

# *Cryptococcus* y Medio ambiente

Malva Puchades Reig

TUTORES: Dra. M<sup>a</sup> Francisca Colom Valiente y Dr. Manuel Sánchez Angulo

Área de Microbiología

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

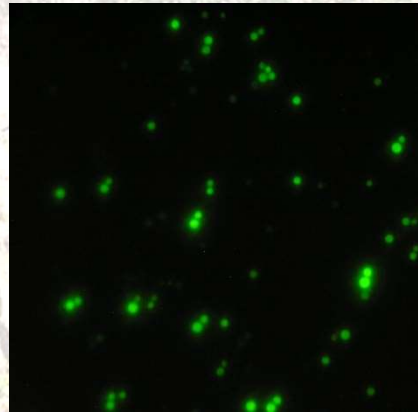
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2015-2016

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ



**Agradecimientos:**

A la Dra. M<sup>a</sup> Francisca Colom, por su paciencia y dedicación a mi formación, por su apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal.

Al Dr. Manuel Sánchez y la Dra. Marina Torreblanca por abrirme las puertas de su laboratorio permitiéndome aprender y madurar en el ámbito de la investigación, por ofrecerme sus conocimientos y experiencia. Así como, la oportunidad de entrar en un grupo de trabajo con excelentes personas.

A la profesora Dra. Josefa Antón por disponer a nuestro alcance el microscopio de fluorescencia del laboratorio de microbiología de la Universidad de Alicante.

Al Dr. Ferry Hagen del Departamento de microbiología médica del “Canisius Wilhemina Hospital” en Nijmegen (Países Bajos) por ofrecernos su amplia experiencia en identificación molecular y la validación de los resultados obtenidos.

# Índice

Resumen	I	
Glosario	II	
1	Introducción	1
1.1	Repaso histórico	1
1.2	Biología del complejo de especies <i>Cryptococcus neoformans-C. gattii</i>	2
1.3	Taxonomía	4
1.4	Epidemiología	5
2	Antecedentes y objetivos	7
3	Material y métodos	8
3.1	Aislamiento de medio ambiente de especies patógenas de criptococos	8
3.1.1	Toma de muestras: ámbito geográfico y procedimiento de muestreo	8
3.1.2	Procesado de muestras. Aislamiento de levaduras sospechosas.	9
3.2	Identificación fenotípica de levaduras del género <i>Cryptococcus</i>	9
3.2.1	Crecimiento a 37 °C.	10
3.2.2	Degradación de urea	10
3.2.3	Producción de melanina	11
3.2.4	Siembra en CGB.	11
3.2.5	Auxonograma de carbono. Perfil de asimilación de azúcares.	12
3.3	Conservación de aislamientos en la Colección de Criptococos Alicante (CCA)	13
3.4	Identificación intraespecie: tipado molecular o Genotipado	13
3.4.1	Extracción y purificación del ADN	13
3.4.2	Determinación del perfil de restricción del gen <i>URA5</i>	14
3.4.3	Determinación del tipo sexual y serotipo	16
3.5	Ensayos de supervivencia en microcosmos artificiales	17
3.5.1	Cepas usadas	17
3.5.2	Montaje e inoculación	17
3.5.3	Recuento y estimación de la viabilidad	18
4	Resultados	19
4.1	Distribución geográfica de los muestreos	19
4.1.1	Variedades genéticas de los aislamientos	21
4.2	Estudio de <i>Cryptococcus</i> en sustratos vegetales.	25
4.2.1	Supervivencia	25
4.2.2	Cambios morfológicos	27
5	Discusión	30
6	Conclusiones y proyección futura	32
7	Bibliografía	33

## RESUMEN

---

El complejo de especies *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii*, incluyen un grupo de levaduras patógenas y saprófitas cuyo nicho ecológico principal son los árboles. Son el agente causal de la criptococosis, enfermedad que afecta fundamentalmente al sistema nervioso central. En este trabajo se ha realizado una búsqueda de estas especies en medio ambiente. Se han caracterizado por métodos de biología molecular las especies aisladas y de forma paralela se ha llevado a cabo un estudio de supervivencia de estas levaduras en microcosmos artificiales que simulan el nicho ecológico natural. Se ha detectado la variedad de la especie de *C. neoformans* con mayor prevalencia: *C. neoformans* var. *grubii* (genotipo VNI, serotipo A) y tipo sexual  $\alpha$ . En los aislamientos obtenidos en España para este estudio no se detectó *C. gattii*. En el estudio de supervivencia, ambas especies muestran una alta capacidad para sobrevivir. Se ha comprobado que las células fúngicas tras largos periodos en condiciones adversas son capaces de reducir su tamaño a un diámetro inferior a 4 micras. Por ello, se respalda la hipótesis de que estas células reducidas se convierten en posible agente infeccioso por vía inhalatoria.

**Palabras clave:** *Cryptococcus*, algarrobo, levadura, patógeno, epidemiología.

### Summary:

The *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex, includes a group of pathogen and saprophytic yeasts whose main ecological niche are trees. They are the causative agents of cryptococcosis, a disease which primarily affects the central nervous system. In this work a search for these species in the environment has been done. We have characterized the isolated species by molecular biology methods and in addition a study of survival of these yeasts has been carried out in artificial microcosms that simulate their natural ecological niche. The *C. neoformans* variety that has been detected with higher prevalence, was *C. neoformans* var. *grubii* (genotype VNI, serotype A), and mating type  $\alpha$ . No *C. gattii* species was detected during the development of this work. In the study of survival, both species show a high capacity to survive. We found that after long periods under adverse conditions yeast cells were able to reduce their size to less than 4 micron. This fact support the hypothesis of these small cells are a possible infective agent by inhalation.

**Key words:** *Cryptococcus*, carob, yeast, pathogen, epidemiology.

# GLOSARIO

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AEM	Asociación Española de Micología.
AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism” Fragmento amplificado de longitud polimórfica.
CCA	Colección <i>Cryptococcus</i> Alicante.
CGB	“L-Canavanina-Glicina- Azul de bromotimol”
dNTP	“Deoxynucleoside triphosphates” desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>GFP</i>	“Green Fluorescent Protein” Gen que codifica para la proteína verde fluorescente.
pb	acrónimo de pares de bases.
PCR	“Polimerase Chain Reaction” Reacción en cadena de la polimerasa.
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
ROS	“Reaction Oxygen Species” Especies reactivas del oxígeno.
SDA	“Sabouraud Dextrose Agar” Medio de cultivo semisintético para levaduras
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.
<i>STE12</i>	Gen de levaduras que codifica para un factor de transcripción Ste12p, que regula el desarrollo sexual y la patogenicidad.
UFC	Unidades formadoras de colonias. Medida de las células viables en microbiología.
UMH	Universidad Miguel Hernández
<i>URA5</i>	Gen de levaduras que codifica para la orotidina monofosfato pirofosforilasa.
Var	Variedad.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.
YED	“Yeast Extract Dextrose” Extracto de levadura y dextrosa.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

El complejo de especies *Cryptococcus neoformans*-*C. gattii* comprende a un grupo de levaduras patógenas que pueden causar infecciones cutáneas, pulmonares y más frecuentemente afectar al sistema nervioso central provocando una meningoencefalitis criptocócica, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Aunque morfológicamente son levaduras (hongos unicelulares), gracias al análisis filogenético se las clasifica en el grupo de los basidiomicetos. De hecho en determinadas condiciones pueden desarrollar un micelio y cuerpos fructíferos donde se pueden encontrar las basidiosporas [20]. Sin embargo, generalmente estas levaduras se multiplican asexualmente mediante gemación.

## 1.1 REPASO HISTÓRICO

*Cryptococcus neoformans* se identificó y describió por primera vez como patógeno humano en 1894. Este hecho se produjo casi de forma simultánea por autores diferentes. Por un lado, los médicos alemanes Otto Busse y Abraham Buschke describieron el caso de una mujer joven con una lesión en la tibia de la que se aisló un microorganismo que describieron como un blastomiceto. Busse denominó al microorganismo como *Saccharomyces hominis*. Buschke realizó un trabajo independiente describiendo al microorganismo como un coccidio [17].

Por otra parte, en ese mismo año en Italia, Sanfelice aisló una levadura encapsulada a partir de un zumo de melocotón y demostró su patogenicidad en un modelo animal. Denominó a este microorganismo *Saccharomyces neoformans*. Además aisló una levadura similar de un nódulo linfático que presentaba ciertas diferencias a *S. neoformans* y la denominó *Saccharomyces lithogenes*. [11]

En 1896, se detectó un segundo caso de criptococosis humana en Francia. Ferdinand Curtis aisló un hongo con apariencia levaduriforme en una lesión de cadera. A este organismo se le denominó como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. A finales del siglo XIX, se realizaron nuevas descripciones de *Cryptococcus*, de diferentes lesiones tanto en humanos como en animales. El hecho de que el microorganismo recibiera diferentes denominaciones generó confusión para avanzar en su conocimiento. [7]

A principios del siglo XX Jean Paul Vuillemin estudió las levaduras aisladas por Busse y Sanfelice. No consiguió observar las típicas ascosporas que se forman en el género *Saccharomyces* y además no eran capaces de fermentar carbohidratos. Por ello, clasificó estas levaduras en el género *Cryptococcus*, y nombrándolas respectivamente como *Cryptococcus hominis* y *Cryptococcus neoformans*. [11]

Durante la primera mitad del siglo XX se describieron nuevos casos en los que estaba implicada esta levadura y por ello se estudió en profundidad. Se detectó una levadura como agente causante de

## Introducción

una meningitis por Von Hansenmann (1905). Tras este hallazgo, Stoddard y Culter (1916) nombraron a la levadura como *Torula histolytica*. [3, 11]

En 1935 Rhoda Benham estableció los caracteres morfológicos, serológicos y los criterios de identificación de más de 40 cepas. Concluyó que todos los aislamientos humanos pertenecían a la misma especie y las nombró con el nombre propuesto por Vuillemin en 1901, *Cryptococcus neoformans*. [17]

A partir de 1950 el término *C. neoformans* comenzó a ser utilizado e incluido en la literatura micológica y médica. Las características peculiares de la criptococosis fueron descritas en humanos y varios investigadores también describieron la infección animal. Por otro lado, los estudios del polisacárido antigénico, así como el inicio de los conocimientos sobre la ecología, biología e inmunología, están datados en estas décadas [11, 12, 17]. En 1970, *C. gattii* fue descrita como una variedad de *C. neoformans* (*C. neoformans var gattii*) mucho más virulenta. Pero a raíz del descubrimiento de la forma sexual, la observación de diferencias en las pruebas bioquímicas y los muchos estudios genéticos, se demostró que *C. gattii* era una nueva especie independiente. Además posteriormente se describieron especies híbridas por lo que por comodidad, al conjunto de estas especies y sus híbridos se les denominan con el término complejo de especies *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii*. [4]

## 1.2 BIOLOGÍA DEL COMPLEJO DE ESPECIES **CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS-C. GATTII**

Este complejo se caracteriza por ser hongos saprófitos, que se encuentran principalmente en árboles, preferentemente en oquedades preservadas de la radiación solar, donde hay mayor humedad y acumulación de detritus, pero se pueden encontrar en otras partes del tronco, en las hojas, las flores y en suelo bajo la copa de los árboles. Se consiguen aislar del medioambiente en forma de levadura, las cuales presentan morfología redonda u ovalada. Normalmente la célula está envuelta por una cápsula de polisacárido que le sirve como mecanismo de supervivencia y como factor de virulencia cuando se encuentran parasitando y se utiliza para determinar el serotipo de la cepa. Pueden llegar a medir de diámetro hasta unas 10-12 micras, pero incluyendo la cápsula estas levaduras pueden llegar hasta 25-30 micras. El tamaño de la cápsula depende de la cepa, del medio de cultivo que se utilice para aislar la levadura, o de las condiciones ambientales en que se encontraba la levadura al aislarla del medio ambiente [1, 3, 5, 10, 12].

