bien en medios bacteriológicos generales como agar sangre, Ruiz Castañeda y medios líquidos para hemocultivos. Para muestras contaminadas como las provenientes de vías respiratorias o muestras ambientales se usan medios especiales selectivos como son el medio de Guizotia (semilla de girasol), también conocido como medio Staib, el ácido cafeico o el medio Pal que usa un extracto acuoso de semillas de Girasol (*Helianthus annuus*). En estos medios *C. neoformans* sintetiza la enzima fenoloxidasas que cataliza la oxidación de unos sustratos difenólicos en productos similares a la melanina. En estos medios las colonias se observan de un color pardo permitiendo diferenciarlas de otras levaduras como *cándida spp* u de otras especies de *Cryptococcus*(56) (57).

### **5.7 Tratamiento**

El tratamiento depende, principalmente, de dos factores: el sitio anatómico involucrado y el estado inmunológico del hospedero. En formas leves sin compromiso del SNC usualmente se utiliza Fluconazol vía oral 400 mg diariamente por 6 a 12 semanas. Itraconazol puede ser utilizado, pero es menos efectivo (58). En casos severos con compromiso del SNC, para pacientes con VIH, se indica una primera fase de inducción con Anfotericina B vía endovenosa (VE) a dosis de 0,7mg/kg diario combinado con 5-fluocitosina VE a dosis de 100mg/kg (la combinación con 5-fluocitosina ayuda a una esterilización más rápida del LCR), divididos en cuatro dosis, por dos semanas, seguidos por una fase de mantenimiento con Fluconazol 400 a 800mg vía oral (VO) diarios por un mínimo de 8 semanas (58). Para pacientes sin VIH con compromiso del SNC la fase de inducción se prolonga por 4 semanas, pudiendo sustituirse la Anfotericina B por Anfotericina B liposomal las últimas dos semanas, esto en pacientes en los cuales el LCR se torna estéril a las dos semanas, si no se logra la esterilización del LCR y el paciente presenta complicaciones neurológicas la fase de inducción se prolonga por 6 semanas (58).

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 de peso/ día IV + Fluconazol 800mg/día VO durante 2 semanas en la fase de inducción. En la fase de mantenimiento se utiliza Fluconazol 800mg/día VO por un mínimo de 8 semanas (59). En cuanto a los nuevos tratamientos, actualmente se cuenta con limitada información sobre la utilidad de los nuevos triazoles, Voriconazol y posaconazol para el tratamiento de la criptococosis. En los pacientes con VIH que han completado las 10 semanas de tratamiento se les debe administrar una dosis de Fluconazol 200mg/día de manera permanente o hasta que se produzca

una mejora de su inmunidad como consecuencia del TARGA (profilaxis secundaria). En caso la presión del LCR sea  $\geq 25$  cm H<sub>2</sub>O y existan síntomas de hipertensión intracraneana, se deben realizar punciones lumbares terapéuticas diarias buscando la disminución de la presión en un 50% (59).

Voriconazol: Antifúngico triazólico de amplio espectro. Inhibidor de la síntesis de ergosterol. Hongos sensibles: *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, incluidas *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*; especies de *Aspergillus*, incluidas *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*. También activo frente a *Cryptococcus neoformans*, micosis endémicas (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*) y dermatofitos. Actividad fungistática frente a *Candida* y fungicida frente a *Aspergillus*. Las cepas de *C. glabrata* resistentes a fluconazol son también resistentes a Voriconazol (60).

Anfotericina B: Antifúngico de amplio espectro, de actividad fungicida o fungistática en función de concentración. Activa frente a *Candida spp.* (Excepto algunas cepas de *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.* (Excepto *A. terreus* y algunas cepas de *A. flavus*). A pesar de que no atraviesa barrera hematoencefálica es eficaz contra la criptococosis. Tiene el inconveniente de ser nefrotóxico, con aumentos niveles de creatinina (61).

Fluconazol: Antifúngico. Pertenece al grupo de los azoles, concretamente a la clase de los triazoles. Su mecanismo de acción reduce la concentración de ergosterol, esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica. Su efecto es fungistático. Su espectro de acción incluye: *Candida albicans* y otras especies de *Candida* excepto *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. ciferri* y *C. inconspicua*. El 50% de las cepas de *C. glabrata*, casi un 50% de las de *C. famata* y en torno al 10% de las de *C. tropicalis* son parcial o totalmente resistentes. También es activo frente a *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, dermatofitos y *Malassezia furfur*. Su difusión es satisfactoria incluso al sistema nervioso central en ausencia de meninges inflamadas. Su metabolismo es hepático y su eliminación renal (62).

En Colombia se usan las recomendaciones de las guías IDSA 2010 (63), según lo muestran varios casos clínicos; las cuales indican que el compromiso leve a moderado puede ser tratado con fluconazol 400 mg vía oral día, durante seis a doce meses; en caso de compromiso pulmonar severo, la recomendación es aplicar el tratamiento para la neurocriptococosis. Las alternativas de tratamiento son Itraconazol oral 200 mg dos veces al día, voriconazol oral 200 mg dos veces al día y posaconazol oral 400 mg dos veces al día. El tratamiento de criptococomas múltiples o de gran tamaño causados por *C. gattii* amerita un abordaje más agresivo. Por tanto, en estos casos se recomienda manejo con Anfotericina B + Flucitosina por 4 a 6 semanas, seguido de fluconazol por 6 a 18 meses (64).

## 5.8 Susceptibilidad

La evaluación de susceptibilidad in-vitro para *C. neoformans* sirve como una guía clínica importante en la selección del agente antifúngico adecuado para el tratamiento de la criptococosis, así como para la detección de la aparición de aislamientos resistentes durante la ejecución de la vigilancia pasiva. Numerosos esfuerzos se han realizado para garantizar que métodos de evaluación de la susceptibilidad in-vitro de *C. neoformans* sean reproducibles y clínicamente relevantes, lo que ha promovido su estandarización y uso en laboratorios, con el fin de obtener resultados comparables

entre ellos. Actualmente, existen tres métodos de referencia estandarizados para realizar pruebas de susceptibilidad in-vitro con levaduras: primero por el CLSI (documento "M27-A3" y sus suplementos "M27-S3" y "M27-S4") , el segundo por EUCAST, ambos basados en la técnica de microdilución en caldo, y el tercero es el método de difusión de disco, también desarrollado por el CLSI(documento "M44-A2") (65).

Sin embargo, dada la necesidad obvia de tener valores de referencia que guían la elección de la terapia apropiada, algunas alternativas han sido propuestas. Han propuesto utilizar los puntos de corte establecidos por el método CLSI M27-A3 para *Candida spp.*, para la interpretación de resistencia antifúngica en *C. neoformans*. Estos puntos de corte categorizan un aislado como susceptible (S), sensibles dosis dependiente (SDD), intermedio (I) y resistente (R) para cada agente antimicótico.

Como no se han establecido puntos de corte para el posaconazol (PCZ), estos autores han propuesto el uso de los que ya han desarrollado para Voriconazol (VCZ)(65). Al usar el Método CLSI M44-A2 para la difusión en disco, los puntos de corte son los siguientes: FCZ → S  $\geq$  19 mm, SDD 15-18 mm, R  $\leq$  14 mm; VCZ → S  $\geq$  17 mm, SDD 14-16 mm, R  $\leq$  13 mm. Otra alternativa es interpretar los valores MIC obtenidos, teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos y aplicados en estudios de vigilancia para evaluar la resistencia antifúngica de *C. neoformans*. Estos puntos son específicos para los siguientes agentes antifúngicos: FCZ  $\geq$  16 o  $\geq$  64  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ; Itraconazol (ITZ)  $\geq$  1  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ; VCZ  $\geq$  2  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ; AB  $\geq$  1  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ; 5-FC  $\geq$  32  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Es importante tener en cuenta que estos puntos de corte deben interpretarse cuidadosamente, teniendo en cuenta el contexto clínico del paciente (66).

#### Métodos de susceptibilidad para *Cryptococcus*

- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): antes conocido como el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), formó un subcomité de Prueba de susceptibilidad antifúngica que publicó, en 1997, el documento M27A "Método de referencia para la susceptibilidad antifúngica a la dilución en caldo "Prueba de levadura; Norma aprobada ". Este documento define referencias de cepas con rangos de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y Puntos de ruptura (BP) para algunos antifúngicos y su acción contra las levaduras como *Candida* y *Cryptococcus*. Desde entonces, varias actualizaciones tienen publicado, el actual se aprobó en abril de 2008. Para los hongos filamentosos, el primer documento se publicó en 2002: M38A: "Método de referencia para la prueba de susceptibilidad antifúngica a la dilución en caldo" de hongos filamentosos; Approved Standard "con una segunda edición publicado en 2008, que es el actualmente aceptado (67).
- Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST): es un comité permanente organizado conjuntamente por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC), y los Comités Europeos de Punto de Inflexión Nacional ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). El subcomité de prueba de susceptibilidad antifúngica del EUCAST (AFST-EUCAST) se formó en 1997, y en 2008 publicó un estándar de prueba de susceptibilidad para levaduras (incluyendo *Cryptococcus sp.*). Esta norma se actualizó en 2012. Todos estos estándares están disponibles en línea y se pueden descargar del sitio web de EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). Diferencias entre

ambos estándares se encuentran principalmente en el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación y composición media. A pesar de estas diferencias, los resultados obtenidos por ambos métodos son comparables CLSI y EUCAST incluyen en sus estándares para probar la levadura algunas modificaciones para *Cryptococcus*. Así, en CLSI la recomendación es leer MIC para *Cryptococcus* después de 70 a 74 horas de incubación (tabla 1) (68) (en contraste con 24-48h para *Candida*), mientras EUCAST recomienda la incubación de las placas a 30°C cuando el control de crecimiento no alcanza una densidad óptica de 0.2 a 35°C (67).

**Tabla 1.** Test de susceptibilidad antifúngica por metodología CLCI vs EUCAST

Table 1		
Métodos de susceptibilidad antifúngica CLSI vs EUCAST		
	CLSI M27-A3	EUCAST Edef 7.2
Parametro	Microdilución	Microdilución
Tamaño pocillo de la placa	Redondo	Plano
Medio	RMPI 1640	RMPI 1640
Concentración de glucosa	0.2%	2%
Densidad del inóculo	0.5-2.5 x 10 <sup>3</sup>	0.5-2.5 x 10 <sup>5</sup>
Temperatura de incubación	35 °C	35 °C
<b>Tiempo de incubación</b>		
AMB, FCZ,	24h	24h
Azoles	48h	24h
<i>Cryptococcus</i>	72h	48h
Lectura	Visual	Espectrofotometría
Punto de corte		
AMB	100 % Inhibición	90% Inhibición
Azoles	50 % Inhibición	50% Inhibición

AMB= Anfoteciniva B , FCZ= Fluconazol .

Métodos de dilución en caldo: Constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad in-vitro, tanto de levaduras como de hongos filamentosos y miden CIM a distintos fármacos antifúngicos, como Anfotericina B, Fluocitosina, Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol y los nuevos triazoles como Voriconazol, posaconazol y Ravuconazol. En la actualidad se dispone de dos estándares que utilizan el método de microdilución en caldo con este propósito. Uno es el documento M27-A3, de la CLSI, en el cual se han establecido puntos de corte después de una exhaustiva correlación clínica y epidemiológica para definir susceptibilidad in-vitro a determinados

antifúngicos como los azoles (67). Se han determinado puntos de corte de CIM para Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol y Fluocitosina (Tabla 2). Los puntos de corte para las equinocandinas (Caspofungina, micafungina, anidulafungina) contra *Candida*, aún no han sido validados; sin embargo, es importante señalar que *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. famata* tienden a presentar CIMs más altas a estos fármacos.

El otro es el estándar europeo EUCAST-AFST, cuya versión definitiva se publicó el año 2007 y que ha establecido puntos de corte clínicos de acuerdo con la especie y la relación entre criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos y la distribución de las CIMs. Es así como hay especies con puntos de corte relacionados y no relacionados (Tabla 2). Aunque ambos estándares son similares, presentan diferencias en varios aspectos en la metodología para evaluar susceptibilidad de levaduras fermentadoras como *Candida sp.* Algunas de las diferencias más importantes son: el tiempo de incubación (24 hrs para EUCAST y 48 hrs para el estándar CLSI) pues el primero utiliza un inóculo mayor; el fondo del pocillo de la placa de microdilución (plano para EUCAST y redondo para CLSI); la lectura (espectrofotométrica en EUCAST, visual en CLSI). Ambos utilizan RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y una concentración de glucosa de 0,2 y 2% (CLSI y EUCAST, respectivamente) (Tabla 5). Según lo descrito en la literatura científica, ambos estándares correlacionan bastante bien dentro de tres diluciones; sin embargo, el método EUCAST, tendería a leer CIMs más bajas que el método CLSI, siendo la correlación ocasionalmente más baja si con EUCAST se utilizan los puntos de corte de CLSI11. Es recomendable leer en cada estándar con sus propios puntos de corte. Desde el punto de vista práctico, el método EUCAST es menos laborioso, más fácil de interpretar, sobre todo en cepas que presentan “trailing” y arroja resultados definitivos a las 24 hrs de incubación(67).

En el 2011 Michael A. Pfaller, 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 fluconazol (FLC), posaconazol (PSC) y voriconazol (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 MIC para FLC, PSC y VRC fueron 4 mg/L, 0.12 mg/L y 0.06 mg/L, respectivamente. Los puntos de corte expresados en miligramos por litro para FLC, PSC y VRC fueron 8 (96.9), 0.25 (96.5) y 0.12 (95.1), respectivamente (% de aislados que tenían  $MIC \leq$  punto de corte) (69). Más tarde en el 2013 y 2015, SENTRY confirmaron los puntos de corte para estos antifúngicos en aislamientos clínicos de *C. neoformans* además que realiza la vigilancia antifúngica para esta levadura y otras micosis en diferentes continentes, concluyen que la resistencia a los antifúngicos es poco común entre los aislamientos de *C. neoformans*.

**Tabla 2.** Puntos de corte para fluconazol, posaconazol y voriconazol en *C. neoformans* (69).

Agente antifungico	MIC (mg/L)	
	Rango	Corte
Fluconazol (285)	0.25-32	4
Posaconazol (285)	0.03-0.5	0.12
Voriconazol (285)	0.008-0.5	0.06

Método de difusión en disco: Es un método simple, desarrollado para levaduras y disponible para fármacos solubles en agua, tales como Flucitosina, Fluconazol y Voriconazol, estandarizado por el CLSI en el documento M44-P para especies de *Candida*. Se obtiene un halo de inhibición cuya medición correlaciona muy bien con el método de referencia, lo cual ha sido demostrado en estudios multicéntricos que han probado más de 1.000 cepas. La utilización de azul de metileno disperso en la superficie de la placa parece mejorar los límites de la zona de inhibición y facilitar la lectura(67).

