

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudio de las bases moleculares y de los factores que inducen cambios morfológicos en *Cryptococcus neoformans*

Characterization of the molecular basis and factors that induce morphological changes in *Cryptococcus neoformans*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Irene García Barbazán

DIRIGIDA POR

Dr. Óscar Zaragoza Hernández

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Estudio de las bases moleculares y de los factores que
inducen cambios morfológicos en
*Cryptococcus neoformans***

**Characterization of the molecular basis and factors that
induce morphological changes in
*Cryptococcus neoformans***

IRENE GARCÍA BARBAZÁN

Director

Dr. Óscar Zaragoza Hernández

Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología
Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2024

A mis padres, Isabel y Javier, y a mi hermana, Eli.

A Opi.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director, Oscar Zaragoza. Cuando escogí mi proyecto de fin de máster jamás pensé encontrar a una persona que me motivase tanto a la hora de trabajar, y eso que fuiste mi segunda opción, ¡un hurra por las segundas opciones! Nunca quise hacer la tesis, pero después de trabajar juntos siempre dije que si la hacía, sería contigo. Gracias, porque después de 5 años seguiste teniéndome en mente para el proyecto. Tengo la suerte de haber tenido como director a alguien que considero un gran amigo. Gracias por todo lo que me has enseñado, por cómo me has hecho crecer, por confiar en mí y por hacer que yo misma confíe un poquito más en mí, por tu apoyo, por pasarme un poco de tu pasión por la ciencia y por *Cryptococcus*, y por dejarme llevar a cabo el proyecto de tesis tan bonito que nos ha quedado. ¡Mil gracias por todo, jefe y amigo!

A las que como yo, son fieles seguidoras de *Cryptococcus*, Rocío, Nuria y Alba. A Rocío, que en su último mes me enseñó todo para poder empezar. Me dijiste que los cuatro años de tesis se me iban a pasar volando, pensé que exagerabas, pero cuánta razón tenías. Me encantó trabajar contigo y ojalá hubiéramos coincidido más, sé que hubiera aprendido muchísimo de ti. A Nuria, que ha sido mi compi de poyata durante casi tres años y ha estado ahí para ayudarme con cualquier duda del labo, tramites, papeleo o lo que fuera. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar y por darme ánimos. Y la última incorporación, Alba, quien ha sido capaz de sacarme de mi agujero y hacer que me abriese un poco más (aunque me haya tenido de chofer y yo a ella de ayudante). Me ha encantado tenerte este último año conmigo en la poyata, me has dado fuerzas cuando ya no las tenía, y te estaré eternamente agradecida por toda tu ayuda con los últimos experimentos. Te he intentado enseñar lo mejor que sé, y espero que a ti también te acaben encantando tanto como a mí los círculos dentro de círculos. Sé que tú también llegarás a ser el emperador y sus locuras.

A todo el personal del laboratorio de Micología, con quien he pasado cuatro años maravillosos: Emilia, Mariajo, Jorge, Teresa, Ali, Laura Alcázar, Cris Armentia, Susana, Cris Carballo, Sheila, Leti, Ana Alastruey, Rosa y Cris Rueda. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros y he aprendido muchísimo de todos. Millones de gracias. Quería mencionar especialmente a Emi y a Ali, a quienes tengo un cariño especial y agradezco todos sus consejos y apoyo durante estos cuatro años, y a Cris Armentia, que ha estado ahí desde el principio y con quien podía contar para cualquier cosa, gracias por los buenos momentos.

A mis compis de doctorado, Jose, Narda, Irene y Juan Carlos. A Jose, con quien llevo 4 años compartiendo penas y alegrías. Muchísimas gracias por todo tu apoyo y tu cariño, has sido una pieza clave de mi doctorado, y sin ti no habría sido lo mismo, vales oro amigo. A Narda, que se me fue antes de tiempo y la eché muchísimo de menos, pero con quien pasé buenísimos momentos, gracias por todo tu cariño. A Irene, con quien fue una suerte coincidir y quien es un ejemplo a seguir del trabajo bien hecho. Y a Juan Carlos, a quien como compañero de risas no le gana nadie y ha amenizado todos los ratos fuera del labo. También a los que en algún momento han sido compis de despacho, de los cuales algunos ya son la siguiente remesa de doctorandos. Alejandra, Laura Alguacil, Rebeca, Sergio, Samu, Ainhize, Álvaro, Candela, Laura Leal... Hemos pasado muy buenos momentos y habéis ayudado a que el doctorado haya sido un poco mejor. Muchas gracias por todo.

Agradecimientos

A mis brasileños, Suelen y Rafa. El tiempo que coincidí con vosotros fue una ráfaga de aire fresco, sois energía pura y me encantó compartir una parte de mi tesis con vosotros. Me hicisteis pasar grandes momentos y siempre os llevaré en el corazón. A pesar de la distancia, en algún momento la vida nos volverá a juntar y volveremos a vernos.

A las distintas unidades del ISCIII. A Microscopía, sobre todo a Diego, Juli, Martin, Carmen y Félix, que me han ayudado mucho con los microscopios. Quiero hacer especial mención a Diego, me abriste un mundo del que no tenía ni idea con las macros, y he aprendido muchísimo de ti. Mil gracias por todo tu apoyo durante estos años. A Genómica, en especial a Pilar, quien ha aguantado todas mis dudas sobre el procesamiento del RNA-seq que tanto me estresaba. Y a Bioinformática, en especial a Sarai, que nos ha ayudado muchísimo con el análisis del dichoso RNA-seq. Muchas gracias a todos.

También al grupo de Toni Gabaldón, del IRB, quien nos ayudó con los análisis de la secuenciación masiva sin los cuales este proyecto no habría podido casi ni empezar. A Sonsoles Hortelano y a Aída Pitarch, por la disposición que siempre han tenido para ayudarme. Y a Luis Gandía, que me ha ayudado con la logística de estos tres últimos meses, lo que ha ayudado enormemente a no volverme loca.

I would like to say thank you to Arturo Casadevall. Thank you for accepting me at your lab, it was a great pleasure to meet you and to learn from you. Also, a special thanks to Maggie, who helped me even before I arrived. Thank you for all your help and for offering me your home, I will never forget it. I wanted to thank to all lab members, Seth, Livia, Piotr, Gracen, Daniel, Rada, Emma, Quigly, Rossanna, Scott, Ella, and Jesus. I learnt a lot from you all and it was a pleasure to spend three months with you guys, you have a home in Spain. Also, I would like to thank to Flavia and Marcio, who I happened to meet in Baltimore, thanks for all your help in our time in the USA.

Quería agradecer también a todas las personas con las que me he cruzado durante mi carrera profesional en los distintos laboratorios, en GSK, en especial a Carolina Ródenas, Noemi Bahamontes y Alfonso Mendoza, en el Imperial College, en el departamento de microbiología de farmacia, etc. Todos vosotros habéis aportado un granito de arena para mi formación y os estaré eternamente agradecida.

A Blanca, quien ya me advirtió del doctorado y quien se convirtió en una gran amiga y apoyo al reencontrarnos después de años. Gracias por todo tu cariño, te quiero.

A mis amigos de Londres, en especial a Raquel y Pablo, que me han apoyado en cada momento y me han dado ánimos para seguir. Cada quedada ha sido un chute de energía, sois los mejores. Os quiero mucho. *Also, to Alisje, whom I miss enormously and was one of the hardest people to leave when I left London. I have felt your support even in the distance, I love you.*

A mis farmacéuticas Ester, Angela, Cris e Ire. Gracias chicas por el apoyo que me habéis dado. Todo esto empezó con vosotras hace ya bastante tiempo, y es un lujo ver como hemos ido creciendo. Os quiero mucho.

A Mapi, que fue de las primeras personas que conocí en mi carrera científica y se volvió imprescindible desde el minuto uno. Gracias por estar siempre ahí y por apoyarme, te quiero.

A toda mi familia, a los que están y a los que ya me mandan sus fuerzas desde arriba. A mis tíos Marisa y Pedro, quienes me han dado muchos ánimos sobre todo en estos últimos años. A Nacho, siempre dispuesto a ayudar, y quien me ha pasado algunos de sus conocimientos de PhotoShop. A Belén, Miguel y María, por su cariño durante estos años. Gracias a todos.

Y ahora, los más importantes y los que más me han apoyado durante estos años.

A mis padres, Isabel y Javier, y a mi hermana, Eli, que son lo que más quiero en este mundo. Habéis hecho de mi la persona que soy, y me lo habéis dado todo, así que no podría estar más agradecida. Os doy un gracias inmenso por el apoyo que me habéis mostrado siempre con absolutamente todo, los consejos, las risas, los momentos vividos, juntos y en la distancia, los buenos ratos con las manualidades, todo lo que me habéis enseñado... TODO. Soy lo que soy por vosotros, sois mi casa, y el lugar más seguro al que recurrir y donde más me gusta estar. Sois lo mejor que tengo. Os quiero muchísimo.

A Opi, la persona que más me ha aguantado y la que más ha sufrido mi tesis sin tener nada que ver. Un millón de gracias, no tengo palabras para ti. No podría haber encontrado a una persona mejor con la que compartir mi vida, eres mi persona favorita. Gracias por tu paciencia infinita y tu apoyo, tu cariño, tus consejos, por cuidarme y mimarme, por todo lo que me das sin pedir nada a cambio, por enseñarme y hacerme crecer, por no dejarme caer nunca, gracias simplemente por estar ahí, conmigo, siempre. La ciencia fue una excusa para conocernos y no me equivoco diciendo que nos ha cambiado la vida. Nos queda mucho por vivir, y estoy deseando disfrutar de cada momento juntos. ¡Te quiero infinito!

Y quiero acabar con unas palabras para lo que ha supuesto esta etapa para mí. Han sido 4 años muy bonitos y en los que he aprendido muchísimo, sobre todo a confiar más en mí misma, pero los cuales también me han dado los mayores quebraderos de cabeza ...ese dichoso tic en el ojo que durante estos últimos años ha estado siempre al acecho. Todo pasa y todo llega, y ahora toca volver a disfrutar.

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación proporcionada por el
Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, mediante el contrato
FPI PRE2018-083436, asociado al proyecto SAF2017-86912-R.

Índice

1. ABREVIATURAS	9
2. RESUMEN/SUMMARY	15
3. INTRODUCCIÓN	21
3.1. Desarrollo de las enfermedades fúngicas invasoras	23
3.2. Hongos patógenos humanos	24
3.3. Virulencia fúngica y morfogénesis	25
3.4. <i>Cryptococcus</i> y criptococosis	25
3.5. Clasificación de <i>C. neoformans/gattii</i>	26
3.6. <i>Cryptococcus neoformans</i>	27
3.6.1. Distribución e incidencia.....	27
3.6.2. Infección, cuadro clínico y tratamiento.....	28
3.6.3. Adaptación al pulmón.....	30
3.6.4. Diseminación al cerebro.....	30
3.7. Mecanismos de virulencia de <i>C. neoformans</i>	31
3.7.1. Factores de virulencia.....	31
3.7.1.1. Cápsula.....	31
3.7.1.1.1. Composición y estructura de la cápsula.....	31
3.7.1.1.2. Cápsula como factor de virulencia.....	32
3.7.1.2. Producción de melanina.....	32
3.7.1.3. Producción de otras enzimas involucradas en virulencia: ureasa y fosfolipasa.....	33
3.7.2. Mecanismos de adaptación.....	33
3.7.2.1. Crecimiento a 37 °C.....	33
3.7.2.2. Patogénesis intracelular facultativa.....	34
3.7.2.3. Morfogénesis.....	35
3.7.2.3.1. Aumento del tamaño de la cápsula.....	35
3.7.2.3.2. Aumento del tamaño de la cápsula y el cuerpo celular.....	36
3.8. Células titanes	37
3.8.1. Características de las células titanes.....	37
3.8.2. Función de las células titanes en virulencia.....	38
3.8.3. Factores que favorecen la formación de las células titanes.....	38
3.8.3.1. Limitación de nutrientes.....	40
3.8.3.2. Regulación mediante <i>quorum sensing</i>	41

3.8.3.3. CO ₂ y limitación de O ₂	41
3.8.3.4. Suero.....	41
3.8.3.5. Componentes bacterianos.....	42
3.8.3.6. pH.....	42
3.8.3.7. Fondo genético de las cepas	42
3.8.4. Rutas involucradas en la formación de células titanés	42
3.8.4.1. Ruta AMPc/PKA y apareamiento	42
3.8.4.2. Ruta PKC	43
3.8.4.3. Otros	43
4. OBJETIVOS	47
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
5.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	53
5.1.1. Cepas de <i>Cryptococcus</i>	53
5.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	53
5.1.2.1. Inducción del crecimiento de la cápsula	53
5.1.2.2. Inducción de células titanés <i>in vitro</i> en TCM	55
5.1.2.3. Inducción de la titanización bajo una fuente de luz azul	55
5.2. Técnicas microbiológicas	56
5.2.1. Curvas de crecimiento.....	56
5.2.2. Análisis de las unidades formadoras de colonias	56
5.2.3. Fijación de las células con p-formaldehído 4%.....	56
5.2.4. Análisis del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.....	56
5.2.5. Cuantificación de la actividad fosfolipasa C	56
5.2.6. Cuantificación de la actividad ureasa.....	57
5.2.7. Obtención y cuantificación de la producción de vesículas extracelulares	57
5.2.8. Medida del consumo de oxígeno.....	58
5.3. Tinciones.....	59
5.3.1. Tinción negativa con tinta china	59
5.3.2. Tinción con lactofucsina	59
5.3.3. Tinción con MitoTracker.....	59
5.4. Técnicas de biología molecular.....	60
5.4.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico	60
5.4.2. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados	61
5.4.3. Obtención, visualización, purificación y concentración de ADN.....	61

5.4.4. Reinserción del gen <i>BWC2</i>	63
5.4.4.1. Obtención del inserto <i>BWC2</i>	63
5.4.4.2. Clonación del inserto <i>BWC2</i> en el vector pGEM®-T	63
5.4.4.4. Preparación del inserto <i>BWC2</i> y del plásmido pSDMA57	64
5.4.4.5. Clonación del inserto <i>BWC2</i> en el plásmido pSDMA57	65
5.4.5. Construcción de mutantes de delección (KO).....	67
5.4.5.1. Mutante <i>bwc2</i>	69
5.4.5.2. Mutante <i>cnag_04756</i>	69
5.4.5.3. Mutante <i>bwc1</i>	70
5.4.6. Transformación biolística para la obtención de mutantes	70
5.4.7. Comprobación de los clones obtenidos	72
5.4.7.1. Comprobación de la reinserción del gen <i>BWC2</i>	72
5.4.7.2. Comprobación de la interrupción de los distintos genes	72
5.4.7.2.1. Gen <i>BWC2</i>	73
5.4.7.2.2. Gen <i>CNAG_04756</i>	73
5.4.7.2.3. Gen <i>BWC1</i>	73
5.4.8. Secuenciación Sanger.....	73
5.4.9. Secuenciación masiva	73
5.4.10. Extracción y cuantificación del ARN	74
5.4.11. Secuenciación masiva del ARNm (RNA-seq).....	74
5.5. Modelos de interacción hospedador-patógeno	75
5.5.1. Modelo del lepidóptero <i>Galleria mellonella</i>	75
5.5.1.1. Recepción y acondicionamiento	75
5.5.1.2. Preparación de los cultivos e infección de las larvas	75
5.5.1.3. Curvas de supervivencia	76
5.5.1.4. Extracción de la hemolinfa.....	76
5.5.1.5. Actividad lítica de la hemolinfa	76
5.5.2. Modelo de ratón.....	76
5.5.2.1. Cepas de ratón	76
5.5.2.2. Preparación del inóculo de levaduras.....	77
5.5.2.3. Anestesia intraperitoneal e infección intranasal	77
5.5.2.4. Seguimiento del bienestar animal y sacrificio.....	77
5.5.2.5. Curvas de supervivencia	77
5.5.2.6. Extracción de los órganos	77
5.5.2.7. Aislamiento de <i>C. neoformans</i> a partir de pulmón y cerebro	77

5.5.2.8. Histopatología en pulmones	78
5.5.2.9. Cuantificación de la concentración de citoquinas en pulmón y cerebro.....	78
5.6. Microscopía	78
5.6.1. Microscopía en campo claro y fluorescencia	78
5.6.2. Microscopía confocal.....	78
5.6.3. Microscopía electrónica de transmisión	79
5.6.3.1. Visualización de vesículas extracelulares	79
5.6.3.2. Visualización de mitocondrias.....	79
5.7. Citometría de flujo.....	79
5.7.1. Unión del anticuerpo monoclonal 18B7 a la cápsula de <i>C. neoformans</i>	79
5.7.2. Detección de especies reactivas de oxígeno	80
5.7.3. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial	80
5.8. Inhibición farmacológica de las células titanes.....	81
5.8.1. Colección de Prestwick	81
5.8.2. Protocolo desarrollado para el cribado de compuestos	81
5.8.3. Curvas de inhibición de la titanización	82
5.8.4. Viabilidad de las levaduras en presencia de los compuestos	82
5.9. Estudio del polisacárido de la cápsula.....	83
5.9.1. Obtención del exopolisacárido	83
5.9.2. Análisis del polisacárido GXM	83
5.9.2.1. Técnica ELISA de captura	83
5.9.2.2. Resonancia magnética nuclear	84
5.10. Técnicas de bioinformática	84
5.10.1. Macros en Fiji.....	84
5.10.1.1. Macro para levaduras teñidas con lactofucsina	84
5.10.1.2. Macro para los cuerpos celulares de las levaduras en campo claro	85
5.11. Análisis estadísticos	85
6. RESULTADOS.....	87
6.1. Sección 1. Caracterización de cepas isogénicas que presentan distinta capacidad de formar células titanes.....	89
6.1.1. Morfogénesis de <i>C. neoformans in vitro</i>	90
6.1.1.1. Inducción de células titanes.....	90
6.1.1.2. Crecimiento en medio de inducción de cápsula	92
6.1.2. Asociación entre morfogénesis y virulencia	93
6.1.2.1. Crecimiento <i>in vitro</i> en medio Sabouraud.....	93

6.1.2.2. Modelos <i>in vivo</i>	94
6.1.2.2.1. Virulencia en el modelo de <i>Galleria mellonella</i>	94
6.1.2.2.1.1. Selección de la dosis infectiva	94
6.1.2.2.1.2. Curvas de supervivencia en <i>Galleria mellonella</i>	94
6.1.2.2.1.3. Evaluación de la carga fúngica	95
6.1.2.2.1.4. Actividad lítica de la hemolinfa	96
6.1.2.2.2. Virulencia en modelo de ratón	96
6.1.2.2.2.1. Caracterización de la infección con H99-1 y H99-3	98
6.1.2.2.2.1.1. Estudio de la morfología de <i>C. neoformans</i> en los pulmones.....	98
6.1.2.2.2.1.2. Análisis del peso de pulmones y cerebros	100
6.1.2.2.2.1.3. Carga fúngica en pulmones y cerebros.....	100
6.1.2.2.2.1.4. Histopatología en pulmones	102
6.1.2.2.2.1.5. Cuantificación de la producción de citoquinas	105
6.1.2.2.2.1.5.1. Producción de citoquinas en pulmón	105
6.1.2.2.2.1.5.2. Producción de citoquinas en cerebro	105
6.1.3. Estudio de la cápsula de <i>C. neoformans</i>	108
6.1.3.1. Unión del anticuerpo 18B7 a la cápsula	108
6.1.3.2. Estudio de la producción de exopolisacárido (EPS).....	108
6.1.3.2.1. Estructura del EPS determinada mediante RMN	109
6.1.4. Otros fenotipos de virulencia	111
6.1.4.1. Producción de vesículas extracelulares	112
6.1.4.2. Estado metabólico de las levaduras	112
6.1.4.3. Secreción de enzimas: ureasa y fosfolipasa	113
6.1.4.4. Análisis de sensibilidad a estrés oxidativo	114
6.1.5. Mecanismos moleculares involucrados en titanización.....	115
6.1.5.1. Análisis genómico	115
6.1.5.2. Secuenciación del gen <i>BWC2</i> en la variante H99-3.....	116
6.1.5.3. Implicación del gen <i>BWC2</i> en titanización	118
6.1.5.3.1. Reinserción del gen <i>BWC2</i> en la variante H99-3.....	118
6.1.5.3.2. Deleción del gen <i>BWC2</i>	121
6.1.5.3.2.1. Mutante <i>bwc2</i> en la variante H99-YSB	121
6.1.5.3.2.2. Mutante <i>bwc2</i> en la variante H99-2	122
6.1.5.3.2.3. Fenotipo del mutante <i>bwc2</i> en el fondo genético H99.....	123
6.1.5.3.2.4. Mutante <i>bwc2</i> en el fondo genético KN99	124
6.1.5.4. Implicación del gen <i>CNAG_04756</i> en titanización	125

6.1.5.4.1. Deleción del gen <i>CNAG_04756</i>	125
6.1.5.4.2. Mutante <i>cnag_04756</i> en el fondo genético KN99	128
6.1.5.5. Implicación del gen <i>BWC1</i> en titanización	128
6.1.5.6. Efecto de la luz en la titanización de <i>C. neoformans</i>	131
6.1.5.7. Estudio de la expresión génica mediante secuenciación del ARNm.....	134
6.1.5.7.1. Determinación de las condiciones de ensayo	134
6.1.5.7.2. RNA-seq	134
6.2. Sección 2: Inhibición farmacológica de las células titanes.....	139
6.2.1. Efecto del DMSO en <i>C. neoformans</i>	139
6.2.1.1. Efecto del DMSO durante la titanización de <i>C. neoformans</i>	139
6.2.1.2. Crecimiento de <i>C. neoformans</i> en presencia de DMSO	140
6.2.2. Estandarización del protocolo para el cribado de compuestos	141
6.2.2.1. Lactofucsina como reactivo de visualización	141
6.2.2.2. Rastreo fenotípico de los compuestos de la colección de Prestwick	142
6.2.3. Identificación y categorización de los compuestos	142
6.2.4. Selección de compuestos.....	143
6.2.5. Confirmación de compuestos	144
6.2.6. Efecto de los compuestos en la viabilidad de <i>C. neoformans</i>	146
6.2.7. Efecto de otros antioxidantes: ácido ascórbico y N-acetilcisteína	148
6.2.8. Detección de ROS durante la formación de células titanes	148
6.2.9. Detección de ROS durante la titanización en presencia de ácido retinoico.....	150
6.2.10. Estudio de la mitocondria durante la formación de células titanes.....	151
6.2.10.1. Detección del potencial de membrana mitocondrial	151
6.2.10.2. Respiración mitocondrial	153
6.2.10.2.1. Optimización del ensayo: densidad celular	153
6.2.10.2.2. Respiración mitocondrial durante la formación de células titanes.....	154
6.2.10.3. Morfología de la mitocondria durante la formación de células titanes	154
6.2.10.3.1. Tinción con MitoTracker	154
6.2.10.3.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	156
6.2.11. Efecto del ácido retinoico en la titanización de distintas cepas de <i>Cryptococcus</i>	157
6.2.12. Detección de ROS en cepas con diferente capacidad de titanización	159
7. DISCUSIÓN	161
7.1. Asociación entre morfogénesis y virulencia.....	163
7.2. Mecanismos moleculares involucrados en la formación de células titanes	167