## Introducción

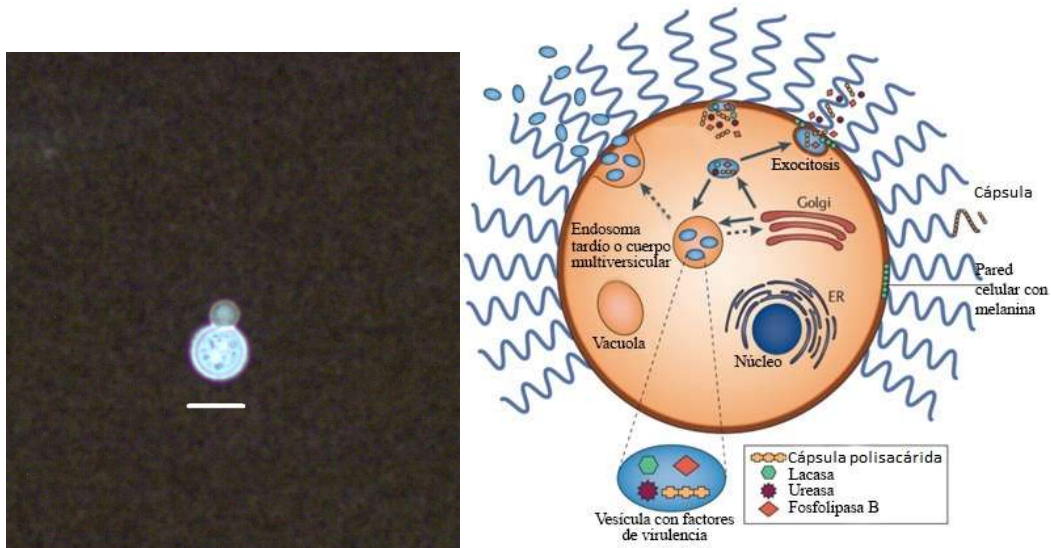


Figura1: Preparación con tinta china x1000. Realizada en el laboratorio de la UMH. La barra indica un tamaño de 10 µm (Izq.). Morfología celular y factores de virulencia (Dcha.). [16]

Estas levaduras muestran otros factores de virulencia, como los depósitos de melanina en la pared celular que les confiere resistencia frente a las ROS (especies reactivas del oxígeno), la producción de enzimas extracelulares (lacasas, fosfolipasas y ureasas) y la termotolerancia que les permite crecer a 37°C [16].

En su hábitat natural se reproducen asexualmente por gemación, aunque se cree que también pueden hacerlo de forma sexual, a pesar de que sólo se ha conseguido observar este comportamiento *in vitro*. La morfología de las basidiosporas en el estado teleomórfico es diferente para cada complejo de especies. En este caso el género es *Filobasidella*, *F. neoformans* produce basidiosporas esféricas u ovaladas, mientras que *F. bacillosporus* produce basidiosporas alargadas o baciloformes [18, 19, 20, 21].

En la figura 2 podemos ver cómo se desarrollan las diferentes morfologías del ciclo de vida de este microorganismo.



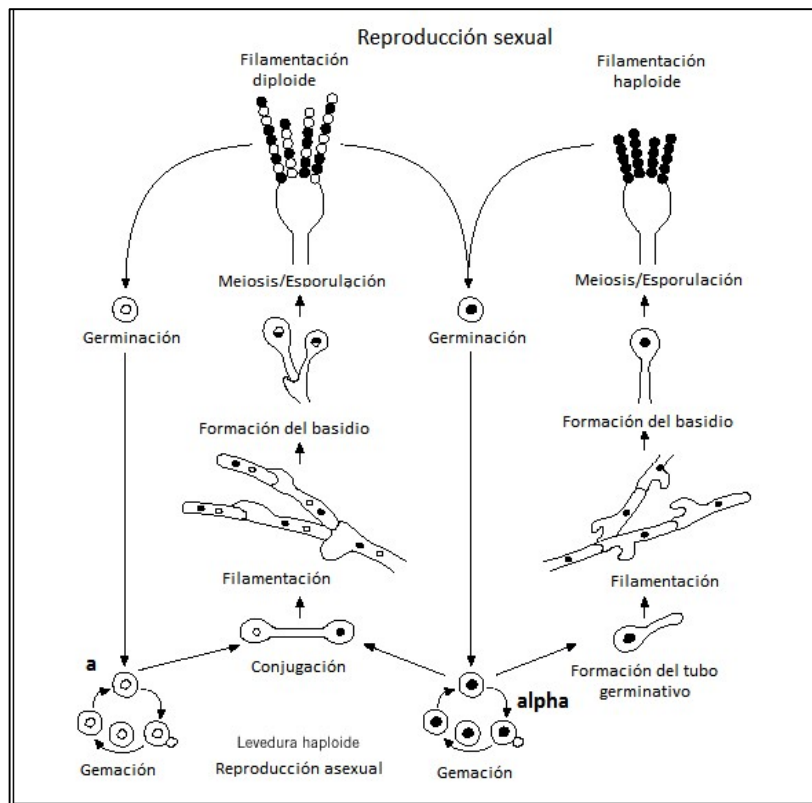


Figura 2: Ciclo de vida de *Cryptococcus* spp. Fuente: da Silva Lacaz C. Med. Cut. 2002.

### 1.3 TAXONOMÍA

Los hongos pueden encontrarse o desarrollarse en dos estados morfológicos, el perfecto o teleomorfo (pluricelular) con reproducción sexual y el levaduriforme o anamorfo (unicelular) en el que tienen reproducción asexual, tal como se muestra en la figura 2.

Debido a esta dualidad morfológica, algunos hongos se clasifican en más de un género y especie. En este caso en concreto del microorganismo en el que se centra el trabajo, tiene la siguiente clasificación filogenética. Dominio: *Eukarya*, Reino: *Fungi*; Filum: *Basidiomycota*; Subfilum: *Agaricomycotina* Clase: *Tremellomycetes*; Orden: *Tremellales*; Familia: *Tremellaceae*. A partir del género y la especie diverge la nomenclatura según el estado en el que se encuentren, *Filobasidiella neoformans* (teleomorfo/estado sexual)-*Cryptococcus neoformans* (anamorfo/estado asexual) y *F. bacillispora* (teleomorfo/estado sexual) – *C. gattii* (anamorfo/estado asexual). Por razones prácticas se considera a este grupo como el agente que produce la criptococosis y se le denomina de forma general como complejo de especies *C. neoformans*-*C. gattii*. [19, 34]

Como ya se ha indicado, *C. neoformans* y *C. gattii* son normalmente levaduras haploides que se reproducen de forma asexual. Sin embargo, poseen un sistema de reproducción sexual con dos tipos sexuales, diferenciados: a y  $\alpha$ . La región en el genoma donde se encuentra el locus del tipo sexual

## Introducción

(*MAT*), regula su ciclo sexual. Este locus codifica para más de 20 genes, incluyendo genes homeóticos que establecen la identidad sexual, genes implicados en la producción de feromonas, así como los genes *STE12* y *STE20* utilizados en identificación molecular y otros genes esenciales. [1]

Por otro lado, podemos identificar y clasificar a estas levaduras por el serotipo, viene determinado por la composición del polisacárido que forma la cápsula. Tradicionalmente se clasificaban en cinco grupos A, D, A/D (*C. neoformans*) y B, C (*C. gattii*). Recientemente se han descrito dos serotipos híbridos interespecies B/D, A/B. [3, 12]

En 2015 se publicó una revisión de la taxonomía de ambos complejos, con una nueva propuesta de especies. (Tabla 1). [12]:

Tabla 1: Nueva propuesta de clasificación de las especies patógenas de *Cryptococcus*.

<b><i>Cryptococcus</i>: Especies patógenas</b>					
Especie	Variedad	Serotipo	Genotipo		Nuevas especies
			RFLP	AFLP	
<b><i>C. neoformans</i></b>	<i>C.n. var grubii</i>	A	VNI	AFLP1	<b><i>C. neoformans</i></b>
			VNII	AFLP1A/B	
	Intervariabilidad híbrida	AD	VNIII	AFLP3	<b><i>C. neoformans/C. deneoformans</i></b>
	<i>C.n. var neoformans</i>	D	VNIV	AFLP2	<b><i>C. deneoformans</i></b>
<b>Híbridos</b>	Híbridos interespecie	BD	VNIV/VGI	AFLP8	<b><i>C. deneoformans/C. gattii</i></b>
		AB	VNI/VGI	AFLP9	<b><i>C. neoformans/C. gattii</i></b>
		AB	VNI/VGII	AFLP11	<b><i>C. neoformans/ C. deuterogattii</i></b>
<b><i>C. gattii</i></b>	--	B	VGI	AFLP4	<b><i>C. gattii</i></b>
	--		VGII	AFLP6	<b><i>C. deuterogattii</i></b>
	--		VGIV/III	AFLP10	<b><i>C. decagattii</i></b>
	--	C	VGIII	AFLP5	<b><i>C. bacillisporus</i></b>
	--		VGIV	AFLP7	<b><i>C. tetragattii</i></b>

## 1.4 EPIDEMIOLOGÍA

Estas levaduras son ubicuas, aunque inicialmente se creía que *Cryptococcus gattii* se encontraba únicamente en zonas tropicales o subtropicales, pero esta concepción cambia a raíz del brote infeccioso que se inició en la Isla de Vancouver (Columbia Británica, Canadá) en 1999 y que se extendió por la región de la costa norte del Pacífico en EEUU, y la posterior detección en otras regiones del mundo [23]. Este fenómeno y posteriores estudios con muestreos en otras zonas como los

## Introducción

que ha llevado a cabo este grupo de investigación, han determinado la ubicuidad de este complejo de especies (*C. neoformans* y *C. gattii*) de levaduras en todo el mundo y su presencia en distintos tipos de especies arbóreas, así como la presencia de *C. neoformans* en aves, principalmente palomas. [3, 4, 5, 15]

La importancia del estudio de estas levaduras radica en que son los agentes etiológicos de la criptococosis que afecta fundamentalmente a mamíferos, tanto al ser humano como animales. Esta enfermedad se adquiere por inhalación y produce varios cuadros clínicos afectando al sistema nervioso central, los pulmones y/o la piel. La infección por vía inhalatoria es posible si las partículas infectantes tienen menos de 4 micras de diámetro y así alcanzar el alvéolo pulmonar [3, 13]. Estas levaduras son capaces de sobrevivir dentro de macrófagos y así pasan inadvertidos frente al sistema inmunitario [16], de esta forma pasan al torrente sanguíneo y se diseminan al resto de órganos. Se ha observado que *C. neoformans* infecta a individuos inmunodeprimidos, mientras que *C. gattii* infecta inmunocompetentes preferentemente [16]. La criptococosis tuvo un auge en la tasa de infecciones en la época de los 80, ya que tiene una incidencia mayor en enfermos afectados por el VIH (pacientes con SIDA). Actualmente, esta enfermedad es muy prevalente en regiones en las que no se dispone de terapia antiretroviral de alta efectividad. En estos casos el agente causal principal es *C. neoformans*, lo que no excluye la presencia de *C. gattii* en el medio ambiente. Estudios realizados en Brasil y el sur de California han comprobado que la prevalencia de *C. gattii* es la misma antes y después de la aparición del SIDA, lo que sugiere que existe una susceptibilidad diferente para la infección para cada una de las especies [2, 3, 28, 29].

## 2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---

El grupo de investigación del Departamento de Producción vegetal y Microbiología, en el cual he realizado mi trabajo, tiene una larga trayectoria en el estudio de las levaduras patógenas del género *Cryptococcus*. También han aportado diferentes estudios sobre el hábitat de estas levaduras. Una de las aportaciones relevantes de este grupo fue la detección de *C. gattii* en un hurón doméstico con criptococosis, adquirida a partir de *C. gattii* presente en la corteza de un algarrobo cercano. Este caso aportó la evidencia de que estas levaduras se encuentran en medio ambiente en la zona mediterránea en árboles autóctonos, ya que hasta entonces se pensaba que procedían de árboles tropicales tipo eucalipto y de las palomas. [24].

Los cambios detectados durante la última década en la epidemiología de la criptococosis, especialmente los brotes de enfermedad por *C. gattii* alejados de las zonas cálidas tradicionalmente descritas como autóctonas para este patógeno, llevaron en 2013 a una reactivación de la búsqueda de este patógeno y a la puesta en marcha de un estudio específico de detección y tipado de *Cryptococcus spp.* en Europa (*Cryptococcus European environmental survey/ISHAM*). Dentro de este ámbito, el grupo especializado de la Asociación Española de Micología (AEM), dirigido desde el laboratorio de Micología Médica de la UMH, realiza y coordina la búsqueda de criptococos patógenos en toda la península ibérica y en las islas españolas y portuguesas.