Métodos comerciales: Uno de los más utilizados en los laboratorios de microbiología por su factibilidad de montar y su buena concordancia con los métodos de dilución en caldo es el Etest® (AB BioDisk, Solna, Sweden), aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para susceptibilidad in-vitro de *Candida sp* contra Fluconazol e Itraconazol. Es un método simple, que involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, lo cual permite determinar la CIM. Luego, la placa se incuba a 37°C por 24-48 horas y se genera una elipse de inhibición que permite obtener la CIM. Se ha utilizado en levaduras y en hongos filamentosos y mide la CIM a Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol, Fluocitosina, Voriconazol, posaconazol y Caspofungina. Este método ha sido uno de los más eficaces comparado al método de referencia de microdilución para detectar resistencia a Anfotericina B en *Candida*. Se han probado distintos medios siendo el más utilizado, RPMI suplementado con glucosa al 2%. Otros medios utilizados han sido Casitona, para azoles, Yeast Nitrogen Base (YNB), particularmente para *C. neoformans*, AM3 y Mueller-Hinton suplementado con glucosa al 2% y azul de metileno. Este último medio ha sido especialmente recomendado para discriminar cepas resistentes a Anfotericina B, produciendo elipses de inhibición más definidos (67).

El método Etest® (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia); se basa en un gradiente de concentración continua del agente antimicótico a lo largo de una tira de plástico, lo que permite determinar los MIC. Varios investigadores han comparado Etest® y microdilución de caldo por CLSI para la determinación de susceptibilidad de aislados de *C. neoformans* usando agar RPMI-1640 medio con 2% de glucosa, obteniendo un buen acuerdo para AB, FCZ, 5-FC y VCZ, pero no así para ITZ. Thompson et al. comparó Etest® con el método CLSI Curr Fungal Infect Rep para isavuconazol, encontrando un acuerdo del 97.8% entre ambos. En términos generales, la concordancia de Etest® con el CLSI M27-A3 es > 90%. Estudios en los que el agar Mueller-Hinton con glucosa al 2% y 0.5µg/ml de azul de metileno también se usaron buenos acuerdo para AB, FCZ y PCZ, en comparación con el Método CLSI (70). En base a estos estudios, el Etest® podría ser una

alternativa a la microdilución de caldo para determinar la prueba de susceptibilidad antifúngica in-vitro a *C. neoformans*, y en particular, para la detección de aislamientos resistentes a AB(65).

### **5.9 *Galleria mellonella* como un sistema modelo para estudiar la patogénesis de *C. neoformans***

Debido a las similitudes estructurales y funcionales que existen entre el sistema inmune del insecto y la respuesta inmune innata de los mamíferos, los insectos han sido ampliamente utilizados para estudiar la virulencia de patógenos como *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* los cuales han generado resultados que se correlacionan con los que se pueden obtener utilizando mamíferos (71). Estudios recientes han aprovechado el amplio rango del modelo animal de *C. neoformans* para desarrollar sistemas modelo de invertebrados fáciles que utilizan la ameba *Acanthamoeba castellanii*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el moho del limo *Dictyostelium discoideum* y el insecto *Drosophila melanogaster*; como huéspedes para el estudio de los atributos de virulencia establecidos o para identificar nuevos genes implicados en la virulencia (8). Algunos de estos modelos alternativos desarrollados anteriormente están limitados por la incapacidad del sistema huésped para sobrevivir a 37°C, la dificultad de administrar inóculos fúngicos exactos o la dificultad de administrar quimioterapia antimicótica (8). *Galleria mellonella* es una polilla del orden de los Lepidópteros y pertenece a la familia *Pyralide*. El ciclo completo de *Galleria* puede ser utilizado para variados experimentos, por ejemplo, la producción de huevos y larvas ha sido utilizada universalmente como larva huésped para la reproducción in vivo del grupo de nematodos *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* con biofermentaciones (8). Por lo anterior, la producción de larvas de *G. mellonella*, para el aislamiento de hongos entomopatógenos y la producción de nematodos es de gran interés.

Dentro del campo de estudio, la polilla (*G. mellonella*) es una opción de modelo animal para este tipo de ensayos debido a su facilidad de inoculación, rentabilidad y falta de restricciones legales y éticas para su uso. Se pueden usar varios puntos finales para evaluar la respuesta de las larvas a infección que incluye mortalidad, grado de melanización, alteración en el hemocito, población o función y alteración en el perfil proteómico. Una correlación entre alteraciones en la densidad de hemocitos en larvas y la virulencia relativa de hongos patógenos ha sido establecido (71). Dentro de su medio ambiente natural sin duda se encuentran varios microbios a los que ha evolucionado su respuesta inmune. La susceptibilidad a infecciones, así como su capacidad para montar una respuesta de defensa hace de *G. mellonella* un anfitrión interesante en el estudio de patogenicidad enfocándonos específicamente en infecciones fúngicas. La forma larval del insecto ha sido empleada para estudiar hongos tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida spp.* y *C. neoformans* (72).

La mayor ventaja de trabajar con este modelo invertebrado es que las larvas pueden mantenerse en un rango de temperatura de 25°C a 37°C, 5 facilitando así un número de las condiciones templadas bajo las cuales hongos existen en cualquiera de los entornos naturales nichos o hosts de mamíferos(8). Este modelo animal puede ser inoculado con un agente etiológico a través de tres métodos: (1) aplicación tópica, (2) oral o (3) inyección (72). El método de inyección ofrece el beneficio de que los hongos se inyectan directamente en el hemocele de las larvas y por lo tanto las larvas pueden recibir una concentración conocida del patógeno. Una vez inoculados la mortalidad

de las larvas puede ser monitoreado para determinar la patogenicidad (69). Otras ventajas de usar las larvas son su bajo costo, disponibilidad comercial y facilidad de uso(72).

Estos organismos al tener un sistema inmune innato que consta de respuesta humoral y defensas celulares, donde en la respuesta humoral incluyen una variedad de moléculas secretadas con propiedades antimicrobianas, que incluyen fenoloxidasa, que defiende contra los patógenos catalizando la formación de melanina y compuestos intermedios de melanina tóxica. Las respuestas inmunes celulares incluyen fagocitosis y formación de nódulos. La formación de nódulos ocurre cuando los microorganismos son reconocidos por el sistema inmune. Los componentes humorales y celulares también pueden trabajar juntos ya que la melanización ocurre dentro de los nódulos (39).

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Evaluar la relación entre la susceptibilidad o resistencia antifúngica con la capacidad patogénica de aislamientos clínicos de *C. neoformans* determinando los perfiles proteómicos citoplasmáticos.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la actividad antifúngica in-vitro a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de *C. neoformans*.
2. Determinar la capacidad patogénica de aislamientos clínicos de *C. neoformans* en *Galleria mellonella*.
3. Determinar la expresión de factores de virulencia de aislamientos clínicos de *C. neoformans*.
4. Comparar perfiles proteómicos citoplasmáticos globales de aislamientos susceptibles y resistentes a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

## 7. METODOLÓGICA

**Material Biológico:** 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* disponibles en el cepario del grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, obtenidos a través de la vigilancia pasiva de la criptococosis en Colombia (Anexo 1)

**Tabla 3. Cepas control: cepa de alta virulencia H99 y baja virulencia (JEC21)**

ID INS	Cepa	Especie	Variedad	Serotipo/pareja sexual	Virulencia
H0058-I-1129	H99	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	A/ a	Alta
H0058-I-1128	JEC 21		<i>neoformans</i>	D/ α	Baja

Los 29 aislamientos fueron suministrados con datos moleculares por PCR (Huella Digital) y RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), donde 26 aislamientos fueron VNI, 1 aislamiento VNII y 2 VNIV.

### Objetivo específico N°1:

Determinar la actividad antifúngica in-vitro a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

---

Ajuste del inóculo: Se realizó un ajuste del inóculo a una escala 0.5 de Macfarlán que equivale a  $1.5 \times 10^6$  UFC/ml a una absorbancia de 530nm con un rango de 0.08 a 0.12, posteriormente se realizarán dos diluciones 1/100 y 1/20 según metodología de CLSI. Cada paso tiene un volumen final de 100µl y a cada cepa se le realizó un ajuste en 3ml (73).

Por cada placa de microdilución hay un espacio para 4 cepas por duplicado, estas se incubaron a 37°C a 110 rpm por 24, 48 y 72 horas. Se procedió con una lectura observacional y de absorbancia para finalmente obtener todas las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC).

Ensayo de susceptibilidad: Se realizaron concentraciones de los antifúngicos según la metodología de CLSI (Tabla N°4) en placas de microdilución a un volumen final de 100ml, donde se realizará para cada ensayo por duplicado (73).

**Tabla 4.** Concentraciones de antifúngicos Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B según estimación del CLSI para determinar la MIC.

Antifúngico	Concentración	ug/ ml
Fluconazol	0.125	64
Voriconazol	0.0313	16
Anfotericina B	0.0313	16

**Tabla 5.** Cepas control en susceptibilidad antifúngica para *C. neoformans* según parámetros de CLSI con su respectivo ID.

Cepa control	ID
<i>Candida krusei</i> (resistente)	ATCC 6258
<i>Candida parapsilosis</i> (sensible)	ATCC 22019

Primero se realizó una solución madre a partir de la concentración más alta del antifúngico empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso x potencia (0.99)}}{\text{La concentración más alta x 100}} = \text{ml}$$

Se resuspendió fluconazol en medio Roswell Park Memorial Institute (en inglés, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (RMPI) con dimetilsulfóxido (DMSO) o agua estéril según especificación del fabricante. Posteriormente a partir de esa solución se realizaron diez diluciones seriadas. Seguido de esto a partir de la solución madre se realizó una segunda dilución seriada para luego ser sembradas en las placas de microdilución; cada placa contenía el inóculo ajustado a una concentración de  $\times 10^6$  UFC/ml y el antifúngico resuspendido en medio RMPI. De esta última dilución se sembraron 100  $\mu$ l en cada placa de microdilución. Adicionalmente para cada montaje se usó un control de crecimiento como *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* de cada antifúngico por cada concentración y un control negativo (sin crecimiento) donde solo tendrá concentración del antifúngico más medio RMPI sin inóculo. Posterior al montaje de las placas se almacenaron a 4°C previo a su uso.

**Tabla 6.** Interpretación de susceptibilidad con rangos de sensibilidad, SDD y resistencia según CLSI (73).

Antifúngico	Sensible	SDD	Resistente
Anfotericina B	$\leq 0.5$ ug/ml	-	$\geq 2$ ug/ml
Fluconazol	$\leq 8$ ug/ ml	16-32 ug/ml	$\geq 64$ ug/ml
Voriconazol	$\leq 1$ ug/ml	2 ug/ml	$\geq 4$ ug/ml
5- Flucitosina	$\leq 1$ ug/ml	8-16 ug/ml	$\geq 32$ ug/ml

## **Objetivo específico N°2:**

Determinar la capacidad patogénica de aislamientos clínicos de *C. neoformans* en *Galleria mellonella*.

---

Control de ajuste de inóculo: En los inóculos  $1,5 \times 10^5$  UFC/ml, se realizó una dilución hasta  $\times 10^3$  UFC/ml y se sembraron 100 $\mu$ l en agar glucosado Sabouraud a 37°C por 48 horas con el fin de evaluar el ajuste del inóculo, culminado el tiempo se realizó un recuento de UFC.

Características macroscópicas del modelo invertebrado: Las larvas se seleccionaron según sus características macroscópicas sin presentar ninguna coloración en la cutícula, ya que así se pueden indicar larvas infectadas por hongos u otros microorganismos, además se seleccionaron larvas de últimos estadios (quinto y sexto).

Desinfección de las larvas: Se desinfectaron en una concentración de 0,1% de hipoclorito por 30 segundos a 110 rpm, seguido de dos baños en agua destilada estéril por 30 segundos a 110 rpm.

Inoculación de las larvas: Se inocularon 21 larvas por cada cepa con 10 $\mu$ l de una suspensión de levadura ajustada a  $1,5 \times 10^5$  UFC/ml, mediante una inyección con  $1,5 \times 10^2$  UFC/ml en la última pseudopata izquierda usando una jeringa de insulina de 50 UI de calibre (74). Después de la inyección, 20 de las larvas se incubaron en cajas de Petri a 37°C y se realizó un seguimiento por 15 días registrando el número vivas y muertas. Una larva se sacrificará ese mismo día con el fin de evaluar el control de inoculación, esta se maceró y se realizó una dilución 1/1000 con solución salina al 0.9%, se sembró 100 $\mu$ l de esta dilución en agar glucosado de Sabouraud a 37°C por 48 horas, culminado el tiempo se realizó un recuento de UFC (8).

Un grupo de 60 larvas se implementaron como control absoluto, control de desinfección y control de inoculación siendo 20 ejemplares para cada control; el primer control de larvas no tuvo ninguna manipulación (para controlar la calidad de las larvas), el segundo grupo control de larvas únicamente fueron desinfectadas (para controlar microorganismos) y el tercer grupo control de larvas de inoculó con PBS 1X y fueron desinfectadas (para controlar algún tipo de daño locomotor causado por la inoculación) (8).

Para evaluar la capacidad fagocítica de los hemocitos de *G. mellonella* frente a *C. neoformans*, un grupo de 5 larvas por cada aislamiento evaluado (Incluido los controles de alta y baja patogenicidad), se sacrificaron y se les extrajo la hemolinfa. Para este procedimiento cada larva sacrificada (según el resultado de las curvas de Kaplan-Meier, del ensayo de *G. mellonella*) se llevaron a -80°C durante 10 minutos, al finalizar este tiempo se realizó una incisión en la última pseudopata derecha con el fin de obtener la hemolinfa, esta se extendió en una lámina y se le realizó coloración de Wright para su visualización y un conteo de 100 hemocitos por cada condición en un microscopio de luz a 100X.

### **Objetivo específico N°3:**

Determinar la expresión de factores de virulencia de aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

---

Tamaño capsular y celular: Después de haber concluido el ensayo experimental del segundo objetivo, se determinó la media mortalidad de las tres replicas en el modelo invertebrado, que consistió en tomar como punto de referencia el día en donde el 50% de las larvas murieron, esto se realizó por cada cepa. Cada larva muerta se maceró y se homogenizó en 1 ml de PBS 1X. Se preparó una lámina que contenía una gota de tinta china y una gota de cada tubo, a continuación, cada lámina se visualizó en un Microscopio Zeiss Axiophot en un lente de 40x X 20x, por cada cepa se visualizarán 100 células, midiendo el área total de la célula y el área de la cápsula, se calculó el área celular según el área total menos el área de la cápsula (75).