7.2.1. Análisis genómico de las variantes de la cepa H99	167
7.2.2. Expresión génica durante la formación de células titanes	171
7.3. Inhibición farmacológica de las células titanes	173
7.4. Integración de los resultados obtenidos en las distintas secciones	178
8. CONCLUSIONES	183
9. BIBLIOGRAFÍA	187
10. MATERIAL SUPLEMENTARIO	213

1. Abreviaturas

A

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
AmB	Anfotericina B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Ácido Retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ART	Terapia Antirretroviral (<i>Antiretroviral Therapy</i>)
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)

B

BHE	Barrera Hematoencefálica
BSA	Álbumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BWC1/BWC2	Basidiomiceto White collar 1/ Basidiomiceto White collar 2

C

CPS	Polisacárido capsular (<i>Capsular Polysaccharide</i>)
Ctrl	Control

D

d	Día
DAG	Diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
D.O.	Densidad Óptica
DHF	Diacetato de Dihidrofluoresceína

E

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE. UU.	Estados Unidos
EFI	Enfermedad Fúngica Invasora
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMA	Agencia Europea del Medicamento (<i>European Medicines Agency</i>)
EPS	Exopolisacárido

F

FAD	Dinucleótido de Flavina y Adenina
FBS	Suero Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
5-FC	5-Flucitosina
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FL-1/FL-2	Fluorescencia en el canal 1/Fluorescencia en el canal 2
FSC	<i>Forward Scatter</i>

G

<i>g</i>	Gravedad
g	Gramos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GXM	Glucuronoxilomanano
GXMGal	Glucuronoxilomananogalactano
GST	Glutación S-Transferasa

H

h	Horas
---	-------

I

IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
IFN- γ	Interferon γ
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
ISCI	Instituto de Salud Carlos III

J

JC-1	Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
------	--

K

kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
KO	Inactivación génica (<i>Knockout</i>)
kV	Kilovoltio

L

L	Litro
LOV	Dominio Luz-Oxígeno-Voltaje
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina

M

M	Molar
MCA	Análisis de Correspondencias Múltiples (<i>Multiple Correspondence Analysis</i>)
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
mL	Mililitro
MM	Medio Mínimo
mm	Milímetro
μ L	Microlitro
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (<i>Multilocus sequence typing</i>)
μ m	Micrómetro o micra
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
Mut	Mutante

N

nm	Nanómetros
ns	No significativo

O

OCR	Consumo de Oxígeno (<i>Oxygen Consumption Rate</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud

P

PAS	Dominio Per-Arnt-Sim
pb	Pares de bases
PBS	Tampón Fosfato Salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído o p-formaldehído
pg	Picogramo
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
pmol	Picomol
ppm	Partes por millón
PS	Polisacárido
psi	Libra por pulgada cuadrada (<i>pound per square inch</i>)

Q

QS	<i>Quorum Sensing</i>
----	-----------------------

R

Ref	Referencia
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA-seq	Secuenciación del ARN (<i>RNA sequencing</i>)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
®	Marca registrada

S

Sab	Sabouraud
SARS-CoV-2	Síndrome Agudo Respiratorio Severo Coronavirus 2
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
Sec	Secuencia
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema Nervioso Central
SRG	Grupo estructural de reporte (<i>Structural-Reporter Group</i>)
SSC	<i>Side Scatter</i>

T

TCM	Medio inductor de células titanés (<i>Titan Cells Medium</i>)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission electron microscopy</i>)
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2

Abreviaturas

Th17	Linfocitos T helper 17
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
™	Marca registrada

U

U	Unidades de enzima
UFCs	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta

V

var.	Variedad
VEs	Vesículas Extracelulares
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

W

WC-1/2	White collar 1/White collar 2
--------	-------------------------------

X

X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
-------	---

Y

YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast-extract Peptone Dextrose</i>

2. Resumen/Summary

Estudio de las bases moleculares y de los factores que inducen cambios morfológicos en *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans es un hongo cosmopolita ambiental perteneciente a la familia de los basidiomicetos que puede causar enfermedad en personas inmunodeprimidas, principalmente en pacientes VIH⁺. La infección se adquiere por la inhalación de esporas o levaduras desecadas que llegan a los pulmones. En casos de inmunosupresión, las levaduras pueden diseminarse, teniendo especial tropismo por el cerebro y causando el cuadro clínico más severo de la criptococosis, una meningoencefalitis que puede llegar a ser letal si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Este hongo posee distintos mecanismos de virulencia que le ayudan a sobrevivir en el huésped, siendo el más característico la presencia de una cápsula de polisacárido que rodea el cuerpo celular. Además, puede cambiar drásticamente de tamaño y generar una población heterogénea durante la infección, lo que favorece la evasión del sistema inmunitario y la adaptación al hospedador. Esta levadura es capaz de aumentar su tamaño celular, lo cual puede producirse de varias maneras. Por un lado, puede aumentar el tamaño de su cápsula, y por otro, puede aumentar tanto el cuerpo celular como la cápsula, formando las denominadas células titanes (mediante un proceso denominado titanización). Durante la infección en humanos, estas células tienen un diámetro de entre 50–70 μm , pudiendo alcanzar hasta 100 μm . Son poliploides y tienen una cápsula más densa y una pared celular engrosada. Son mucho más resistentes a factores de estrés que las células de menor tamaño, sin embargo, la contribución exacta de estas células en la infección y enfermedad, así como los mecanismos moleculares que regulan su formación, no están totalmente caracterizados, haciendo fundamental su estudio.

Los objetivos principales de este trabajo han sido investigar el papel de las células titanes en virulencia y caracterizar los mecanismos moleculares que intervienen en su formación.

En nuestro laboratorio disponíamos de diferentes variantes de la cepa de referencia H99 de *C. neoformans*, procedentes de distintos laboratorios. Pudimos comprobar que estas cepas isogénicas mostraron distinta capacidad de titanización *in vitro*, confirmando que habían sufrido microevolución, y siendo la variante H99-3 la que mayor cantidad de células titanes formó. Para investigar la asociación de las células titanes con la patogénesis se testó la virulencia de las distintas variantes en modelos animales. Estudios en el lepidóptero *Galleria mellonella* permitieron definir grupos de virulencia, seleccionando las dos variantes H99 que mostraron mayores diferencias (H99-1 y H99-3, con mayor y menor virulencia, respectivamente) para posteriormente realizar experimentos en modelos murinos. Tras los ensayos en ratones, demostramos que la variante H99-1 poseía mayor virulencia y menor proporción de células titanes, mientras que el comportamiento de la variante H99-3 fue el inverso, permitiendo determinar una asociación inversa entre la existencia de células titanes y virulencia.

Tras las diferencias morfológicas y de virulencia obtenidas con las distintas variantes H99, se decidió llevar a cabo un análisis genómico para estudiar las mutaciones que poseía cada cepa e intentar identificar genes involucrados en la formación de células titanes. Las diez variantes H99 procedían de un mismo aislado clínico inicial, por lo que su fondo genético similar permitiría la identificación de genes relacionados con el proceso de titanización. Tras

los resultados obtenidos en la secuenciación masiva, se decidió profundizar en el estudio de algunos genes mediante la obtención de mutantes por transformación biolística, identificándose tres genes implicados en la transición a célula titán. Los genes *BWC1* y *BWC2*, que codifican un complejo regulador de la transcripción y cuya actividad depende de la presencia de luz, mostraron actividad represora de la titanización, mientras que el gen *CNAG_04756* fue inductor de dicho proceso. Dada la relación del complejo Bwc1/Bwc2 con respuestas a la luz, se quiso investigar el posible efecto de esta en la titanización, encontrándose que la luz inducía el crecimiento celular en cepas silvestres, pero, sin embargo, dicho proceso era inhibido en ausencia de los genes *BWC1* y *BWC2*.

Además, se llevaron a cabo estudios de expresión génica mediante secuenciación masiva del ARN (RNA-seq) para identificar nuevos genes implicados en la formación de células titanes *in vitro*, y se buscaron genes cuya expresión estuviese regulada por el gen *BWC2*. Se utilizaron distintas cepas (H99 y KN99) y sus respectivos mutantes *bwc2*, y tras un análisis cinético comparativo, se obtuvieron genes cuya expresión tuvo un comportamiento similar en ambas cepas. Los genes *CNAG_05278* y *CNAG_05279* se sobreexpresaron en las cepas parentales, mientras que los genes *CNAG_04585*, *CNAG_03848* y *CNAG_00165* aparecieron sobreexpresados en las cepas mutantes. Esto indicó una implicación directa de estos genes en el proceso de titanización, y su caracterización en detalle será objeto de estudio en futuras investigaciones.

En la segunda parte de este trabajo se llevó a cabo una inhibición farmacológica de la formación de las células titanes para intentar elucidar dianas o rutas que estuvieran interviniendo en esta transición. Para ello, se utilizó la colección de compuestos químicos de Prestwick, que contiene 1.520 compuestos no sometidos a patente y seguros en humanos. Se diseñó un ensayo basado en fluorescencia para llevar a cabo el cribado de estos fármacos, utilizando la lactofucsina, que tiñó las células con fluorescencia roja. Además, se diseñó una estrategia de análisis de imagen que permitió identificar las levaduras y medir su tamaño de forma automatizada. Tras el cribado de la colección, se obtuvieron alrededor de 100 compuestos inhibidores de la formación de células titanes. Se seleccionaron 10 de ellos, los cuales se confirmaron como inhibidores de la titanización. Llamó la atención que varios compuestos inhibitorios eran antioxidantes, lo que sugirió un posible papel de los radicales libres durante la formación de las células titanes. Para confirmar esta hipótesis, se seleccionó uno de los antioxidantes obtenidos durante el cribado, el ácido retinoico, y se llevaron a cabo distintos ensayos. Se observó que durante la formación de células titanes hubo una mayor acumulación de radicales libres, la cual no se observó en presencia de ácido retinoico. Puesto que la mitocondria es el principal orgánulo donde se producen los radicales libres, llevamos a cabo una caracterización de su funcionalidad durante el proceso de formación de células titanes. Se observaron cambios en la organización espacial de la mitocondria, apareciendo un patrón tubular, además de un aumento en el tamaño de este orgánulo y un aumento del número de crestas mitocondriales. También se encontraron cambios en el potencial de membrana y un incremento en la respiración. Esta segunda parte del trabajo permitió confirmar que la acumulación de radicales libres endógenos, lo cual ocurre por un aumento de la actividad mitocondrial, es una de las señales necesarias para iniciar el desarrollo de las células titanes.

Characterization of the molecular basis and factors that induce morphological changes in *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans is an environmental cosmopolitan fungus belonging to the basidiomycete family that can cause disease in immunocompromised people, especially HIV⁺ patients. Spores or desiccated yeasts from the environment are inhaled and can colonize the lungs. In cases of immunosuppression, *C. neoformans* can disseminate, having special tropism for the brain, where it can cause the most severe clinical presentation of cryptococcosis, a cryptococcal meningitis that can become lethal if not diagnosed and treated on time. This pathogenic yeast has different traits that contribute to its survival in the host. Among its virulence factors, the most characteristic phenotypic feature is the presence of a polysaccharide capsule that surrounds the cell body and protects the fungus during infection. In addition, this yeast can drastically change in size, resulting in a heterogeneous population, which also favours the evasion of the immune system and adaptation to the host. Cell size increase can occur through two mechanisms. On one hand, it can increment the size of the capsule, and on the other, it can increase both the cell body and the capsule, forming the so-called titan cells. During infection in humans, these cells diameter can range between 50-70 μm , being able to reach up to 100 μm . Titan cells are polyploid and have a denser capsule and a thickened cell wall, being much more resistant to stress factors than smaller cells. However, the exact contribution of these cells to infection and disease, as well as the molecular mechanisms that regulate their formation, are not fully characterized.

The main objectives of this work have been the investigation of the role of titan cells in virulence and the identification of molecular mechanisms involved in the titanization process.

At the beginning of this work, we had in our laboratory different variants of the H99 *C. neoformans* reference strain from different groups. We were able to verify that these isogenic strains showed different titanization capacity *in vitro*, confirming that they had undergone microevolution, and being H99-3 the one that showed the greatest capacity to form titan cells. To investigate the association between titan cells and pathogenesis, the virulence of the different variants was tested in animal models. Studies in the lepidopteran *Galleria mellonella* allowed us to define virulence groups, selecting the two H99 variants that showed the greatest differences (H99-1 and H99-3, with higher and lower virulence, respectively) to perform experiments in murine models. In mice, the H99-1 variant had higher virulence and lower proportion of titan cells, while the H99-3 strain showed the opposite behaviour. In this way, we were able to demonstrate that there is an inverse association between the presence of a high proportion of titan cells and virulence.

Since the different variants of the H99 strain showed differences in morphogenesis and virulence, we decided to sequence their genomes using Illumina technology and performed a bioinformatic analysis to identify genes involved in titanization. After the identification of different mutations in each variant, we decided to characterize in detail the role of some of these genes by obtaining mutants using biolistic transformation. In this way, we identified three new genes involved in titanization. The *BWC1* and *BWC2* genes (which encode a transcription-regulating complex and whose activity depends on the presence of light) were repressors of titan cell formation, while the *CNAG_04756* gene was an activator of this

process. Given the relationship of the Bwc1/Bwc2 complex with responses to light, we wanted to investigate the possible effect of the light on titanization. Light was found to induce cell growth in wild-type strains, but this process was inhibited in the absence of the *BWC1* and *BWC2* genes.

In addition, we carried out gene expression studies performing RNA-seq to find new genes involved in the titanization process *in vitro* and whose expression was regulated by the *BWC2* gene. Different strains (H99 and KN99) and their respective *bwc2* mutants were used, and after a comparative kinetic analysis, genes that showed a common behaviour in both strains were obtained. The *CNAG_05278* and *CNAG_05279* genes were overexpressed in the wild-type strains, while the *CNAG_04585*, *CNAG_03848*, and *CNAG_00165* genes were overexpressed in the *bwc2* mutant strains. This indicated a direct involvement of these genes in the titanization process, and their detailed characterization will be studied in future research.

In the second part of this work, we performed a pharmacological inhibition of the formation of titan cells to try to elucidate targets or pathways involved in this transition. For this purpose, we screened the Prestwick Chemical Library, which contains 1,520 off-patent compounds. We developed a fluorescence-based microscopy assay using lactofuchsin staining, a reagent that provided red fluorescence to the yeasts and which allowed us to apply an automated image analysis pipeline for the identification and measurement of yeast sizes. We obtained approximately 100 compounds that inhibited titan cells and selected 10 for further analysis. The 10 selected compounds were confirmed as titanization inhibitors. We found that several inhibitory compounds were antioxidants, suggesting a possible role for free radicals during the formation of titan cells. To confirm this hypothesis, one of the compounds obtained during the screening, retinoic acid, was selected and different studies were carried out. We found that during the formation of titan cells there was an accumulation of free radicals, which were inhibited in the presence of retinoic acid. Since the mitochondrion is the main organelle where free radicals are produced, we studied this compartment, finding that during titanization this organelle underwent significant changes. In titan cells, mitochondria showed a tubular pattern, and they were also significantly larger and with more compacted cristae. In addition, changes in membrane potential and an increase in respiration were also found. This second part of the work confirmed that the accumulation of endogenous free radicals, which occurs by an increase in mitochondrial activity, is a key signal to initiate the development of titan cells.

3. Introducción

3.1. Desarrollo de las enfermedades fúngicas invasoras

Los hongos microscópicos son microorganismos que se encuentran de manera ubicua en el ambiente, donde tienen funciones importantes ayudando al mantenimiento de los ecosistemas (Zeilinger *et al.*, 2016). En el caso de la interacción con los humanos, existen géneros y especies capaces de causar enfermedad en las personas. Clásicamente, los hongos han sido comúnmente asociados con infecciones superficiales de piel y mucosas, como tiñas, vaginitis o infecciones oculares, las cuales se estima que afectan a un billón de personas anualmente (Havlickova *et al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos años ha aumentado significativamente la incidencia de las enfermedades fúngicas invasoras (EFIs), causando enfermedades graves y provocando la muerte de aproximadamente 1,5 millones de personas (Brown *et al.*, 2012).

Las EFIs están normalmente asociadas a casos de inmunosupresión. La creciente aparición de enfermedades y los avances en la medicina, con la consiguiente aplicación de terapias inmunosupresoras, han provocado un aumento en el número de pacientes inmunodeprimidos, apareciendo distintos grupos de riesgo, como enfermos de VIH/SIDA, pacientes oncológicos, pacientes sometidos a trasplante de órganos o en tratamiento con corticoesteroides, pacientes con nutrición parenteral o catéteres, o aquellos con cirugías graves o ingresados en las unidades de cuidados intensivos (Perfect *et al.*, 2010; Sorrell *et al.*, 2010). Más recientemente se ha producido un cambio en la epidemiología, surgiendo nuevos grupos de riesgo susceptibles a sufrir EFIs (Rayens *et al.*, 2022), entre los que se encuentran enfermos con asma (Denning, 2006) o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Molinos-Castro *et al.*, 2020), diabetes no controlada (Rodrigues *et al.*, 2019), fumadores (Pourbaix *et al.*, 2020), infección por el virus de la gripe (Coste *et al.*, 2021), o en estos últimos años, incluso pacientes con infección por SARS-CoV-2 (Hoenigl *et al.*, 2022; Gold *et al.*, 2023). Este incremento en los grupos de riesgo hace que las EFIs supongan un gran problema para la salud pública, contribuyendo al aumento de la morbilidad y mortalidad, y al gasto económico (Drgona *et al.*, 2014; Benedict *et al.*, 2019).

Además, en los últimos años se han identificado nuevas especies, como *Candida auris*, capaces de causar enfermedad (Bongomin *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2019; Friedman and Schwartz, 2019; Arastehfar *et al.*, 2020). Se piensa que existen varias razones que influyen en la selección de nuevas especies patógenas. El uso de antifúngicos en clínica durante décadas ha provocado la aparición de nuevas especies resistentes a la actual terapia antifúngica. Por otro lado, se ha postulado que los cambios ambientales que se han producido en las últimas décadas, como el cambio climático, han favorecido la adaptación de los hongos a nuevos nichos ecológicos (Smith and Casadevall, 2023), confiriéndolos una ventaja selectiva para su posterior adaptación al cuerpo humano. Por ejemplo, se piensa que el aumento de la temperatura en el planeta debida al cambio climático ha permitido a algunas especies desarrollar mayor termotolerancia y con ello, adquirir la capacidad de infectar a las personas (García-Solache and Casadevall, 2010; Nnadi and Carter, 2021; Smith and Casadevall, 2023), lo cual podría, en un futuro, derivar a un drástico incremento en el número de especies capaces de causar infección grave en humanos.

3.2. Hongos patógenos humanos

Los hongos son un grupo de microorganismos que surgieron hace 1,6 millones de años (Wang *et al.*, 1999) y están distribuidos por distintos ambientes, llevando a cabo una gran cantidad de funciones para el planeta, tanto beneficiosas como perjudiciales. Se estima que hay alrededor de 5 millones de especies de hongos (Blackwell, 2011), de las cuales aproximadamente 500 pueden causar enfermedad en humanos (Köhler *et al.*, 2017) y solo algunas de ellas provocan micosis importantes (García-Solache and Casadevall, 2010; Siscar-Lewin *et al.*, 2022).

La mayoría de los hongos son saprófitos, pero en casos de inmunosupresión, algunos pueden actuar como hongos oportunistas y causar enfermedad en humanos (Köhler *et al.*, 2017). Los hongos oportunistas más comunes están divididos en dos grupos. Por un lado, las levaduras, entre las cuales destacan las especies del género *Candida* y *Cryptococcus*, y por otro lado, los hongos filamentosos, donde destacan las especies del género *Aspergillus*. Además de estos dos grupos, también existe otro grupo de hongos que son capaces de afectar tanto a pacientes inmunodeprimidos como inmunocompetentes (Woods, 2001). Estos son los hongos dimórficos primarios, donde se encuentran principalmente las especies *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Sporothrix schenckii* o *Sporothrix brasiliensis*. Por otra parte, algunos hongos son comensales, por lo que se encuentran en nuestro organismo. Este es el caso de algunas especies del género *Candida* (Siscar-Lewin *et al.*, 2022), que se encuentran en las mucosas y en el tracto intestinal, siendo responsable de las enfermedades más frecuentes causadas por levaduras.

Dada la creciente aparición de las EFIs, es necesaria una respuesta que permita impulsar avances en investigación y desarrollo para el mantenimiento de la salud pública. Por ello, recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado por primera vez una lista de patógenos fúngicos de interés prioritario (Tabla 1) como un impulso global para priorizar las enfermedades causadas por estos microorganismos (World Health Organization, 2022). En esta lista, los patógenos se han clasificado en tres grupos de prioridad: 1) prioridad crítica, 2) alta, y 3) media, según su repercusión en la salud pública y el riesgo de aparición de resistencias a los antifúngicos existentes.

Tabla 1. Lista de patógenos fúngicos prioritarios de la OMS.

Prioridad crítica	Prioridad alta	Prioridad media
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	<i>Scedosporium</i> spp.
<i>Candida auris</i>	<i>Histoplasma</i> spp.	<i>Lamentospora</i> <i>prolificans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Agentes causales de Eumycetoma	<i>Coccidioides</i> spp.
<i>Candida albicans</i>	Mucorales	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Cryptococcus gattii</i>
	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Talaromyces marneffe</i>
	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
		<i>Paracoccidioides</i> spp.