A pesar de que ya se conoce la fuente del hongo en medio ambiente y su distribución mundial, quedan aspectos de la patogenia de la enfermedad que aún no han sido aclarados definitivamente, como la forma infectante que se inhala en medio ambiente. Esta podría ser la célula levaduriforme desecada o la basidiospora. Ambas tienen un diámetro inferior a 4 micras, y por tanto son capaces de llegar al alveolo pulmonar.

Por ello, los objetivos principales del trabajo consistirán en:

- Contribuir a aumentar el conocimiento sobre la presencia y distribución del complejo de especies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* en medio ambiente, así como aportar datos al estudio de epidemiología molecular en Europa (Estudio ISHAM).
- Estudiar la capacidad de supervivencia y los cambios morfológicos que se producen en estas levaduras en simuladores del entorno medioambiental (microcosmos artificiales) para detectar el desarrollo de formas infectantes del microorganismo en entornos naturales.

## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 3.1 AISLAMIENTO DE MEDIO AMBIENTE DE ESPECIES PATÓGENAS DE CRIPTOCOCOS

Para el aislamiento de especies patógenas de *Cryptococcus*, se utilizaron medios semisintéticos como el agar Sabouraud (Oxoid) (SDA) y medios complejos como el L-Dopa [27] o el Staib (agar semillas *Guizotia abyssinica*) [30], elaborados tal como describe la bibliografía. Se usaron otros medios diferenciales para la identificación fenotípica de los aislados, se describen más adelante.

A los medios SDA y Staib/L-Dopa se les añadió inhibidores, una vez estériles y dejados enfriar para evitar el crecimiento de bacterias (cloranfenicol 10 mg/ml) y de hongos filamentosos (bifenilo 10 mg/ml), cuando se van a utilizar para sembrar las muestras de medio ambiente. Así hay mayor probabilidad de obtener las colonias que nos interesan evitando el crecimiento de microorganismos indeseables. [5]

#### 3.1.1 Toma de muestras: ámbito geográfico y procedimiento de muestreo

Para la toma de muestras, se seleccionaron las zonas de España que aún no habían sido muestreadas por el equipo, y especialmente aquellas donde se detectaron casos de criptocosis, aunque se pretende tener un alcance en todas las provincias españolas e incluso otros países del área mediterránea.

El equipo de muestreo contenía: hisopos estériles, solución de cloranfenicol, guantes, mascarillas, marcadores o etiquetas, cuaderno de campo, bolígrafos, y cámara fotográfica. La toma de muestras se realizó mediante la técnica del hisopado [25], humedeciendo el hisopo estéril en solución salina o agua destilada con cloranfenicol (0,05 g/ml) antes de introducirlo en la zona elegida del árbol. Tras la toma de muestra se sumerge de nuevo en esta solución para evitar el desarrollo de bacterias y se mantiene en ella hasta el traslado al laboratorio.

Los árboles preferiblemente muestreados fueron algarrobos (*Ceratonia siliqua*), olivos (*Olea europaeae*), pinos (*Pinus spp.*), y otros árboles autóctonos. Es recomendable elegir ejemplares que contengan oquedades en la corteza o zonas al pie del árbol con detritus, por ello siempre se intentaba ir o localizar zonas en las que hubiera presencia de estos árboles. Las muestras deben mantenerse refrigeradas hasta su estudio.

### 3.1.2 Procesado de muestras. Aislamiento de levaduras sospechosas.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de micología clínica de la UMH en el campus de San Juan (Laboratorio de un nivel de Bioseguridad 2). Se utilizó el protocolo establecido por Randhawa [25]. A partir del hisopo con la muestra sumergido en la solución de suero fisiológico (NaCl 0,9%) con cloranfenicol en un volumen aproximadamente de 4 ml, se agita en un mini agitador y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este paso es importante para evitar que en el inóculo haya hongos filamentosos, ya que precipitaran las hifas y otras partículas, antes que las basidiosporas o las levaduras de pequeño tamaño.

Una vez transcurrido el tiempo se toman por duplicado 100 µl de la zona intermedia del sobrenadante y se siembran en superficie en SDA (OXOID) y en un medio con compuestos fenólicos para evidenciar la producción de melanina (Medio Staib o L-Dopa).

Tras la incubación a 30 °C durante 48-72 horas, en el medio SDA debemos observar colonias levaduriformes de color blanquecino y cierto aspecto mucoso. En el medio Staib o L-Dopa, dejamos incubar entre 48 horas a una semana para observar las colonias similares a las crecidas en SDA, pero de color marrón debido a la producción de melanina que sintetizan estas levaduras a partir de precursores fenólicos.

## 3.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LEVADURAS DEL GÉNERO

### *CRYPTOCOCCUS*

De las colonias presumibles de pertenecer al género *Cryptococcus* se obtenían muestras para su observación al microscopio tras teñir con azul de lactofenol. Este agente colorante permite la visualización de los hongos tanto las estructuras miceliales como las formas unicelulares, ya que el fenol inactiva las enzimas líticas permitiendo que la célula quede preservada. Además el ácido láctico provoca un cambio del gradiente osmótico, lo que genera una película protectora en las células. Por otro lado el colorante azul tiñe el citoplasma y la quitina de las células fúngicas. Seguidamente se observaba la presencia de cápsula mediante tinción negativa con tinta china. [22].

Las colonias que son confirmadas mediante la observación al microscopio Epi-fluorescent-B5 (OPTECH), se reaislaron en medio SDA. De aquí se realizaron diversas pruebas, bioquímicas y fenotípicas para su completa identificación (Figura 3)

## Materiales y métodos

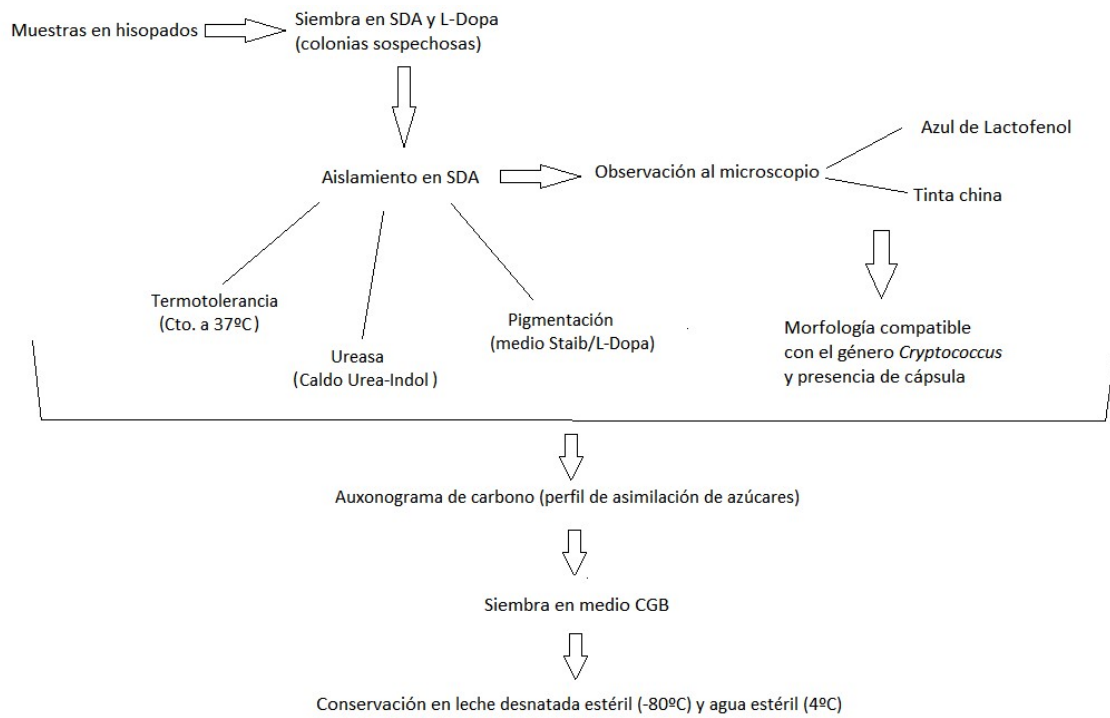


Figura 3: Esquema de los pasos seguidos en el tratamiento de muestras positivas

### 3.2.1 Crecimiento a 37 °C.

Se toma una colonia de cada aislamiento, se siembra nuevamente en medio SDA y se incuba durante 48 horas a 37 °C. Los *Cryptococcus* patógenos deben ser capaces de crecer a esta temperatura, ya que es la que corresponde al cuerpo humano. En la figura 4 se pueden observar las diferencias morfológicas entre las dos especies estudiadas de criptococos.



Figura 4: Crecimiento aislado en SDA de *C. neoformans* (Izq). Crecimiento aislado en SDA de *C. gattii*. (Dcha)

### 3.2.2 Degradación de urea

El género *Cryptococcus* se caracteriza por producir el enzima ureasa que le permite la hidrólisis de la urea. Para este ensayo se inocula la cepa sospechosa en Caldo Urea Indol (PRONADISA) o Agar

## Materiales y métodos

Urea de Christensen (OXOID) y se incuba durante 24 horas a 30 °C. El medio es de color amarillo oscuro, una reacción positiva de degradación de la urea genera un viraje de color del medio a un rosa intenso (Figura 5).



Figura 5: Prueba de la ureasa en agar urea de Christensen. Tubo rosa, resultado positivo. Tubo amarillo, resultado negativo.

### 3.2.3 Producción de melanina

Se realiza la siembra en medio Staib o L-Dopa. La gran mayoría de las cepas del género *Cryptococcus* son capaces de producir melanina y forman colonias de color marrón al crecer en este medio. Este parámetro se tiene en cuenta pero no es decisivo para la identificación de la especie. Se incuba a 30 °C durante 24 horas hasta una semana, dependiendo de la cepa (Figura 6).



Figura 6: Siembra en medio Staib de *C. gattii* CCA232. Colonias marrones, indican cepas productoras de melanina.

### 3.2.4 Siembra en CGB.

Este medio se caracteriza porque su única fuente de carbono y nitrógeno son la glicina y L-canavanina, un aminoácido no proteico [8]. Este medio permite discriminar entre las especies *C. gattii* y *C. neoformans*. La primera es capaz de crecer utilizando la glicina como fuente de carbono y no es sensible a la L-canavanina. Al producir amoniaco como residuo de la asimilación de la glicina se



produce un cambio de pH en el medio y el azul de bromotimol vira de amarillo a azul. En cambio *C. neoformans* es sensible al L-canavanina, excepto el serotipo A que es capaz de asimilar la glicina aproximadamente un 20% [28], pero el crecimiento es mínimo y no es suficiente para que se produzca un cambio de pH. Se realiza la siembra en el medio y se incuba a 30 °C durante 24-48 horas (Figura7).

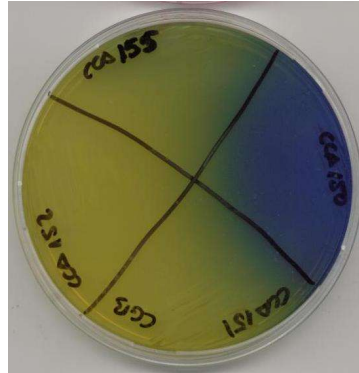


Figura 7: Placa con medio CGB sembrada con diferentes cepas, coloración azul indica crecimiento positivo.

### 3.2.5 Auxonograma de carbono. Perfil de asimilación de azúcares.

Se estudió la capacidad de las levaduras asiladas para utilizar diferentes azúcares como fuente de carbono. La prueba se llevó a cabo bien mediante kits comerciales (Auxacolor® BIO-RAD; API20C AUX® BioMerieux) o mediante un sistema simplificado (protocolo interno) con soluciones de los azúcares que mejor definen el metabolismo de *Cryptococcus* (glucosa, lactosa e inositol) y que permiten la caracterización del género. Estos se dispusieron en disolución al 1,2% en placas multipocillo, incluyendo una base para levaduras de nitrógeno sin carbono (YNB), y azul alamar (resazurina) como indicador de viraje del pH y por tanto del crecimiento de las levaduras (Figura 8).