Determinación de la pareja sexual a ó  $\alpha$ : Cada aislamiento se sembró en cajas de agar Saboraud por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se realizó la extracción de ADN. A los 29 aislamientos clínicos almacenados a -70°C en glicerol al 10%, se les realizó la extracción de ADN como antes se ha descrito por Casali, et al 2003, brevemente: los aislamientos de *C. neoformans*, se sembraron en agar extracto de levadura-peptona-dextrosa (YEPD) durante 48 horas a 27 °C, posteriormente un asada de este cultivo se incubaron a -20 °C por una hora, a continuación se suspendieron en 500 $\mu$ l de buffer de lisis (10 mM Tris, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 8,0 y 1% SDS) y se incubara a 65 °C por una hora, posteriormente se adicionaron 500 $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se centrifugaron por 15 minutos a 13.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen igual de isopropanol, el ADN se precipito a -20 °C durante una hora, posteriormente se centrifugo por 15 minutos a 4 °C a 13.000 rpm. El ADN se precipito con etanol al 70% y se centrifugo nuevamente por 15 minutos a 4 °C a 13.000 rpm, el ADN se seco a temperatura ambiente, las muestras se re-suspendieron en 50 $\mu$ l de TE (33) .

Posteriormente se realizó una PCR de acuerdo con las condiciones descritas por Hallyday et al. Se emplearon los iniciadores MF $\alpha$  que codifican para una feromona específica para la pareja sexual  $\alpha$  y los MF $\alpha$ 2 que codifican para una proteína cinasa específica para la pareja sexual  $\alpha$  (2).

Condiciones de reactivos y de amplificación de PCR de pareja sexual “a” y “alfa ( $\alpha$ )”: La PCR pareja sexual  $\alpha$  se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l que contenía: 37 $\mu$ l de agua de PCR, 2 $\mu$ l (10 ng/ $\mu$ l) de ADN, 5 $\mu$ l de buffer de PCR 10X, 5 $\mu$ l dNTPs a 2 Mm (2 mM de cada base: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1.5 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) 2 $\mu$ l, de cada iniciador 5 $\mu$ l a 10ng/ $\mu$ l, y Taq 0.5 $\mu$ l, la determinación del patrón molecular a partir de un fragmento de 120pb. Las condiciones de amplificación se describen en la tabla 6.

La PCR pareja sexual  $\alpha$  se realizó en un volumen final de 50 $\mu$ l que contenía: 30.72 $\mu$ l de agua de PCR, 2 $\mu$ l (10 ng/ $\mu$ l) de ADN, 5 $\mu$ l de buffer de PCR 10X, 5 $\mu$ l dNTPs a 2 Mm (2 mM de cada base: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 3 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) 2 $\mu$ l, de cada iniciador 1,2 $\mu$ l a 10ng/ $\mu$ l de

Mf $\alpha$ U y 1.58 $\mu$ l a 10ng/ $\mu$ l de Mf $\alpha$ L, y Taq 0.5 $\mu$ l, la determinación del peso molecular a partir de un fragmento de 240pb. Las condiciones de amplificación se describen en la tabla N°3.

**Tabla 6.** Condiciones de amplificación, PCR sexual “*alfa* ( $\alpha$ )” y “*a*” bajo las condiciones de amplificación con 30 ciclos.

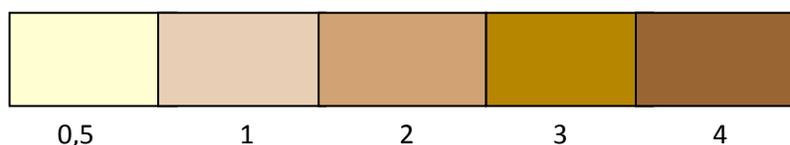
Condiciones PCR (30 ciclos)	
Desnaturalización inicial	94°C durante 5 minutos
Desnaturalización	94°C durante 1 minuto
Anillamiento	55°C durante 1 minuto
Extensión	72°C durante 1 minuto
1 ciclo final de extensión	72°C durante 7 minutos

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2% en buffer 1X (TBE) a 100 V durante 1 hora. La interpretación se realizó por la amplificación de una banda a la altura de 109 pb que correspondió a la pareja sexual  $\alpha$  y una banda de 140pb que corresponde a la pareja sexual a, se implementarán cepas control JEC20 (*C. neoformans* var. *neoformans*) para pareja sexual a y JEC21 (*C. neoformans* var. *neoformans*) para pareja sexual  $\alpha$  (76).

Determinación de las actividades enzimáticas: Cada aislamiento se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se realizó la evaluación enzimática para fenoloxidasa, proteasa y fosfolipasa de la siguiente manera:

*Fenol-oxidasa:* Para esta metodología se partió de un inóculo a 1.5X10<sup>7</sup> UFC/ml, se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm a una lectura de 0.272 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembraron en forma de gota en agar semilla guisotea (girasol) por triplicado para cada aislamiento, se incubo a 27°C y se realizaron observaciones diarias por 15 días para determinar la melanización de la colonia, la escala empleada consto de cinco mediciones según la intensidad de la melanización (figura 3)

**Figura 3.** Escala de medición de la actividad de la enzima fenoloxidasa, observación visual por color.



Se emplearon controles de alta y baja melanización (H99 y JEC21 respectivamente) y *Saccharomyces cereviceae* sin actividad como control negativo (77).

*Proteasa:* Para esta metodología se partió de un inóculo a 3.0X10<sup>7</sup> UFC/ml, se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm a una lectura de 0.561 de absorbancia,

posteriormente se realizó una dilución de 1:100 y se sembraron 10µl del inoculo en agar base carbón levadura (YCB) suplementado con albúmina bovina sérica más poli peptona (BSA +PP) a 27 °C por 10 días, posteriormente se realizó la visualización de las zonas de proteólisis mediante la adición de ácido tricloro acético al 10% y azul de Cómase, la interpretación de la actividad proteolítica extracelular se dio por un valor  $PZ = A/B$ , donde A correspondió al diámetro de la célula y B correspondió al diámetro de la célula más la capsula. El rango de la actividad se catalogó como negativa ( $PZ=1$ ), bajo ( $PZ=0.7-0.99$ ), medio ( $PZ=0.5-0.69$ ) y alto ( $PZ=<0.5$ ) se realizó según los valores PZ. Se emplearon dos controles *C. neoformans* var. *grubii* (H0058-I-743) actividad media y *C. neoformans* var *grubii* (H0058-I-860) actividad baja, (tabla en anexo 1).

#### **Objetivo específico N°4:**

Comparar perfiles proteómicos citoplasmáticos globales de aislamientos susceptibles y resistentes a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

---

Preparación de muestras para espectrometría de masas: las cepas pre-conservadas -80°C, se sembraron en medio Sabouraud (SBA) durante 48h a 37°C. Mediante una extracción con ácido fórmico y acetonitrilo se realizó la exposición de proteínas para su ionización.

Después de ser cultivadas, se realizó una extracción de proteínas citoplasmáticas, brevemente una cantidad pequeña de células se resuspendido en 300µl de agua grado HPLC e inactivada con 600µl de etanol absoluto. Posteriormente el material biológico es separado del etanol por centrifugación y se adicionaron 10µl de ácido fórmico. Después de una incubación a temperatura ambiente de 5-10min se agregaron 10µl acetonitrilo a cada muestra. Se sembró 1µl de la extracción en un pozo dentro de una placa metalica de 96 pozos para MALDI-TOF y después de secar se adiciono 1µl matrix HCCA (Bruker). Se utilizó la biblioteca in House para la identificación de los patrones moleculares creada por el grupo de Micosis humanas del Pontificia Universidad Javeriana, para el análisis mediante el software Microflex, Flex Análisis y Biotyper 3.0. Los análisis generados incluyeron comparaciones representadas en Gel spectra (78)(27).

### *Características de los aislamientos clínicos.*

Los aislamientos clínicos se obtuvieron de la vigilancia pasiva para el estudio de la criptococosis en Colombia por parte del Instituto Nacional de Salud donde son consignados datos demográficos, factores de riesgos y datos clínicos. Se obtuvo la información de la encuesta de 23/29 de los aislamientos, estos provenían de seis departamentos (Atlántico, Antioquia, Cauca, Meta, Norte de Santander y Valle), el 73,9% correspondían al sexo masculino, el promedio de la edad fue 41 años con valores mínimos de 21 años y máximos de 72 años de edad, el síntoma más común fue dolor de cabeza en un 87%, seguido de náuseas y vomito en un 65,2% y fiebre en un 60,9%, en menor proporción confusión, alteración visual, tos y pérdida de peso, el 86,9% de los casos presentaban algún factor de riesgo, siendo el más común VIH/SIDA+ con un 82,6%, de los cuales el 21,7% definió SIDA al momento de diagnosticarles la criptococosis, el 21,7% de los casos fallecieron (Tabla 7).

**Tabla 7.** Manifestaciones clínicas, factores de riesgo y condición de egreso de casos de Criptococosis.

<i>C. neoformans</i>		
Características	n=23	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	17	73,9
Femenino	6	26,1
<b>Signos clínicos</b>		
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
<b>Factores de Riesgo</b>		
VIH/SIDA+	19	82,6
Síndrome de Evans	1	4,3
Sin dato	3	13,0
<b>Condición</b>		
Vivo	3	13,0
Muerto	5	21,7
Sin dato	15	65,2

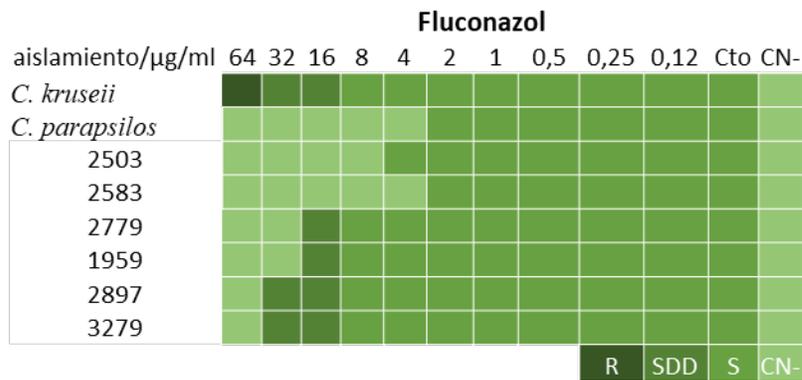
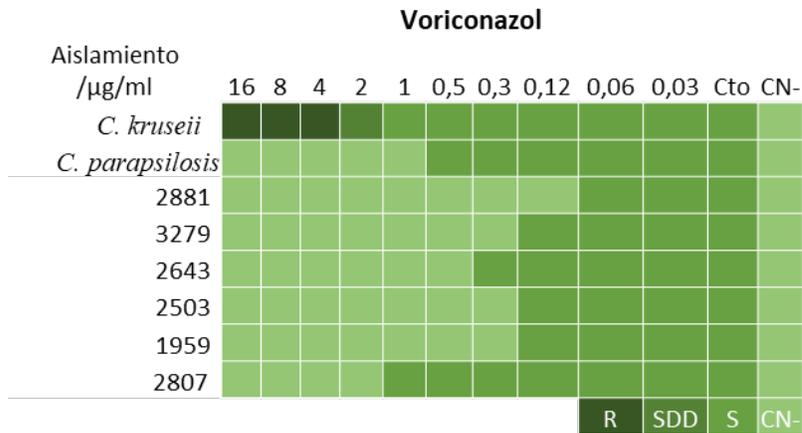
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Objetivo 1:** Determinar la actividad *in-vitro* de Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B en aislamientos clínicos de *C. neoformans*.

Las pruebas de susceptibilidad a Anfotericina B y voriconazol de los 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans* mostraron que el 100% fueron sensibles. Sin embargo, en Anfotericina B se presentaron dos aislamientos con  $MIC \leq 1 \mu\text{g/ml}$  siendo este un resultado indeterminado, y el restante de los aislamientos se comportaron entre el rango de sensibilidad  $MIC \leq 0,03-1 \mu\text{g/ml}$  establecido por CLSI (73). En fluconazol el 75,8% de los aislamientos fueron sensibles  $MIC \leq 1-8 \mu\text{g/ml}$ , el 24,2% restantes fueron SDD ( $MIC, \geq 16-32 \mu\text{g/ml}$ ) (3279,2926,1959,3104,2881,2807,2779); estos aislamientos no se relacionaron con el sexo, ni la ubicación geográfica o factor de riesgo, dos de los casos eran pacientes fallecidos, el esquema del tratamiento en la mayoría de los casos no presentaban dato, sin embargo, es importante destacar que dos aislamientos presentaron una SDD alta ( $32 \mu\text{g/ml}$ ), lo cual los separa a una resistencia, en una dilución (2807 y 3279), en estos aislamientos fueron sensibles para Anfotericina B con una  $MIC$  de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  y para voriconazol de  $0,12-1 \mu\text{g/ml}$  ( Figura 7) (Anexo 1).

**Anfotericina B**

aislamiento/ $\mu\text{g/ml}$	16	8	4	2	1	0,5	0	0,12	0,06	0,03	Cto	CN-
<i>C. kruseii</i>												
<i>C. parapsilosis</i>												
2950												
2257												
3097												
2643												
2677												
2881												
									R	1	S	CN-



**Figura 7.** Lectura de la MIC en micro-placa según lineamientos de CLSI para Anfotericina B, Fluconazol y Voriconazol. Bajo la observación del crecimiento en micro placas.

En la criptococosis, hay pocos estudios relacionados con la susceptibilidad de los aislamientos clínicos. El fracaso terapéutico se asocia con la resistencia de la levadura, las condiciones clínicas del paciente y la farmacocinética del antifúngico. La terapia con fluconazol oral es ampliamente utilizada para tratar la meningitis criptocócica a pesar de que los resultados del tratamiento son mucho mejores cuando se combina con Anfotericina B y Flucitosina (79). Pero la toxicidad severa restringe su uso, los azoles, por el contrario, brindan una opción más segura y eficaz, sin embargo, una preocupación importante es la resistencia, por lo que ha conllevado a un fracaso en el tratamiento, asociado con una alta mortalidad (85). Las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos pueden utilizarse para predecir el resultado de tratamiento en pacientes con criptococosis meníngea, MIC altas de fluconazol se han asociado con fracaso terapéutico y recaída (86).