3.3. Virulencia fúngica y morfogénesis

La virulencia de los hongos patógenos es muy compleja, y en ella participan múltiples factores, tanto intrínsecos del hongo como pertenecientes al hospedador (Casadevall and Pirofski, 2003; Casadevall and Pirofski, 2015). Durante la infección, el hospedador genera una respuesta innata y adaptativa, las cuales son cruciales para determinar si el patógeno es eliminado o, si por el contrario, sobrevive y desarrolla enfermedad (Robert and Casadevall, 2009; Casadevall, 2020). Por otro lado, los hongos tienen mecanismos propios mediante los cuales pueden evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y causar enfermedad. En primer lugar, son capaces de producir factores de virulencia, definidos como los elementos del patógeno que causan daño en el huésped (Pirofski and Casadevall, 2015). Algunos de estos factores de virulencia pueden ser enzimas líticas, como lipasas y proteasas; o toxinas, como péptidos y pequeños metabolitos (Brunke *et al.*, 2016). Además, también son capaces de adaptarse al ambiente metabólico del hospedador y proliferar. El principal factor al que tienen que adaptarse es la temperatura del cuerpo humano. La gran mayoría de los hongos se encuentran normalmente en el ambiente con una temperatura máxima de alrededor de 30 °C, por lo que solo serán hongos patógenos humanos aquellos capaces de crecer a la temperatura fisiológica (Robert and Casadevall, 2009). Además, para que la infección prospere, tienen que ser capaces de adaptarse a cambios de pH, diferentes fuentes de nutrientes, concentraciones de gases como CO₂ y O₂ o incluso distintos factores de estrés como son los radicales libres (Trevijano-Contador *et al.*, 2016).

Una característica especial de los hongos es su capacidad de cambiar de morfología, lo cual les supone una gran ventaja durante la infección. Estas transiciones morfológicas pueden suceder de dos formas. Por un lado, pueden cambiar la forma de las células, generando distintas estructuras, como por ejemplo hifas, pseudohifas, filamentos, esporas o blastoconidias (Kurtzman and Fell, 1998), pero también pueden cambiar el tamaño de las células sin cambiar su forma (Trevijano-Contador *et al.*, 2016; Li and Nielsen, 2017; Min *et al.*, 2020).

3.4. *Cryptococcus* y criptococosis

La criptococosis es una enfermedad fúngica sistémica causada por levaduras del género *Cryptococcus*, el cual comprende múltiples especies que se encuentran en el ambiente. De todas ellas, las principales especies de interés clínico son *C. neoformans* y *C. gattii* (Casadevall and Perfect, 1998), las cuales en la actualidad se consideran como un complejo de especies. Aunque ambas tienen capacidad de causar enfermedad en humanos, se diferencian no solo a nivel genético o en cuanto a su distribución, sino también en el cuadro clínico que producen y en el tipo de pacientes a los que afectan. Las enfermedades causadas por *C. neoformans* están asociadas a pacientes inmunodeprimidos, en especial pacientes VIH⁺. Sin embargo, *C. gattii* tiene mayor capacidad de causar enfermedad en pacientes inmunocompetentes (Sorrell *et al.*, 2010). Ambos causan una neumonía, pero en *C. neoformans* el cuadro clínico suele derivar a una meningitis o meningoencefalitis criptocócica, mientras que en *C. gattii* esto solo ocurre en casos de inmunosupresión (Kwon-Chung *et al.*, 2014; May *et al.*, 2016; Altamirano *et al.*, 2020).

3.5. Clasificación de *C. neoformans/gattii*

Las especies del género *Cryptococcus* pertenecen a la familia de los basidiomicetos y fueron por primera vez descritos en 1894, en una lesión infectada de la tibia de una mujer (Busse, 1894) y en un zumo de melocotón (Sanfelice, 1894). Inicialmente, estos autores lo nombraron como *Saccharomyces*, pero en 1902, Jean-Paul Vuillemin lo reclasificó como *Cryptococcus* (Vuillemin, 1901). A partir de aquí, *C. neoformans* fue adquiriendo distintos nombres (revisado en (Kwon-Chung *et al.*, 2014)). En 1946, se dividió en 3 serotipos (A, B y C) según las propiedades antigénicas de su cápsula de polisacárido (Evans, 1950), y posteriormente se describió un cuarto serotipo (D) (Wilson *et al.*, 1968). La presencia de distintos serotipos se asoció a distintas localizaciones geográficas y nichos ecológicos (Bennett *et al.*, 1977; Kaplan *et al.*, 1981), además de poseer diferencias en virulencia y morfología. Estas diferencias provocaron un agrupamiento de los serotipos A y D por un lado, bajo el nombre *C. neoformans* var. *neoformans*, y los serotipos B y C por otro, bajo el nombre *C. neoformans* var. *gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 1982a). Más tarde, el serotipo A se nombró *C. neoformans* var. *grubii* y el serotipo D se denominó *C. neoformans* var. *neoformans* (Franzot *et al.*, 1999). Además, *C. neoformans* var. *gattii* se elevó a la categoría de especie debido a las múltiples diferencias genéticas observadas, pasando a considerarse una especie distinta llamada *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2002; Kwon-Chung and Varma, 2006). También se han descrito híbridos entre los serotipos AD, AB y BD (Wilson *et al.*, 1968; Lengeler *et al.*, 2001; Boekhout *et al.*, 2001; Bovers *et al.*, 2006; Aminnejad *et al.*, 2012).

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y el genotipado de múltiples cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* reveló que cada especie estaba compuesta por grupos genéticamente diferentes (Meyer *et al.*, 2010). *C. neoformans* var. *grubii* contenía los tipos moleculares VNI y VNII (serotipo A), mientras que *C. neoformans* var. *neoformans* contenía VNIV (serotipo D). El híbrido AD de estas dos variedades era VNIII. Por otro lado, *C. gattii* poseía los tipos moleculares VGI y VGII, que normalmente correspondían con el serotipo B, y los tipos VGIII y VGIV, que correspondían con el tipo C (revisado en (Kwon-Chung *et al.*, 2014)).

Recientemente, gracias al avance de las técnicas de biología molecular y secuenciación masiva, se ha concluido que las diferencias encontradas entre las diferentes variedades y genotipos justifican la separación en nuevas especies, tal y como se describe en la Tabla 2. (Hagen *et al.*, 2015; Hagen *et al.*, 2017). Aun así, hay autores que están en contra de esta clasificación y que sugieren agrupar a las especies de *Cryptococcus* en dos grupos o complejos: especies del complejo *C. neoformans* y especies del complejo *C. gattii*, reconociendo así la diversidad genética pero minimizando posibles inestabilidades de la nomenclatura (Kwon-Chung *et al.*, 2017).

Tabla 2. Clasificación del complejo *Cryptococcus neoformans/gattii*. Adaptado de (Hagen *et al.*, 2015).

Clasificación antigua	Nueva clasificación	PCR <i>fingerprinting</i> / Genotipado RFLP	Clado MLST/ Genotipado AFLP
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (Serotipo A)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	VNI	Clado F, AFLP1
		VNII	Clado G, AFLP1A/VNB
		VNII	Clado H, AFLP1B
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (Serotipo D)	<i>Cryptococcus deneoformans</i>	VNIV	Clado I, AFLP2
<i>Cryptococcus neoformans</i> híbrido intervariedades (Serotipo AD)	<i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus deneoformans</i> híbrido	VNIII	AFLP3
<i>Cryptococcus gattii</i> (Serotipo B y C)	<i>Cryptococcus gattii</i>	VGI	Clado D, AFLP4
	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	VGII	Clado A, AFLP6
	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	VGIII	Clado C, AFLP5
	<i>Cryptococcus tetragattii</i>	VGIV	Clado E, AFLP7
	<i>Cryptococcus decagattii</i>	VGIV/VGIIIc	Clado B, AFLP10
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP4/VGI híbrido	<i>Cryptococcus deneoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> híbrido	-	AFLP8
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus</i> <i>gattii</i> AFLP4/VGI híbrido	<i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i> híbrido	-	AFLP9
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus</i> <i>gattii</i> AFLP6/VGII híbrido	<i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus deuterogattii</i> híbrido	-	AFLP11

3.6. *Cryptococcus neoformans*

De las especies descritas anteriormente, la más importante a nivel clínico es *C. neoformans*, ya que es la más prevalente a nivel mundial. En las siguientes secciones se resumirán las principales características de esta levadura y sus principales mecanismos de virulencia.

3.6.1. Distribución e incidencia

Cryptococcus neoformans es una levadura cosmopolita que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Ya desde el siglo XIX fue descrita como agente causal de enfermedad (revisado en (Heitman *et al.*, 2011)), pero su incidencia aumentó significativamente a finales del siglo XX debido a la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), siendo la infección fúngica oportunista más importante entre estos pacientes (Casadevall and Perfect, 1998). Tras el desarrollo de la terapia antirretroviral (ART) en 1996, en algunas regiones desarrolladas se consiguió disminuir el número de muertes causadas por la criptococosis en enfermos de VIH (Jongwutiwes *et al.*, 2007), pero aun así, hoy en día su incidencia sigue siendo particularmente significativa en regiones en vías de desarrollo. La actualización más reciente estima que la carga fúngica global de este hongo en pacientes VIH⁺ causa alrededor de 152.000 casos totales de meningitis criptocócica al año y 112.000 muertes (Rajasingham *et al.*, 2022) (Figura 1). Dos tercios de estos casos ocurren en África, país donde además se dan el mayor número de muertes, seguido por países de Asia y regiones del Pacífico. En pacientes VIH⁺, el 19% de las muertes se asocian a la criptococosis

meningocócica, siendo solo superadas por las muertes causadas por tuberculosis (Rajasingham *et al.*, 2017; Rajasingham *et al.*, 2022), lo que muestra la necesidad de implementar nuevas medidas que permitan controlar esta enfermedad.

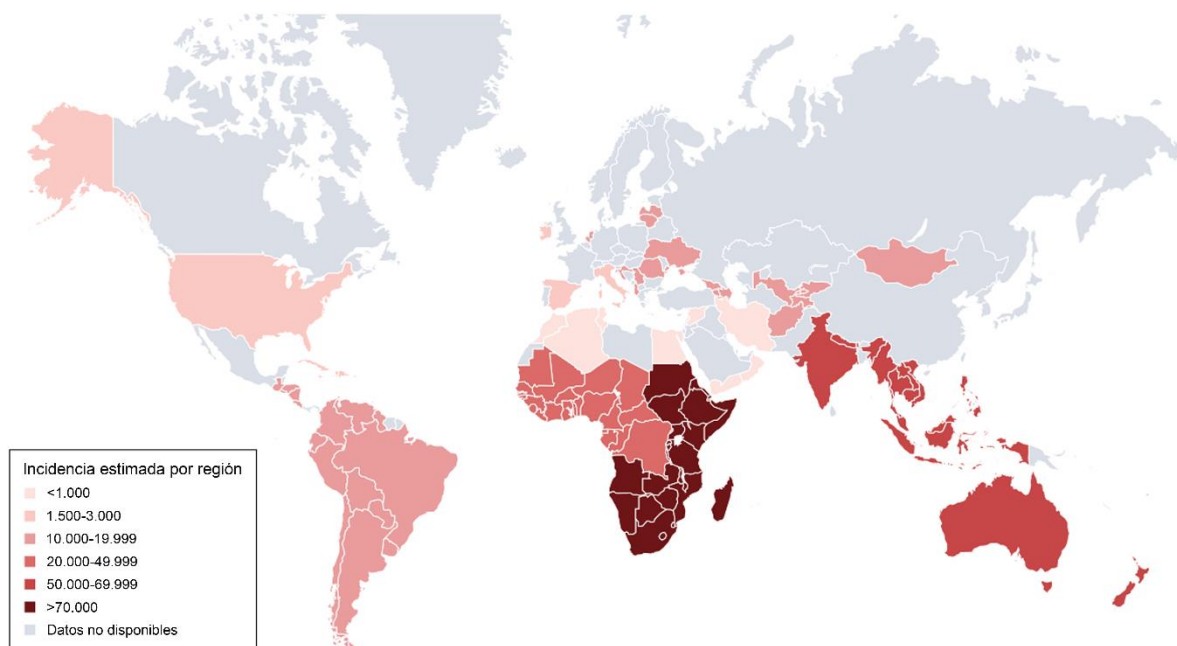


Figura 1. Mapa global de la incidencia anual de la meningitis criptocócica en pacientes VIH⁺. Estimación del número total de casos en el año 2020 de meningitis criptocócica en pacientes VIH⁺ con un conteo de células T CD4⁺ inferior a 200 células/μL y una antigenemia criptocócica de células T CD4⁺ inferior a 200 células/μL. Datos obtenidos de (Rajasingham *et al.*, 2022). Figura adaptada de (Tugume *et al.*, 2023).

3.6.2. Infección, cuadro clínico y tratamiento

Esta levadura se encuentra en el ambiente en distintos nichos ecológicos, sobre todo en excrementos de palomas, suelos fangosos y en la corteza de algunos árboles (Casadevall and Perfect, 1998). Es capaz de infectar a una gran cantidad de hospedadores, por ejemplo predadores unicelulares como amebas o protozoos (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen *et al.*, 2003), nematodos (Mylonakis *et al.*, 2002), insectos (Apidianakis *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2005; García-Rodas *et al.*, 2011), aves (Sethi and Randhawa, 1968; Raso *et al.*, 2004; Refai *et al.*, 2017), plantas (Xue *et al.*, 2007; Girish Kumar *et al.*, 2010; Warpeha *et al.*, 2013), mamíferos, como delfines, koalas, caballos o gatos, y por supuesto, humanos (McGill *et al.*, 2009; Trivedi *et al.*, 2011; Venn-Watson *et al.*, 2012; Refai *et al.*, 2017). Estas interacciones plantean dos aspectos relevantes a considerar en la virulencia de *Cryptococcus*. En primer lugar, esta levadura no es específica de un hospedador, y en segundo lugar, se ha hipotetizado que los procesos involucrados en la virulencia que causa en los humanos han sido adquiridos y seleccionados gracias al gran número de interacciones ambientales que es capaz de establecer (Steenbergen *et al.*, 2001; Casadevall, 2012).

En el caso de los humanos, la infección se adquiere a través de la inhalación de esporas o levaduras desecadas (Giles *et al.*, 2009), las cuales se alojan en primer lugar en los pulmones (Figura 2). En pacientes inmunocompetentes, estas levaduras son controladas por el sistema inmunitario, causando una infección asintomática. No se sabe con certeza si *C. neoformans* es eliminado completamente o permanece en estado de latencia, pero hay evidencias de que puede adquirirse durante la infancia y perdurar en el pulmón durante años

sin causar enfermedad (Dromer *et al.*, 1992; Garcia-Hermoso *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 2007; Alanio, 2020). En individuos inmunodeprimidos, sobre todo pacientes VIH⁺, *C. neoformans* puede multiplicarse y colonizar los pulmones, causando una neumonía, pero también puede diseminarse a otros órganos, como hígado, bazo o cerebro, presentando especial tropismo hacia el cerebro. Puede llegar al sistema nervioso central (SNC), donde es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y causar meningitis criptocócica, el cuadro clínico más característico de la criptococosis. Si la enfermedad no es diagnosticada y tratada a tiempo, puede causar la muerte (Casadevall and Perfect, 1998; Heitman *et al.*, 2011).

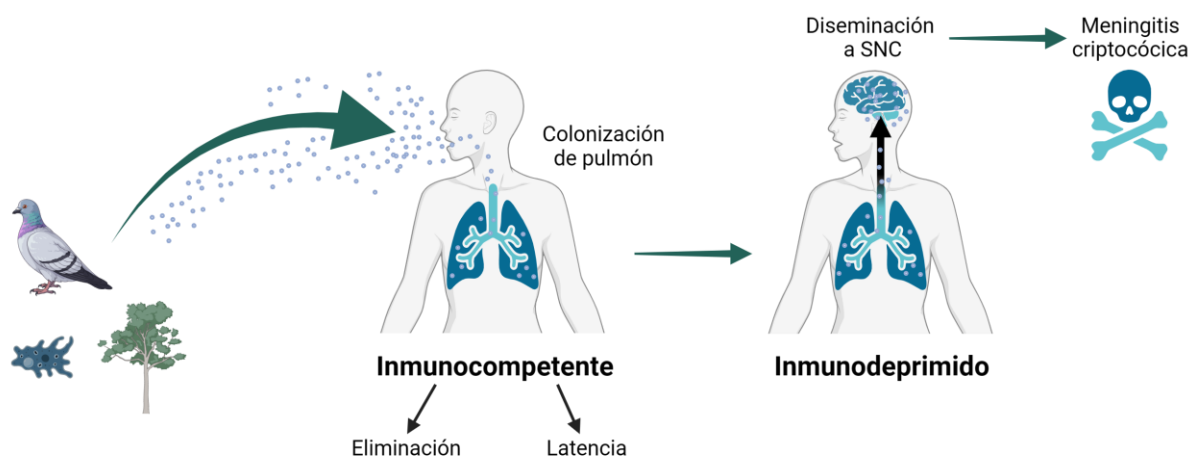


Figura 2. Infección por *C. neoformans*. Las esporas o levaduras desecadas procedentes de excrementos de palomas, suelos fangosos o la corteza de árboles son inhaladas por el ser humano y llegan al pulmón. En individuos inmunocompetentes se puede dar la eliminación de las levaduras o pueden quedar en estado de latencia, pero en pacientes inmunodeprimidos pueden diseminarse a SNC, causando una meningitis criptocócica que puede llegar a provocar la muerte. Figura creada con BioRender.com.

Incluso con tratamiento, la criptococosis meningocócica presenta un 20% de mortalidad (Arras *et al.*, 2017), pero además, dicho tratamiento supone un reto, ya que *C. neoformans* es intrínsecamente resistente a las equinocandinas. El tratamiento clásico frente a la criptococosis se lleva a cabo con tres familias de antifúngicos: 1) polienos, como la anfotericina B (AmB), 2) análogos de pirimidinas, como la flucitosina (5-FC), y 3) azoles, principalmente el fluconazol (Perfect *et al.*, 2010; Spadari *et al.*, 2020). La AmB ejerce su efecto fungicida mediante dos mecanismos, por una parte, se une al ergosterol de la pared celular y forma poros que llevan a la muerte celular, y por otro lado, induce la muerte celular mediante daño oxidativo (García-Barbazán and Zaragoza, 2021). La 5-FC forma metabolitos que bloquean la síntesis de ADN o se incorporan al ARN e interrumpen la síntesis de proteínas y por tanto, el crecimiento. El fluconazol inhibe la síntesis del ergosterol uniéndose a la enzima lanosterol 14 α -demetilasa, resultando en una acumulación de esteroides tóxicos (Gintjee *et al.*, 2020). La terapia de elección actual es la combinación de AmB junto con 5-FC, pero el uso de la AmB tiene inconvenientes, puesto que requiere una administración intravenosa y tiene alta toxicidad. Por ello, el tratamiento alternativo se basa en la combinación de 5-FC con fluconazol, que se administra vía oral y, por lo tanto, facilita la terapia, sobre todo en países en vías de desarrollo (Williamson *et al.*, 2017; Tugume *et al.*, 2023). Aunque efectivo, el tratamiento tiene problemas de accesibilidad, toxicidad y fallo clínico, por lo que es necesario encontrar nuevas estrategias terapéuticas.

Actualmente se están desarrollando fármacos nuevos para la meningoencefalitis criptocócica. Compuestos como el manogepix (APX001A), el opelconazole (PC945) o el APX2039 han demostrado buenos resultados frente a *Cryptococcus* spp. y están en fase clínica (Mourad and Perfect, 2018; Hoenigl *et al.*, 2021; Giamberardino *et al.*, 2022). Además, hay muchos grupos que están basándose en técnicas de reposicionamiento de fármacos para encontrar nuevos tratamientos. Estas técnicas consisten en buscar compuestos previamente aprobados para otros usos, por lo que suponen una alternativa más barata y rápida que el desarrollo de nuevas moléculas. En *C. neoformans* se han llevado a cabo un elevado número de ensayos que han permitido encontrar nuevos fármacos activos frente a esta levadura, pudiendo en un futuro ofrecer nuevas terapias para la criptococosis y mejorar así el pronóstico de esta enfermedad (Butts *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2023; De Oliveira *et al.*, 2022).

3.6.3. Adaptación al pulmón

Uno de los aspectos más importantes de la infección por *Cryptococcus* es su capacidad de supervivencia en el pulmón, siendo este el primer órgano colonizado tras la inhalación de las partículas infectivas. El pulmón es un órgano que está continuamente expuesto a sustancias exógenas que llegan tras ser inhaladas por las vías respiratorias, por lo que debe tener una respuesta inmunitaria muy potente y especializada para poder controlar estas moléculas. Los macrófagos alveolares son los encargados de fagocitarlas y controlarlas para que no causen ningún daño en el hospedador. Tras su inhalación, *C. neoformans* es capaz de evadir esta respuesta y sobrevivir, lo que sugiere que este patógeno ha adquirido mecanismos específicos para causar enfermedad utilizando el pulmón como ruta de entrada al hospedador (Esher *et al.*, 2018). En modelos animales, la mayoría de los hongos no son capaces de causar infección. Por ejemplo, en el caso de *Aspergillus fumigatus*, para que la infección prospere hay que causar una inmunosupresión previa a los ratones (Dixon *et al.*, 1989), y en *Candida albicans*, los ratones son capaces de eliminar totalmente la infección. Sin embargo, *C. neoformans* consigue colonizar los pulmones y diseminarse, poniendo de manifiesto la gran adaptación al pulmón que posee. Esto, junto con sus múltiples mecanismos de virulencia, permiten que este hongo consiga sobrevivir y desarrollar una infección en humanos.

3.6.4. Diseminación al cerebro

La diseminación de las levaduras al cerebro es un punto clave de la enfermedad puesto que permite el desarrollo de la meningoencefalitis criptocócica. Ocurre a través de los vasos sanguíneos, y *C. neoformans* es capaz de cruzar tanto las células epiteliales, para llegar al torrente sanguíneo, como las células endoteliales, para llegar al SNC. La BHE protege al cerebro de partículas exógenas, pero este hongo es capaz de atravesarla mediante diversos mecanismos (Esher *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022). Uno de los mecanismos consiste en atravesar la BHE en el interior de células fagocíticas, estrategia que se ha denominado “caballo de Troya” (Charlier *et al.*, 2009; Sorrell *et al.*, 2016; Santiago-Tirado *et al.*, 2017). También se puede dar penetración paracelular, mecanismo mediante el cual se deterioran las uniones entre las células endoteliales por una alteración del citoesqueleto, provocando la necrosis de dichas células (Chen *et al.*, 2003; Vu *et al.*, 2013). El último mecanismo se denomina transcitosis, y ocurre mediante la internalización de las levaduras desde el lumen de las células endoteliales de la BHE y su posterior liberación en la parte basal (Chang *et al.*,

2004; Shi *et al.*, 2010). Todos estos mecanismos pueden ocurrir, pero se desconoce la contribución de cada uno de ellos en la enfermedad (revisado en (Chen *et al.*, 2022)).

3.7. Mecanismos de virulencia de *C. neoformans*

Cryptococcus neoformans supone un modelo excepcional para investigar la virulencia fúngica por dos razones. En primer lugar, es una levadura que posee factores de virulencia bien conocidos, los cuales son capaces de inducir un efecto deletéreo en el hospedador y contribuir a la evasión del sistema inmunitario. Pero además, ha desarrollado mecanismos de adaptación al hospedador únicos entre los hongos, favoreciendo su supervivencia en este ambiente durante largos periodos de tiempo.