Para esta prueba, tanto el Kit comercial como la forma simplificada, se incuban las muestras a 30°C y se realizan una lectura cada 24 horas hasta las 72 horas de incubación.



Figura 8: Placa multipocillo inoculada con cepa problema, del Kit comercial Auxacolor®.

### **3.3 CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS EN LA COLECCIÓN DE CRIPTOCOCOS ALICANTE (CCA)**

Una vez identificadas las levaduras, por los métodos anteriormente descritos, se toman 1-2 colonias de los aislamientos en medio SDA, para su conservación en la colección del laboratorio (Colección de Criptococos Alicante-CCA). Las células se resuspenden en 1ml de leche desnatada estéril (MERCK®) en un tubo Eppendorf y se conservan en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, se toman otras dos colonias y se resuspenden en 1ml de agua destilada estéril, en un tubo Eppendorf (por triplicado), estos se conservan en nevera a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4 IDENTIFICACIÓN INTRAESPECIE: TIPADO MOLECULAR O GENOTIPADO**

Se estudiaron los aislamientos de medio ambiente conservadas en la colección del laboratorio como CCA desde el número 405 hasta el 507. Estas se identificaron mediante técnicas de biología molecular, como se describe a continuación.

#### **3.4.1 Extracción y purificación del ADN**

A partir del cultivo aislado en SDA se toman 1-2 colonias de la cepa a estudiar y se resuspenden en 1ml de medio YED (“Yeast extract dextrose”) con NaCl 3% [8] en un tubo Eppendorf. Se incuban las células a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 24 horas. Este medio no permite que las células produzcan cápsula y así la extracción del ADN es mucho más efectiva.

Transcurrida la incubación, se centrifugan los tubos a 1200 rpm durante dos minutos, se elimina el sobrenadante y se añade 1ml de suero fisiológico para lavar las células. Se agitan en el mini agitador (“vortex”), se vuelve a centrifugar de nuevo el tubo y se elimina el sobrenadante. Esta operación de lavado de las células se repite. Tras dos lavados se obtiene un pellet que se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 2 hora (protocolo establecido por Bio-Rad).

La extracción del ADN se realiza con una solución comercial InstaGene Matrix (BIO-RAD). Según las indicaciones del fabricante, sobre el pellet se añaden 200  $\mu\text{l}$  de la matriz previamente agitada para tener una buena homogenización. Esta mezcla se pone en un baño a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 15-30 minutos. Posteriormente se agita en el “vortex” 10 segundos y se introduce en un baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 8 minutos. Se vuelve a agitar durante 10 segundos y se centrifuga durante 3 minutos. Del sobrenadante que se obtenga ya se pueden tomar 20  $\mu\text{l}$  para preparar una PCR de 50  $\mu\text{l}$  o congelar para su posterior utilización.

### 3.4.2 Determinación del perfil de restricción del gen *URA5*

El gen *URA5* es característico de ciertas levaduras. Es un gen de 779 pb que se encuentra en el cromosoma 7, que tiene como producto el enzima orotidina monofosfato pirofosforilasa. Este gen está dividido en tres exones como se muestra en la figura 9.

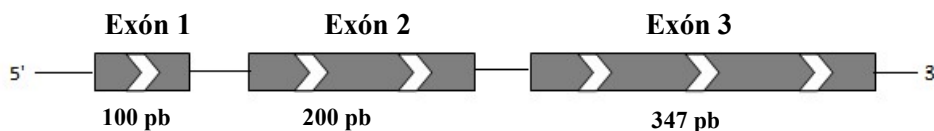


Figura 9: esquema gráfico del gen *URA5*

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen completo son URA5-F (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCCG 3') que hibrida con el extremo 5' del exón 1 y el SJO1 (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3') que hibrida en el extremo 3' del exón 3 (cebadores sintetizados por Invitrogen). Como molde se utilizó el ADN genómico obtenido como indica el apartado (3.4.1.) y como cebadores los oligonucleótidos URA5-F/SJO1 [11, 14].

Para la mezcla de reacción se utilizó un volumen total de 50  $\mu$ l (mezcla PCR (Blirt): “*Reaction Buffer*” 5  $\mu$ l; “*Mix dNTP's*” 4  $\mu$ l;  $Cl_2Mg$  2  $\mu$ l; cebadores 0,5  $\mu$ l; Taq Nova 0,25  $\mu$ l; Agua MilliQ 18,25  $\mu$ l; ADN muestra 20  $\mu$ l) de cada muestra, incluyendo un control negativo y un control positivo. Se utilizó un termociclador “Eppendorf Mastercycler gradient” (EPPENDORF®) para la reacción en cadena de la polimerasa. Las condiciones de trabajo constaban de un programa de 1 ciclo a 94 °C 2 minutos, 35 ciclos (45 segundos de desnaturalización a 94 °C, 1 minutos a 65 °C para la hibridación y 2 minutos a 72 °C para la generación de las hebras complementarias) y un último ciclo de 10 minutos a 72 °C para la elongación final. De cada muestra se tomaban 4  $\mu$ l y se mezclaban con 1  $\mu$ l de tampón de carga y agente intercalante *RunSafe* (Blirt, DNA-Gdansk). Además en uno de los carriles del gel se añadía un marcador de peso molecular de 100 pb a 1000 pb (Blirt, DNA-Gdansk) [11].

Por último se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% para la separación del gen *URA5* amplificado. Esta se llevó a cabo en una minicubeta de electroforesis (SIGMA) aplicando un campo constante de 100 V. El gel estaba sumergido en solución de 45 ml de tampón TBE (Tris, ácido bórico y EDTA) durante 30 minutos aproximadamente. Tras la electroforesis los geles eran visualizados en un sistema de lectura de geles, Gel Doc XR+ (BIO-RAD) [11].

El resultado positivo muestra una banda situada entre 700 pb y 800 pb (Figura 10).



Figura 10: Revelado del gel con la amplificación del gen *URA5* de cepas de la CCA.

### 3.4.2.1 Digestión del gen *URA5*

De las amplificaciones obtenidas del gen *URA5*, se disponían 10 µl de cada muestra incluido el control negativo y se procedía a la digestión de los fragmentos de ADN, con las enzimas de restricción *Cfr13I* (*Sau96I*) y *HhaI* (Thermo Scientific) que reconocen y cortan las respectivas secuencias que se indica en la figura 11, incubándose durante toda la noche a 37 °C. [31]

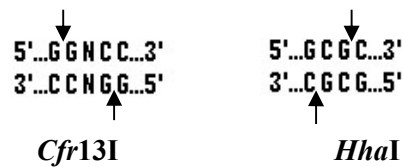


Figura 11: Secuencias diana de los enzimas de restricción e indicación del punto de corte.

Después se procede a una electroforesis en un gel de agarosa al 3% con las mismas condiciones que para el proceso de separación del gen *URA5*, al igual que la visualización del gel. A continuación se muestra una imagen de los patrones que determinan cada genotipo que se pueden obtener.

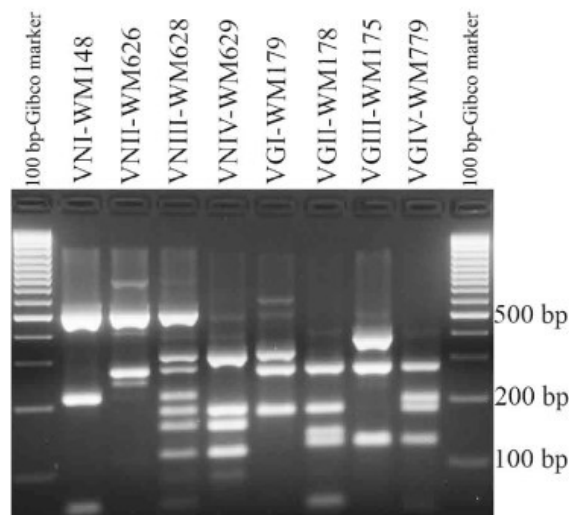


Figura 12: Perfiles de RFLP del gen *URA5* obtenidos mediante la doble digestión del gen obtenido a partir de patrones de los ocho tipos moleculares existentes. [31]

### 3.4.3 Determinación del tipo sexual y serotipo

Para la identificación del tipo sexual de los aislamientos, se utilizó el protocolo establecido con una PCR multiplex [9]. Para ello, se realiza una mezcla de reacción (“*Reaction Buffer*” (Blirt) 5 µl; “*Mix dNTP’s*” 8 µl; Cl<sub>2</sub>Mg 3 µl; Cebador 2 µl (x 8 cebadores); Taq Nova 0,5 µl; ADN muestra 20 µl) con ocho cebadores:

Tabla 2: Cebadores utilizados para la determinación del tipo sexual. (9).

Cebadores	Secuencia de nucleótidos	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño amplificado (pb)
STE20 $\alpha$ AF [11]	5'-TCCACTGGCAACCCTGCGAG-3'	64	860
STE20 $\alpha$ AR [11]	5'-ATCAGAGACAGAGGAGCAAGAC-3'	64	860
NAD4 $\alpha$ AF	5'-CATTTATCCGTATACGCATTCCC-3'	64	320, 400
NAD4 $\alpha$ AR	5'-GCAAATTCAGCACCAGCAATAGT-3'	64	320, 400
STE20 $\alpha$ DF	5'-TGGGCGTATCCCAACCTACGA-3'	64	413
STE20 $\alpha$ DR	5'-TAACGACTCCGGTGCCGTGAA-3'	64	413
NCP1 $\alpha$ DF	5'-GGCAGTGATGGTTTCATCCGTA-3'	64	645
NCP1 $\alpha$ DR	5'-ATTGTCATCAGGGTCGACAAACA-3'	64	645

Estos cebadores nos darán los perfiles:  $\alpha A$ ,  $aA$ ,  $aD$ ,  $\alpha D$ ,  $aA/\alpha D$  y  $\alpha A/aD$ . Todos correspondientes al complejo de especies *Cryptococcus neoformans*. Permiten detectar simultáneamente el tipo sexual y el serotipo. Para determinar el tipo sexual de las cepas de *C. gattii* se utiliza una PCR simple (con una sola pareja de cebadores para el gen *STE12*). [33]

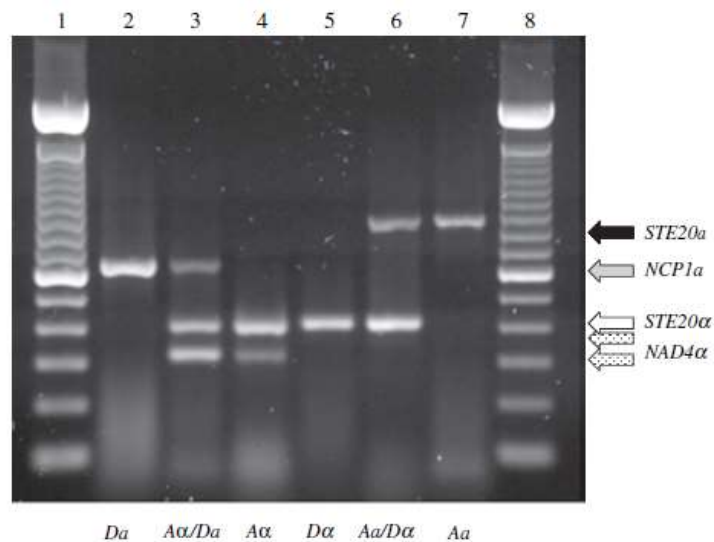


Figura 13: Patrones que se pueden obtener de los resultados de la PCR multiplex [9]

Las condiciones utilizadas en el termociclador para realizar la PCR multiplex son un ciclo a 94 °C dos minutos, 35 ciclos (94 °C 45 segundos, 61 °C 1 minuto, 72 °C 2 minutos) y un último ciclo de hibridación a 72 °C durante 10 minutos. Posteriormente se realizaba la electroforesis para la separación de los distintos fragmentos de ADN, las condiciones de trabajo son las mismas que las indicadas para la electroforesis del gen *URA5*, excepto que el gel se prepara al 1,4% de agarosa [9, 31].