La mayoría de los estudios en diferentes países reportan susceptibilidad a Anfotericina B y Voriconazol. En África en el 2004 (Ruanda, Congo, Gabon, Costa de Marfil) y Camboya,

realizaron un estudio retrospectivo con 162 cepas de *C. neoformans* entre 1998-2001 de pacientes VIH positivos con el objetivo de evaluar la susceptibilidad de Anfotericina B (AMB), voriconazol y fluconazol. Las cepas fueron altamente sensibles a AMB (0.094µg/ml), excepto en una cepa de Camboya (MIC 0.125µg/ml). El 50% de las cepas africanas, demostró una MIC <8 µg/ml para fluconazol y el 22% en las cepas camboyanas, voriconazol fue sensible en todas las cepas. Los resultados de este estudio parecen confirmar que la resistencia de *C. neoformans* a varios azoles no es un fenómeno constante y que el voriconazol podría representar una alternativa de tratamiento útil para la criptococosis (87).

En varios estudios reportan resistencia a Fluconazol para *C. neoformans* entre los países que presentan porcentajes altos y en más de 80 aislamientos clínicos evaluados esta Camboya en 24,2% de 402 aislamientos, seguido de Colombia con el 21% (n=250) y Kenia en 11,2% (n=80) (88)(89), en la presente investigación no se encontró resistencia a Fluconazol, sin embargo, se encontró SDD y en dos aislamientos con una MIC elevada, la cual difiere de resistencia en una dilución, en los últimos años en el país se ha reportado resistencia a este antifúngico. En el estudio de Agudelo y *et al* en el 2015 evaluaron aislamientos clínicos donde reportaron SDD en un 28% y resistencia en un 21%, los autores concluyen que *C. neoformans* no pareció aumentar el riesgo de falla durante el tratamiento (88). En el estudio de De Bedout y *et al*, en 1999 en cepas colombianas no reportaron resistencia ni dosis dependencia a fluconazol (90). Esto demuestra que es importante el seguimiento en cepas clínicas debido a que el estudio de Agudelo y la presente investigación reportan un incremento en las MIC para este antifúngico.

Casos particulares donde existe una alta resistencia a fluconazol en pocos aislamientos se han reportado en Serbia donde realizaron susceptibilidad a 31 aislamientos clínicos de *C. neoformans* encontrando un 29% de resistencia (91) y países como Uganda, India y Malasia presentaron baja resistencia a fluconazol en aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* entre 3 y 7.3%, además en India y Malasia reportaron resistencia a Anfotericina B (1%) y a 5-Fluocitocina (10%) respectivamente (92)(93).

Hay que tener en cuenta que las interpretaciones realizadas son basadas en estudios epidemiológicos multicéntricos donde reúnen varios aislamientos provenientes de diferentes partes del mundo, estos son basados principalmente en el estudio de las distribuciones de las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) a los diferentes agentes antifúngicos, con el fin de identificar cepas de tipo silvestre (WT) y no silvestre (NWT). Este tipo de corte son también útiles para vigilar las tendencias y los cambios temporales de la susceptibilidad *in vitro*, especialmente cuando los puntos de corte no han sido establecidos (94).

Pfaller y colaboradores realizaron estudios que involucraron gran diversidad de zonas geográficas, evaluando la susceptibilidad a diferentes antifúngicos en cepas clínicas 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 voriconazol, posaconazol y fluconazol participaron 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. Fluconazol tenía MIC<8µg/ml para el 98% de los aislamientos (95).

En países como España y Argentina cuentan con cortes clínicos. En España 3/4 estudios han reportado resistencia a Fluconazol con una  $MIC \geq 16 \mu\text{g/ml}$  entre el 3.6 a 46.6% en aislamientos clínicos de *C. neoformans*, utilizando un punto de corte diferente a lo observado en los demás estudios donde el punto de corte para aislamientos resistentes a fluconazol es  $MIC \geq 64 \mu\text{g/ml}$ . Esto se debe a que este punto de corte es puntual para la población de España, adicional se explica por las variaciones en el procedimiento de prueba de susceptibilidad antifúngica (EUCAST vs. CLSI), modificaciones RPMI-2%, lo que indica que la técnica modificada utilizada podría generar MICs falsamente elevadas, sobreestimando las tasas de resistencia al fluconazol (96)(97). Así mismo existen puntos de corte clínicos para Argentina (98). Sin embargo, para nuestro estudio solamente se tuvo en cuenta los parámetros según CLSI.

Objetivo 2: Determinar la patogenicidad de aislamientos clínicos de *C. neoformans* en *G. mellonella*

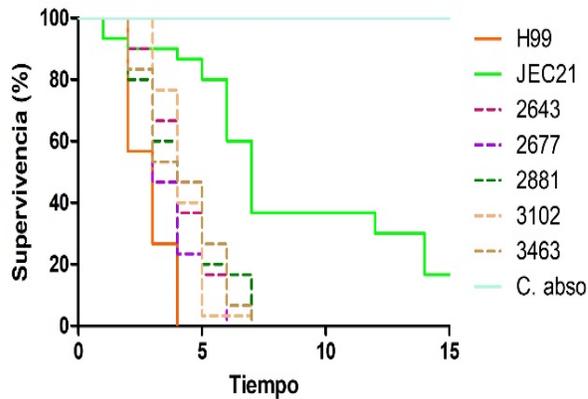
---

Los resultados que se muestran a continuación son basados en tres replicas biológicas. Las larvas infectadas se siguieron por 15 días, el promedio de muerte en general ocurrió a los ocho días post-infección para todos los aislamientos. Se emplearon controles de alta (H99) y baja (JEC21) patogenicidad, en la cepa H99 se observó que el promedio de muerte ocurrió a los dos días post-infección y en la cepa JEC21 a los siete días.

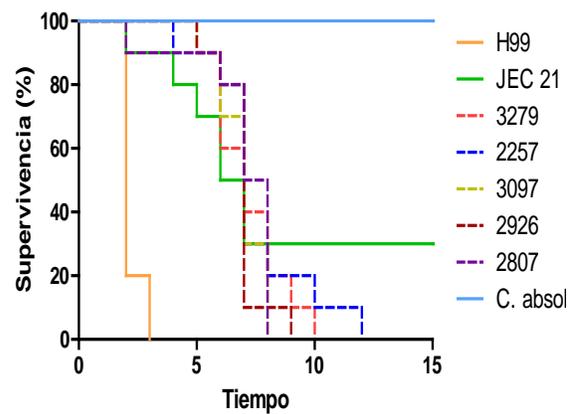
Mediante la comparación de las curvas de supervivencia y tiempos medios de supervivencia, se determinó que los aislamientos 2677, 2881, 2643, 3102, 3463 son los más virulentos, con media de supervivencia de 2 y 3 días respectivamente después de la infección comparables con el control de alta patogenicidad H99 ( $p < 0,01$ ), en contraste con los aislamientos 2257, 3279, 3097, 2807 y 2926, que fueron comparables con la cepa de baja patogenicidad JEC21 ( $p < 0,01$ ). Se observó una supervivencia del 100% para el control absoluto, de inoculación y desinfección, lo que permitió validar los ensayos realizados (figura 8). El comportamiento en general fue del 42% para alta patogenicidad, 26% de baja patogenicidad y el 32% con comportamiento intermedio.

De los aislamientos que se comportaron con baja patogenicidad, solo se tenían dato de tres encuestas, están provenientes del departamento de Antioquia, todos los casos eran VIH/SIDA positivo, en promedio la edad fue de 26 años, dos de los casos eran hombres, los aislamientos 2807, 2926 y 3272 eran SDD a fluconazol. En los aislamientos determinados como alta patogenicidad provenían de tres departamentos (Antioquia, Atlántico y Valle), cuatro de los cuales eran VIH/SIDA positivo y uno presentaba Síndrome de Evans, promedio la edad fue de 31 años, cuatro de los casos eran hombres, el aislamiento 2881 era SDD a fluconazol.

Supervivencia aislamientos clínicos de *C. neoformans* de alta patogenicidad

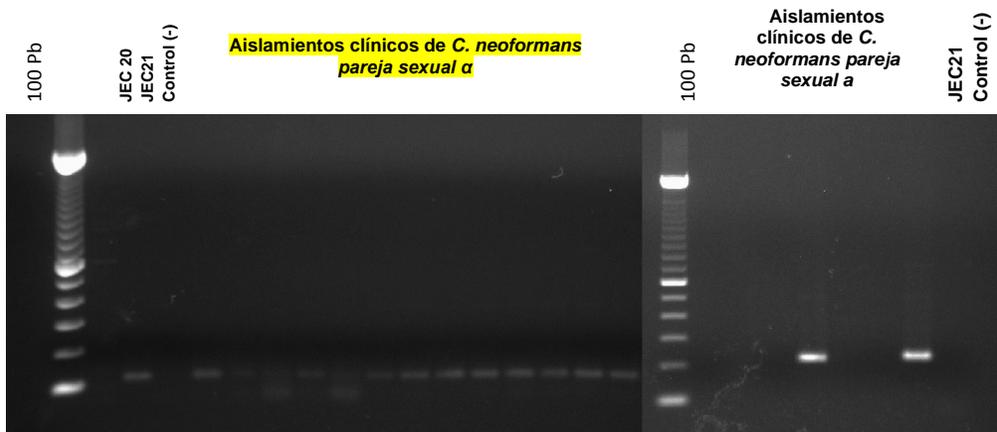


Supervivencia aislamientos clínicos de *C. neoformans* de baja patogenicidad



**Figura 8.** Análisis de supervivencia de 10 aislamientos clínicos comparables con cepas de alta y baja patogenicidad H99 y JEC21 respectivamente en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier) realizadas en Prims-Demo

Determinación de la pareja sexual  $\alpha$  ó  $\underline{\alpha}$ : El 89,6% (n=26) de los aislamientos de *C. neoformans*, fueron pareja sexual *alfa*, el 10,3% (n=3) restante fueron tipo de pareja sexual “*a*” (Figura 9). El aislamiento 2677 que se comportó como alta patogenicidad en el modelo invertebrado fue tipo de pareja sexual “*a*”, en los aislamientos que se comportaron como baja patogenicidad 2/5 eran este tipo de pareja sexual y el restante de alta patogenicidad con tipo de pareja sexual  $\underline{\alpha}$  (Anexo 1).



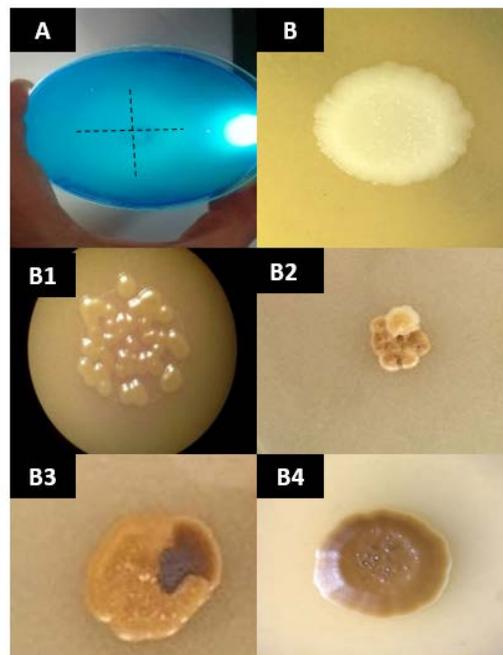
A

B

**Figura 9.** Pareja sexual  $\alpha$  ó  $a$  en aislamientos clínicos de *C. neoformans* (109 pb (pareja sexual  $\alpha$ ) y una banda de 140pb (pareja sexual  $a$ ))

**Objetivo 3:** Determinar la expresión de factores de virulencia asociado a la criptococosis de aislamientos clínicos

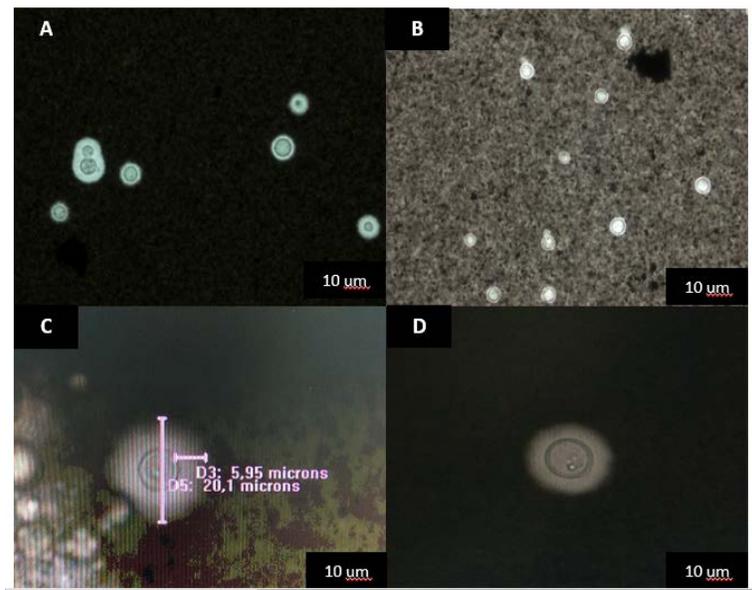
**Determinación de actividad enzimática:** En los 29 aislamientos clínicos se evaluaron las actividades enzimáticas de proteasa y fenoloxidasa, se observaron diferencias en cuanto a la actividad. El 41,3% de los aislamientos presentaron actividad proteolítica alta y el 10,3% baja. El 37,9% presentó actividad alta de fenoloxidasa; sin embargo, el 20,6% no la presentó. El aislamiento 2725 presentó una correlación en las dos enzimas evaluadas con una actividad baja. Los aislamientos 2503, 2642, 2807, 2881 y 2926 presentaron una actividad alta en las enzimas evaluadas. (Figura 10, Anexo 1). De los siete aislamientos que fueron SDD para fluconazol, no presentaron una relación con las enzimas evaluadas; es decir que la susceptibilidad no depende de la producción de enzimas, 2/3 aislamientos que fueron tipo de pareja sexual “ $a$ ” presentaron una actividad fenoloxidasa baja y un aislamiento presentó actividad proteolítica alta, este fue el aislamiento 2257 catalogado como de baja patogenicidad.



**Figura 10.** Actividad enzimática de aislamientos clínicos de *C. neoformans*: A: Proteasa y B: Fenoloxidasa (0.5), B1: Fenoloxidasa con actividad 1 de melanina), B2: Fenoloxidasa con actividad 2 de melanina, B3: Fenoloxidasa con actividad 3 de melanina, B4: Fenoloxidasa con actividad 4 de melanina..