3.7.1. Factores de virulencia

Los factores de virulencia contribuyen a la patogénesis de *C. neoformans* y son capaces de modular la respuesta inmunitaria del hospedador. Entre los factores de virulencia más destacados se encuentran la formación de una cápsula de polisacárido y la producción de melanina, además de la secreción de diversas enzimas capaces de causar daño.

3.7.1.1. Cápsula

Cryptococcus presenta una característica única entre los hongos ya que posee una cápsula de polisacárido que rodea su pared celular. Esta cápsula se puede observar como un halo blanquecino alrededor del cuerpo celular al realizar la clásica tinción con tinta china. Se han descrito múltiples funciones y efectos de la cápsula en la biología de esta levadura, y por ello, se considera la estructura más importante involucrada en virulencia (McClelland *et al.*, 2006).

3.7.1.1.1. Composición y estructura de la cápsula

La cápsula de *C. neoformans* está compuesta mayoritariamente por polisacáridos. El polisacárido mayoritario es glucuronoxilomanano (GXM), que supone aproximadamente el 90% de su composición (Cherniak and Sundstrom, 1994), pero también contiene alrededor de 5–8% de glucuronoxilomanogalactano (GXMGal) y manoproteínas en un porcentaje minoritario (menos del 1%) (Cherniak *et al.*, 1980; Turner *et al.*, 1984). También se ha descrito la presencia de regiones lipofílicas, aunque poco se sabe aún sobre ellas (Sebolai *et al.*, 2007; Nicola *et al.*, 2009; Madu *et al.*, 2015).

El GXM es un polisacárido de gran tamaño (1.700–7.000 kDa) compuesto por una cadena principal lineal de manosas unidas mediante enlaces α -(1,3) con ramificaciones de ácido glucurónico y xilosas, unidas mediante enlaces β -(1,2) y β -(1,2) o β -(1,4), respectivamente (Merrifield and Stephen, 1980; Cherniak *et al.*, 1980; Cherniak *et al.*, 1988; Cherniak *et al.*, 1998; McFadden *et al.*, 2006a; McFadden *et al.*, 2007). Estas ramificaciones determinan los distintos serotipos de *C. neoformans/gattii* (A, B, C, D y AD) puesto que proporcionan diferencias antigénicas (Cherniak and Sundstrom, 1994). El GXMGal es un polímero más pequeño (aproximadamente 100 kDa) y está compuesto por galactosas unidas por enlaces α -(1,6) con ramificaciones de manosas, xilosas (Cherniak and Sundstrom, 1994; Vaishnav *et al.*, 1998) y ácido glucurónico (Heiss *et al.*, 2009).

El GXM y el GXMGal no solo se encuentran unidos a la célula formando la cápsula (polisacárido capsular o CPS), sino que también se secretan al exterior en forma de exopolisacárido (EPS). Durante décadas, el estudio de los polisacáridos se ha hecho a partir del EPS en el medio de cultivo, asumiendo que este polisacárido se originaba directamente de la cápsula. Sin embargo, más adelante se vio que el EPS y el CPS presentaban características físico químicas distintas (Frasés *et al.*, 2008).

Los polisacáridos son empaquetados en vesículas extracelulares (VEs) que se generan en el interior de la célula y que atraviesan la pared celular para ser expulsadas al exterior, liberando su contenido y favoreciendo el crecimiento de la cápsula (Rodrigues *et al.*, 2007). Además, pueden transportar otras moléculas como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, o incluso moléculas involucradas en virulencia, como las enzimas lacasa y ureasa (Rodrigues *et al.*, 2008). Se ha descrito que las VEs intervienen en la modulación de la interacción patógeno-hospedador (Oliveira *et al.*, 2010), por lo que también son importantes para la patogénesis de *C. neoformans*.

3.7.1.1.2. Cápsula como factor de virulencia

La obtención de mutantes acapsulares y la purificación del exopolisacárido han permitido determinar la importancia de la cápsula en la virulencia de *C. neoformans*. Múltiples estudios han demostrado que cepas acapsulares son avirulentas en modelos animales (Fromtling *et al.*, 1982; Chang and Kwon-Chung, 1994), lo cual se debe a diferentes razones. Por una parte, la cápsula protege a las levaduras frente a diferentes factores de estrés, como radicales libres, péptidos antimicrobianos y fármacos antifúngicos (Zaragoza *et al.*, 2008). También tiene propiedades antifagocíticas, ya que bloquea el reconocimiento de epítomos de la pared celular por parte de receptores de células inmunitarias (Kozel and Gotschlich, 1982), e interviene activamente en la diseminación a otros órganos, especialmente a cerebro (Lee *et al.*, 2023). Durante la infección, los polisacáridos se expulsan al espacio extracelular, ejerciendo efectos deletéreos en el hospedador y pudiendo inhibir procesos de la respuesta inmunitaria, actuando como inmunomoduladores. Son capaces de inhibir la producción de anticuerpos y la migración de neutrófilos, inhiben el sistema del complemento, producen cambios en la producción de mediadores inmunitarios (como quimiocinas y citoquinas) e inducen apoptosis en linfocitos y monocitos (revisado en (Zaragoza *et al.*, 2009)).

3.7.1.2. Producción de melanina

La melanina es un pigmento oscuro que se encuentra en la naturaleza en distintos organismos como bacterias, hongos, plantas y animales. Es un compuesto de alto peso molecular, cargado negativamente e hidrofóbico, y tiene múltiples funciones, siendo fotoprotector, termorregulador, antioxidante o incluso evita la deshidratación (revisado en (Cordero and Casadevall, 2017)). Además del efecto protector, también se ha postulado que puede llevar a cabo captación de energía a partir de radiación ionizante (Dadachova *et al.*, 2007).

La formación de melanina en *C. neoformans* se produce cuando en el medio hay presencia de compuestos difenólicos como la L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina), y requiere la acción de la enzima difenoloxidasa (lacasa), codificada por los genes *LAC1* y *LAC2*, siendo el primero el más importante (Pukkila-Worley *et al.*, 2005). La melanina se acumula en la pared celular ayudando a mantener la integridad de la célula (Zhu *et al.*, 2001).

La melanina es necesaria para la virulencia de *C. neoformans* ya que mutantes que no pueden melanizar son avirulentos (Kwon-Chung *et al.*, 1982b; Salas *et al.*, 1996). Esto se debe principalmente a su efecto protector sobre las levaduras, habiéndose demostrado que las células melanizadas son más resistentes a radicales libres y antifúngicos (Wang and Casadevall, 1994; Wang and Casadevall, 1996; Rosas and Casadevall, 2006; Nosanchuk and Casadevall, 2006; Zaragoza, 2019). También interviene en la diseminación del hongo desde el pulmón a otros órganos (Noverr *et al.*, 2004), e interfiere con el sistema inmunitario, ya que partículas de melanina inducen una respuesta inflamatoria en ratones (Rosas *et al.*, 2002).

3.7.1.3. Producción de otras enzimas involucradas en virulencia: ureasa y fosfolipasa

Entre otros factores de virulencia, *C. neoformans* produce distintas enzimas que le ayudan a degradar macromoléculas y obtener nutrientes del ambiente, pero durante la infección, estas enzimas también contribuyen a su patogénesis. Algunas de las mejor caracterizadas son la ureasa y la fosfolipasa.

La ureasa es una enzima extracelular que cataliza la hidrólisis de urea a amonio y carbamato. Mutantes *ure1* han demostrado ser menos virulentos que la cepa parental en modelos de ratón (Olszewski *et al.*, 2004). Parece que la presencia de esta enzima promueve la diseminación al cerebro (Olszewski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013) y una respuesta inmunitaria tipo Th2 (Osterholzer *et al.*, 2009), lo que dificulta la eliminación de la infección.

Por otro lado, las fosfolipasas son enzimas extracelulares que degradan los fosfolípidos de la membrana celular. *Cryptococcus neoformans* contiene distintas fosfolipasas, siendo las más relevantes las fosfolipasas B y C. Estas enzimas ayudan en la unión de la levadura a las células del hospedador. La fosfolipasa B promueve la invasión, degradando fosfolípidos del surfactante pulmonar y de la membrana plasmática, y además es crítica para la supervivencia de *C. neoformans* en el SNC (Hamed *et al.*, 2023). La fosfolipasa C se ha asociado con distintos fenotipos que participan en la virulencia del hongo, como crecimiento a 37 °C, producción de melanina y resistencia a antifúngicos, pero también está involucrada en procesos de homeostasis y mantenimiento de la pared celular (Almeida *et al.*, 2015).

3.7.2. Mecanismos de adaptación

Cryptococcus neoformans es un hongo muy característico ya que aparte de los factores de virulencia que posee, también ha desarrollado mecanismos específicos que le permiten evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y así persistir durante largos periodos de tiempo. Algunos de estos mecanismos de adaptación se describen a continuación.

3.7.2.1. Crecimiento a 37 °C

La capacidad de crecer a 37 °C es esencial para que los hongos puedan causar infección en humanos. La mayoría de las especies fúngicas tienen un crecimiento óptimo entre 25 y 35 °C, sin embargo, solo algunas son capaces de tolerar temperaturas más altas entre 35 y 40 °C. La temperatura óptima de crecimiento de *C. neoformans* está entre 25–30 °C, pero es capaz de sobrevivir a 37 °C, lo que le permite causar infección en humanos. Se han identificado múltiples genes necesarios para crecer a esta temperatura, los cuales participan en rutas de señalización de estrés, ensamblaje de la pared celular, preservación de la integridad de la membrana celular y metabolismo basal (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

3.7.2.2. Patogénesis intracelular facultativa

Cryptococcus neoformans es considerado un patógeno intracelular facultativo ya que es capaz de sobrevivir en el interior de las células fagocíticas del hospedador, como macrófagos, monocitos, neutrófilos, células dendríticas y células endoteliales (Zhang *et al.*, 2015). Tiene diversas estrategias para regular la fagocitosis, pudiendo inhibir este proceso o, por el contrario, puede ser fagocitado y utilizar la célula fagocítica para su beneficio.

La inhibición de la fagocitosis se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos: aquellos mediados por la cápsula y aquellos en los que no interviene la cápsula (García-Rodas and Zaragoza, 2012; Gaylord *et al.*, 2020). Para que la fagocitosis ocurra, las células fagocíticas tienen que reconocer los epítomos que se encuentran en la pared celular de *C. neoformans*, pero la cápsula crea una barrera física que impide que se dé este reconocimiento. Además, la cápsula es capaz de aumentar su tamaño, lo que también inhibe la fagocitosis. En cuanto a los mecanismos de inhibición de la fagocitosis que no dependen de la cápsula, existen distintas rutas. *Cryptococcus neoformans* secreta una proteína antifagocítica, App1, que inhibe la fagocitosis mediante su unión a los receptores del complemento CR2 y CR3 de las células fagocíticas (Stano *et al.*, 2009). El factor de transcripción Gat201 también está involucrado en este proceso, ya que mutantes carentes de este factor son eliminados tras 3 días de infección, mostrando Gat201 un papel importante en la evasión de la fagocitosis al inicio de la infección (Chun *et al.*, 2011). También se ha descrito que el envejecimiento celular de las levaduras produce cambios estructurales en la cápsula, provocando que las levaduras sean más resistentes a la fagocitosis (Orner *et al.*, 2019).

A pesar de que *C. neoformans* ha desarrollado las estrategias antifagocíticas expuestas anteriormente, durante la infección, las células fagocíticas pueden internalizar a las levaduras gracias a su opsonización con anticuerpos o proteínas del sistema del complemento (García-Rodas and Zaragoza, 2012; Gaylord *et al.*, 2020). Incluso se ha descrito que algunos receptores, como CD18, pueden reconocer directamente al GXM y con ello favorecer la fagocitosis de *C. neoformans*. Una vez ocurre la fagocitosis, se han descrito varios mecanismos por los cuales las levaduras reducen la actividad del fagolisosoma. En primer lugar, *C. neoformans* inhibe la acidificación de este compartimento mediante la secreción de amonio, lo que disminuye la actividad antimicrobiana de dicho compartimento (Smith *et al.*, 2015). Además, también es capaz de causar daño en las membranas del fagosoma, aumentando su permeabilidad (Feldmesser *et al.*, 2000; Tucker and Casadevall, 2002). Desde el fagolisosoma emergen unas vesículas con polisacárido que se acumulan en el citoplasma de los macrófagos, vesículas a las cuales se las ha denominado “células hueco”. No se sabe su función, pero se piensa que pueden causar daño en las células fagocíticas del hospedador (Feldmesser *et al.*, 2000). Además, una vez internalizado, las propiedades antioxidantes de la cápsula proporcionan a las levaduras una mayor resistencia a factores de estrés en el interior de los macrófagos (Zaragoza *et al.*, 2008).

Tras la fagocitosis, pueden ocurrir distintos procesos. Las levaduras pueden evadir la muerte y replicarse en el interior de los macrófagos, pudiendo desencadenar la explosión de los mismos (Feldmesser *et al.*, 2001b). También pueden intercambiarse entre macrófagos vecinos, pasando de un macrófago a otro mediante transmisión lateral (Alvarez and Casadevall, 2007; Ma *et al.*, 2007). Se puede dar un proceso denominado vomocitosis, extrusión o exocitosis no lítica, mediante el cual las levaduras son expulsadas del macrófago

sin suponer ningún daño ni para la célula fagocítica ni para el hongo (Alvarez and Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006; Voelz *et al.*, 2009). En última instancia, también puede producirse la muerte de la levadura. Todos estos procesos pueden ocurrir simultáneamente, lo que indica la gran complejidad de la patogénesis intracelular de *C. neoformans*.

3.7.2.3. Morfogénesis

Uno de los factores más importantes que contribuyen a la virulencia de muchos hongos es su capacidad de inducir cambios morfológicos (Trevijano-Contador *et al.*, 2016; Min *et al.*, 2020). Muchos hongos patógenos producen hifas y pseudohifas durante la infección. Es el ejemplo de *Candida albicans*, cuyas hifas y pseudohifas le permiten una mayor penetración en los tejidos, mientras que las formas levaduriformes se han relacionado con una mejor diseminación debido a su pequeño tamaño (Trevijano-Contador *et al.*, 2016). Sin embargo, otras especies del género *Candida*, como son *C. auris* o *C. glabrata*, raramente aparecen como pseudohifas y ejercen su patogenicidad como blastoconidias o en forma de biofilms (Min *et al.*, 2020). En el caso de *C. neoformans*, la filamentación ocurre durante la reproducción sexual (Kozubowski and Heitman, 2012), pero sin embargo, durante la infección, esta levadura raramente produce hifas o pseudohifas (Williamson *et al.*, 1996; Gazzoni *et al.*, 2009), presentando todas las células un aspecto esférico. *Cryptococcus neoformans* no cambia estrictamente de forma, pero es capaz de inducir una transición que le confiere una ventaja selectiva durante la infección, formando una población heterogénea de levaduras de distintos tamaños para combatir la respuesta inmunitaria del hospedador.

Se han descrito las micro-células, cuyo tamaño es de entre 1–2 μm , y aparecen normalmente junto a las células de mayor tamaño (Feldmesser *et al.*, 2001a; Zaragoza, 2011). Debido a su pequeño tamaño, se piensa que pueden estar involucradas en la diseminación al cerebro, y se han relacionado con la aparición de síntomas neurológicos y un aumento de la presión intracraneal, asociándose con una etapa avanzada de la enfermedad (Feldmesser *et al.*, 2001a; Fernandes *et al.*, 2018). Además, se han relacionado con cepas hipervirulentas (Fernandes *et al.*, 2022), y parecen ser específicas de *C. neoformans*, no apareciendo en otras especies del complejo *C. gattii* (Fernandes *et al.*, 2018). Estas células no han sido estudiadas en profundidad, por lo que aún no se conoce completamente su labor durante la infección.

Recientemente también se han descrito células con morfología irregular y acúmulos de cápsula, tanto junto a las propias células como separadas de ellas (Fernandes *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2022), pero poco se sabe aún de su posible función.

Sin embargo, el cambio más característico que desarrolla *C. neoformans* durante la infección es un aumento del tamaño celular, lo cual puede producirse de dos maneras: 1) aumentando el tamaño de la cápsula, o 2) aumentando simultáneamente el tamaño de la cápsula y del cuerpo celular. Estos cambios morfológicos se han relacionado con múltiples procesos involucrados en la adaptación al hospedador y en la evasión del sistema inmunitario.

3.7.2.3.1. Aumento del tamaño de la cápsula

La cápsula es capaz de cambiar su tamaño y reajustar su composición según las condiciones, lo que le hace una estructura altamente dinámica (revisado en (McFadden *et al.*, 2006b; Zaragoza *et al.*, 2009)). En medios ricos tiene un tamaño pequeño (1–2 μm), pero en

determinadas condiciones puede aumentar drásticamente su tamaño, llegando a alcanzar 30 μm *in vivo* (Rivera *et al.*, 1998). A lo largo de los años se han desarrollado distintos protocolos *in vitro* para aumentar el tamaño de la cápsula, por lo que se conocen distintos factores que intervienen en este proceso. Un aumento en la concentración de CO_2 , una limitación de hierro, la presencia de suero de mamífero o una limitación de nutrientes a pH alcalino son algunos de los factores involucrados en el crecimiento de la cápsula (Littman, 1958; Granger *et al.*, 1985; Vartivarian *et al.*, 1993; Zaragoza *et al.*, 2003; Zaragoza and Casadevall, 2004; O'Meara and Alspaugh, 2012). Por el contrario, factores como la elevada presión osmótica o altas concentraciones de glucosa reducen su tamaño (Dykstra *et al.*, 1977). El aumento de tamaño de la cápsula implica cambios estructurales que hacen que tenga una mayor densidad en las regiones internas cercanas a la pared celular comparado con la densidad de las zonas más distales (Pierini and Doering, 2001; Gates *et al.*, 2004). Además, crece de forma apical mediante la adición de nuevas fibras de polisacárido a las capas ya existentes formando uniones no covalentes (McFadden *et al.*, 2006a; Zaragoza *et al.*, 2006; Maxson *et al.*, 2007b), por lo que requiere una producción importante de nuevo polisacárido.

Esta transición ocurre tanto en hospedadores ambientales como en mamíferos (Feldmesser *et al.*, 2001a; Chrisman *et al.*, 2011; García-Rodas *et al.*, 2011), contribuyendo significativamente a la virulencia de *C. neoformans* al ser una de las primeras respuestas que aparecen (revisado en (Casadevall *et al.*, 2019)).

3.7.2.3.2. Aumento del tamaño de la cápsula y el cuerpo celular

Además del aumento de la cápsula, *C. neoformans* también es capaz de aumentar el cuerpo celular, generando un crecimiento masivo de sus células y formando las denominadas células titanes durante la infección, las cuales se describen en detalle en los siguientes apartados. El proceso de formación de las células titanes se ha denominado comúnmente como proceso o fenómeno de "titanización", término que ha sido aceptado en este campo y que será utilizado en esta tesis doctoral.

Todos estos cambios morfológicos que lleva a cabo *C. neoformans* muestran la gran plasticidad que posee este hongo para adaptarse al ambiente del hospedador, y ponen de manifiesto que es la combinación de múltiples fenotipos lo que contribuye en gran medida a su perfil de virulencia.

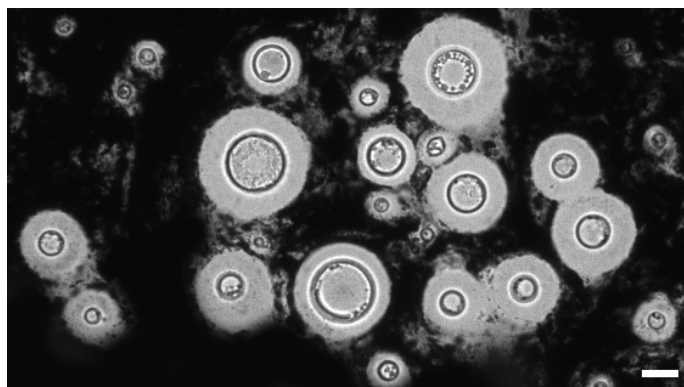


Figura 3. Morfología de *C. neoformans*. Levaduras suspendidas en tinta china procedentes de los pulmones de un ratón infectado con *C. neoformans*. Se puede observar el cuerpo celular rodeado por la cápsula. Se muestra la gran diversidad de tamaños que adquieren las levaduras durante la infección (tanto en cuerpo celular, cápsula y tamaño total), generando una población altamente heterogénea. Barra de escala de 20 μm .

3.8. Células titanes

Las células de *C. neoformans* cultivadas *in vitro* en medios ricos presentan un tamaño de 5–7 μm , pero durante la infección son capaces de aumentar el tamaño del cuerpo celular y la cápsula, llegando a formar células de hasta 70–100 μm (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). Aunque este fenómeno había sido descrito ocasionalmente en la literatura en muestras de pacientes y en ratones (Cruickshank *et al.*, 1973; Love *et al.*, 1985; D'Souza *et al.*, 2001; Feldmesser *et al.*, 2001a; Zaragoza *et al.*, 2005), no fue hasta 2010 cuando dos trabajos, de manera independiente, las caracterizaron en detalle, denominándolas “células gigantes” o “células titanes” (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010).

3.8.1. Características de las células titanes

En los últimos años se han propuesto diferentes criterios para identificar a las células titanes (Zaragoza and Nielsen, 2013; Zhou and Ballou, 2018), pero en la actualidad, el criterio más aceptado es denominar como titanes a aquellas células que tienen un diámetro de cuerpo celular mayor de 10 μm (Dambuza *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Las células de tamaño normal de *C. neoformans* son haploides, sin embargo, las células titanes son células poliploides, normalmente tetraploides u octaploides, aunque pueden llegar a tener hasta 16, 32, 64 o más copias del genoma, y posiblemente son generadas por un proceso de endoreduplicación (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010), proceso mediante el cual la célula aumenta su ploidía mediante rondas sucesivas de replicación del ADN sin llevar a cabo la mitosis (Kondorosi *et al.*, 2000). Aunque estas células tienen mayor contenido de ADN, presentan un único núcleo, y se ha demostrado que pueden producir un gran número de células hijas haploides o aneuploides (Gerstein *et al.*, 2015).