### 3.5 ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA EN MICROCOSMOS ARTIFICIALES

#### 3.5.1 Cepas usadas

Se han utilizado cuatro cepas cedidas por Robin C. May (Universidad de Birmingham. UK), incluidas en la CCA como CCA347 (*C. neoformans*), CCA348 (es la misma cepa que CCA347, transformada con el gen *gfp*), CCA349 (*C. gattii*) y CCA350 (cepa CCA349, transformada con el gen *gfp*). Las cepas transformadas expresan la proteína GFP y emiten fluorescencia verde de forma constitutiva.

#### 3.5.2 Montaje e inoculación

Para la preparación de los microcosmos se tomaron muestras de corteza y detritus de un algarrobo situado en el campus de San Juan de la Universidad Miguel Hernández. Previamente se comprobó que no había presencia de otros criptococos en los sustratos vegetales que se tomaron. La corteza fue cortada en trozos de aproximadamente un 1mm<sup>2</sup> y de los detritus fueron eliminadas piedras, hojas y ramas. Se dispusieron estas muestras (30 trozos aprox. de corteza y 10 g de detritus) en placas Petri estériles, incluyendo una placa de control negativo por sustrato. Otro grupo de 10 muestras idénticas (4 de corteza y 4 de detritus) se envolvieron en papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave. Después se dispusieron igualmente en placas Petri, tal como se indica en la figura 14. El inóculo fueron 10<sup>6</sup> células /ml de las cepas de *Cryptococcus*. De esta forma realizamos un total de 20 microcosmos diferentes.

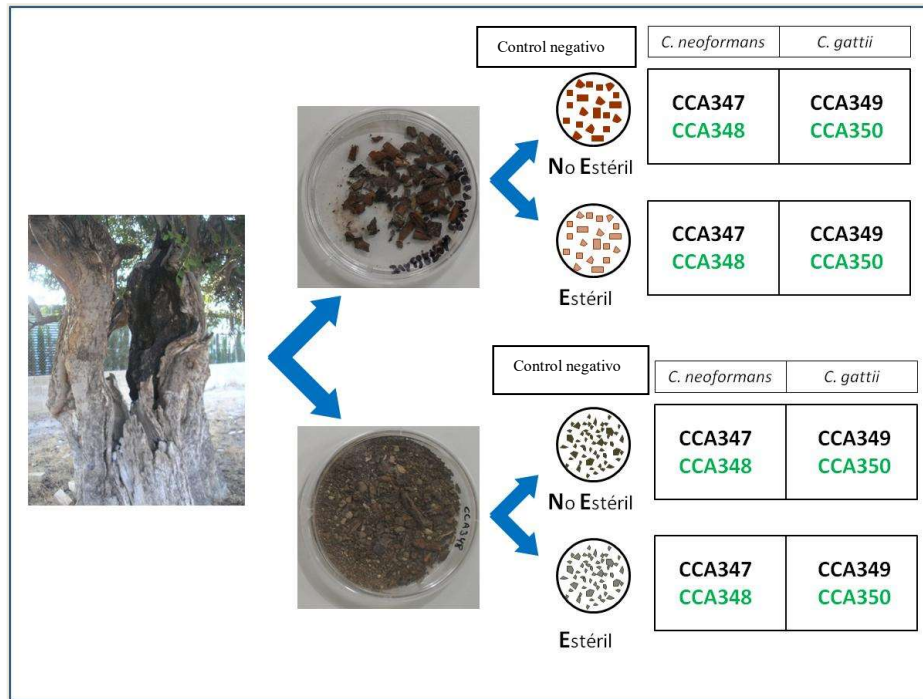


Figura 14: Esquema de la disposición de las cepas en los microcosmos.

### 3.5.3 Recuento y estimación de la viabilidad

Se estudió la capacidad de supervivencia y se observaron los posibles cambios morfológicos de las levaduras en distintos periodos de tiempo. Este estudio constaba de un recuento en placa mediante siembra en superficie en SDA y L-Dopa/Staib, observación del tamaño celular mediante tinción con azul de lactofenol y observación de la cápsula mediante tinción con tinta china. Para ello se estableció una rutina de muestreo durante 42 semanas.

De cada microcosmos se tomaba, en el caso de la corteza, un fragmento de 1 mm<sup>2</sup> aproximadamente, y 0,1 g de detritus. Se hidrataban en 1 ml de suero fisiológico, se agitaba en el mini agitador y se realizaban las pruebas descritas.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS MUESTREOS

Los muestreos realizados a lo largo de la geografía española, fueron programados, con especial interés en zonas donde se han registrado casos de criptococosis. En la figura 15 se muestran los puntos estudiados hasta ahora por el grupo de trabajo.

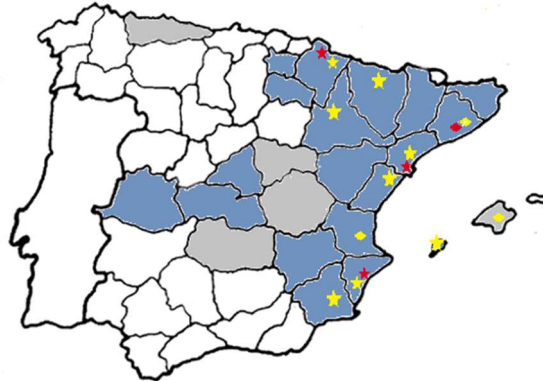


Figura 15: Las provincias marcadas en color azul corresponden a muestreos realizados durante el 2010-2015, las provincias de color gris corresponden a muestreos anteriores. Los aislados obtenidos de *C. neoformans* están indicados con una estrella amarilla y los de *C. gattii* con una estrella roja.

Durante la estancia en el laboratorio participé de forma activa, en los muestreos realizados en las provincias de Alicante, Valencia, Madrid y Girona. De forma extraordinaria realicé un muestreo en Turquía (zona de Capadocia) durante un viaje personal a la zona, pero no se obtuvieron aislamientos de *Cryptococcus*.



Figura 16: Toma de muestras en un algarrobo. Jubalcoy, Elche.



## Resultados

En la siguiente tabla se muestran los diferentes árboles muestreados y las cepas de interés obtenidas para el estudio. Partiendo de la larga trayectoria y conocimientos del grupo de investigación, por sus estudios previos, se priorizaron los muestreos en Algarrobos (*Ceratonia siliqua*), Olivos (*Olea europaea*) y Pinos (*Pinus sp.*). Se incluyen datos de otros muestreos, ya que se realizó el estudio de aislamiento e identificación junto con otras muestras en el laboratorio.

Tabla 3: Resumen de los muestreos realizados y aislamientos obtenidos

FECHA	MUESTREOS PROGRAMADOS		ÁRBOL	Nº ÁRBOLES	MUESTRAS	Criptococos aislados		
						<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	otras especies
jun-11	Alicante	San Juan	Algarrobo	8	18	15		2
			Olivo	3	6			
			Pino	1	1			
jul-11		Relleu	Olivo	2	4			
		San Vicente	Algarrobo	2	2			
		Jubalcoy (Elche)	Algarrobo	5	10	5		
			Olivo	1	2			
ago-11		Campello	Algarrobo	5	10	2		1
		Altea-Calpe	Algarrobo	2	9	4		1
			Olivo	2	3			1
	Benissa	Algarrobo	4	8				
		Olivo	1	1				
		El Altet	Higuera	1	1			
	Algarrobo		2	2				
	Valencia	L'Alcudia	Algarrobo	4	8	1		2
jul-12	Alicante	Crevillente	Algarrobo	8	8	8		
			Olivo	4	4	3		
			Pino	4	4			
abr-15	Girona	Sant Antoni de Calonge	Algarrobo	5	10			
			Almendro	1	1			
			Alcornoque	2	3			
			Olivo	7	12			
may-15	Huesca	Pirineo aragones	Liquidambar	2	2			
			Chopo	1	1			
		Monte perdido	Árbol seco	1	1			
			Tronco muerto	2	5			
		Valle de Benasque	Abeto	1	2			
			Pino	3	4			
			Pino seco	2	3			
		Enate	Olivo	2	7	2		
	Almendro		2	4	3			
		Madrid	Parque El Retiro	Grevillea	2	2		
NO PROGRAMADOS						<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	otras especies
sep-12	Turquía	Ürgüb (Cappadocia)	Espino blanco	1	1			
			Chopo	2	2			
			Fresno?	1	1			
<b>Total</b>				<b>96</b>	<b>162</b>	43	0	7
<b>Total aislamientos</b>						<b>50</b>		

## Resultados

Se muestrearon 96 árboles, 162 muestras en total que se procesaron tal como se indica en material y métodos, obteniendo un total de 50 aislamientos, 43 de los cuales fueron *C. neoformans* y el resto otras levaduras no patógenas.

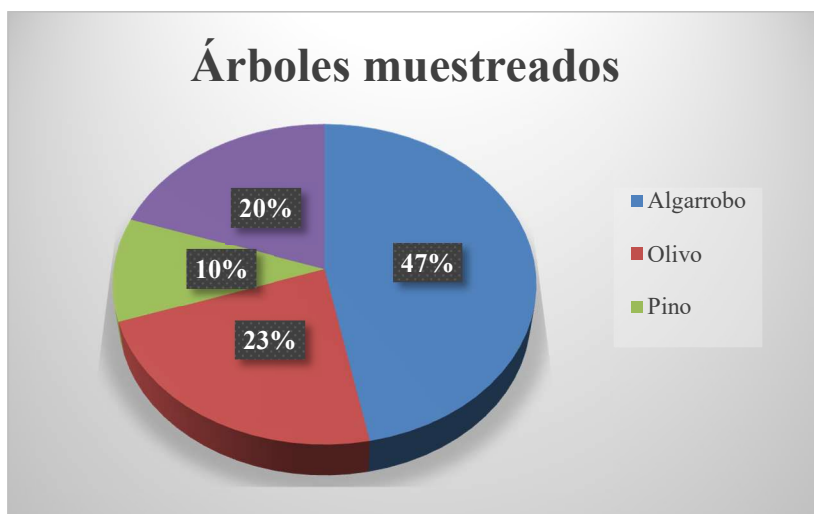


Figura 17: árboles muestreados y su incidencia de muestreo.

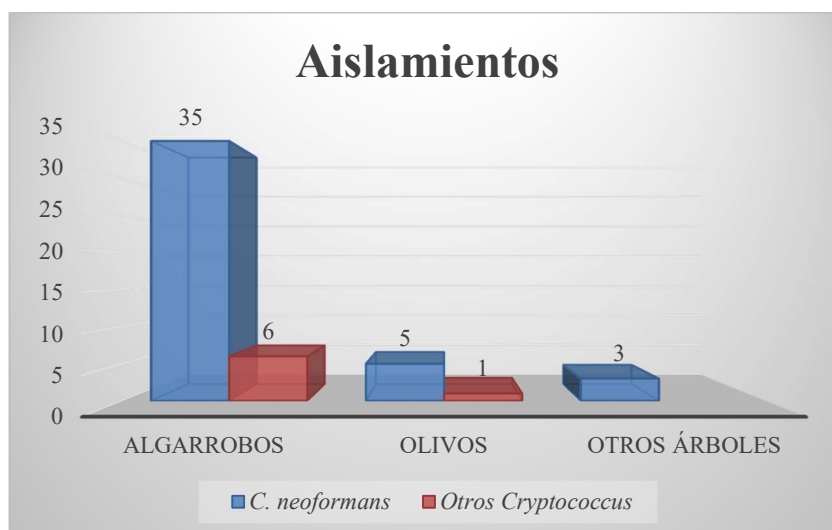


Figura 18: Aislamientos obtenidos en relación con los árboles donde han sido hallados.

### 4.1.1 Variedades genéticas de los aislamientos

Se analizaron un total de 73 aislamientos obtenidos durante los muestreos realizados en el periodo 2013-2015, además de otros aislamientos enviados por los colaboradores facultativos de casos clínicos de criptococosis animal. Los resultados obtenidos del análisis molecular se resumen en la siguiente tabla, los aislamientos sombreados en azul corresponden a especies de *Cryptococcus* no patógenos y otras levaduras.

Tabla 4: Resumen de los datos obtenidos de identificación molecular.