**Tamaño capsular y celular:** El promedio del tamaño total de la célula pre-inoculación para los 29 aislamientos evaluados fue de 3.9 $\mu$ m (Vmax 5,2 y Vmin 2,8), el tamaño capsular de fue 0.7 $\mu$ m (Vmax 1,6 y Vmin 0,2). El 50% de los aislamientos evaluados presentaron cápsulas pequeñas. Se

evaluó el tamaño celular y capsular post-inoculación, para esto se recuperó la levadura tras macerar la larva en el día donde el 50% de la población estaba viva, se observó un efecto del cambio en un  $2,4\mu\text{m}$  ( $p<0,01$ ). En general se observaron capsulas más grandes después de pasar por el modelo en un 72.4% solo dos aislamientos presentaron capsulas de tamaño medio, la capsula más grande se observó en el aislamiento 3463 en promedio su capsula fue de  $8,5\mu\text{m}$ , el aislamiento 2503 fue el aislamiento que presento la menor capsula en  $0,5\mu\text{m}$  (Figura 11, Anexo 1). **Todas las mediciones se compararon con los respectivos controles de tamaño medio H0058-I- 548, 737I y tamaño grande H0058-I- 580.**



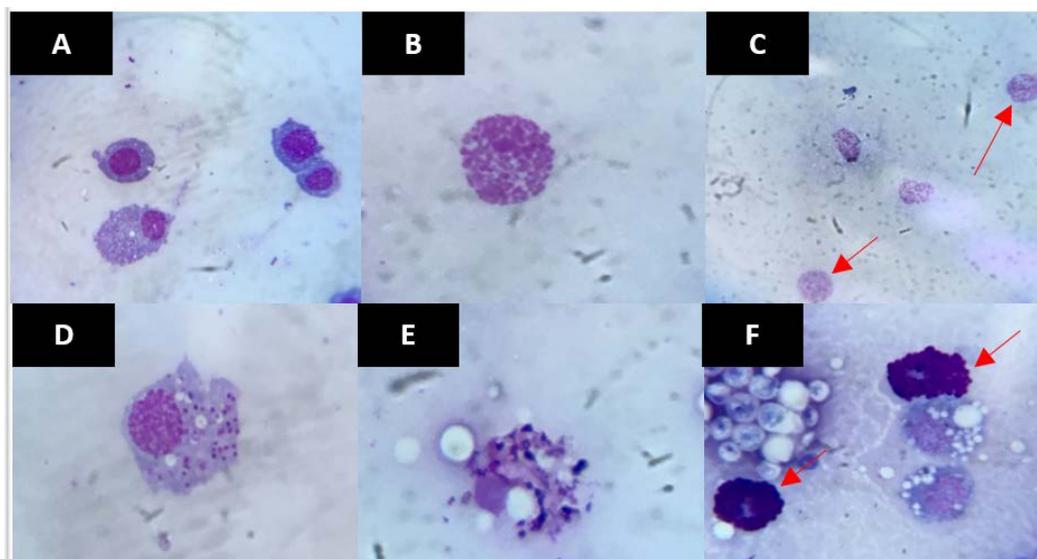
**Figura 11.** Coloración de contraste con tinta china de tamaño capsular y celular pre y pos-inoculación en el modelo *G. mellonella* de aislamientos clínicos de *C. neoformans* (80X). **A: Gemación celular, B: tamaño celular pre-inoculación, C: Medidas de tamaño celular y capsular pre- inoculación, D: Morfología celular.**

El tamaño de las células **varió  $2,4\mu\text{m}$**  pre-inoculación y post-inoculación observándose células más grandes al pasar por el modelo. Este efecto del cambio del tamaño celular y capsular se comprobó utilizando la prueba McNema, generado con un 95% de confianza para cada medición, donde se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas en el aumento del tamaño capsular y celular ( $p<0.005$ ), aunque hay que resaltar que el aislamiento 3589 presento una disminución de la capsula después que este paso por el invertebrado (Tabla 8). Todos los aislamientos SDD a fluconazol presentaron capsulas aumentadas, al igual que los aislamientos que se comportaban con alta y baja mortalidad en la larva.

**Tabla 8.** Tamaño capsular y celular en aislamientos clínicos de *C. neoformans*, datos de promedio pre-inoculación y pos-inoculación.

	Pre-inoculación			Post-inoculación		
	T-Total (μm)	T. Capsula(μm)	T. Celular(μm)	T-Total(μm)	T. Capsula(μm)	T. Celular(μm)
Promedio	3,9	0,7	3,2	11,5	3,1	8,4
Valor Máximo	5,2	1,6	3,6	24,5	8,5	16,0
Valor Mínimo	2,8	0,2	2,5	6	0,5	5,5
Desviación estándar	0,5	0,3	0,2	4,7	1,8	3,0

**Fagocitosis:** se observaron levaduras fagocitadas por los hemocitos, formación de granulomas a partir de la unión de hemocitos y células del sistema inmune lisadas (Figura12). El promedio de fagocitosis general fue de 22%, la cepa que más presentó fagocitosis fue la 2642 con 76% seguido de 3746 (64%), 3104 (27%) y los aislamientos que presentaron menor fagocitosis fue el 2720 y 2583 en un 8% respectivamente seguido del 10% para los aislamientos 3102 y 2643 y el 3% para el aislamiento 2926. Los aislamientos que se comportaron con alta patogenicidad presentaron valores intermedios en la capacidad fagocítica entre el 10 y 23%, en aislamientos que se comportaron con baja patogenicidad este comportamiento fue similar, sin embargo, en el aislamiento 2926 presentó un 3% de fagocitosis, este tenía una actividad alta para fenoloxidasa y proteasa, es pareja sexual *alfa* y es SDD para fluconazol. Los tres aislamientos pareja sexual “*a*” presentaron entre 11 y 23% de esta capacidad fagocítica (Anexo 1).



**Figura 12.** Hemocitos de *Galleria mellonella* se caracterizaron según literatura, laminas con coloración de Wright en objetivo de 100X por microscopia de luz. A. Plasmocitos. B. Enterocitoides. C. Células granulares. D. Levadura fagocitada por hemocito. E. Lisis celular. F. Formación de granuloma. La

La mayoría de los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo típicamente reportado a nivel mundial en cuanto a tipo de pareja sexual, aumento del tamaño capsular después que la levadura pasa por un modelo *in-vivo*, actividad proteolítica y fenoloxidasa.

Diversos estudios coinciden que el tipo de pareja sexual  $\alpha$  es considerado como un factor asociado a una alta virulencia (99)(100) y a su vez predomina en la especie de *C. neoformans*, tanto entre aislamientos clínicos y ambientales, a nivel mundial (101). Sin embargo, en la presente investigación observamos tres aislamientos tipo de pareja sexual “ $\alpha$ ”, que se relacionaban con perfiles de factores de virulencia asociados a una alta patogenicidad, se observó que uno era SDD a fluconazol con una MIC de 32 $\mu$ g/ml, estos aislamientos se catalogaron como baja patogenicidad (n=2) y alta (n=1), además se relacionaron a casos VIH/SIDA positivos.

Se observó que la actividad enzimática varió según aislamiento clínico, los resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas se relacionan con estudios previos realizados en Colombia, donde se ha observado actividad proteolítica y fenoloxidasa en aislamientos clínicos y ambientales. El trabajo de Sanchez *et al.* describe un 27% y 32% correspondiente a una actividad media en las enzimas proteolítica y fenoloxidasa respectivamente en aislamientos de *C. neoformans* (102), es decir que la actividad no siempre se comporta de la misma manera ya que cada cepa se comportó de manera diferente dependiendo la respuesta inmune del hospedero y la capacidad patogénica de la levadura según el requerimiento de energía para metabolizar dichas enzimas. Por otro lado, no observamos una correlación entre la actividad enzimática con la susceptibilidad antifúngica ya que los aislamientos que tenían alta producción de melanina y alta actividad proteolítica eran sensibles y algunas con baja actividad fueron SDD; sin embargo, varios estudios *in vitro* han establecido de manera concluyente que las células melanizadas de *C. neoformans* son menos susceptibles a los oxidantes que las células no melanizadas y también son menos susceptibles a la muerte por péptidos microbicidas, ingestión y muerte por macrófagos(40)(80)(81).

Los estudios de patogénesis de microorganismos en huéspedes invertebrados durante la última década han contribuido al conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la patogénesis y la defensa del huésped. Las larvas de *G. mellonella*, se han utilizado para estudiar la infección por diversos patógenos, incluyendo *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Candida spp.*, entre otros (103)(104). En el presente trabajo se evaluó el tamaño capsular y celular, se determinó pre-inoculación y pos-inoculación en el modelo invertebrado, se observaron cápsulas significativamente mayores después de que el hongo paso por la larva para todos los aislamientos, lo cual se relaciona con varios estudios de patogenicidad como el realizado por Firacative *et al.*, en el 2014, al encontrar tamaño celular y capsular incrementados después de la inoculación donde el tamaño total de células de *C. gattii* antes de la infección varió entre 5 a 12 micras, el tamaño total de las células después de la infección varió de 15 a 75 micras (105).

Se observó en un aislamiento la disminución de la capsula después de que paso por el modelo invertebrado, esto coincide con varias investigaciones al encontrar cápsulas pequeñas recuperadas de casos clínicos. Kimura *et al.*, reportó un caso de criptococosis pulmonar debido a una cepa sin cápsula en un paciente con hepatocarcinoma (106). Laurenson *et al.*, informó de un caso de meningitis sin cápsula en un paciente infectado por el VIH (107). Moser *et al.*, reportó este mismo fenómeno en un paciente con blastomicosis pulmonar (107), entre otros (108)(109). Estudios

realizados por Salkowski y Balish de modelos en animales, mostraron que una cápsula no siempre es necesaria para que *C. neoformans* y *C. gattii* pueda causar enfermedad en ratones (110).

Se determinó que el porcentaje de fagocitosis vario entre los aislamientos evaluados donde no hubo una relación entre la capacidad fagocítica y la patogenicidad en el modelo invertebrado, así como los demás factores de virulencia evaluados. Se han descrito 4 tipos morfológicos de estas células inmunes en la larva de *G. mellonella*, donde solo tres de estas tienen capacidad fagocítica frente a la levadura (células plasmocitoides, células granulares y enterocitoides) (82). Desde el punto de vista la producción del estallido oxidativo, fagocitosis y liberación de péptidos antimicrobianos son mecanismos importantes por los cuales las células efectoras inmunes median en la acción antimicrobiana, donde varios resultados sugieren que la melanina puede aumentar la virulencia al proteger las células fúngicas contra el ataque del sistema inmune. La habilidad de la melanina para proteger contra la lesión oxidativa también ha sido demostrada en otros microorganismos(80). En la presente investigación no se pudo caracterizar el tipo de células que están más implicadas en el porcentaje de fagocitosis ya que se requería más tiempo para ello, costos y demás, por lo tanto, se recomienda en próximas investigaciones establecer qué tipo de célula del invertebrado está más asociada con la actividad fagocítica.

Solo un aislamiento (2881) se relacionó con los factores de virulencia evaluados, presento una patogenicidad alta en *G. mellonella*, capsula aumentada después que paso por el modelo, porcentaje de fagocitosis medio, actividad enzimática alta, SDD a fluconazol y tipo de pareja sexual *alfa*. En conclusión, el presente estudio demostró que la virulencia no está asociada específicamente a un determinado factor de virulencia. Diversos estudios han determinado que la virulencia de una cepa es muy variable no sólo entre diferentes aislamientos sino entre células de una misma cepa, demostrando que diferentes factores pueden intervenir en la virulencia.

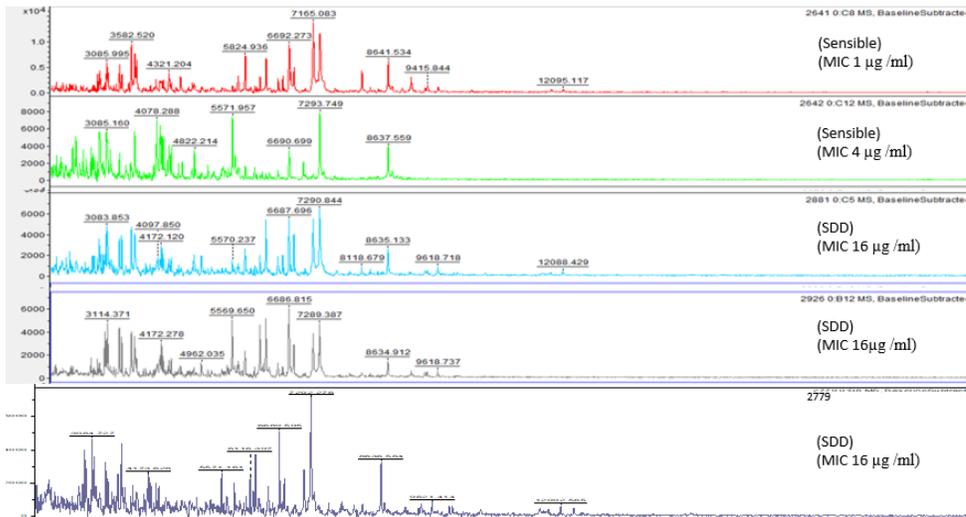
Los estudios in vitro han demostrado que la lacasa puede contribuir a la virulencia independientemente de su papel en la catalización de la polimerización de la melanina. Las catecolaminas en el cerebro pueden promover el daño oxidativo y se ha sugerido que su conversión a la melanina por la lacasa de hongos podría eliminar una potencial fuente de toxicidad para la célula fúngica(40). Los productos de oxidación del sustrato por lacasa incluyen varios reactivos productos intermedios que pueden ser tóxicos para las células efectoras del huésped. Además, los estudios in vitro han demostrado que la lacasa puede proteger *C. neoformans* contra macrófagos alveolares(83). Los estudios in vitro tienen muestra que las células melanizado de *C. neoformans* son menos susceptibles a los efectos fungicidas, lo que indica un papel potencial de la melanina en la protección contra la terapia(84).

Nuestros resultados sugieren que lacasa también puede proteger *C. neoformans* contra la muerte mediada por los hemocitos de *G. mellonella* ya que algunos aislamientos con alta actividad de esta enzima tenían menos porcentajes de fagocitosis, aunque no se correlaciono con todas de la misma manera, es decir que había aislamientos con alta actividad enzimática pero la capacidad fagocitica de los hemocitos era alta; sin embargo, no hubo una correlación con el efecto antifúngico de los antifúngicos evaluados.