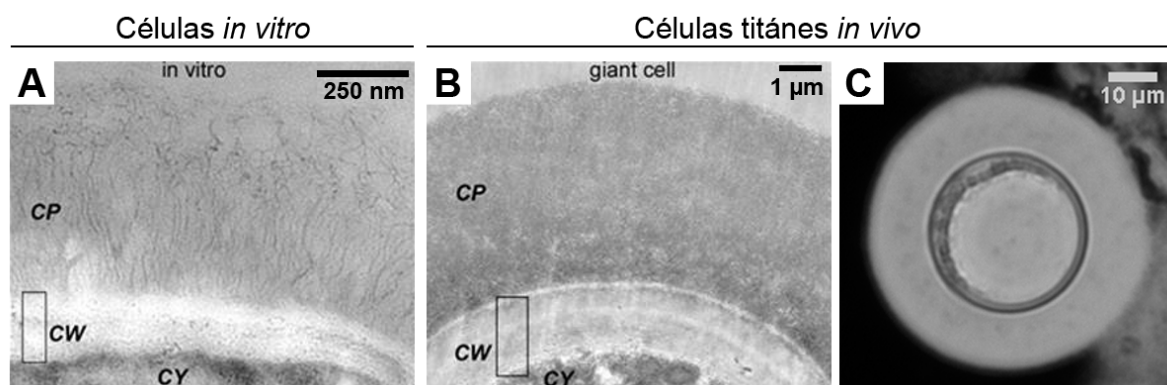


Figura 4. Características morfológicas de las células titanes. A y B) Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de una célula cultivada *in vitro* (A) y una célula obtenida *in vivo* (B). En la célula titán se observa una pared celular (CW) más gruesa y una cápsula (CP) más densa y compacta que las observadas en la célula obtenida *in vitro*. CY, citoplasma; “giant cell”, célula titán. Fotografías adaptadas de (Zaragoza *et al.*, 2010). C) Fotografía en microscopio óptico de una célula titán suspendida en tinta china. Se observa una vacuola única de gran tamaño en el interior del cuerpo celular y la gran cápsula de polisacárido rodeando dicho cuerpo celular. En ambos casos (B y C) las células titanes proceden de los pulmones de un ratón infectado con *C. neoformans*.

Fenotípicamente presentan también diferencias sustanciales al compararlas con las células de tamaño normal (Figura 4). Tienen una pared celular engrosada de 2–3 μm , frente a los 50–100 nm de las células de tamaño normal (Zaragoza *et al.*, 2010). Dicha pared celular tiene además un mayor contenido en quitina, glucosamina y melanina, menor cantidad de glucosa, y una capa de mananos (Wiesner *et al.*, 2015; Mukaremera *et al.*, 2018). Su cápsula

es más densa y compleja que la de células de tamaño normal, e internamente tienen una vacuola de gran tamaño que ocupa gran parte del cuerpo celular (Zaragoza *et al.*, 2010) (Figura 4 C). De hecho, se ha postulado que las vacuolas permiten el crecimiento celular bajo condiciones limitadas de nutrientes, ayudando a mantener un volumen citoplasmático constante (Veses *et al.*, 2008), por lo que el aumento de tamaño de *C. neoformans* no implicaría un incremento significativo en la síntesis de nuevos componentes celulares.

3.8.2. Función de las células titanes en virulencia

Desde su caracterización en 2010, diferentes estudios han abordado como las células titanes participan en diferentes procesos de virulencia.

Uno de los aspectos más estudiados ha sido su resistencia a diferentes tipos de estrés. Se ha comprobado que debido a su mayor tamaño, estas células tienen mayor resistencia a radicales libres y a antifúngicos como el fluconazol (Zaragoza *et al.*, 2010; Gerstein *et al.*, 2015), confiriendo una ventaja selectiva para poder evadir la respuesta inmunitaria. Igualmente, la progenie de estas células es también más resistente a factores de estrés (Gerstein *et al.*, 2015).

Por otra parte, las células titanes alteran la fagocitosis de *C. neoformans* de diferentes maneras. Los macrófagos alveolares tienen un diámetro de 10–20 μm (Cannon and Swanson, 1992) mientras que las células titanes pueden llegar a tener un diámetro aproximado de 50–100 μm . El tamaño de estas células supone un impedimento para que las células fagocíticas puedan internalizarlas, promoviendo la persistencia del hongo en el pulmón y la evasión inmunitaria (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Okagaki and Nielsen, 2012). Se ha comprobado que la presencia de células titanes reduce la fagocitosis de células de tamaño normal, causando cambios en la respuesta inmunitaria que resultan en una menor activación de las células fagocíticas (Okagaki and Nielsen, 2012; Crabtree *et al.*, 2012).

Otro aspecto importante en la virulencia de esta levadura es la diseminación desde el pulmón a otros órganos. Debido a su tamaño, se piensa que las células titanes no pueden diseminarse, pero sin embargo, promueven la proliferación de las células hijas en los pulmones y su diseminación al cerebro y otros tejidos (Okagaki *et al.*, 2010; Crabtree *et al.*, 2012; Denham *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2018; Mukaremera *et al.*, 2019).

Además, la aparición de las células titanes no ocurre de la misma manera en distintas cepas de ratón que presentan diferente respuesta inmunitaria. La proporción de células titanes es mayor en ratones que presentan una respuesta Th2, que se considera no protectora frente a *C. neoformans*, en comparación con animales que desarrollan una respuesta de tipo Th1 (Crabtree *et al.*, 2012; García-Barbazán *et al.*, 2016).

Todos estos factores hacen que las células titanes de *C. neoformans* proporcionen una mayor adaptación al ambiente del hospedador, y por lo tanto, intervengan activamente en la infección, suponiendo una ventaja selectiva para el hongo.

3.8.3. Factores que favorecen la formación de las células titanes

Clásicamente, para la investigación y obtención de las células titanes se ha precisado del uso de modelos animales, lo que ha supuesto una gran limitación para su estudio. Por razones bioéticas y económicas, ha sido difícil planificar experimentos en los que se

necesitase un alto número de células titanicas, por ejemplo, para experimentos de transcriptómica o proteómica. La obtención de una cantidad suficiente de células titanicas y su purificación a partir de pulmones de animales infectados requería de protocolos complejos y del uso de un gran número de animales de experimentación. En la literatura se habían descrito ocasionalmente condiciones en las que *C. neoformans* era capaz de aumentar su tamaño significativamente. Love y sus colaboradores describieron que levaduras procedentes de un aislado clínico cultivadas a 35 °C formaban células de mayor tamaño que las células cultivadas a 25 °C (Love *et al.*, 1985), y Zaragoza *et al.* consiguieron un bajo porcentaje de células de 25–30 µm tras incubación durante 4 días en medio mínimo (MM) (Zaragoza *et al.*, 2010). Posteriormente se encontró que la sobreexpresión de *PKA1* o la exposición a amebas o a extractos de macrófagos también favorecían la aparición de células titanicas *in vitro* (Okagaki *et al.*, 2010; Chrisman *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012).

En 2018 se produjo un avance significativo en este campo de investigación, ya que diferentes grupos describieron condiciones que permitían reproducir parcialmente la obtención de células titanicas *in vitro* (Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). La incubación de las levaduras siguiendo las distintas condiciones descritas produce un aumento significativo del tamaño de las células, aunque sin alcanzar el tamaño obtenido en modelos animales (Figura 5). Por ello, a las células obtenidas mediante estos protocolos se las ha denominado como “titan-like”. A pesar de esta limitación, estos trabajos han permitido realizar nuevos abordajes para investigar factores que regulan la formación de las células titanicas y determinar distintas rutas de señalización involucradas en su formación. Además, más recientemente se han descrito dos protocolos nuevos mediante los cuales conseguir la titanización *in vitro* (Dylağ *et al.*, 2022; Saidykhan *et al.*, 2022), aportando nueva información sobre dicho proceso. Las condiciones descritas hasta la fecha (ver Figura 6) presentan algunos aspectos comunes, como una incubación a baja densidad celular y 37 °C, presencia de CO₂, o una limitación de nutrientes y oxígeno. Además, en dos de estos protocolos la adición de suero fetal bovino es un factor necesario para que tenga lugar la formación de células titanicas (Dambuza *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018).

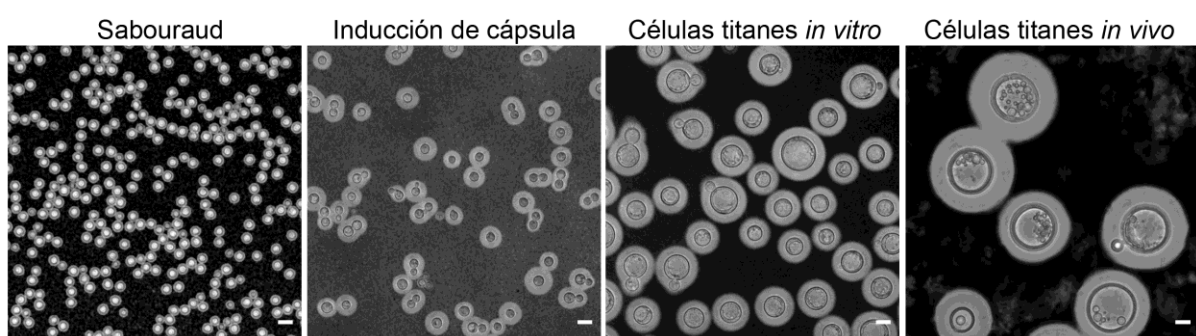


Figura 5. Cambios morfológicos de *C. neoformans* *in vitro* e *in vivo*. Fotografías de levaduras cultivadas en distintas condiciones y suspendidas en tinta china. Se observa el cuerpo celular, delimitado por la pared celular y rodeado por la cápsula, el halo blanco que rodea el cuerpo celular. Levaduras incubadas *in vitro* en medio rico (Sabouraud), en medio de inducción de cápsula, y en medio TCM (medio inductor de células titanicas), e *in vivo*, procedentes de los pulmones de un ratón infectado. La barra de escala representa 10 µm.

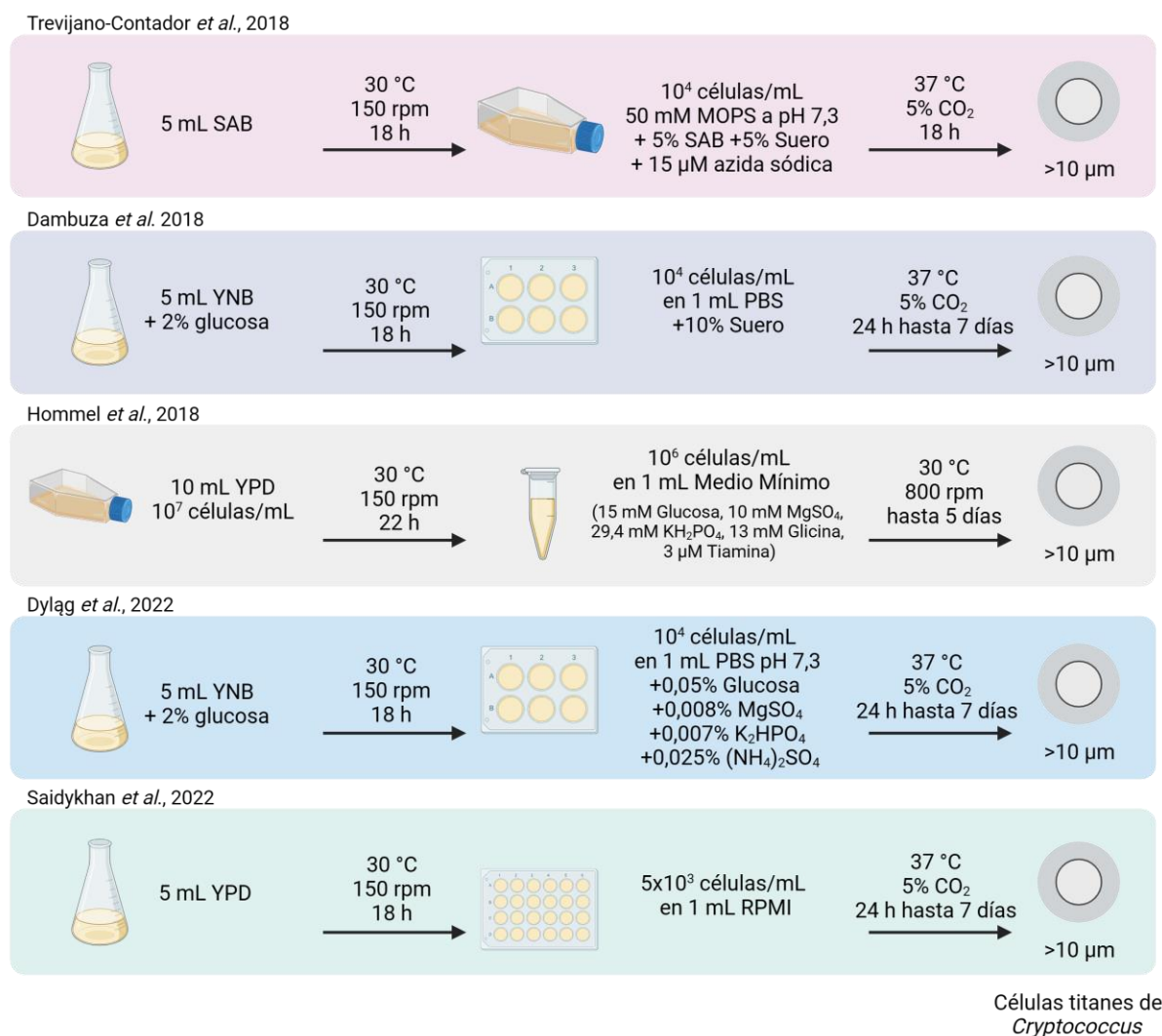


Figura 6. Esquema de los distintos protocolos de titanización *in vitro* descritos. Métodos publicados hasta el momento para la obtención de las células titanes *in vitro*, descritos en los artículos: (Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Dyląg *et al.*, 2022; Saidykhan *et al.*, 2022). Figura creada con BioRender.com.

La obtención de células titanes *in vitro* ha permitido caracterizar y descubrir nuevos factores involucrados en el proceso de titanización. A continuación se describen algunos de los principales factores importantes para que ocurra esta transición *in vitro*.

3.8.3.1. Limitación de nutrientes

La limitación de nutrientes parece ser uno de los elementos clave para la inducción de las células titanes (Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018), lo que sugiere que estas células se forman como una respuesta a señales de estrés metabólico. Mediante estudios de secuenciación del ARN (RNA-seq) se ha identificado que durante la titanización aumenta la expresión de genes que codifican proteínas quelantes de hierro, como Cig1 (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), sugiriendo que la formación de las células titanes también está regulada por las concentraciones de este elemento en el medio. De acuerdo con esta hipótesis, se demostró que la incubación de las levaduras en presencia de agentes quelantes de hierro inducía parcialmente el crecimiento celular, incluso en medios

ricos (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), indicando que la limitación de hierro también contribuye a la señalización que induce la formación de las células titanés.

3.8.3.2. Regulación mediante *quorum sensing*

Durante la infección, el grado de titanización observado en los pulmones depende del número de células inoculadas en los animales, siendo la proporción de células titanés significativamente mayor en animales infectados con dosis bajas de levaduras que desarrollan una infección crónica (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). La formación de las células titanés *in vitro* también depende de la concentración celular, obteniendo una mayor titanización a concentraciones bajas (Dambuza *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Dylağ *et al.*, 2022; Saidykhan *et al.*, 2022). Estos resultados sugieren que la formación de células titanés está regulada por fenómenos de “quorum sensing” (QS), un mecanismo de comunicación entre células a través de las moléculas que son secretadas al medio. En *C. neoformans* se ha descrito un péptido, Qsp1, que participa en procesos que dependen de la concentración celular y afecta a la virulencia (Lee *et al.*, 2007; Homer *et al.*, 2016), y se ha demostrado que este péptido inhibe la formación de células titanés (Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Saidykhan *et al.*, 2022). Por otro lado, el ácido pantoténico también se ha relacionado con fenómenos de QS (Albuquerque *et al.*, 2013). En este caso, se ha descrito que esta molécula induce la titanización a concentraciones bajas (0,125 – 12,5 μM) (Hommel *et al.*, 2018), pero la inhibe a concentraciones altas, por lo que aún queda por descifrar su implicación real en este proceso.

3.8.3.3. CO₂ y limitación de O₂

Se ha comprobado que la inducción de células titanés es más eficiente cuando los cultivos son incubados en presencia de CO₂ (Dambuza *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Dylağ *et al.*, 2022; Saidykhan *et al.*, 2022), gas que ya ha sido descrito como inductor de la síntesis de la cápsula (Granger *et al.*, 1985; Zaragoza *et al.*, 2003). En *C. neoformans*, el CO₂ se descompone a bicarbonato mediante la acción de la enzima anhidrasa carbónica, activando la ruta del AMP cíclico (AMPc) (Klengel *et al.*, 2005), la cual es necesaria para la formación de las células titanés.

Además, se ha comprobado que la incubación en condiciones estáticas favorece la aparición de células titanés en comparación con incubaciones en agitación, lo que sugiere que la limitación de oxígeno es otro factor que induce la titanización en *C. neoformans* (Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). La hipoxia es un factor de estrés al que se enfrentan los hongos durante la infección (Grahl *et al.*, 2012), pudiendo, de nuevo, activar rutas de señalización como la ruta del AMPc.

3.8.3.4. Suero

El suero es un inductor del tamaño de la cápsula de *C. neoformans* (Zaragoza *et al.*, 2003) y también se ha descrito que induce la formación de células titanés (Dambuza *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018), habiendo demostrado que la fracción de lípidos polares del suero tiene capacidad de aumentar el tamaño de las células (Chrisman *et al.*, 2011; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). En otros hongos, como por ejemplo *C. albicans*, el suero induce la transición de levadura esférica a hifa mediante la vía del AMPc (Xu *et al.*, 2008). En el protocolo de Saidykhan *et al.* describieron un medio basado en RPMI con y sin adición de

suero, obteniendo titanización en ambos casos, aunque el mayor crecimiento ocurría en presencia de este componente (Saidykhan *et al.*, 2022). Sin embargo, en otros protocolos publicados se ha podido inducir la formación de células titanes en ausencia de suero (Hommel *et al.*, 2018; Dylağ *et al.*, 2022), e incluso en el protocolo de Hommel *et al.* describen que el suero inhibe la titanización, sugiriendo que en estos casos, la formación de células titanes puede estar mediada por distintas rutas.

3.8.3.5. Componentes bacterianos

Dambuza *et al.* describieron que el microbioma del pulmón es otro factor que regula la formación de las células titanes (Dambuza *et al.*, 2018). Estos autores demostraron que la incubación de *C. neoformans* con bacterias presentes en el lavado broncoalveolar inducía la titanización. Además, también observaron que el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias es un componente clave para esta transición.

3.8.3.6. pH

El pH del medio es también importante para la formación de células titanes. Trevijano-Contador y colaboradores utilizan un medio a pH 7,3 para inducir la titanización (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), y Dylağ *et al.* observaron que a pHs de 5,5, 7 y 8 se producía una inhibición de este proceso, pero sin embargo, a pH 7,3 conseguían menor proliferación celular y mayor titanización (Dylağ *et al.*, 2022). Además, el factor de transcripción Rim101, involucrado en respuestas celulares frente a cambios de pH, también participa en la formación de las células titanes (Okagaki *et al.*, 2011; O'Meara *et al.*, 2013). Por otro lado, Hommel *et al.* describieron la importancia de un pH bajo (pH 5,5) en sus condiciones de titanización (Hommel *et al.*, 2018), pero hay que señalar que este protocolo no requiere de una incubación en presencia de CO₂, pudiendo esto explicar las diferencias en los requerimientos de pH entre los distintos protocolos.

3.8.3.7. Fondo genético de las cepas

Existe una gran heterogeneidad en la capacidad de titanización de diferentes cepas de *C. neoformans* (Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Dambuza *et al.*, 2018; Dylağ *et al.*, 2020; Saidykhan *et al.*, 2022). Se ha observado que aunque existe una gran variabilidad entre cepas de la misma especie, este fenómeno es más frecuente en *C. neoformans* que en *C. deneoformans*. Sin embargo, recientemente se ha visto que dentro del género *Cryptococcus*, la titanización parece ser un mecanismo desarrollado únicamente por las especies patógenas (*C. neoformans/C. gattii*) (Dylağ *et al.*, 2020), sugiriendo que este proceso se ha seleccionado específicamente en especies que tienen capacidad de sobrevivir dentro de hospedadores.

3.8.4. Rutas involucradas en la formación de células titanes

Se han descrito algunas rutas necesarias para la formación de células titanes usando tanto abordajes *in vivo* como *in vitro*. A continuación se describen las principales rutas que se conocen hasta el momento involucradas en este proceso.

3.8.4.1. Ruta AMPc/PKA y apareamiento

Las rutas mejor caracterizadas que intervienen en la formación de las células titanes son la ruta del AMP cíclico y la proteína quinasa A (AMPc/PKA), ruta que juega un papel muy

importante en la regulación de distintos factores de virulencia de *C. neoformans*; y la ruta del apareamiento. La implicación de la ruta AMPc/PKA en esta transición se describió por primera vez tras observar que mutantes de la adenilato ciclasa (*Cac1*) no formaban células titanes (Zaragoza *et al.*, 2010). A diferencia de otras levaduras, los mutantes de la adenilato ciclasa son viables en *C. neoformans*, pero presentan importantes defectos de virulencia debido a la implicación de esta ruta en procesos como la producción de melanina o síntesis de cápsula (D'Souza *et al.*, 2001; Alspaugh *et al.*, 1997). La implicación de la ruta del apareamiento se describió al observar un aumento de la producción de células titanes *in vivo* en coinfecciones con levaduras de los dos tipos sexuales α y α (Okagaki *et al.*, 2010). Más tarde se describió que dos receptores, el *Ste3a*, un receptor de feromonas, y el *Gpr5*, un receptor acoplado a proteína G, eran necesarios para la titanización (Okagaki *et al.*, 2011). Ambos receptores interaccionan con la subunidad $G\alpha$ de la proteína *Gpa1*, la cual activa la ruta AMPc/PKA. Mas recientemente se ha descrito que también el receptor *Gpr4* está involucrado en la producción de células titanes *in vitro* (Hommel *et al.*, 2018). Por debajo de esta ruta se han encontrado distintas proteínas como *Pka1* y *Pkr1*, o los factores de transcripción *Usv101*, *Rim101* y *Gat201*, que también regulan este proceso (Okagaki *et al.*, 2011; Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018).

3.8.4.2. Ruta PKC

La proteína quinasa C (PKC) es una familia de proteína quinasas activadas por calcio, diacilglicerol (DAG) o fosfolípidos (Heinisch and Rodicio, 2018), y están involucradas en distintos factores de virulencia de *C. neoformans*, como la producción de cápsula o melanina, la tolerancia a distintas temperaturas, la resistencia a distintos factores de estrés como el fluconazol, o el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Gerik *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012). Trevijano-Contador *et al.* describieron que la inhibición de la ruta PKC mediante distintos inhibidores regula negativamente la formación de las células titanes (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). El mecanismo más posible se debe a la degradación de los fosfolípidos mediante la fosfolipasa C, que produce DAG, un activador de la PKC (Noverr *et al.*, 2003; Heung *et al.*, 2004).