Denominación CCA	Procedencia	Especie	Tipo sexual	Serotipo	RFLP/AFLP
405	Detritus Olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
406	Hisopado Olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
407	Hisopado Olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
408	Hisopado Olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
409	Hisopado Olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
430	Algarrobo hisop	<i>C. albidus</i>			
431	hisop algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
432	hisopado algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
433	hisopado algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
434	hisopado olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
435	hisopado algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
437	hisopado olivo	<i>C. albidus</i>			
438	hisopado eucalipto	<i>C. albidus</i>			
439	hisopado algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
440	hisopado olivo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
443	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
444	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
445	Algarrobo hisopado	<i>C. gattii</i>	$\alpha$	B	VGI/AFLP4
446	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
447	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
448	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
449	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
450	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
451	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
452	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
453	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
454	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
455	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
456	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
457	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
458	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
459	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
460	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
461	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
462	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
463	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
464	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
465	Algarrobo hisopado	Otras levaduras			
466	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	a	A	VNI
467	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
468	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
469	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
470	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
471	Algarrobo hisopado	Otras levaduras			
472	Algarrobo hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
473	Algarrobo Hisopado	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
478	Hisopado Algarrobo	Otras levaduras			
479	Hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
480	Hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
481	Hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
482	Corteza Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
483	Hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
484	Hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
485	Corteza Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
486	Hisopado Akgarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
487	Hisopado Algarrobo	<i>C. gattii</i>	$\alpha$	B	VGI/AFLP4
488	Corteza Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
489	hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
491	hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
492	hisopado Algarrobo	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
493	Hisopado Algarrobo	<i>C. gattii</i>	$\alpha$	B	VGI/AFLP4
496	Hisopado Plátano indias	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	A	VNI
497	Hisopado corteza Pino	<i>C. gattii</i>	$\alpha$	B	VGI/AFLP4
498	Hisopado corteza Pino	<i>C. gattii</i>	$\alpha$	B	VGI/AFLP4
499	Detritus suelo encina	<i>C. neoformans "C. deneoformans"</i>	$\alpha$	D	VNIV
500	Veter. Perro	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	D	VNI
501	Veter. Perro	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	D	VNI
502	Veter. Perro	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$	D	VNI
503	hisopado Olivo detritus	<i>C. neoformans</i>			VNI
504	hisopado Olivo detritus	<i>C. neoformans</i>	$\alpha$		VNI
505	hisopado corteza almendro	<i>C. neoformans</i>			VNI
506	hisopado corteza almendro	<i>C. neoformans</i>			
507	hisopado corteza almendro	<i>C. neoformans</i>			

## Resultados

Se enviaron algunos de los aislados al laboratorio de referencia del Departamento de microbiología médica del “Canisius Wilhemina Hospital” en Nijmegen (Países Bajos), donde fueron genotipados mediante la técnica que estudia los AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”), de forma se pudiera validar nuestros resultados. En este estudio se detectó que los aislados CCA465, CCA471 y CCA478 no correspondían al género *Cryptococcus*, por lo que se indicaron en la colección como otras levaduras.

Por otro lado las muestras CCA506 y CCA507, presentaban un patrón anómalo en la determinación del gen *URA5*, ya que presentaban la banda característica de éste, pero de forma muy sutil un tamaño algo inferior, y cuando se pretendió determinar el RFLP, no se obtuvo fragmentación del gen. Estas muestras están pendientes de confirmación.

Tabla 5: Genotipos obtenidos de las muestras analizadas

Especies	<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>
	60		5
Genotipos	VNI	VNIV	VGI
	59	1	5

De las cepas estudiadas se obtuvo el genotipo de 65, de las cuales para *C. gattii* sólo se obtuvo uno de los cuatro que se conocen y para *C. neoformans* dos de los cuatro genotipos.

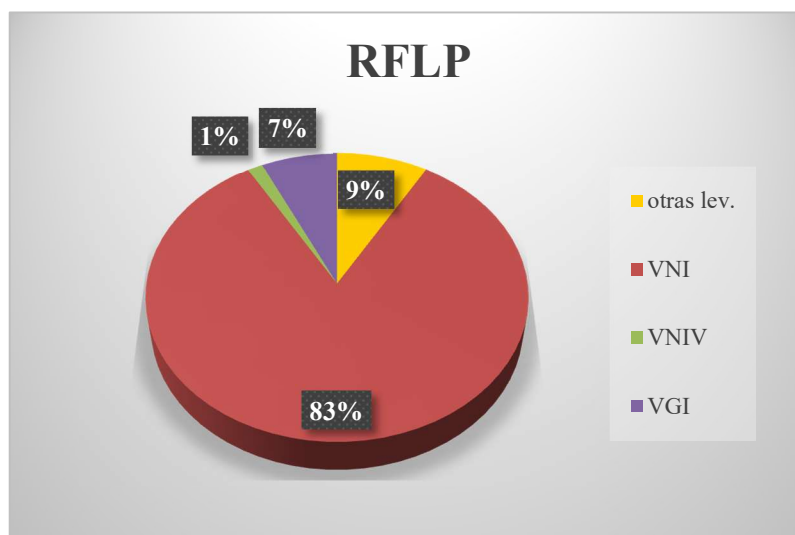


Figura 19: Porcentaje de los AFLP obtenidos

## Resultados

Se obtuvo el tipo sexual de 63 cepas, obteniendo de forma mayoritaria el tipo  $\alpha$ , como se puede observar en el gráfico.

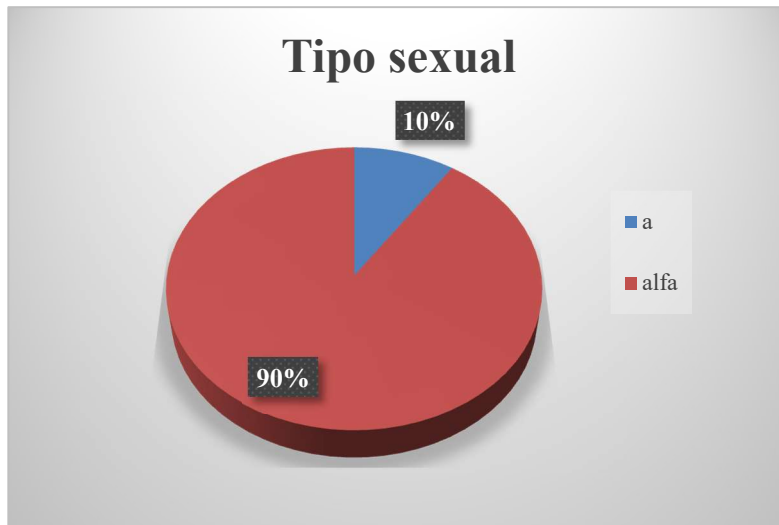


Figura 20: Porcentajes obtenidos del tipo sexual de las cepas estudiadas.

De la determinación del serotipo de las cepas estudiadas se obtuvo el resultado de 62 cepas, obteniendo mayoritariamente del serotipo A. En el gráfico siguiente (figura 20) se pueden observar los distintos porcentajes obtenidos para cada serotipo.

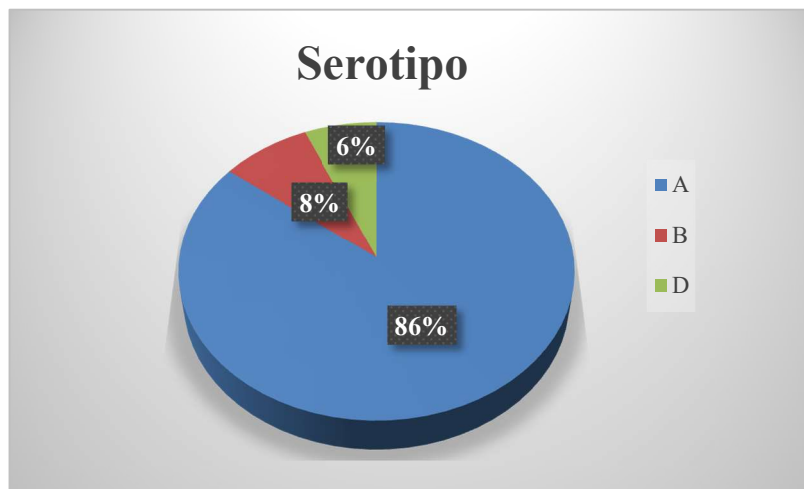


Figura 21: Porcentajes de los diferentes serotipos de las cepas estudiadas.

## 4.2 ESTUDIO DE *CRYPTOCOCCUS* EN SUSTRATOS VEGETALES.

En Julio de 2011, se crearon los microcosmos tal como se indica en material y métodos. A continuación se exponen los resultados de supervivencia y cambios morfológicos que experimentaron las células en estos ambientes artificiales.

La toma de cada muestreo corresponde a las siguientes fechas:

T0	2/09/2011 (Semana 0)	T1	7/09/2011 (Semana 1)
T2	26/09/2011 (Semana 3)	T3	7/11/2011 (Semana 9)
T4	2/01/2012 (Semana 16)	T5	14/03/2012 (Semana 27)
T6	19/06/2012 (Semana 40)	T7	05/07/2012 (Semana 42)

### 4.2.1 Supervivencia

Las siguientes figuras muestran la progresión del tamaño poblacional respecto al tiempo en cada uno de los diferentes sustratos vegetales y con microbiota competitiva o sin ella. Los resultados de recuento poblacional se expresan en unidades viables expresadas en UFC/mm<sup>2</sup> o UFC/100 mg según el sustrato vegetal estudiado. En la observación al microscopio mediante tinción con azul de lactofenol se comprobó que la gran mayoría de células se encontraban en gemación (reproducción asexual).

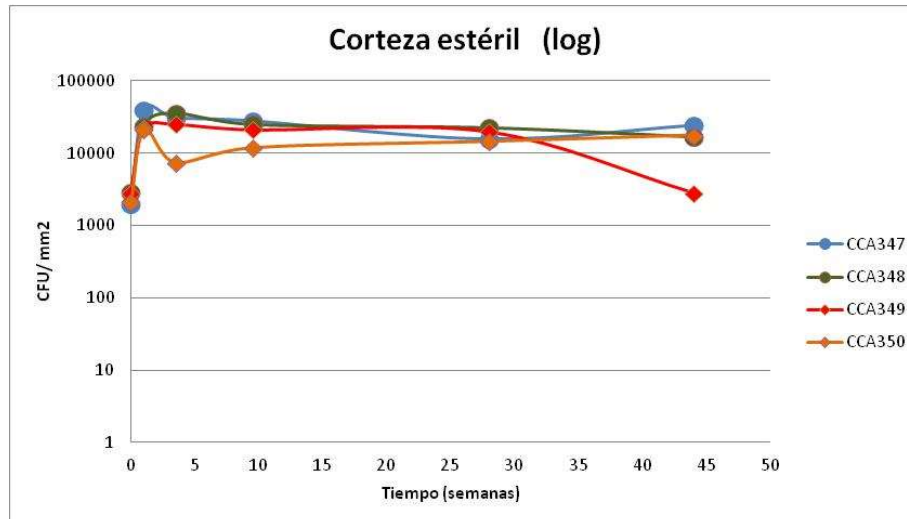


Figura 22: Recuento del tamaño poblacional en sustratos corteza estéril inoculada [26].

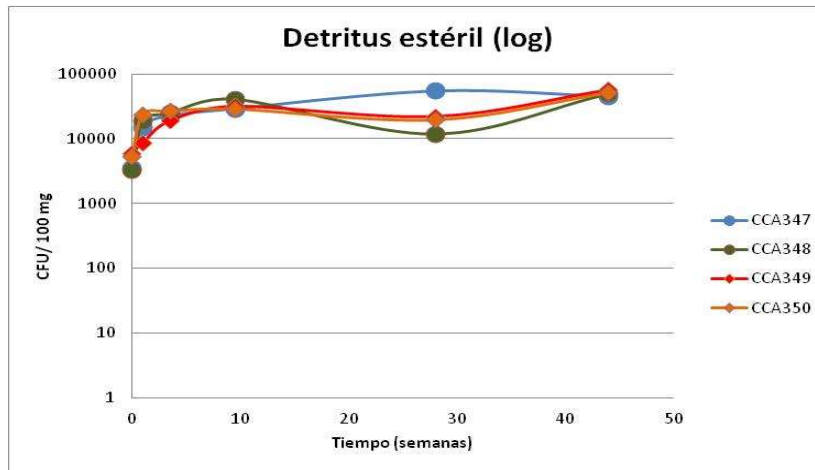


Figura 23: Recuento del tamaño poblacional en detritus estériles inoculados [26].