**Objetivo 4:** Comparar perfiles proteómicos citoplasmáticos globales de aislamientos susceptibles y resistentes a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B.

---

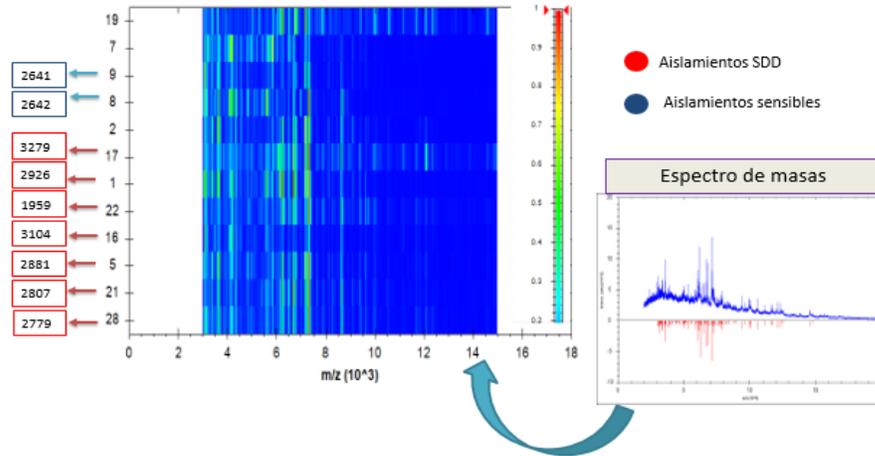
Se pretendía comparar aislamientos resistentes vs sensibles, sin embargo, los resultados no mostraron resistencia en ningún aislamiento clínico por lo que se optó evaluar el perfil proteómico en fluconazol en los aislamientos que fueron SDD (MIC  $\geq 16$ -32 $\mu\text{g/ml}$ ) con los aislamientos que fueron sensibles. Se observó una diferencia entre los aislamientos SDD y los aislamientos sensibles (figura 13). En la representación por Heatmap se buscaron patrones entre los aislamientos sensibles y SDD se observó que no hay patrones que se repitan entre ellos, sin embargo, los picos de los aislamientos SDD tienden a tener una secuencia parecida en su número de patrón molecular (figuras 13-14).



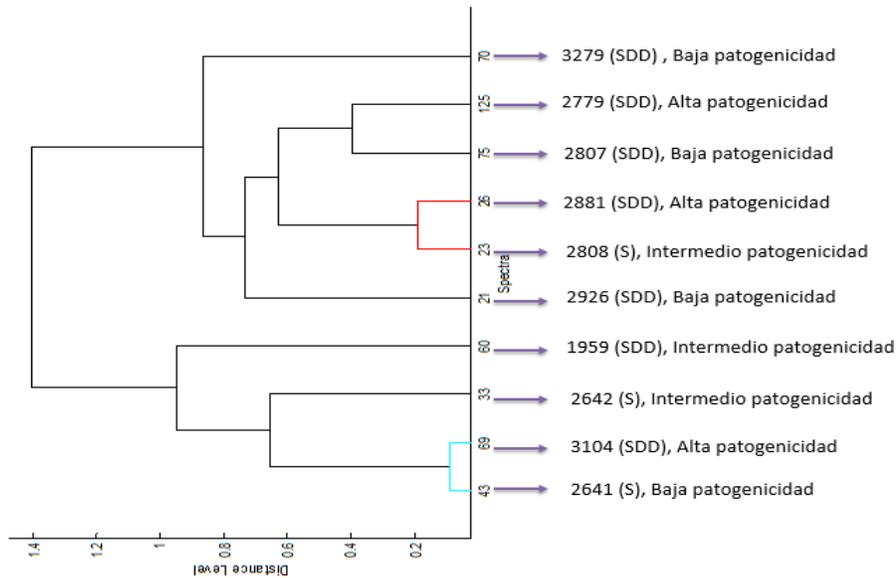
**Figura 13.** Visualización del espectro de masas de aislamientos sensibles y SDD a Fluconazol graficas mostradas por la técnica MALDI-TOF.

En el análisis del dendrograma se observó dos clados diferentes, de ellos se derivan subclados donde se muestran los proteomas de los aislamientos clínicos SDD, sensibles y sus rango de patogenicidad distribuidos de manera distinta indicando la relación carga/masa y la diversidad de proteínas en los perfiles, no relacionó las proteínas citoplasmáticas totales según su susceptibilidad y patogenicidad, estos resultados no se relacionaron con el factor de riesgo, con el tipo de sexo, todos estos aislamientos fueron LCR, sin embargo los aislamientos 2779 y 2807 se relacionaron según zona geográfica al provenir los dos de Antioquia, el aislamiento 3279 presento un perfil diferencial esto lo asociamos a qué tipo de pareja sexual “a” (figura 15).

## HEATMAP de aislamientos SDD VS Sensibles a Fluconazol



**Figura 14.** Gel de heatmap de aislamientos sensibles y SDD a fluconazol mostradas por el sistema MALDI-TOF como mapa de calor según actividad.



**Figura 15.** Dendrograma de aislamientos sensibles y SDD a fluconazol mostrados por la técnica MALDI-TOF.

Según estudio en el 2012 por Firacative, los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF identificaron correctamente el 100% de todos los aislamientos estudiados, agruparon cada aislado de acuerdo con las especies actualmente reconocidas, *C. neoformans* y *C. gattii*. Además, todos los aislamientos se separaron claramente de acuerdo con su tipo molecular principal, generando

mayores diferencias espectrales entre los tipos moleculares de *C. neoformans* que los tipos moleculares de *C. gattii* reflejando relaciones filogenéticas entre ellos (27). Este estudio indica que la identificación de aislamientos clínicos con la técnica de MALDI-TOF es confiable y según los espectros de masa podemos hacer una comparación entre especies para ver la relación o no según filogenia, sin embargo, solo trabajamos con la especie *C. neoformans* con cepas basales sin ningún contacto con antifúngicos, como consecuencia a esto los resultados entre si hay o no relación entre la susceptibilidad no es de total ayuda, sin embargo para futuras investigaciones se sugiere realizar estudio con aislamientos bajo la actividad de los antifúngicos evaluados en el primer objetivo. Lo que respecta a nuestro estudio la identificación de la especie *C. neoformans* fue confirmada para el 100% de los aislamientos clínicos evaluados siendo estos de tipo molecular VNI se logró evidenciar una gran diferencia entre sus espectros de masas reflejando una diversidad filogenética entre los aislamientos SDD y los sensibles a Fluconazol. Por otro lado, Ferry Hagen en el 2015 dice que la evaluación de las especies de *C. neoformans* se caracteriza por datos multigeno estables y otros métodos genotípicos como PCR-fingerprinting y AFLP, pero estas técnicas pueden identificarse fenotípicamente por diferencias en el proteoma (MALDI-TOF MS), y muestran diferencias en los síntomas de la enfermedad y la susceptibilidad a antifúngicos por dicha técnica (85), lo que es coherente con nuestros resultados donde los aislamientos clínicos SDD si tuvieron diferencias en el proteoma global con los aislamientos sensibles evaluados para fluconazol, voriconazol y Anfotericina B. Sin embargo, en la actualidad el método de elección para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica es microdilución según parámetros estandarizados por CLSI o EUCAST.

## 8. CONCLUSIONES

9.1 Determinar la actividad *in-vitro* de Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B en aislamientos clínicos de *C. neoformans*

En la presente investigación no se observó resistencia a los antifúngicos evaluados, lo que confirma que las terapias combinadas que se emplean en Colombia son adecuadas; aunque hay que mencionar que se ha descrito en la literatura hetero resistencia en *Cryptococcus sp* como un fenómeno donde hay subpoblaciones celulares resistentes dentro de una sola colonia en cepas susceptibles las cuales logran tolerar concentraciones de un antifúngico más altas que las MICs, es importante mencionar que aunque la vigilancia de la criptococosis sea pasiva, se necesita más compromiso por partes de las instituciones para realizar un buen diligenciamiento de las encuesta, debido a que en muchos de los casos no presentaban el tipo de tratamiento y/o dosis.

9.2 Determinar la patogenicidad de aislamientos clínicos de *C. neoformans* en *G. mellonella*

Se identificaron 5 aislamientos de alta patogenicidad determinadas por su comportamiento en el modelo de *G. mellonella* post- infección de la levadura, donde se evidencio que al día 2 y 3 el 100% de las larvas estaban muertas, mostrando así un comportamiento paralelo con el control de alta patogenicidad (H99) a su vez se identificaron 5 aislamientos de baja patogenicidad donde al día 10 y 12 el 100% de las larvas estaban muertas mostrando un comportamiento similar al control de baja patogenicidad (JEC 21) y los aislamientos restantes tuvieron un comportamiento de patogenicidad intermedia es decir que no fueron ni de alta ni de baja patogenicidad, con esto podemos determinar

que los aislamientos clínicos evaluados tienen diversos comportamientos de patogenicidad en el modelo animal de *G. mellonella*.

#### 9.3 Determinar la expresión de factores de virulencia asociado a la criptococosis de aislamientos clínicos

Mediante la prueba de supervivencia en *G. mellonella*, se observaron cambios en el tamaño de la cápsula, lo que concuerda con los reportes durante la infección en mamíferos. se demostró que la patogenicidad no está asociada específicamente a un determinado factor de virulencia. Diversos estudios han determinado que la virulencia de una cepa es muy variable no sólo entre diferentes aislamientos sino entre células de una misma cepa, demostrando que diferentes factores pueden intervenir en la virulencia.

#### 9.4 Comparar perfiles proteómicos citoplasmáticos globales de aislamientos susceptibles y resistentes a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de *C. neoformans*

Al comparar los aislamientos SDD y los sensibles no se logró evidenciar una relación directa con su patogenicidad ya que mostraron distinta distribución en relación carga/ masa y una diversidad de proteínas en sus perfiles, lo que nos indica una gran diversidad a nivel del proteoma global; quizás esto se deba al origen de la muestra, lugar demográfico, tiempo de la enfermedad, entre otros factores.

Sin embargo, no se encontró una relación entre los perfiles fenotípicos, proteómicos con la susceptibilidad antifúngica de los aislamientos clínicos de *C. neoformans*, indicando un comportamiento diferencial entre los aislamientos ya que cada una de ellos pertenecía a un hospedero diferente, las condiciones donde se evaluaron fueron en un modelo animal invertebrado donde solo se pudo evidenciar la respuesta inmune celular y humoral, faltaría hacer un acercamiento en modelos murinos para hacer una evaluación más precisa. También la exposición de los aislamientos con diferentes concentraciones de antifúngicos para poder comparar los perfiles proteómicos citoplasmáticos de los aislamientos sensibles de las SDD por la técnica MALDI-TOF como es indicado en la literatura.

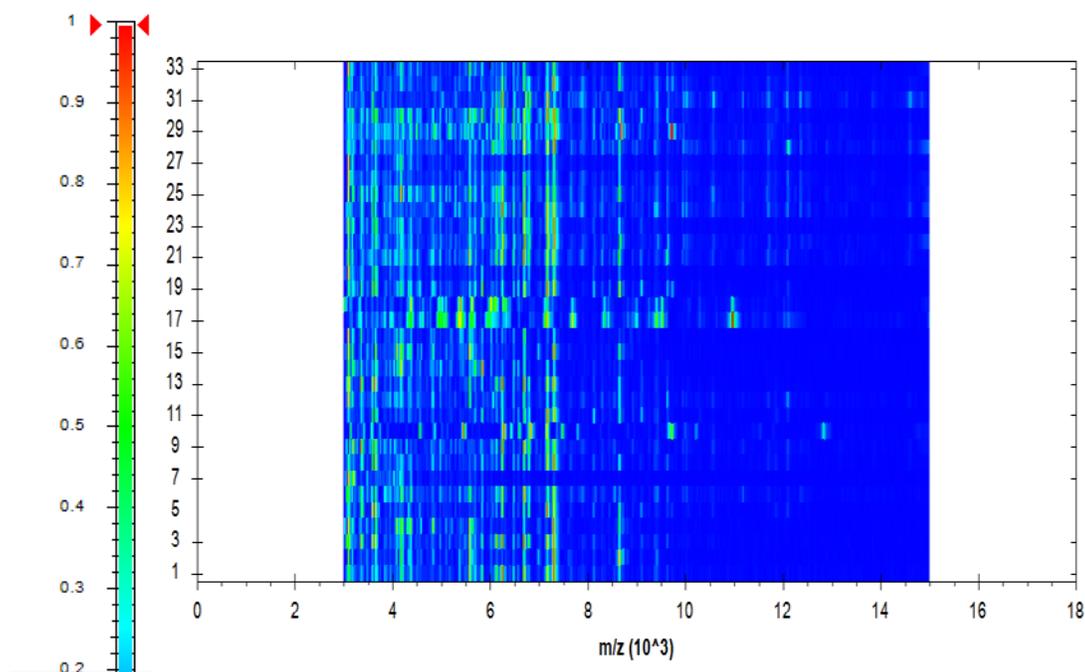
## 9. ANEXOS

**Tabla 9. Anexo 1.** Información general de los 29 aislamientos clínicos de *C. neoformans*, según los factores de patogenicidad evaluados