3.8.4.3. Otros

Trevijano-Contador y colaboradores encontraron una sobreexpresión de genes que codifican proteínas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la glicolisis y genes relacionados con respuestas de estrés, sugiriendo que hay una regulación metabólica de la titanización (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Además, también encontraron una sobreexpresión de genes que intervienen en el transporte de proteínas.

Por otra parte, también se han identificado otros reguladores específicos involucrados en la formación de las células titanes, tanto positivos (*Ada2*, *Cap59*, *Cap60*, *Ric8*, *Sgf29*, *Lmp1*, *Cdc420*, *Plb1*), como negativos (*Tsp2*, *Cne1*, *Pdr802*, *Cnc1560*, *Pcl103*, *Rho104*) (Okagaki *et al.*, 2011; O'Meara and Alspaugh, 2012; Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018; Reuwsaat *et al.*, 2021).

En última instancia, se piensa que el ciclo celular interviene en la titanización. El aumento del tamaño de la célula se produce principalmente en las fases G_1 y G_2 , por lo que se piensa que la formación de células titanes se debe a alteraciones del ciclo celular que resultan en una elongación de esas fases. Sin embargo, hay muy poca información sobre la regulación

del ciclo celular durante la titanización. Los primeros trabajos demostraron que las células titanes aisladas de ratones infectados eran poliploides, sugiriendo que se forman por endoreduplicación (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). En cambio, las células titanes obtenidas *in vitro* no tienen un aumento significativo del contenido de ADN (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), lo que sugiere que en estas condiciones, el aumento de tamaño se debe a una parada del ciclo celular en las fases G₁/G₂. En este sentido, se ha encontrado que durante el desarrollo de las células titanes se da una represión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Altamirano y colaboradores describieron que la ciclina Cln1 regula negativamente la formación de células titanes en presencia de una limitación de nutrientes (Altamirano *et al.*, 2021). En sus experimentos, las células eran arrestadas en la fase G₂, inhibiendo la gemación y formando células con mayor contenido de ADN, para posteriormente ser liberadas del arresto G₂ y poder entrar de nuevo en el ciclo celular y producir células hijas.

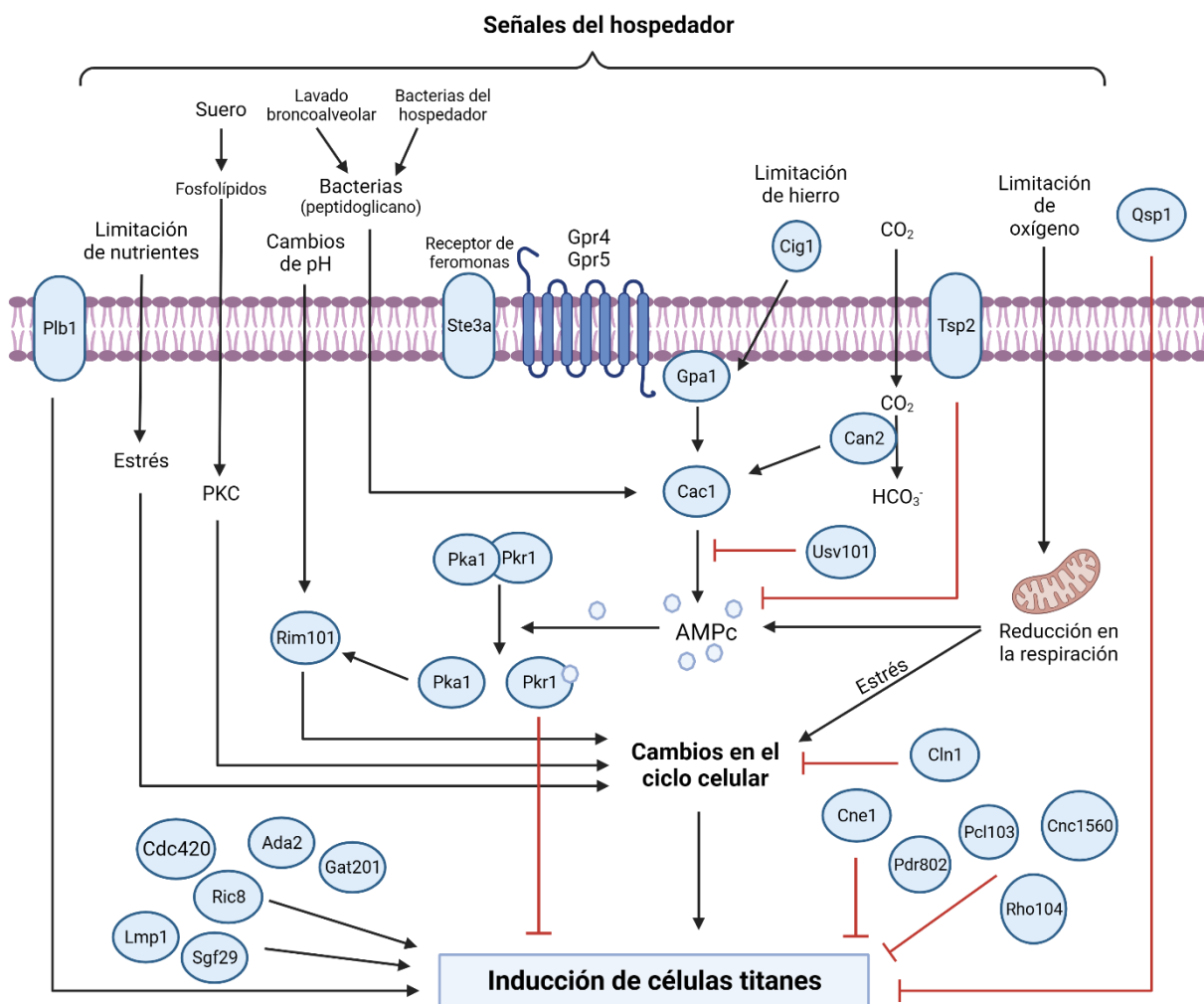


Figura 7. Esquema de rutas y factores involucrados en el proceso de titanización. Las múltiples señales generadas por el hospedador son de gran importancia para iniciar la transición a célula titán. Distintas rutas y factores participan en la formación de células titanes, muchos de ellos produciendo cambios en el ciclo celular, para finalmente inducir la titanización.

En resumen, *C. neoformans* es una levadura única para estudiar la patogénesis fúngica y por ello es importante entender los cambios morfológicos que lleva a cabo para poder entender los mecanismos mediante los cuales causa enfermedad. La titanización es un proceso multifactorial que depende de varias rutas y componentes genéticos de las células. Sin embargo, todavía no se conocen en detalle todos los procesos involucrados en la formación de las células titanes. La posibilidad de simular este proceso *in vitro* abre la posibilidad de diseñar nuevas líneas de investigación que permitan elucidar los cambios celulares y moleculares que ocurren durante esta transición. Además, su función durante la virulencia no está totalmente determinada, por lo que también es necesario determinar su papel durante la infección y su importancia en la patogénesis de *C. neoformans*.

4. Objetivos

Cryptococcus neoformans es uno de los hongos patógenos que mayor mortalidad causa, por lo que el estudio de su patogénesis es de vital importancia. Este hongo posee múltiples factores de virulencia que causan daño al hospedador, pero además, también es capaz de adaptarse a los cambios que le rodean modificando su morfología, permitiéndole sobrevivir en el huésped. La formación de células titanes es uno de estos mecanismos de adaptación, pero la implicación de estas células en la patogénesis de *C. neoformans* no está del todo clara. Por ello, en este trabajo hemos intentado elucidar la asociación entre las células titanes y la virulencia de este hongo, además de intentar esclarecer algunos de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso de titanización.

Los objetivos principales de este trabajo han sido identificar el papel que tienen las células titanes en virulencia y caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en su formación. Para ello, se plantearon dos objetivos generales, cada uno con objetivos específicos:

Objetivo 1. Caracterización de cepas isogénicas que presentan distinta capacidad de formar células titanes. Mediante este objetivo se persiguieron los siguientes objetivos específicos:

- 1.1. Asociación entre células titanes y virulencia.
- 1.2. Identificación de genes involucrados en titanización.

Objetivo 2. Identificación de fármacos que inhiben la formación de células titanes. Con este objetivo se persiguió el siguiente objetivo específico:

- 2.1. Búsqueda de nuevos mecanismos necesarios para la titanización a través de la identificación de las dianas de los fármacos inhibitorios.

5. Materiales y Métodos

5.1. Cepas y condiciones de cultivo

5.1.1. Cepas de *Cryptococcus*

Durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado diversas cepas de *Cryptococcus*. La mayoría de los experimentos han sido realizados con la cepa H99 de *C. neoformans* (var. *grubii*, serotipo A; Perfect *et al.*, 1980), concretamente, distintas variantes de esta cepa H99. Estas variantes han sido obtenidas de diferentes laboratorios y, por lo tanto, han sido nombradas con un código que indica el laboratorio de procedencia (con las siglas del responsable de cada laboratorio, como se muestra en la Tabla 3). También se ha trabajado con la cepa KN99 de *C. neoformans* (var. *grubii*, serotipo A; Nielsen *et al.*, 2003), y se han adquirido mutantes (*bwc2* y *cnag_04756*) procedentes del “Fungal Genetics Stock Center” (FGSC; Kansas, EE. UU.; <https://www.fgsc.net>), depositados en la “American Type Culture Collection” (ATCC; Rockville, Maryland, EE. UU.) por el Dr. Hiten Madhani. Además, durante la ejecución de este trabajo, se han creado diferentes mutantes en distintas variantes de la cepa H99 y en la cepa KN99. Estos mutantes han sido *bwc1*, *bwc2* y *cnag_04756*, y todos los clones obtenidos se encuentran en la Tabla 3. También se ha llevado a cabo la reinserción del gen *BWC2* en el fondo genético H99 (*H99-3::BWC2*). Por último, en algunos experimentos se han utilizado las cepas de *C. deneoformans* B3501 (var. *neoformans*, serotipo D; Kwon-Chung, 1976) y *C. deuterogattii* R265 (*C. gattii*, serotipo B/C; Kidd *et al.*, 2007). Todas las cepas utilizadas, así como los mutantes obtenidos, se detallan en la Tabla 3.

5.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras se preservaron en medio Sabouraud líquido (Oxoid) suplementado con 30% de glicerol en viales de criogenización almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las cepas se recuperaron en medio Sabouraud sólido con 1,5% agar (Oxoid) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Para el mantenimiento rutinario de las levaduras se usó medio Sabouraud sólido. Para iniciar los experimentos, las cepas se cultivaron en 5 mL de medio Sabouraud líquido a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 150 r.p.m. durante la noche. En determinados experimentos (cuantificación de VEs) el medio de crecimiento de los cultivos fue “Yeast Peptone Dextrose” o YPD, compuesto por 1% extracto de levadura (BD), 2% peptona (BD) y 2% D-glucosa (Sigma-Aldrich). Este medio se utilizó tanto en medio líquido como sólido, con 2% de agar bacteriológico (Difco).

En ocasiones, las placas de medio Sabouraud sólido se suplementaron con nourseotricina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Werner Bioagents) o geneticina (G418 Sulfato, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Enzo Life Sciences), para seleccionar levaduras que expresaran el gen *NAT^R* o *NEO^R*, respectivamente. Para cultivar bacterias se utilizó medio LB, compuesto por 1% bacto triptona (BD), 0,5% extracto de levadura (BD) y 1% cloruro de sodio (PanReac AppliChem). Este medio se suplementó con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina (Sigma-Aldrich), y se utilizó tanto líquido como sólido (con 1,5% de agar bacteriológico). Estos cultivos se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24–48 horas.

5.1.2.1. Inducción del crecimiento de la cápsula

Para inducir el crecimiento de la cápsula se usó medio de inducción de cápsula compuesto por 10% Sabouraud líquido tamponado con 50 mM MOPS (Sigma-Aldrich) a pH 7,3 (Zaragoza and Casadevall, 2004). Las levaduras se inocularon a 10^6 células/mL y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin CO_2 y sin agitación durante una noche. El crecimiento de la cápsula se visualizó bajo el microscopio en campo claro tras la suspensión de las levaduras en tinta china.

En ocasiones, el crecimiento de la cápsula también se indujo tras la incubación en medio mínimo (MM, compuesto por 15 mM D-glucosa, 10 mM MgSO₄ • 7 H₂O, 20,3 mM KH₂PO₄, 3 mM glicina y 10 mg/mL de tiamina a pH 5,5). Para ello, las levaduras se incubaron durante 2 días en este medio a 30 °C con agitación a 150 r.p.m. Pasado este tiempo, se realizó una dilución 1/1.000 del cultivo en MM para obtener una concentración aproximada de 10⁸ células/mL y se incubó durante 3 días a 30 °C con agitación a 150 r.p.m. Tras esto, se visualizó el crecimiento de la cápsula mediante la suspensión de las levaduras en tinta china.

Tabla 3. Listado de cepas utilizadas y mutantes creados en distintos fondos genéticos durante la realización de esta tesis doctoral.

Especie	Cepa	Referencia
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H99 (MAT α) (ATCC 208821)	(Perfect <i>et al.</i> , 1980)
	H99-OZ-1 o H99-1	Laboratorio del Dr. Óscar Zaragoza
	H99-OZ-2 o H99-2	Laboratorio del Dr. Óscar Zaragoza
	H99-OZ-3 o H99-3	Laboratorio del Dr. Óscar Zaragoza
	H99-YSB	Laboratorio del Dr. Yong-Sun Bahn
	H99-RM	Laboratorio del Dr. Robin May
	H99-JK	Laboratorio del Dr. James Kronstad
	H99-MP	Laboratorio del Dr. Maurizio Del Poeta
	H99-JL	Laboratorio de la Dra. Jennifer Lodge
	H99-HM	Laboratorio del Dr. Hiten Madhani
	H99-PG	Laboratorio de la Dra. Claudia-Marcela Parra-Giraldo
	H99-AC	Laboratorio del Dr. Arturo Casadevall
	KN99 (MAT α)	(Nielsen <i>et al.</i> , 2003)
	H99-3::BWC2 (mut 4)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	H99-3::BWC2 (mut 12)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	H99-3::BWC2 (mut 13)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	H99-3::BWC2 (mut 18)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	H99-3::BWC2 (mut 20)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	H99-3::BWC2 (mut 21)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	Mutante <i>bwc1</i> (mut 1)	Este trabajo (fondo genético H99-YSB)
	Mutante <i>bwc1</i> (mut 8)	Este trabajo (fondo genético H99-YSB)
	Mutante <i>bwc1</i> (mut 7)	Este trabajo (fondo genético KN99)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 234)	Este trabajo (fondo genético H99-YSB)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 9)	Este trabajo (fondo genético H99-2)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 12)	Este trabajo (fondo genético H99-2)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 13)	Este trabajo (fondo genético H99-2)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 29)	Este trabajo (fondo genético H99-2)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 36)	Este trabajo (fondo genético H99-2)
	Mutante <i>bwc2</i> (mut 43)	Este trabajo (fondo genético H99-2)
	Mutante <i>bwc2</i>	FGSC (fondo genético KN99)
	Mutante <i>cnag_04756</i> (mut 1)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	Mutante <i>cnag_04756</i> (mut 3)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
	Mutante <i>cnag_04756</i> (mut 16)	Este trabajo (fondo genético H99-3)
Mutante <i>cnag_04756</i>	FGSC (fondo genético KN99)	
<i>Cryptococcus deneoformans</i>	B3501 (MAT α)	(Kwon-Chung, 1976)
<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	R265 (MAT α)	(Kidd <i>et al.</i> , 2007)

5.1.2.2. Inducción de células titanés *in vitro* en TCM

Para la obtención de células titanés *in vitro* se utilizó el medio inductor de células titanés, denominado “Titan Cell Medium” o TCM, descrito por Trevijano-Contador y colaboradores (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Este medio está compuesto por 5% Sabouraud líquido, 5% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Gibco) y 15 μM de azida de sodio (Sigma-Aldrich) preparada en tampón fosfato estéril (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,3), todo ello tamponado con 50 mM MOPS (Sigma-Aldrich) a pH 7,3. Previo a su preparación, la inactivación del suero se llevó a cabo incubando a 56 °C durante 30 minutos. El medio se preparó fresco el día del experimento y para inducir el crecimiento de las células titanés, las levaduras se inocularon a 10^4 o 5×10^4 células/mL y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% CO_2 durante 18 horas. Tras este tiempo, se visualizó el crecimiento celular mediante la observación del cuerpo celular de las levaduras.

La incubación en TCM se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano, tanto de plástico (Falcon) como de vidrio (Greiner), añadiendo 170–200 μL /pocillo. Para los experimentos en los que se necesitaron volúmenes de cultivo más grandes, las levaduras se cultivaron en frascos de cultivo celular de 75 cm^2 (Corning), con 30 mL de cultivo/frasco, o frascos de cultivo de 225 cm^2 (Corning), con 100 mL/frasco.

5.1.2.3. Inducción de la titanización bajo una fuente de luz azul

Para estudiar la influencia de la luz azul en la titanización se introdujo una fuente de luz dentro de un incubador con 5% de CO_2 (ver Figura 8). La titanización se indujo de igual forma que se ha descrito en el apartado 5.1.2.2, pero bajo una fuente de luces led azules (Shenzen DaYang Photo Electricity Co). Se utilizó un luxómetro (Chauvin Aenoux) para controlar que la intensidad de luz se encontrase en un rango de aproximadamente 700–900 luxes. Se llevó siempre en paralelo un control de inducción de células titanés en ausencia de luz. La titanización se indujo en placas de 96 pocillos con fondo plano de plástico (Falcon).

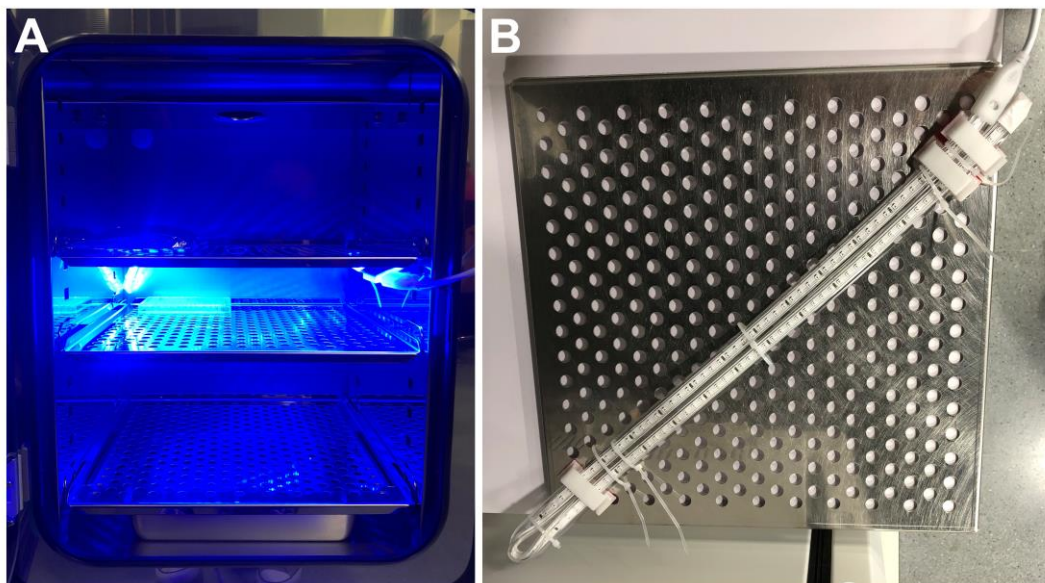


Figura 8. Incubación de las levaduras en presencia de luz azul. A) Incubador con una fuente de luz led azul que incide a las levaduras por la parte superior. B) Cadena de luces led fijada a una balda de incubador mediante la cual se proporciona luz azul a los cultivos.

5.2. Técnicas microbiológicas

5.2.1. Curvas de crecimiento

Las levaduras se inocularon en medio Sabouraud líquido a 30 °C con agitación a 150 r.p.m. durante la noche. Tras este tiempo, los cultivos se lavaron dos veces con Sabouraud líquido y se determinó la densidad celular mediante un contador celular automático TC20 (BioRad). Las levaduras se prepararon a 10^5 células/mL en Sabouraud líquido y se añadieron 200 μ L por triplicado o cuadruplicado en los pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano de plástico (Falcon). Algunos experimentos se hicieron en medio Sabouraud líquido en presencia de distintas concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO) para determinar el efecto de este solvente en las levaduras. Las placas se incubaron en un espectrofotómetro iEMS (Thermofisher) a 30 o 37 °C con agitación de 10 segundos antes de cada medición o sin ella, según el experimento, y se registró la densidad óptica (D.O.) a 540 nm cada 60 minutos durante 48 horas. Los resultados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EE. UU.; www.graphpad.com), representando D.O. frente a tiempo. Se hicieron tres réplicas de cada experimento en días distintos.

5.2.2. Análisis de las unidades formadoras de colonias

La viabilidad de las levaduras o la carga fúngica se determinó realizando el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs). Las suspensiones celulares se diluyeron para obtener entre 100–200 colonias por placa. Se añadieron por duplicado o triplicado 50 o 100 μ L de cada muestra en placas de medio Sabouraud sólido y las levaduras se extendieron con bolas de vidrio de 5 mm de diámetro (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron a 30 °C durante 48 horas, tiempo tras el cual se procedió al conteo de las colonias que habían crecido en cada placa. Se realizaron, al menos, dos réplicas biológicas en días distintos.

5.2.3. Fijación de las células con p-formaldehído 4%

Para la fijación de las células se utilizó p-formaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich), preparado en PBS. La suspensión de levaduras se centrifugó a $3.500 \times g$ durante 5 minutos y el precipitado se suspendió en 500 μ L de PFA, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 2 veces con PBS para retirar los restos de PFA y finalmente se suspendieron en 200 μ L de PBS. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

5.2.4. Análisis del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno

Los cultivos se iniciaron en Sabouraud líquido y al día siguiente se lavaron con PBS y se prepararon a una densidad celular de 2×10^3 células/mL utilizando un contador celular automático. Las levaduras se incubaron en presencia de 0,6 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Sigma-Aldrich) a 37 °C sin CO_2 . A tiempos 0, 1,5 y 3 horas se tomaron 100 μ L de cada cultivo y se realizó recuento de las levaduras viables mediante conteo de UFCs, realizado como se describe en el apartado 5.2.2.