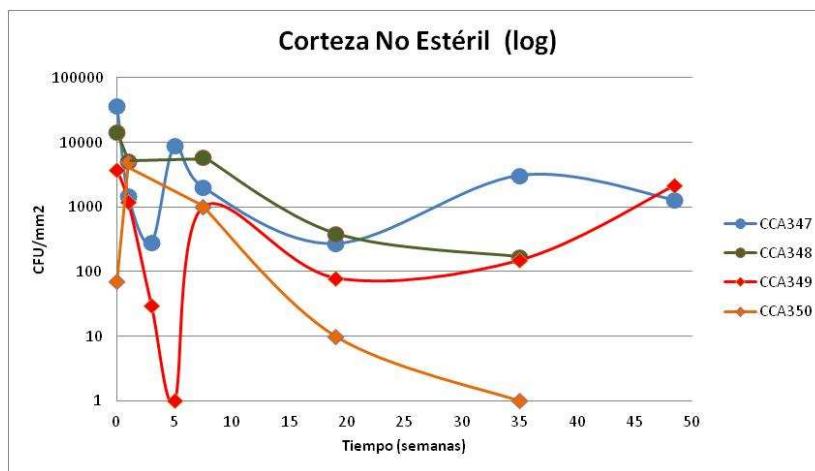


Figura 24: Recuento del tamaño poblacional en corteza inoculada con biota [26].

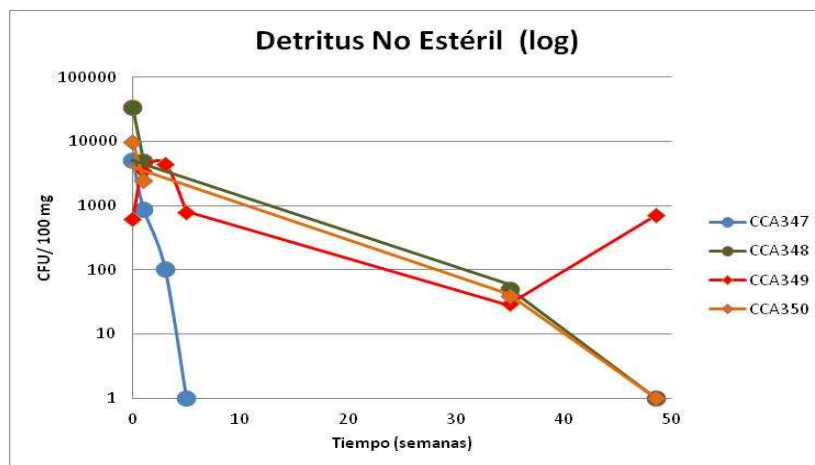


Figura 25: Recuento del tamaño poblacional en sustratos vegetales inoculados con biota [26].

En las cuatro gráficas se observa un periodo de adaptación al medio las primeras semanas, posteriormente en los microcosmos con competencia (no estériles) se observa una gran disminución de la población. Incluso la aparente desaparición de la cepa CCA347 en detritus.

### 4.2.2 Cambios morfológicos

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los cambios morfológicos observados (diámetro celular), para la realización de la gráfica se tomó la moda de la serie de valores mostrados en la tabla 6.

Tabla 6: Serie de valores obtenidos tras los muestreos, del número de células y su diámetro celular.

Inóculo: 10 <sup>6</sup> células/100mg	MUESTRAS ESTÉRILES <i>C. neoformans</i> CCA347										Muestreos	Inóculo: 10 <sup>6</sup> células/100mg	MUESTRAS ESTÉRILES <i>C. gattii</i> CCA349												
	∅ celular (µm)	≤1	2	3	4	5	6	7	8	9			≥10	∅ celular (µm)	≤1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10	
DETRITUS (nº células)				8	16	12	6					T0				10	20	19	4				T0		
			1	11	37	17	5					T1		16	20	52	12							T1	
				10	15	14	2					T2				12	34	20	4					T2	
		aglomeraciones*										T3		aglomeraciones*										T3	
			6	11	8							T4		1	17	4	3							T4	
			1	18	21	19	3	1				T5			7	17	20	10							T5
		113	1	2								T6		158										T6	
		2	22	17	18	1						T7		2	15	19	10	1						T7	
∅ celular (µm)	≤1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10	∅ celular (µm)	≤1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10				
CORTEZA (nº células)			3	23	34	21	17	3	1		T0				18	17	27	24	6	1			T0		
			1	13	21	12	4				T1			3	14	24	11	1					T1		
				8	27	20	5				T2			1	9	31	31	3					T2		
			1	13	26	30	7	2			T3				6	18	13	3					T3		
			5	12	7	2					T4		2	18	7	2								T4	
			1	25	22	16	6				T5			3	20	24	19	2						T5	
		39	3								T6		93											T6	
			14	37	40	16					T7		3	10	20	12	6							T7	

\*: Se observaron las células en forma de agrupaciones, se comprobó la presencia de nuestras cepas estudiadas mediante fluorescencia.

Los datos correspondientes a las cepas CCA348 y CCA350, no se incluyen. Se comprobó en los tres primeros muestreos que las células tenían un comportamiento muy similar CCA347/CCA348 y CCA349/CCA350, esto es debido a que son la misma cepa. Tampoco se incluyen los datos de los microcosmos correspondientes a los sustratos vegetales no estériles, ya que era muy sencillo confundir las células con levaduras de otros géneros o incluso con formas de resistencia. En cada muestreo se comprobaba la presencia de nuestras cepas de interés mediante la observación de la fluorescencia de las cepas CCA348 y CCA350.

Debido al tiempo empleado para realizar este estudio, los análisis fueron realizados por distintas personas, por este motivo y siendo una prueba que depende del observador, la toma 6 no se ha incluido en las gráficas, ya que los resultados distan mucho del resto de valores, posiblemente lo que se observó en este caso de forma mayoritaria fueron artefactos.



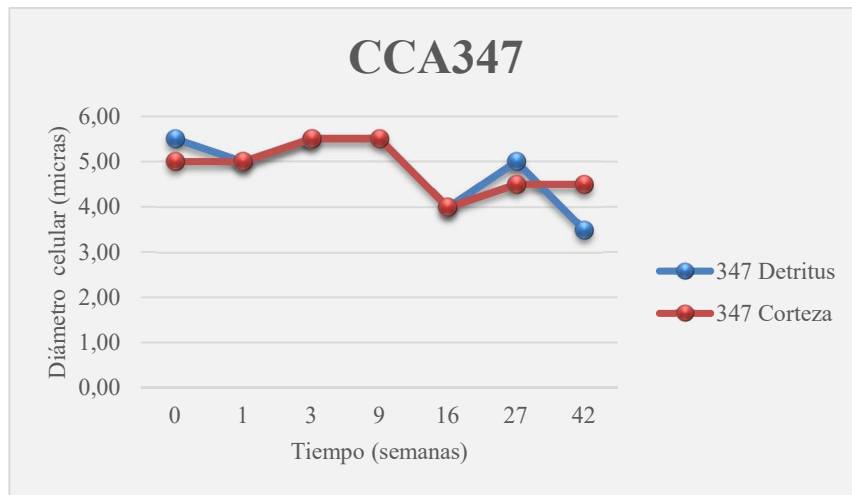


Figura 26: Variación del diámetro celular respecto al tiempo de la cepa CCA347

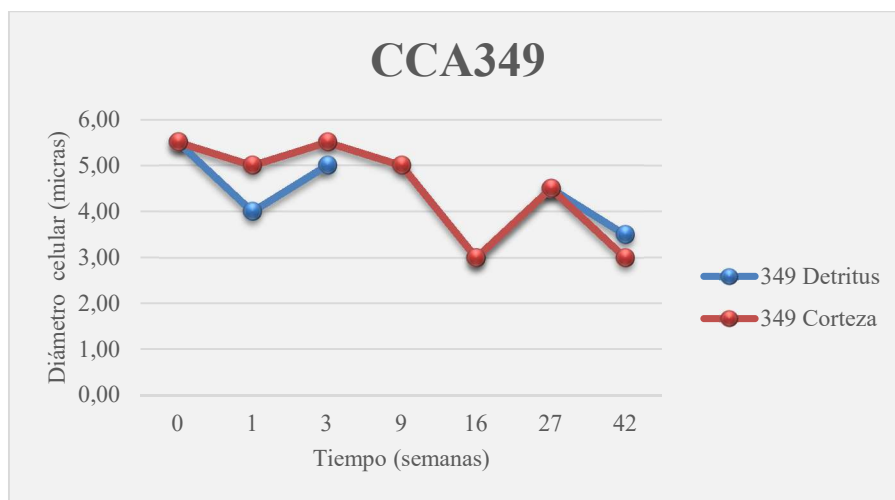


Figura 27: Variación del diámetro celular respecto al tiempo de la cepa CCA349

Durante el 2015, se volvieron a muestrear estos microcosmos que se habían mantenido en el laboratorio en las mismas condiciones desde el 2011, pero únicamente se comprobó la viabilidad de las células en estos y su tamaño, se confirma la tendencia vista durante el año de estudio.

Se observa que la fluorescencia es menor en *C. neoformans* que en *C. gattii*. El recuento en placa para cada especie era similar, aunque las colonias de *C. neoformans* eran mucho menores.

## Resultados

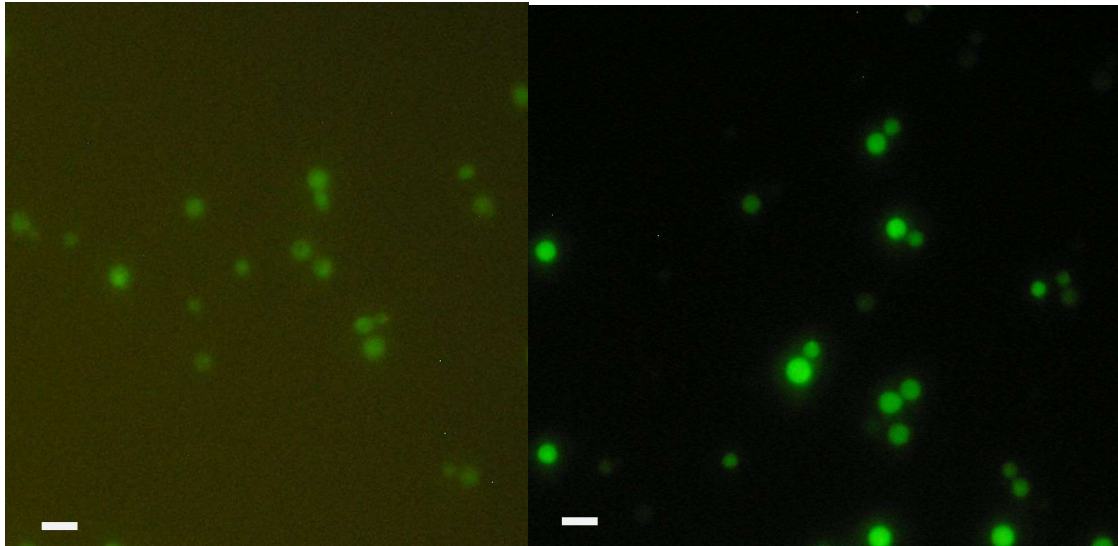


Figura 28: Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia. CCA438 a 400x perteneciente a la muestra de corteza estéril (Izq.). CCA450 a 400x perteneciente a la muestra de corteza estéril (Dcha.). La barra indica 10 micrómetros.