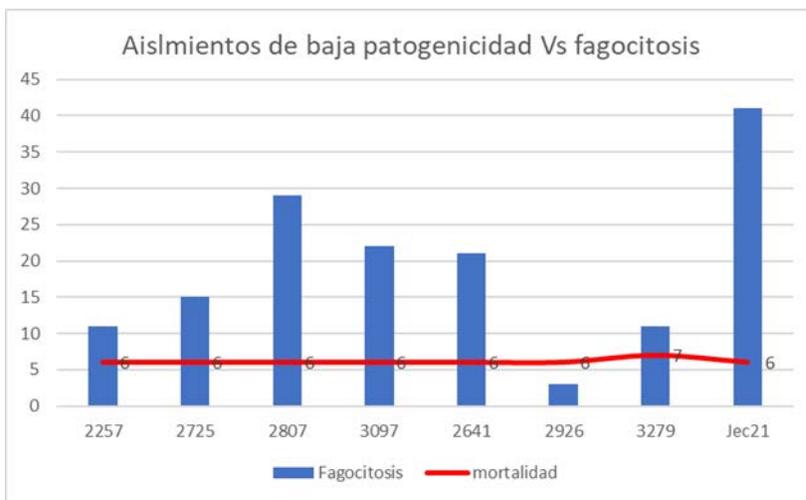
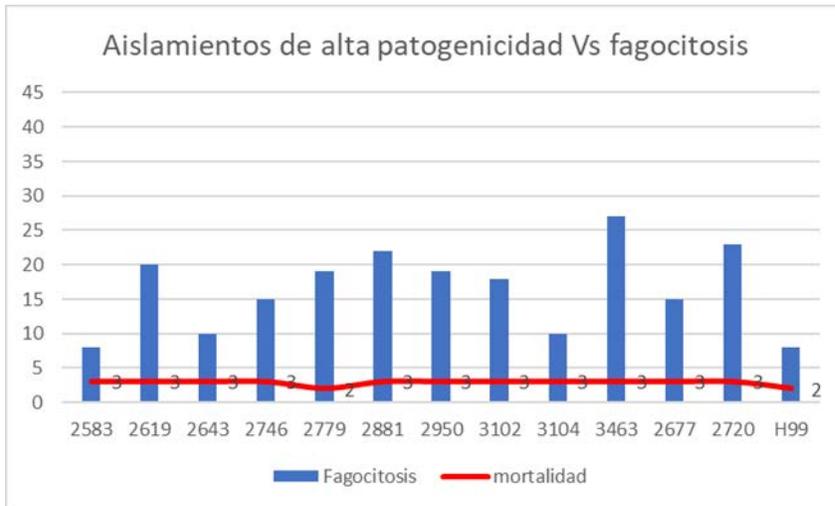
Aislamiento	Origen	Pareja sexual	Anfotericina B		Fluconazol		Voriconazol		Proteasa	Lacasa	Tamaño celular y capsular				Media de supervivencia	Fagocitosis		
			MIC50	Interpretación	MIC50	Interpretación	MIC50	Interpretación			Pre-inoculación		Pos-inoculación				G. mellonella	
											Diametro (um)	Interpretación	Diametro (um)	Interpretación			Media de supervivencia	Fagocitosis
2257	Antioquia	A	0,5	S	2	S	0,03	S	Alto	Bajo	0,6	Bajo	1,5	Alto	6	11%		
2503	N. Santander	Alfa	0,5	S	4	S	0,6	S	Alto	Alto	0,2	Bajo	0,5	Medio	4	5%		
2527	Sin dato	Alfa	0,5	S	8	S	0,06	S	Alto	Bajo	1,0	Alto	4,2	Alto	5	29%		
2583	Antioquia	Alfa	0,5	S	2	S	0,25	S	Medio	Alto	0,9	Bajo	4,1	Alto	3	8%		
2619	Antioquia	Alfa	0,5	S	8	S	0,6	S	Medio	Bajo	0,7	Bajo	1,6	Alto	3	20%		
2642	Antioquia	Alfa	0,5	S	4	S	0,6	S	Alto	Alto	0,3	Bajo	2,0	Alto	5	76%		
2643	Antioquia	Alfa	0,5	S	4	S	0,25	S	Medio	Bajo	0,5	Bajo	3,2	Alto	3	10%		
2725	Antioquia	Alfa	0,5	S	2	S	0,12	S	Bajo	Bajo	0,4	Bajo	1,0	Alto	6	15%		
2746	Valle	Alfa	0,5	S	4	S	0,6	S-	Bajo	Bajo	0,7	Bajo	1,6	Alto	2	19%		
2779	Antioquia	Alfa	1	S	16	SDD	0,12	S	Medio	Medio	1,0	Alto	1,0	Alto	3	22%		
2806	Antioquia	Alfa	0,5	S	8	S	0,06	S	Alto	Bajo	0,5	Bajo	1,7	Alto	5	20%		
2807	Antioquia	Alfa	0,5	S	32	SDD	1	S	Alto	Alto	0,4	Bajo	2,9	Alto	6	29%		
2808	Antioquia	Alfa	0,5	S	8	S	0,06	S	Medio	Bajo	0,5	Bajo	5,1	Alto	5	20%		
2881	Valle	Alfa	1	S	16	SDD	0,06	S	Alto	Alto	0,4	Bajo	2,9	Alto	3	19%		
2950	Valle	Alfa	0,3	S	8	S	0,06	S	Medio	Medio	0,7	Bajo	4,9	Alto	3	18%		
3097	Antioquia	Alfa	0,5	S	4	S	0,06	S	Alto	Medio	0,5	Bajo	2,0	Alto	6	22%		
3102	Antioquia	Alfa	0,5	S	2	S	0,03	S	Medio	Bajo	1,0	Alto	3,4	Alto	3	10%		
3104	Meta	Alfa	0,5	S	16	SDD	0,06	S	Medio	Alto	0,5	Bajo	1,0	Alto	3	27%		
3463	Atlantico	Alfa	0,5	S	4	S	0,06	S	Medio	Medio	0,6	Bajo	8,5	Alto	3	15%		
3589	Cundinamarca	Alfa	1	S	4	S	0,12	S	Medio		1,4	Alto	0,8	Bajo	5	13%		
3746	Cauca	Alfa	0,5	S	4	S	0,6	S	Alto	Medio	0,8	Bajo	1,6	Alto	5	64%		
1959	N. santander	Alfa	1	S	16	SDD	0,6	S	Bajo	Alto	0,8	Bajo	5,4	Alto	5	12%		
2641	Sin dato	Alfa	1	S	1	S	0,03	S	Alto	Medio	0,3	Bajo	4,9	Alto	6	21%		
2672		Alfa	1	S	2	S	0,06	S	Alto	Bajo	0,6	Bajo	2,9	Alto	5	18%		
2677	Antioquia	A	1	S	4	S	0,12	S-	Medio	Alto	0,7	Bajo	1,6	Alto	3	23%		
2713	Sin dato	Alfa	1	S	4	S	0,03	S	Medio	Alto	0,5	Bajo	3,4	Alto	4	27%		
2720		Alfa	0,5	S	4	S	0,06	S	Medio	Alto	0,9	Bajo	4,8	Alto	2	8%		
2926		Alfa	0,5	S	16	SDD	0,06	S	Alto	Alto	0,4	Bajo	2,0	Alto	6	3%		
3279		A	0,5	S	32	SDD	0,12	S	Medio	Bajo	0,2	Bajo	3,2	Alto	7	11%		

**Tabla 10.** Controles usados según metodología.

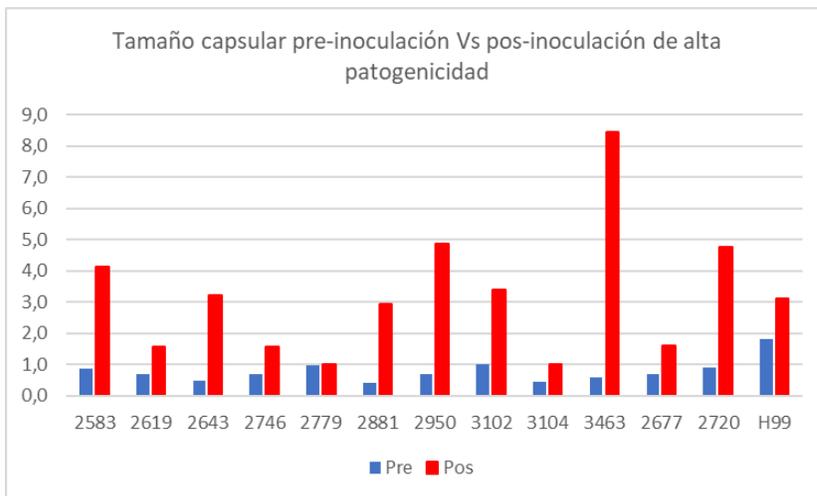
metodología	Controles
1. Determinar la actividad antifúngica in-vitro a Fluconazol, Voriconazol y Anfotericina B de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i>	<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258) <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)
2. Determinar la capacidad patogénica de aislamientos clínicos de <i>C. neoformans</i> en <i>Galleria mellonella</i> .	H0058-I-1129: H99 (alta patogenicidad) H0058-I-1128: JEC 21 (baja patogenicidad)
3. Determinación de pareja sexual	H0058-I-1128: JEC 21 (alfa) H0058-I-1127: JEC 20 (a)
4. Actividad enzima fenoloxidasa	H0058-I-1129: H99 H0058-I-1128: JEC 21 <i>Saccharomyces cereviceae</i> (sin actividad)
5. Actividad enzima proteasa	H0058-I- 743 H0058-I-860

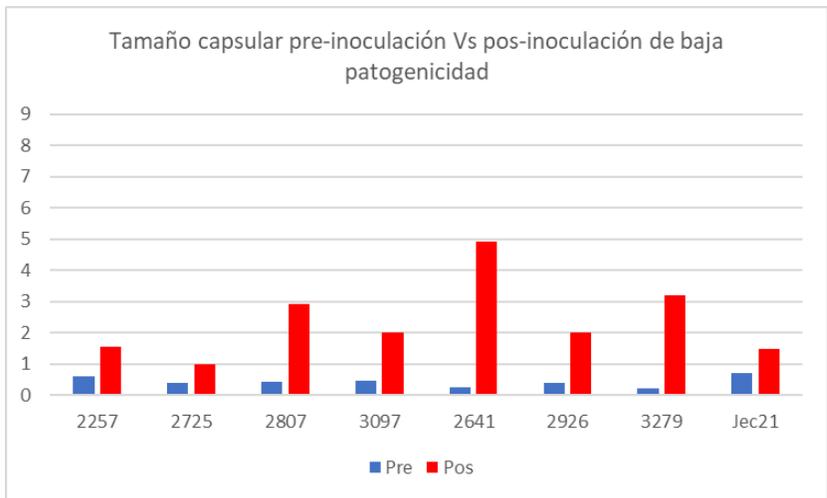


**Figura 16.** Heatmap de los 29 aislamientos clínicos.  
(2583,2619,2643,2746,2779,2881,2950,3102,3104,3463,2677,2720,  
2257,2725,2807,3097,2641,2926,3279)

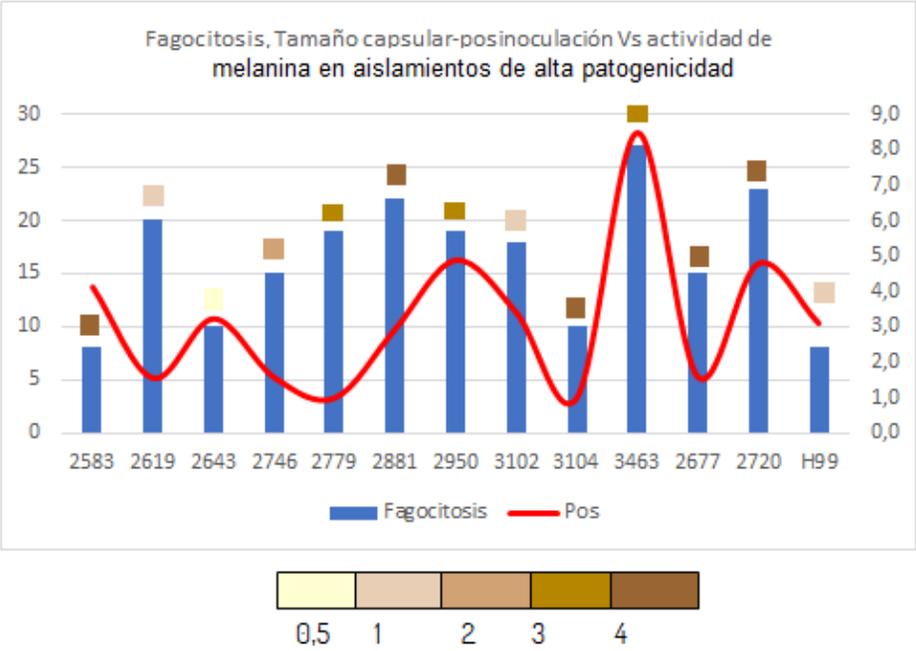


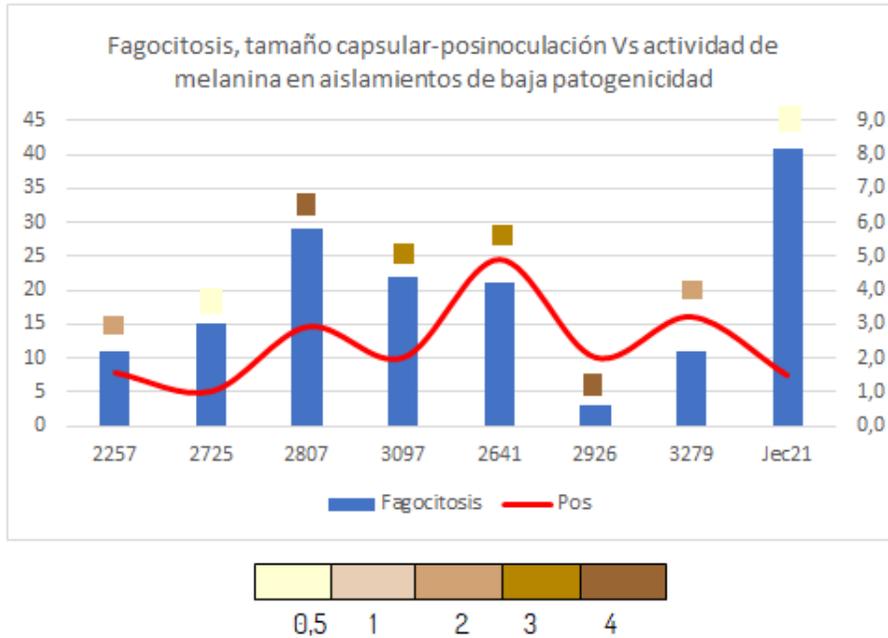
**Figura 17.** Aislamientos clínicos de alta y baja patogenicidad comparados con el porcentaje de fagocitosis, graficas realizadas en Excel.



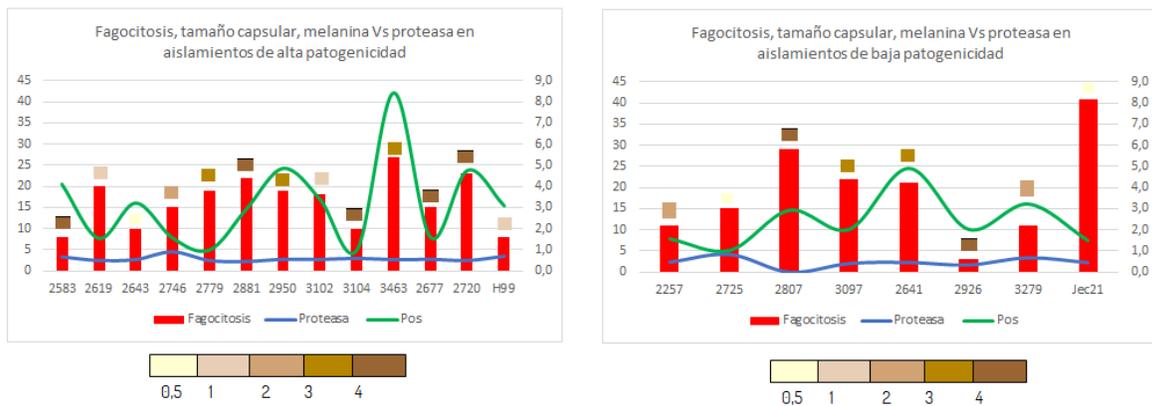


**Figura 18.** Tamaño capsular pre y pos inoculación comparado con los aislamientos de alta y baja patogenicidad. Graficas realizadas en Excel.