5.2.5. Cuantificación de la actividad fosfolipasa C

Para determinar la actividad fosfolipasa se utilizaron placas de Sabouraud suplementadas con yema de huevo en las que se midió el diámetro del halo generado por las levaduras tras su incubación. Para la preparación de las placas se suplementó medio Sabouraud al 2% de agar con 0,05 M de cloruro cálcico (Sigma-Aldrich) y 1 M de cloruro sódico (Fisher), y tras

autoclavarlo y atemperarlo, se añadió 8% de yema de huevo (Himedia Labs). Las placas se conservaron a 4 °C hasta su uso. Para el experimento, en las placas preparadas se añadieron gotas de 3 µL (10.000 células), poniendo un máximo de 3 gotas/placa para permitir el crecimiento del halo. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días, y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon D60 (Nikon). El diámetro total (halo y gota de levaduras) y el diámetro de la propia gota de levaduras se midieron con la ayuda del programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). El diámetro del halo generado se determinó restando la medición del diámetro total y del diámetro de la gota de levaduras, y se normalizó respecto al diámetro de la gota de levaduras. Estos experimentos se realizaron en triplicado en días diferentes.

5.2.6. Cuantificación de la actividad ureasa

Las levaduras se cultivaron en medio Sabouraud líquido la noche anterior al experimento, y posteriormente se lavaron con PBS y se preparó una suspensión celular de 10^8 células/mL en medio ureasa líquido. Este medio estaba compuesto por 0,25 g de peptona (BD), 1,25 g de cloruro sódico (Fisher Chemical), 0,25 g de glucosa (Sigma-Aldrich), 5 g de urea (AmBion), 0,34 g de KH_2PO_4 (MP) y 0,003 g de rojo fenol (Sigma-Aldrich), todo disuelto en 250 mL de agua destilada y autoclavado. Las levaduras se incubaron a 30 °C en agitación a 150 r.p.m. hasta un máximo de 10 horas, extrayendo 100 µL de los cultivos cada 60 minutos. Los cultivos extraídos se precipitaron y 75 µL del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano de plástico (Falcon) para leer la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro SpectraMax iD5 (Molecular Devices). Además, en todos los experimentos se determinó a tiempo 0 un recuento de UFCs para asegurar que todos los cultivos partían del mismo número de levaduras. Este experimento se repitió por triplicado en distintos días.

5.2.7. Obtención y cuantificación de la producción de vesículas extracelulares

Las levaduras se cultivaron en 5 mL de YPD líquido en agitación a 150 r.p.m. y 30 °C durante la noche. Al día siguiente, los inóculos se prepararon a $3,5 \times 10^7$ células/mL en medio YPD, se repartieron 300 µL en 3–5 placas de YPD con 2% agar y se incubaron durante 24 horas a 30 °C. Al día siguiente se recogió el césped de levaduras con un asa de siembra y se suspendieron en 30 mL de PBS estéril en tubos para ultracentrífuga (Beckman Coulter). Se determinó el número de levaduras recogidas con un contador celular automático. Para eliminar las células, la suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y $5.000 \times g$ en una centrifuga Sorvall RC 6 Plus (Thermo Scientific) con un rotor Sorvall SS-34 (Thermo Scientific), y posteriormente, el sobrenadante se volvió a centrifugar a $15.000 \times g$ durante 15 minutos y 4 °C para eliminar los restos celulares. Para la obtención de las vesículas extracelulares (VEs), el sobrenadante obtenido se pasó a través de filtros con un tamaño de poro de 0,45 µm (Corning) y se centrifugó a $100.000 \times g$ a 4 °C durante 1 hora en una ultracentrífuga Optima XPN-100 (Beckman Coulter) con un rotor SW-28 (Beckman Coulter). Se eliminó el sobrenadante y las VEs se suspendieron en 300 µL de PBS. Las preparaciones se conservaron a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación de las VEs se llevó a cabo con el equipo NanoSight 3000 (Malvern Panalytical), como se describe en (Reis *et al.*, 2019). Brevemente, se utilizó un sistema de análisis de nanopartículas LM10 acoplado a un láser de 488 nm, equipado con una cámara sCMOS y una bomba de jeringa (Malvern Panalytical). El análisis de datos se llevó a cabo con el programa NTA 3.0 (Malvern Panalytical). Las muestras se diluyeron en PBS para

obtener un rango óptimo de lectura (9×10^7 – $2,9 \times 10^9$ partículas/mL) y se inyectaron mediante una jeringa de 1 mL acoplada a una bomba de inyección. Por cada muestra se tomaron 3 videos de 60 segundos, y el número de partículas se normalizó por el número inicial de levaduras del cultivo. Los experimentos se realizaron en triplicado en días distintos.

La visualización de las VEs obtenidas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), según se describe en el apartado 5.6.3.1.

5.2.8. Medida del consumo de oxígeno

Se cuantificó el consumo de oxígeno (“oxygen consumption rate”, OCR) en un equipo Seahorse XFe24 (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con ligeras modificaciones.

El día previo al experimento se procedió a encender el equipo Seahorse XFe24 y a hidratar las sondas del cartucho (placa verde, Figura 9 A y B) sumergiéndolas en 200 μ L de agua destilada estéril añadida en la “utility plate” (placa transparente de la Figura 9 B). El cartucho se incubó toda la noche a 37 °C en un incubador sin CO₂. El día del experimento, el primer paso fue sustituir el agua destilada que había hidratado las sondas por 200 μ L de medio XF Calibrant (Agilent), previamente atemperado a 37 °C. Las sondas del cartucho se mantuvieron al menos una hora en este medio. También se añadieron 400 μ L de medio XF Calibrant a los pocillos de alrededor de las sondas para ayudar a mantener la temperatura. Los cultivos de levaduras se lavaron con medio XF DMEM (Agilent) dos veces y se prepararon a la densidad celular adecuada para cada tiempo y para cada condición.

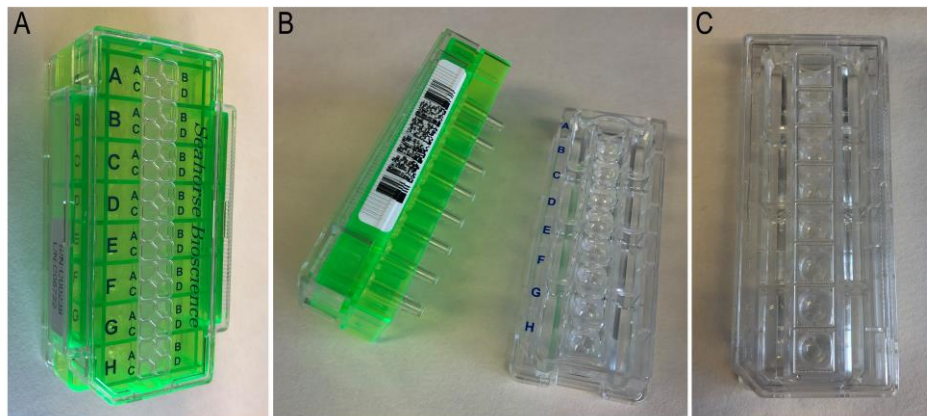


Figura 9. Material fungible del equipo Seahorse XFe24. A) Placa donde se encuentran las sondas (placa verde) mostrando los pocillos donde se añaden los compuestos inhibitorios (no descrito en este trabajo). B) Vista lateral de la placa donde se encuentran las sondas (columnas que sobresalen por debajo de la placa verde) y la “utility plate”, donde se hidratan las sondas y se hace la calibración del equipo (placa transparente). C) Placa de ensayo donde se dispensan las levaduras y se lleva a cabo la lectura final del consumo de oxígeno.

Para la medición del OCR es importante tener una capa homogénea de células con una confluencia de alrededor del 80–90%, por lo que para establecer la densidad celular adecuada primero se realizó una curva con distintas concentraciones celulares (desde 100.000 hasta 10.000 células/pocillo). Para las células de tamaño normal (inducidas en medio Sabouraud líquido), la concentración de células utilizada fue de 80.000–100.000 células por cada pocillo. Sin embargo, las células titanes aumentan de tamaño a lo largo del experimento, por lo que no se pudo usar la misma concentración celular a todos los tiempos y tuvo que

ajustarse (80.000–100.000 células/pocillo a tiempo 0, 60.000 células/pocillo a 3 horas, y 40.000 células/pocillo a 6 y 24 horas). Una vez los cultivos estuvieron preparados a la densidad celular adecuada, se dispensaron a la placa de ensayo (Figura 9 C). Inicialmente se añadieron 50 μ L del inóculo preparado, dejándolo sedimentar, y posteriormente, muy despacio, se completó con medio XF DMEM hasta 180 μ L (primero se añadieron 20 μ L de XF DMEM, luego otros 20 μ L, y finalmente 90 μ L, para completar el volumen final de 180 μ L). En la medida de lo posible, se mantuvo todo a 37 °C, y antes de la lectura en el equipo Seahorse XFe24 se comprobó bajo un microscopio de campo claro la distribución homogénea de las levaduras en el pocillo.

5.3. Tinciones

5.3.1. Tinción negativa con tinta china

Para la observación de la cápsula de *C. neoformans* se usó la tinción negativa de tinta china. Esta técnica permite ver la cápsula de *Cryptococcus* como un halo alrededor del cuerpo celular de la levadura por exclusión de la tinta china. Para ello, sobre un portaobjetos se mezclaron 7 μ L de la suspensión de levaduras concentrada y 3 μ L de tinta china (Remel Bactidrop). Se colocó un cubreobjetos de 24 × 40 mm (Menzel-Gläser) y se tomaron fotografías bajo el microscopio en campo claro.

Para determinar el diámetro de las levaduras se utilizó el programa Fiji, y los tamaños se midieron manualmente. El tamaño total de la célula se definió como el diámetro total de la levadura, incluyendo la cápsula; el cuerpo celular se encontró delimitado por la pared celular; y el tamaño de la cápsula se calculó como la diferencia entre el tamaño total de la célula y el diámetro del cuerpo celular. Según las necesidades del experimento se determinaron el tamaño total de la célula, del cuerpo celular, y/o de la cápsula.

5.3.2. Tinción con lactofucsina

Se preparó una solución de 1 mg/mL de fucsina ácida (Sigma-Aldrich) en ácido láctico al 63% (Merck). Para realizar la tinción de las levaduras se realizó una dilución 1/30 de esta solución en agua destilada estéril, quedando la lactofucsina a 33 μ g/mL en 2,1% de ácido láctico. Finalmente, 30 μ L de esta solución se añadieron sobre 200 μ L de células, siendo la concentración final de lactofucsina de 4,3 μ g/mL en 0,27% de ácido láctico. A continuación, se tomaron fotografías en un microscopio Cytell™ Cell Imaging System (GE Healthcare Life Sciences), y el tamaño celular se analizó de forma automatizada en dicho equipo (utilizando una de las “BioApps” preinstaladas, denominada “NucShape”) o usando las macros diseñadas en el programa Fiji durante esta tesis doctoral, descritas en el apartado 5.10.1.1.

5.3.3. Tinción con MitoTracker

Para visualizar la morfología de las mitocondrias las células se suspendieron en PBS y se tiñeron con 40 nM de la sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen), incubando 30 minutos a 37 °C y 5% CO₂. Se lavó con PBS dos veces y la fluorescencia de las células se observó en un microscopio confocal STELLARIS 8 (Leica Microsystems). Las imágenes se procesaron usando los programas Fiji (Schindelin *et al.*, 2012), LAS X (Leica Microsystems) y Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated; San Jose, California, EE. UU.).

5.4. Técnicas de biología molecular

5.4.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico

Para la extracción de ADN se utilizaron dos protocolos, uno más detallado mediante el cual se obtuvo ADN para la secuenciación masiva, y otro más rápido que se utilizó para la comprobación del ADN de los mutantes obtenidos por transformación biolística.

En el protocolo utilizado para secuenciación masiva se partió de un cultivo de *C. neoformans* incubado durante 24 horas en medio Sabouraud líquido. El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a $3.500 \times g$, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 1 mL de agua destilada fría. Se centrifugó a $13.800 \times g$ durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 500 mg de bolas de vidrio de 425–600 μm de diámetro (Sigma-Aldrich) y 50 μL de tampón de lisis (1% SDS, 0,5 M NaCl, 0,2 M Tris-HCl a pH 7,6, 10 mM EDTA a pH 8). Se procedió a la rotura mecánica de las levaduras con ayuda de un FastPrep-24™ (MP Biomedicals), realizando 2 ciclos de 45 segundos a máxima velocidad con intervalos en hielo de 1 minuto para enfriar las muestras. Tras esto, se añadieron 350 μL de tampón de lisis y 4 μL de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Se mezcló por inversión y se incubó durante 2 horas a 65 °C. Se añadieron 400 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) y se mezcló con vortex, llevando a cabo 5 ciclos de 30 segundos con 1 minuto en hielo entre cada ciclo. Se centrifugó a $13.800 \times g$ durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante (350–400 μL) sin tocar la interfase. Se añadió igual cantidad de cloroformo-isoamílico (24:1) y tras mezclar, se centrifugó en frío a $13.800 \times g$ durante 15 minutos. Se recogieron 300 μL de la fase acuosa y se mezclaron con 0,6 volúmenes de isopropanol (Fisher Chemical). Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 15 minutos a $13.800 \times g$ a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante por aspiración con un sistema de vacío y se añadieron 300 μL de etanol 70%. Se centrifugó a $13.800 \times g$ en frío durante 10 minutos y se volvió a eliminar el sobrenadante. El ADN se suspendió en 25–50 μL de agua destilada con 1–2 μL de 1 mg/mL RNAsa (Roche) y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

En el protocolo rápido de extracción de ADN se partió igualmente de un cultivo de *C. neoformans* incubado en Sabouraud líquido. Las levaduras se suspendieron en 500 μL de tampón de lisis (2% Triton 100x, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA a pH 8) y la mezcla se transfirió a tubos de 2 mL que contenían 500 mg de bolas de vidrio de 425–600 μm de diámetro (Sigma-Aldrich). Se añadieron 500 μL de una solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) y se procedió a la rotura mecánica de las levaduras con ayuda de un FastPrep-24™ (MP Biomedicals), realizando 2 ciclos de 45 segundos a máxima velocidad con intervalos en hielo de 2 minutos para enfriar las muestras. Los tubos se centrifugaron a $13.800 \times g$ durante 10 minutos y entre 400–500 μL de la fase acuosa se transfirieron a nuevos tubos de 2 mL. Se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto (PanReac AppliChem) y se mezclaron las muestras por inversión. Se centrifugó de nuevo a $13.800 \times g$ durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 400 μL de tampón TE (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA a pH 8). Para favorecer la eliminación del ARN se añadieron 5 μL de una solución de RNAsa (Roche) a 1 mg/mL y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Para la precipitación del ADN se añadieron 10 μL de 5M acetato de amonio y 1 mL de etanol absoluto, mezclando por inversión. Finalmente, se procedió a lavar el sedimento, centrifugando a $13.800 \times g$ durante

5 minutos, tras lo cual se eliminó el sobrenadante por aspiración con ayuda de un sistema de vacío y se añadieron 500 μ L de etanol 70%. Sin mezclar, se repitió la centrifugación y se eliminó de nuevo el sobrenadante. El precipitado se dejó secar en cabina de extracción de gases y se suspendió en 25–50 μ L de tampón de elución (Invitrogen).

El ADN se conservó a -20 °C y para su cuantificación se midió la absorbancia a 260/280 y 260/230 nm en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific).

5.4.2. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo se especifican en la Tabla 4, y se usaron para la construcción de mutantes.

Tabla 4. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Referencia	Marcador de resistencia	Usos en este trabajo
pSDMA57	(Arras <i>et al.</i> , 2015)	NEO ^R	Reinserción <i>BWC2</i> en H99-3
pPZP-NATcc	(Walton <i>et al.</i> , 2005)	NAT ^R	Delección <i>BWC2</i> en H99-YSB y H99-2 Delección <i>BWC1</i> en H99-YSB y KN99 Delección <i>CNAG_04756</i> en H99-3

Los oligonucleótidos utilizados (Sigma-Aldrich) se diseñaron según las necesidades de cada experimento con la ayuda del programa Primer designing tool (nih.gov), y se detallan en la Tabla 5. En todos los casos, se preparó una solución madre a una concentración de 100 μ M con agua de PCR (Roche).

5.4.3. Obtención, visualización, purificación y concentración de ADN

Todas las PCR realizadas se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L con tres posibles enzimas, AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems), Phusion™ High-Fidelity ADN polimerasa (Thermo Scientific) y PrimeSTAR® HS ADN polimerasa (Takara Bio), y la enzima utilizada se especifica en cada apartado correspondiente. La mezcla de reacción para cada enzima fue siempre la misma y se especifica a continuación. Para la enzima AmpliTaq ADN polimerasa se utilizó tampón 1x con 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 0,2 mM dNTPs (Biorad), 0,2 μ M de los oligonucleótidos específicos para cada caso, 1,5 μ L de DMSO 100% (Thermo Scientific) y 2,5 U de enzima AmpliTaq ADN polimerasa. Para la enzima Phusion™ High-Fidelity ADN polimerasa la mezcla de reacción contuvo tampón Phusion HF 1x con 1,5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 0,2 mM dNTPs (Biorad), 0,2 μ M de oligonucleótidos específicos, 1,5 μ L de DMSO 100% y 1 U de enzima ADN polimerasa Phusion. Salvo que se indique lo contrario, con ambas enzimas se utilizaron 100 ng de ADN genómico o plasmídico como molde. Por último, la enzima PrimeSTAR® HS ADN polimerasa se utilizó para llevar a cabo todas las PCRs de fusión, y la mezcla de reacción fue la siguiente: tampón PrimeSTAR 1x (Mg²⁺ plus) (Takara Bio), 0,2 mM dNTPs (Takara Bio), 0,2 μ M de oligonucleótidos, 1,5 μ L de DMSO 100% y 1,25 U de enzima ADN polimerasa PrimeStar HS. En este caso, como ADN molde se añadió una cantidad equimolar de cada fragmento A, B y C, distinta para cada reacción, por lo que dicha cantidad se especifica en cada apartado correspondiente. En todos los casos, la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) utilizando protocolos de amplificación específicos. En la mayoría de los casos hubo que ajustar las condiciones de los ciclos de amplificación según el fragmento a amplificar, por lo que dichas condiciones se describen en cada apartado correspondiente.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados. Se diseñaron oligonucleótidos para la creación de mutantes y para la comprobación de dichos mutantes. Todos los oligonucleótidos que no incluyen una referencia se diseñaron durante este trabajo. F, “forward” o directo; R, “reverse” o reverso; Sec, secuencia.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'– 3'	Localización y/o función
Cn02435_Sacl_F3	ATCTAGAGCTCTGGAGGATCGTTAGCAGGGTGAGTCGC	Sec. externa <i>BWC2</i> con sitio Sacl para reinserción <i>BWC2</i>
Cn02435_Sacl_R	ATCGTGAGCTCAGCTGATCAACAAGCTCGACGACGC	Sec. externa <i>BWC2</i> con sitio Sacl para reinserción <i>BWC2</i>
UQ1768	TCAGCAACGCCGTTGAATCCT	Comprobación de reinserción <i>BWC2</i> (Arras <i>et al.</i> , 2015)
UQ2962	GGGTATGCCACAGATGCAGAT	Comprobación de reinserción <i>BWC2</i> (Arras <i>et al.</i> , 2015)
UQ2963	TTGGATCCTCAATTGTCTCCT	Comprobación de reinserción <i>BWC2</i> (Arras <i>et al.</i> , 2015)
UQ3348	ACTGGTGAGTACTCAACCAAG	Comprobación de reinserción <i>BWC2</i> (Arras <i>et al.</i> , 2015)
Yep352-Cn02435_5F (1)	TACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTGGAGGATCGTTAGCAGGGT	PCR de fusión <i>BWC2</i>
Cn02435- NAT_5R (2)	GCTTATGTGAGTCCTCCCGTAAGAGCCCAAGACGCTCAGGTTAAC	PCR de fusión <i>BWC2</i>
NAT-Cn02435_F (3)	GTAAACCTGAGCGTCTTGGGCTCTTACGGGGAGGACTCACATAAGC	PCR de fusión <i>BWC2</i>
NAT-Cn02435_R (4)	CCCAGCGATCAGTCCAAAGTGAAGAGATGTAGAAACGAG	PCR de fusión <i>BWC2</i>
Cn02435-NAT_3F (5)	CTCGTTTCTACATCTCTTCACTTTGGACTGATCGCTGGG	PCR de fusión <i>BWC2</i>
Yep352-Cn02435_3R (6)	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCATTGGTAAGCGGGACCTGTG	PCR de fusión <i>BWC2</i>
CNAG_02435_SeqF	CGCTGACGTGTAGTACGGAA	Sec. interna <i>BWC2</i> para comprobación <i>bwc2</i>
CNAG_02435_SeqR	TTGCCATCGCCTTCTCCAAT	Sec. interna <i>BWC2</i> para comprobación <i>bwc2</i>
Cn02435-1152_F	CTTCCGGGATTCATTCTCG	Sec. externa <i>BWC2</i> para comprobación <i>bwc2</i>
Cn02435+1104_R	TGTGGTACGCGTTGGCTATC	Sec. externa <i>BWC2</i> para comprobación <i>bwc2</i>
Cn04756_5F (1)	CGGCAACTTTTCCCAAATCC	PCR de fusión <i>CNAG_04756</i>
NAT-Cn04756_5R (2)	GCTTATGTGAGTCCTCCCAACTAACTGCTCACTTCTTCC	PCR de fusión <i>CNAG_04756</i>
Cn04756_NAT_F (3)	GGAAGAAGTGAGCAGTTAGTTGGGGAGGACTCACATAAGC	PCR de fusión <i>CNAG_04756</i>
Cn04756-NAT_R (4)	CTCCTGTTGTTCTTGCACGGAAGAGATGTAGAAACGAG	PCR de fusión <i>CNAG_04756</i>
NAT_Cn04756_3F (5)	CTCGTTTCTACATCTCTTCCGTGCAAGAACAACAGGAG	PCR de fusión <i>CNAG_04756</i>
Cn04756_3R (6)	CCGATTGCTTCTGATTCATCC	PCR de fusión <i>CNAG_04756</i>
seqCNAG_04756_F	GAGCTTGACCCTCTTTCTTCC	Sec. externa <i>CNAG_04756</i> para comprobación <i>04756</i>
seqCNAG_04756_R	CGTCTCATCCATCACAGTAG	Sec. externa <i>CNAG_04756</i> para comprobación <i>04756</i>
CNAG_05181_1	ACGTAGTTGAGTTGGTCCGC	PCR de fusión <i>BWC1</i>
CNAG_05181_2B	GCTTATGTGAGTCCTCCCTAGATTGTGTGAGAGGCGGC	PCR de fusión <i>BWC1</i>
CNAG_05181_3B	GCCGCTCTCACACAATCTAGGGAGGACTCACATAAGC	PCR de fusión <i>BWC1</i>
CNAG_05181_4	GCCTGCTTAGGCACTGAACGAAGAGATGTAGAAACGAG	PCR de fusión <i>BWC1</i>
CNAG_05181_5	CTCGTTTCTACATCTCTTCCGTTCCAGTGCCTAAGCAGGC	PCR de fusión <i>BWC1</i>
CNAG_05181_6	GATGTGGGTGGCGTCATTG	PCR de fusión <i>BWC1</i>
CNAG_05181_intF1	CACCCAGCTCCTCACATAGC	Sec. interna <i>BWC1</i> para comprobación <i>bwc1</i>
CNAG_05181_intR1	GTAAGGGCTCGACCATCCG	Sec. interna <i>BWC1</i> para comprobación <i>bwc1</i>
CNAG_05181_extF	GCGACGAACACGCACGCAGAA	Sec. externa <i>BWC1</i> para comprobación <i>bwc1</i>
CNAG_05181_extR	GTAGCTACACCGCAATCCCCT	Sec. externa <i>BWC1</i> para comprobación <i>bwc1</i>
NAT_F	GGTCACCAACGTTAACGCAC	Sec. interna <i>NAT^R</i> para comprobación de mutantes

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Sigma-Aldrich), añadiendo 5 μ L del intercalante de ADN Midori Geen Advance (Nippon Genetics) y tampón de carga (0,25% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), 0,25% xilenecianol (Sigma-Aldrich), 15% ficoll (Sigma-Aldrich)) para la correcta visualización de las muestras. En todos los casos se añadió un marcador de tamaño de 10 kb (Promega). Se tomaron fotografías con un transiluminador conectado a un equipo de captación de imágenes ChemiDoc™ XRS+ (BioRad).