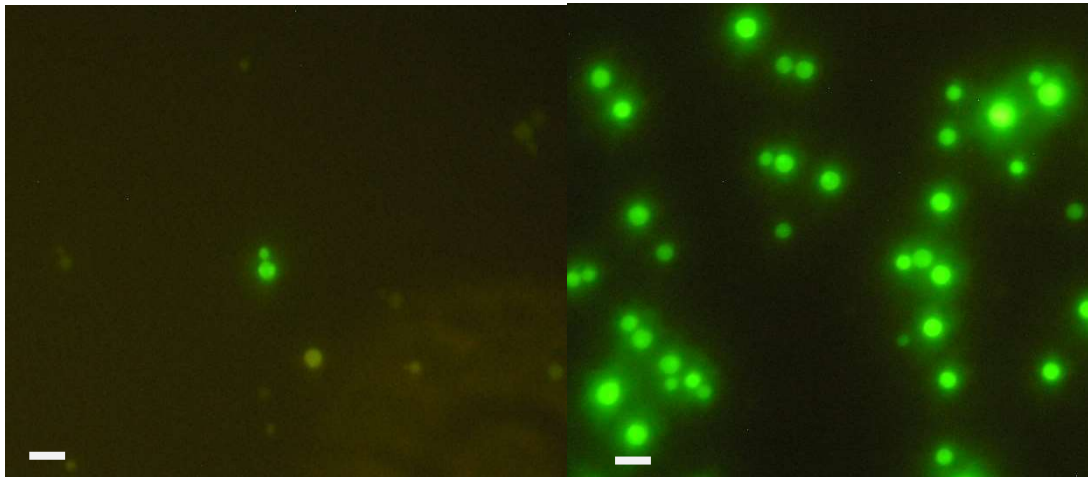


Figura 29: Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia. CCA438 a 400x perteneciente a la muestra de detritus estéril (Izq.). CCA450 a 400x perteneciente a la muestra de detritus estéril. La barra indica 10 micrómetros.

## 5 DISCUSIÓN

---

El aumento de la incidencia de casos de criptococosis a nivel mundial en las últimas décadas ha incrementado el interés por mejorar el conocimiento sobre el género *Cryptococcus*, y principalmente la biología de las especies patógenas, también es de especial interés el estudio del nicho ecológico y la fuente de adquisición de la criptococosis para una mejor prevención. El presente trabajo amplía el conocimiento sobre la presencia de estas levaduras en el medio ambiente de la cuenca mediterránea. La determinación de genotipos permite mejorar la información sobre epidemiología y evolución de estas levaduras. Por otra parte, el estudio de las especies más importantes del género *Cryptococcus* en ambientes simulados, aporta información interesante acerca de la vida del patógeno en el medio natural.

Los datos presentados muestran una importante presencia de levaduras de este género en árboles autóctonos, como el Algarrobo (*Ceratonia siliqua*) y el Olivo (*Olea europea*). Ambas especies arbóreas reúnen características que les confieren gran idoneidad como nicho ecológico de estas levaduras. Son árboles que en sus troncos se forman fácilmente oquedades, dando lugar a zonas protegidas de la exposición a la radiación solar, con bastante humedad y gran disponibilidad de sustratos (detritus).

Otro resultado interesante es que hemos determinado que en esta zona del planeta el genotipo predominante de *C. neoformans*, es el VNI, serotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) y el tipo sexual predominante es el  $\alpha$ . Este dato concuerda con los estudios realizados por otros autores [31,32], que sugieren que hay una mayor prevalencia de este tipo sexual frente al tipo *a*.

Los resultados obtenidos en el tipado molecular tanto en este trabajo como en otros previos del grupo, muestran que en árboles mediterráneos se aíslan todas las especies/variedades descritas de *C. neoformans*, pero no ocurre lo mismo con *C. gattii*, ya que únicamente se han encontrado dos de los genotipos, uno de los cuales es un genotipo raro (VGIV/AFLP7) [6]. A pesar de esto, los datos confirman la presencia de ambas especies en España.

Finalmente, los datos de supervivencia muestran que ambas especies *C. neoformans* y *C. gattii* pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en los sustratos que reproducen su hábitat, incluso aunque haya presencia de otros microorganismos compitiendo con ellos. La población de criptococos puede verse ampliamente reducida con el paso del tiempo en los microcosmos con competencia (no estériles), pero aun así estos persisten. Este hecho se ve reflejado durante los periodos de muestreos que se realizaron durante 50 semanas y se confirma con la toma de muestra realizada de estos microcosmos cuatro años después de que se crearan. A la vista de los resultados presentados, estas

## Discusión

levaduras son capaces de sobrevivir en condiciones de desecación prolongada e incluso mantener el gen que no les confiere ninguna ventaja adaptativa como es el gen de la proteína verde fluorescente.

De las observaciones en el estudio de supervivencia cabe destacar la disminución del tamaño celular. A los quince días del inicio del estudio se observa una disminución drástica del tamaño, que posteriormente se recupera en cierta medida, al mes del ensayo. Esto puede explicarse por el periodo de adaptación de las células al nuevo medio y las condiciones restrictivas de este. Tras el primer mes ya se observa una mayor cantidad de células con diámetros por debajo de las 5 micras. Con el paso de las semanas se va observando un mayor número de células que han disminuido el tamaño celular hasta alcanzar diámetros por debajo de las 4 micras, lo cual corresponde con la posibilidad, como se ha indicado en la introducción de que sean formas infectivas susceptibles de ser adquiridas por vía inhalatoria. Esta disminución del tamaño puede tener una gran importancia desde el punto de vista de la salud pública ambiental.

## 6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

---

- Se confirma la presencia en España del complejo de especies *C. neoformans*-*C. gattii* en árboles autóctonos mediterráneos.
- Existe una mayor prevalencia en España, como en otras partes del mundo, del genotipo *C. neoformans* VNI (*C. neoformans* var. *grubii*), así como del tipo sexual  $\alpha$ .
- Las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* estudiadas presentan un alto grado de supervivencia en hábitats artificiales que simulan su nicho ecológico, ya sean los únicos individuos (microcosmos estériles) o con microbiota ambiental (microcosmos no estériles). Aunque en el caso de esta última se observa una menor población, lo que indica la existencia de competencia.
- Las especies patógenas de *Cryptococcus* estudiadas presentan una marcada disminución del diámetro celular tras un periodo de 294 días de permanencia en microcosmos que simulan el nicho natural, en los que llegan a alcanzar valores iguales o inferiores a 4 micras.
- El índice de supervivencia en estos hábitats artificiales y la disminución de su diámetro de las levaduras corroboran la hipótesis de que los sustratos vegetales de árboles mediterráneos, son una fuente para la adquisición de criptococosis.
- La supervivencia en sustratos vegetales es mayor para *C. gattii* que para *C. neoformans* en los estudios realizados, pero en ambos casos esta es mayor de cuatro años.

El estudio queda abierto para seguir aislando cepas del medio ambiente, sobre todo en zonas donde se detecten nuevos casos de criptococosis, de esta forma se sigue ampliando el conocimiento de este género y se aportan nuevos datos al estudio epidemiológico Europeo.

Para confirmar que las células que han reducido su tamaño en el estudio de supervivencia en microcosmos artificiales, son formas infectivas, habría que realizar un estudio con animales de experimentación, y así poder comprobar su capacidad infectiva.

Realizar estudios de las poblaciones microbianas presentes en los sustratos utilizados para crear estos ambientes artificiales, y así poder evidenciar de forma más clara el efecto de la competencia microbiana y la adaptación al medio de *Cryptococcus* spp.

Para conocer mejor los nichos ecológicos donde residen estas levaduras, habría que hacer un estudio más exhaustivo de los aspectos bioquímicos del hábitat y compararlos con estudios en zonas geográficas con distintas condiciones ambientales, para comprobar si hay similitudes o si utilizan ciertos compuestos orgánicos como fuente de sustrato.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*- *C. gattii* species complex. Rev. Iberoam. Micol. 2008. 25: S4-S12.
2. Canelo C, Navarro A, Guevara M, Urcia F, Zurita S, Casquero J. Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con sida. Rev Med Exp 1999, XV (1-2).
3. Casadevall A., Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washintong D. C. USA, ASM Press; 1998.
4. Chaturvedi V. Chaturvedi S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. Trends Microbiol 2011. 19:564-571
5. Colom MF. Alberdi M. Meseguer I. Torres-Rodriguez JM. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. Rev Iberoam Micol 1997. 14:63-64.
6. Colom MF. Linares C. Torreblanca M. Esteban V. Alvaro R. Hagen F. Enviromental sampling of *Ceratonia siliqua* (Carob) trees in Spain reveals the presence of rare *Cryptococcus gattii* genotype AFLP7/VGIV. Rev. Iberoam. Micol. 2015. 32(4):269-272.
7. Drouhet E. Milestone in the history of *Cryptococcus* and criptococosis. J.Mycol.Med. 1997. 7:10-27.
8. Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R. (2007) *Descriptions of medical fungi*. Adelaide, Australia: Mycology Unit. Women's and Children's Hospital.
9. Esposto MC, Cogliati M, Tortorano AM, Viviani MA. Determination of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mating type by multiplex PCR. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(12):1092-4.
10. Evans E.E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. J. Immunol. 1950. 64:423-430.
11. Frasés Susana. Epidemiología molecular de *Cryptococcus neoformans*. Tesis doctoral. 2004. Universidad Miguel Hernández.
12. Hagen F. Khayhan K. Theelen B. Kolecka A. Polacheck I. Sionov E. Falk R. Parnmen S. Lumbsch T. Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. Fungal genetics and biology 2015. 78:16-48.
13. Hatch TF. Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract. Bacteriol Rev 1962. 25:237-240.

14. Jackson S. The *URA5* gene of *Cryptococcus neoformans*: Its use as an auxotrophic selection marker for biolistic transformation and as a target for RFLP targeting. Tesis (2001), University of Western Sydney, Campbelltown, Australia
15. Kidd SE., Hagen F., Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH. Fyfe M. MacDougall L. Boekhout T., Kwon-Chung KJ. Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). 17258-17263 PNAS. 2004 vol.101 n°49.
16. Kronstad JW1, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* species break out of the opportunistic box. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(3):193-203.
17. Knoke, M. y Schwesinger G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. Mycoses. 1994. 37:229-233.
18. Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 1975. 67:1197-1200.
19. Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia. 1976; 68:943-946.
20. Kwon-Chung KJ. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 1976. 68:821-833.
21. Kwon-Chung KJ. Bennett JE, Rhodes JC. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. Antonie van Leeuwenhoek 1982; 48: 25-38.
22. López-Jácome L.E., Hernández-Durán M., Colín-Castro C., Ortega-Peña S., Cerón-González G., Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Inv. Disc. 2014. Vol.3 (1); 10-18.
23. Mak S. et al. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. Environ Health Perspect. 2010; 118:653-658.
24. Morera N1, Juan-Sallés C, Torres JM, Andreu M, Sánchez M, Zamora MÁ, Colom MF. *Cryptococcus gattii* infection in a Spanish pet ferret (*Mustela putorius furo*) and asymptomatic carriage in ferrets and humans from its environment. Med Mycol. 2011. 49(7):779-84
25. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. Med Mycol. 2005; 43(1):67-71.
26. Sánchez M. Torreblanca M. Puchades M. Zorraquino A. Colom MF. Supervivencia de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en microcosmos vegetales. Póster presentado en el XI Congreso Nacional de Micología. Septiembre 2012. Cádiz (España).
27. Shaw CE. Kapica L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus*. Applied Microbiol. 1972. 24(5):824-830.

## Bibliografía

28. Sorrell TC and Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam 1997. 14:42-43.
29. Sorrell TC, Chen S, Meyer W. *Cryptococcus gattii* infection. Clinical Microbiol Rev 2014. 27:980-1024.
30. Staib, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. Oleifera* D. C.). Z Hyg. Infekt.-Kr. 1962; 148: 466-475.
31. Trilles L, Lazéra, Márcia dos Santos W. Bodo, Oliveira R. Vasconcelos, Barbosa G. Gonçalves N. Marília M. Morales B. y Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2008. 103(5), 455-462.
32. Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the  $\alpha$ -mating type. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:7327-7331.
33. Wickes, B. L., Edman, U. and Edman, J. C. The *Cryptococcus neoformans* *STE12 $\alpha$*  gene: a putative *Saccharomyces cerevisiae* *STE12* homologue that is mating type specific. Molecular Microbiology. 1997; 26: 951–960.
34. www.uniprot.org. Página visitada en Diciembre de 2015.  
<http://www.uniprot.org/taxonomy/5206>