**Figura 19.** Porcentaje de fagocitosis comparado con tamaño capsular pos inoculación y la actividad de melanina en aislamientos de alta y baja patogenicidad. Graficas realizadas en Excel.



**Figura 20.** Porcentaje de fagocitosis comparado con tamaño capsular pos inoculación y la actividad de proteasa en aislamientos de alta y baja patogenicidad. Graficas realizadas en Excel.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Padilla del Carmen, Franco GN, Cortés SP, *et al.* Criptococosis diseminada asociada con VIH. *Dermatologia Rev Mex.* 2012;56(2):126–31.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2017;2(1):357-16.
3. French N, Gray K, Watera C, *et al.* Cryptococcal infection in a cohort of HIV-infected Ugandan adults. *AIDS* 2002;16(7):1031-1038.
4. Escandón P, Lizarazo J, Inés Agudelo C, Castañeda E. Cryptococcosis in Colombia: Compilation and Analysis of Data from Laboratory-Based Surveillance. *J Fungi (Basilea)* . 2018 Mar; 4 (1): 32.
5. McFadden DC, Casadevall a. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2001;39 Suppl 1(718):19–30.
6. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1–23.
7. Gago S, Serrano C, Alastruey-Izquierdo A, *et al.* Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. *Mycoses.* 2017;60(1):40–50.
8. Mylonakis E, Moreno R, El JB, *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* 2005;73(7):3842–2850.
9. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(9):1378–83.
10. Agudelo CA, Muñoz C, Ramírez A, *et al.* Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(4):214–20.
11. Sloan DJ, Dedicoat MJ, Lalloo DG. Europe PMC Funders Group Treatment of Cryptococcal Meningitis in Resource Limited Settings Disease Burden in Resource Limited Settings. 2014;22(5):455–63.
12. Nussbaum JC, Jackson A, Namarika D, *et al.* *NIH Public Access.* 2011;50(3):338–44.
13. Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, *et al.* Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2464–70.
14. Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, *et al.* Symptomatic Relapse of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis after Initial Fluconazole Monotherapy: The Role of Fluconazole Resistance and Immune Reconstitution. *Clin Infect Dis.* 2006;43(8):1069–73.
15. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, *et al.* Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009;77(10):4345–55.
16. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal

- status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol. 1999;37(3):838–40.
17. Tomas MTB. Epidemiología de la Criptococosis en España . *Cryptococcus neoformans* . (Universidad Autonoma de Barcelona) 2002; 12:123.
  18. Escandón P, Quintero E, Granados D, *et al.* Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de Eucalyptus spp . en Colombia. Biomédica. 2005;25:390–7.
  19. Stephen C, Lester S, Black W, *et al.* Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. Can Vet J. 2002;43(10):792–4.
  20. Omar T, Bastidas Z, Karina D, *et al.* Criptococosis Cerebral : análisis de 12 casos y revision de la literatura. 2013;35(2):104–22.
  21. Park, B. J., Wannemuehler, K. A.,*et al.* *Cryptococcus* : Screening for Opportunistic Infection among People Living with HIV / AIDS Cryptococcal Infection. Aids. 2009;24(3):525–30.
  22. Lizarazo J, Escandón P, Agudelo CI, *et al.* Cryptococcosis in Colombian children and literature review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(6):797–804.
  23. Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, *et al.* Cryptococcosis in Colombia: results of the national surveillance program for the years 2006–2010. Biomédica. 2012;32:386–98.
  24. Lizarazo J. Infectio Asociación Colombiana de Infectología Consideraciones sobre la criptococosis en los pacientes con sida Cryptococcosis in AIDS patients , some considerations. 2012;16(5):94–9.
  25. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013;2013(serotype D):23.
  26. Tapia P. C V. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect. 2009;26(2):144–50.
  27. Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. PLoS One. 2012;7(5).
  28. Ferandez Acero FJ. Aplicacion de la proteómica a la caracterización de patogenicidad en Botrytis cinerea. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas. 2006;113.
  29. De La Torre Russis V, Valles A, Gómez R, *et al.* Interacciones proteína-proteína: Bases de datos y métodos teóricos de predicción. Biotecnol Apl. 2003;20(4):201–8.
  30. Sánchez A, Escandón P, Castañeda E. Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 2008 Sep;25(3):145–9.
  31. Grossman NT, Casadevall A. crossm Susceptibility. 2017;61(3):1–12.
  32. Tello M, Gutiérrez E, Béjar V, *et al.* Criptococosis. Rev Méd Risaralda. 2013;19(2):147–53.
  33. C. A. D’Souza, a J. W. Kronstad, a G. Taylor, *et al.* Genome Variation in *Cryptococcus gattii* , an Emerging Pathogen of. 2011;2(1):1–11.
  34. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006;6(4):574–87.

35. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, *et al.* Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):599–607.
36. Benton CB, Nazha A, Pemmaraju N, *et al.* HHS Public Access. 2016;95(2):222–42.
37. Liu T, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis Do not distribute. *Landes Bioscience* . 2012;(April):1–9.
38. Ecevit IZ, Clancy CJ, Schmalfuss IM, *et al.* The poor prognosis of central nervous system cryptococcosis among nonimmunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. *Clin Infect Dis.* 2006;42(10):1443–7.
39. Eisenman HC, Duong R, Chan H, *et al.* Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in galleria mellonella. *Virulence.* 2014;5(5).
40. Polacheck I, Platt Y, Aronovitch J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1990;58(9):2919–22.
41. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3519–28.
42. Duin D Van, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of. *Society.* 2002;46(11):3394–400.
43. Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* 1994;14(7):4912–9.
44. Rathore SS, Raman T, Ramakrishnan J. Magnesium ion acts as a signal for capsule induction in *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol.* 2016;7(MAR):1–16.
45. Chrisman CJ, Albuquerque P, Guimaraes AJ, *et al.* Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog.* 2011;7(5).
46. Zaragoza O, Rodrigues ML, Jesus M De, *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 2009;68(9):133–216.
47. Aminnejad M, Cogliati M, Duan S, *et al.* Identification and characterization of VNI/VNII and novel VNII/VNIV hybrids and impact of hybridization on virulence and antifungal susceptibility within the *C. neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS One.* 2016;11(10):1–28.
48. Dolande Franco M. Factores de virulencia e inmunidad en criptococosis. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2001;21(2):62–6.
49. Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(5):570–4.
50. Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, *et al.* Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem.* 2007;282(52):37508–14.
51. Djordjevic JT, Del Poeta M, Sorrell TC, *et al.* Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochem J.* 2005;389:803–12.
52. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in

- experimental cryptococcosis. *Infect Immun*. 2000;68(2):443–8.
53. Harris J, Lockhart S, Chiller T. *Cryptococcus gattii* : where do we go from here? *Med Mycol*. 2012;50(2):113–29.
  54. Bava AJ, Trombetta L, Galache V, *et al*. Diagnóstico de criptococosis a partir de lesiones cutáneas. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2002;44(1):33–6.
  55. Guzmán D AM. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev Chil infectología*. 2004;21(1):39–47.
  56. Zambrano D. The isolates were recovered from cerebrospinal fluid of HIV seropositive patients with. 2018;37(2017):1–12.
  57. Bava AJ, Zuliani MV. en medios de cultivo empleados para diagnóstico bacteriológico Growth of *Cryptococcus neoformans* in culture Resumen. 2009;43(2):195–9.
  58. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults. *Dep Heal Hum Serv*. 2013;408.
  59. Castañeda E, Lizarazo J. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. *Infectio*. 2012;16:123–5.
  60. CI USO, Ni N. Voriconazol.
  61. CI USO, Anfotericina N. Anfotericina.
  62. Pertenece A. Fluconazol.
  63. Warren JJ, Blanchette D, Dawson D V, *et al*. HHS Public Access. 2017;44(2):319–35.
  64. A ÁPM, Camacho RC, S MD. Criptococosis pulmonar en el paciente inmunocompetente Pulmonary cryptococcosis in the immunocompetent patient. *Rev Colomb Neumol*. 2014;26(1).
  65. Ferrara G, Panizo MM, Alarcón V, García N, Dolande M. *Cryptococcus neoformans* Epidemiological Cutoff Values. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017;1–8.
  66. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, *et al*. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):291–322.
  67. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, Bonfietti LX, Rodriguez JL. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(Suppl 19):57–64.
  68. Kantarcioğlu AS, Boekhout T, Yücel A, Altas K. Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Med Mycol*. 2009;47(2):169–76.
  69. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. 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(3):252–9.
  70. Ochiuzzi ME, Santiso GM, Arechavala AI. Correlation of Etest and Neo-Sensitabs diffusion assays on Mueller-Hinton-methylene blue agar with broth microdilution reference method

(CLSI-M27-A2) for testing susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and fluconazole. *Med Mycol.* 2010;48(6):893–6.

71. Sheehan G, Kavanagh K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence.* 2017;5594:1–10.
72. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB El, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence.* 2010;1(6):475–82.
73. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition. Vol. 28, Clinical and Laboratory Standards. 2008.
74. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34(2):153–7.
75. McFadden DC, Fries BC, Wang F, Casadevall A. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2007;6(8):1464–73.
76. Halliday CL, Bui T, Krockenberger M, *et al.* Presence of  $\alpha$  and **a** mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2920–6.
77. C GP, H GG, J MCD. ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASAY SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A FLUCONAZOL EN AISLAMIENTOS CLINICOS Y AVIARIOS DE *Cryptococcus neoformans* ( Phospholipase activity and « in vitro » susceptibility to fluconazol in clinical and aviars isolates of *Cryptococcus neoformans*. 2008;23:21–5.
78. UCO. Fuente de iones. Available from: [https://www.uco.es/servicios/scai/pdf/identificacion\\_de\\_proteinas.pdf](https://www.uco.es/servicios/scai/pdf/identificacion_de_proteinas.pdf)
79. Illnait Zaragoza MT, Marie Meis JFG, Martínez Machín GF, *et al.* Perurena Lancha MR. Susceptibilidad in vitro frente a fluconazol y voriconazol de cepas de *Cryptococcus* aisladas en Cuba. *Rev Cuba Med Trop.* 2009;61(1):70–4.
80. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3(4):354–8.
81. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. *Infect Immun.* 1995;63(8):3131–6.
82. Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell.* 2016;48(4):297–304.
83. Nosanchuk JD, Rosas a L, Casadevall a. The antibody response to fungal melanin in mice. *J Immunol.* 1998;160(12):6026–31.
84. Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(10):3864–6.
85. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii* / *Cryptococcus neoformans* species complex. Vol. 78, *Fungal Genetics and Biology.* 2015. p. 16–48.
84. Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60(1):69–105.

85. Izquierdo AA, Melchem MS, Bonfietti LX RJ. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop.* 2015;57(19):57–54.
86. Lee CH, Chang TY, Liu JW, Chen F, Chien C TY. Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2012;12:361–9.
87. Chandener J, Adou-Bryn KD, Douchet C, *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(6):506–8.
88. Agudelo CA, Muñoz C, Ramírez A, *et al.* Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(4):214–20.
89. Bii CC, Makimura K, Abe S, *et al.* Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses.* 2007;50(1):25–30.
90. *Rev Iberoam Micol* 1999;16: 36-39.
91. Trpković A, Pekmezović M, Barać A, *et al.* In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. *J Mycol Med.* 2012;22(3):243–8.
92. Gutch RS, Nawange SR, Singh SM, *et al.* Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. *Brazilian J Microbiol.* 2015;46(4):1125–33.
93. Tay ST, Tanty Haryanty T, Ng KP, Rohani MY, Hamimah H. In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses.* 2006;49(4):324–30.
94. Ferrara G, Panizo MM, Alarcón V, García N DM. *Cryptococcus neoformans* Epidemiological Cutoff Values. *Curr Fungal Infect Rep.* 2017;11(4):163–70.
95. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, *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(3):201–5.
96. Guinea J, Hagen F, Peláez T, *et al.* Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. *Med Mycol.* 2010;48(7):942–8.
97. Aller AI, Claro R, Castro C, *et al.* Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV-infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain: 1994-1996 and 1997-2005. *Chemotherapy.* 2007;53(4):300–5.
98. Córdoba S, Isla MG, Szusz W, Vivot W, Altamirano R DG. Susceptibility profile and epidemiological cut-off values of *Cryptococcus neoformans* species complex from Argentina. *Mycoses.* 2016;59:351–6.
99. Nielsen K, Cox GM, Wang P, *et al.* Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic a and alpha isolates. *Infect Immun.* 2003;71:4831–484.
100. Kwon-Chung KJ, Edman JC & Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1992; 60: 602–605

101. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. PNAS. 2001; 98: 15245–15250
102. 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.
103. Miyata S, Casey M, Frank D, Ausubel F, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infect Immun 2003; 71: 2404–2413
104. Wang, C. S., Z. Z. Li, and T. M. Butt. Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. J Invertebr Pathol 2002; 80:29-34
105. Firacative C, Shuyao D, Meyer W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. PLoS One. 2014; 9:8, e1050576
106. Kimura, M., L. Kaufman, S. Maekura, K. Teramura, T. Satou, and S. Hashimoto. Pulmonary cryptococcosis due to a capsule-deficient strain confused with metastatic lung cancer. Mycopathologia 2007; 140:65-68
107. Laurenson I, Ross J, Milne L. Microscopy and latex antigen negative cryptococcal meningitis. J Infect. 1998; 36: 3, 329-331.
108. Moser, S. A., L. Friedman, and A. R. Varraux.. Atypical isolate of *Cryptococcus neoformans* cultured from sputum of a patient with pulmonary cancer and blastomycosis. J Clin Microbiol 1978; 7:316-318.
109. Ro, J. Y., S. S. Lee, and A. G. Ayala. Advantage of Fontana-Masson stain in capsule-deficient cryptococcal infection. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:53-57.
110. Harding, S. A., W. M. Scheld, P. S. Feldman, and M. A. Sande. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1979; 382:113-118.