Los productos de PCR se purificaron directamente o, en la mayoría de los casos, a partir de un gel de agarosa de 0,8%. Se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta que permitió la visualización de las bandas para posteriormente cortarlas con un bisturí. La purificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit de purificación NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Para los experimentos en los que se necesitó concentrar el ADN se recurrió al equipo Concentrator Plus (Eppendorf), realizando una fase previa de calentamiento a 30 °C durante 15 minutos, seguido del programa concentrador V-AQ a 30 °C durante el tiempo necesario para cada caso (15–50 minutos).

5.4.4. Reinserción del gen *BWC2*

Se reintrodujo el gen *CNAG_02435 (BWC2)* silvestre en una variante en la que dicho gen estuviera mutado, es decir, en la variante H99-3. Para ello, se procedió a amplificarlo por PCR a partir de una variante H99 silvestre y se clonó en el vector de clonación comercial pGEM®-T Easy Vector System II (Promega). Posteriormente, se extrajo y se clonó en el plásmido pSDMA57 (Arras *et al.*, 2015), el cual fue linealizado mediante digestión enzimática y finalmente introducido en el fondo genético deseado mediante transformación biofísica.

5.4.4.1. Obtención del inserto *BWC2*

El gen *BWC2* silvestre se amplificó mediante PCR convencional usando como molde ADN de la cepa H99-YSB y los oligonucleótidos Cn02435_SacI_F3 y Cn02435_SacI_R. En el diseño de los oligonucleótidos se añadieron unas secuencias con los sitios de restricción para la enzima SacI en los extremos 5' y 3' del inserto *BWC2*. Se utilizó la enzima AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems) y la amplificación se llevó a cabo con los siguientes ciclos: un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 3 minutos a 72 °C, y se finalizó con un ciclo de 7 minutos a 72 °C.

5.4.4.2. Clonación del inserto *BWC2* en el vector pGEM®-T

El inserto *BWC2* obtenido se introdujo en el vector de clonación pGEM®-T Easy siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial (pGEM®-T Easy Vector System II, Promega). Brevemente, se llevó a cabo una ligación de plásmido e inserto durante 1 hora a temperatura ambiente y, después, una transformación bacteriana con las bacterias competentes JM109 (Promega). Para ello, la mezcla fue sometida a un choque térmico de 45–50 segundos en baño de agua a 42 °C y luego se transfirieron nuevamente a hielo durante 2 minutos. Las bacterias positivas se seleccionaron mediante crecimiento en placas de LB con 100 μ g/mL de ampicilina e IPTG (8 μ L de una solución a 200mg/mL) y X-Gal (40 μ L de una solución a 20 mg/mL).

5.4.4.3. Identificación del vector pGEM®-T con el inserto *BWC2* correcto

Las colonias obtenidas tras la transformación bacteriana se sembraron en medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C durante 24 horas, y al día siguiente se extrajo el ADN plasmídico con el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La correcta clonación del fragmento se comprobó mediante digestión de las muestras con distintas enzimas de restricción, que se llevó a cabo según las especificaciones de la casa comercial. La primera comprobación se realizó con la enzima de restricción NdeI (Thermo Scientific). La mezcla de restricción se incubó a 37 °C durante 5 minutos, inactivando posteriormente la enzima durante 5 minutos a 65 °C. Las muestras correctas generaron una banda lineal de 6 kb (Figura 10 A). Se llevó a cabo una segunda comprobación con la enzima de restricción EcoRI (Thermo Scientific), incubando durante 2 horas a 37 °C y posteriormente durante 20 minutos a 65 °C. En este caso, las colonias positivas mostraron bandas de 813, 2.364 y 3.015 pb (Figura 10 B).

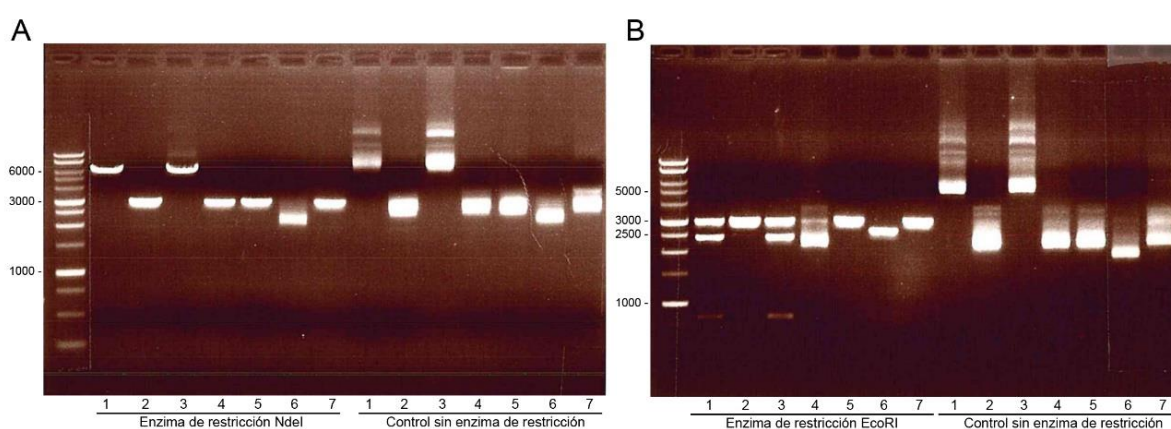


Figura 10. Comprobación del inserto *BWC2* con enzimas de restricción. Tras la ligación y la transformación bacteriana del vector de clonación pGEM®-T Easy y el inserto *BWC2*, se obtuvieron 7 muestras (1–7), que se digirieron con distintas enzimas de restricción para comprobar la correcta incorporación del inserto *BWC2*. Las muestras se visualizaron en gel de agarosa al 1%. A) Muestras 1–7 digeridas con la enzima de restricción NdeI. Esta enzima cortó una vez al vector pGEM®-T Easy, generando una banda de 6 kb en las muestras correctas. B) Muestras 1–7 digeridas con la enzima de restricción EcoRI. Esta enzima cortó 2 veces al plásmido y una vez al inserto, generándose tres bandas con los siguientes tamaños: 813, 2.364 y 3.015 pb. Se identificaron las muestras 1 y 3 como positivas. La muestra 1 se escogió para continuar con el proceso. En ambos casos se incluyó un control de cada muestra sin digerir. A la izquierda de cada imagen se detalla el tamaño de las bandas con un marcador de los tamaños de 10 kb.

5.4.4.4. Preparación del inserto *BWC2* y del plásmido pSDMA57

El plásmido pGEM®-T Easy poseía un tamaño de 3.015 pb y el inserto *BWC2*, 3.186 pb, por lo que se requirió una digestión con dos enzimas para poder diferenciarlos. Se utilizaron las enzimas PdmI (Thermo Scientific) y SacI (Thermo Scientific), siguiendo en ambos casos los protocolos del fabricante. La primera digestión se llevó a cabo con la enzima PdmI, incubando durante 2 horas a 37 °C e inactivando posteriormente la enzima durante 20 minutos a 65 °C. El producto obtenido fue una banda de aproximadamente 6 kb (Figura 11 A), que se utilizó directamente para la segunda digestión con la enzima SacI. Esta incubación se realizó siguiendo el mismo protocolo, y se obtuvieron tres tamaños de banda, entre ellos una banda de 3.186 pb que correspondió con el inserto *BWC2* (Figura 11 B, carril 1). Esta banda se aisló en gel de agarosa 0,8% y posteriormente se purificó con el kit de purificación NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

El plásmido pSDMA57 (Arras *et al.*, 2015) contiene el marcador de resistencia *NEO^R*, que codifica la neomicina fosfotransferasa II y confiere resistencia a la geneticina o G418 en levaduras. Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *SacI*, incubando la mezcla de reacción como se ha descrito en el párrafo anterior. Se verificó la obtención de una sola banda mediante gel de agarosa 0,8% (Figura 11 C) y se purificó con el kit de purificación NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). El plásmido digerido se defosforiló con una enzima fosfatasa alcalina (Thermo Scientific) incubando durante 10 minutos a 37 °C y 5 minutos a 75 °C. El producto obtenido se purificó utilizando el mismo kit comercial anterior.

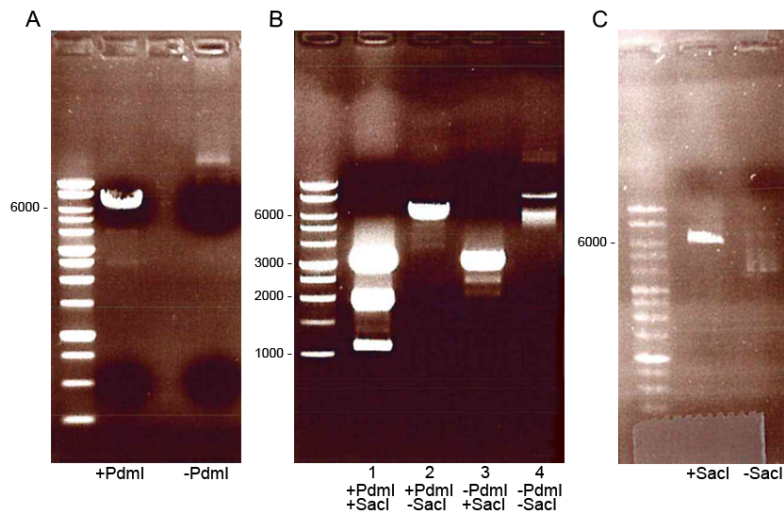


Figura 11. Preparación del inserto *BWC2* y del plásmido pSDMA57 para su clonación. A) El inserto, clonado en el plásmido pGEM®-T Easy, se digirió con la enzima de restricción *Pdml* y se obtuvo una banda lineal de 6 kb. B) El fragmento digerido con *Pdml* se digirió con la enzima de restricción *SacI* (carril 1) y se obtuvieron 3 bandas, siendo la banda de 3.186 pb el inserto *BWC2*. Además, se incluyeron distintos controles (carriles 2, 3 y 4). C) Plásmido pSDMA57 digerido con la enzima *SacI*. En todos los casos se incluyeron controles sin las enzimas de restricción (-), y las muestras en las que se añadió enzima de restricción se señalan con (+). A la izquierda de cada imagen se detalla el tamaño de las bandas con un marcador de 10 kb.

5.4.4.5. Clonación del inserto *BWC2* en el plásmido pSDMA57

El inserto *BWC2* se clonó en el plásmido pSDMA57. Brevemente, se llevó a cabo una ligación con el kit comercial Rapid Ligation Kit (Thermo Scientific), con la enzima T4 ADN ligasa, incubando durante 5 minutos a 22 °C. Tras esto, se realizó la transformación con las bacterias competentes Library Efficiency™ DH5α™ (Thermo Scientific), incubando la mezcla durante 30 minutos en hielo y aplicando posteriormente un choque térmico de 3 minutos a 42 °C y 2 minutos en hielo. Las bacterias positivas se seleccionaron mediante crecimiento en placas de LB con 100 µg/mL ampicilina e IPTG y X-Gal. Las colonias obtenidas se sembraron en medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se aisló el plásmido utilizando el kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

La correcta incorporación del inserto *BWC2* en el plásmido pSDMA57 se comprobó utilizando las enzimas de restricción *SacI*, *EcoRI* y *HindIII* (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Inicialmente se utilizó la enzima *SacI*, que generó dos bandas en las muestras correctas, una banda de 3 kb (inserto *BWC2*) y otra de 6 kb (plásmido pSDMA57) (Figura 12).

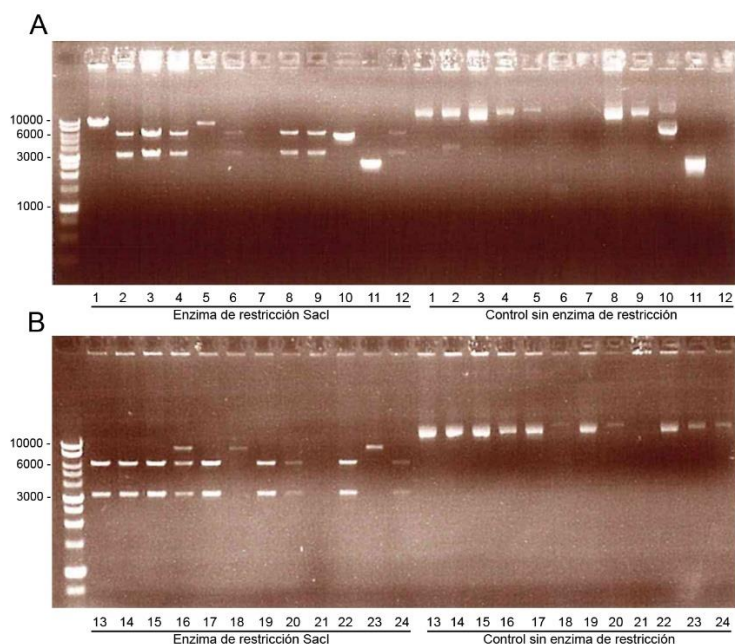


Figura 12. Digestión con *SacI*. El inserto *BWC2* se clonó en el plásmido pSDMA57 y se obtuvieron 24 colonias. La positividad de estas colonias se comprobó realizando una digestión con la enzima de restricción *SacI*. Las muestras correctas mostraron dos bandas, una de 3 kb (inserto *BWC2*) y otra de 6 kb (plásmido pSDMA57). A) Muestras 1–12. B) Muestras 13–24. Se incluyeron controles de todas las muestras sin digerir. A la izquierda de cada imagen se detalla el tamaño de las bandas con un marcador de 10 kb.

Posteriormente se seleccionaron solo algunas muestras (muestras 1, 2, 3, 14 y 15) con las que se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. La incubación de la mezcla de reacción para la enzima *EcoRI* se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, y la reacción con la enzima *HindIII* se incubó 15 minutos a 37 °C y posteriormente 10 minutos a 80 °C. El inserto *BWC2* pudo introducirse en dos orientaciones (orientación A y orientación B), por lo que las bandas tras la digestión mostraron distintos tamaños de banda según la orientación en la que se incorporó el inserto en el plásmido (Figura 13).

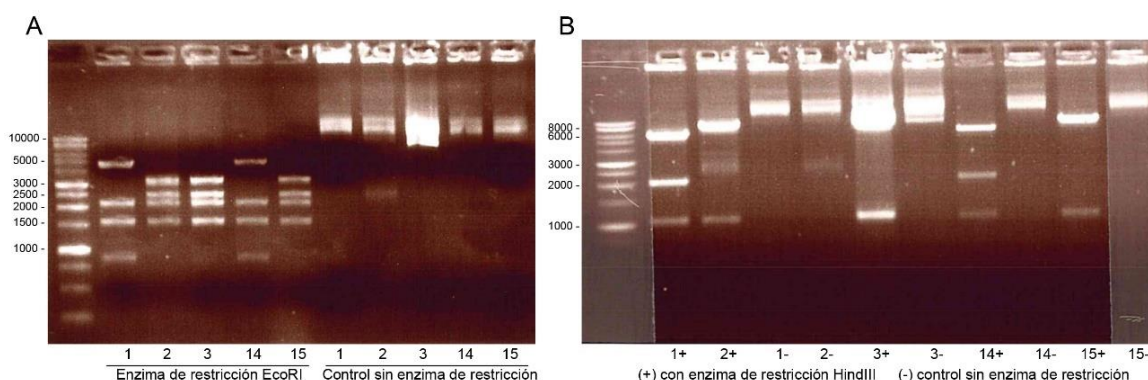


Figura 13. Comprobación con enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Tras la digestión con la enzima *SacI* (Figura 12), se escogieron las muestras 1, 2, 3, 14 y 15 para la comprobación con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. A) Digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. El inserto *BWC2* generó 4 fragmentos con distintos tamaños de banda según su orientación. En la orientación A se generaron bandas de 1.532, 2.092, 2.412 y 3.200 pb, y en la orientación B, los tamaños fueron de 865, 1.532, 2.092 y 4.747 pb. B) Digestión con la enzima de restricción *HindIII*. Se generaron 3 bandas de distintos tamaños según la orientación del inserto. En la orientación A los tamaños fueron de 183, 1.050 y 8.003 pb, y en la orientación B, de 1.050, 2.068 y 6.118 pb. Se confirmó que todas las muestras poseían el inserto *BWC2*. Las muestras 1 y 14 tenían el inserto en orientación B y las muestras 2, 3 y 15, en orientación A. Se escogieron las muestras 14 y 15 para continuar con el proceso. Se incluyeron controles de todas las muestras sin digerir. A la izquierda de cada imagen se detalla el tamaño de las bandas con un marcador de 10 kb.

Seguidamente, se procedió a linealizar el plásmido pSDMA57 (Figura 14). Este proceso podía realizarse con tres enzimas de restricción, BaeI, PaeI y AseI (Arras *et al.*, 2015), pero se comprobó con el programa RestrictionMapper V3 (<https://restrictionmapper.org>) que en este caso solo podían utilizarse las enzimas PaeI y AseI (BaeI cortaba el inserto). Se decidió usar la enzima PaeI (Thermo Scientific) para linealizar el fragmento (Figura 14 C). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37 °C y 20 minutos a 65 °C. El producto linealizado se visualizó, purificó y concentró como se ha descrito anteriormente, y finalmente se introdujo en la cepa deseada mediante transformación biolística.

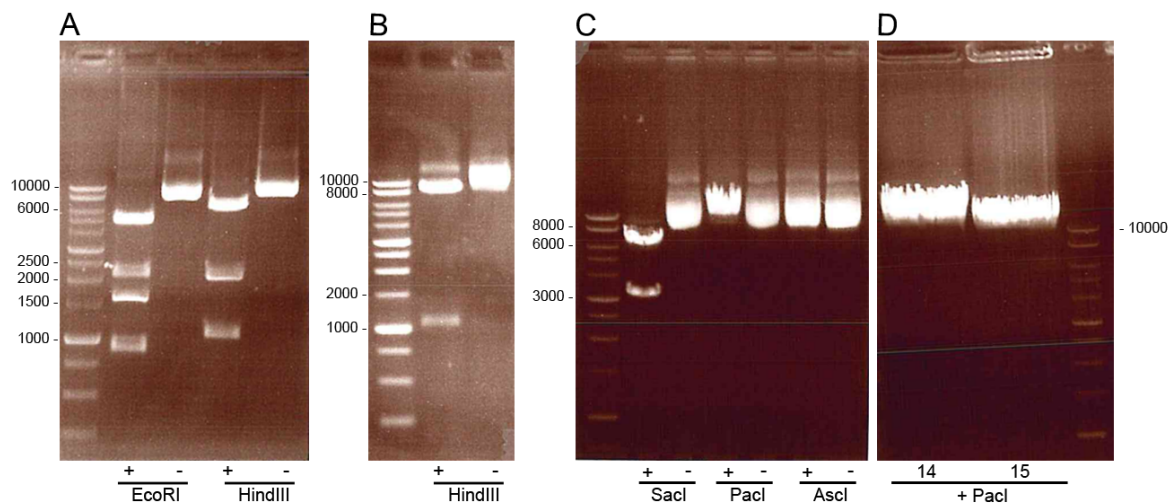


Figura 14. Comprobación de las muestras 14 y 15 y linealización del plásmido. Se confirmaron los cortes generados por las enzimas de restricción EcoRI y HindIII en las muestras 14 (A) y 15 (B). C) Comprobación del funcionamiento de las enzimas PaeI y AseI en la muestra 14. Se añadió la enzima SacI como control. D) Digestión de las muestras 14 y 15 con la enzima de restricción PaeI para su linealización y posterior introducción en la cepa deseada mediante transformación biolística. Se añadieron controles de las muestras sin digerir (-), y las muestras en las que se añadió enzima se señalan con (+). Cada imagen incluye un marcador de 10 kb.

5.4.5. Construcción de mutantes de delección (KO)

Se construyeron distintos mutantes a los que se les eliminaron diferentes genes. Para ello, se diseñaron distintos fragmentos (A, B y C) que posteriormente se fusionaron mediante una PCR de fusión para generar la construcción de interrupción (Davidson *et al.*, 2002), que se introdujo finalmente en el fondo genético deseado mediante transformación biolística (ver Figura 15).

En cada caso, se obtuvieron los fragmentos adyacentes al gen de interés (fragmentos A y C). El fragmento A se encontró aguas arriba (en la región 5' o "upstream") del gen a deleccionar, y tenía aproximadamente 1 kb. El fragmento C, con el mismo tamaño, se localizó aguas abajo (en la región 3' o "downstream") del gen a eliminar. El fragmento B se obtuvo a partir del plásmido pPZP-NATcc (Walton *et al.*, 2005), que proporcionó el gen *NAT^R*, con el que se sustituyó el gen a deleccionar, que codifica la nourseotricina N-acetil transferasa y confiere resistencia a nourseotricina.

En todos los casos, las PCRs para la obtención de los fragmentos A y C se realizaron utilizando como molde 150 ng de ADN genómico de la cepa H99. Las condiciones de PCR de estos fragmentos variaron en cada mutante, por lo que se especifican en los apartados correspondientes. En el caso del fragmento B, se utilizaron como molde 100 ng de ADN

plasmídico procedente del plásmido pPZP-NATcc. Las PCRs para este fragmento siempre se llevaron a cabo de la misma manera, utilizando la enzima Phusion™ High-Fidelity ADN polimerasa (Thermo Scientific) y amplificando con un ciclo inicial de 2 minutos a 98 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 98 °C, 15 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72 °C.

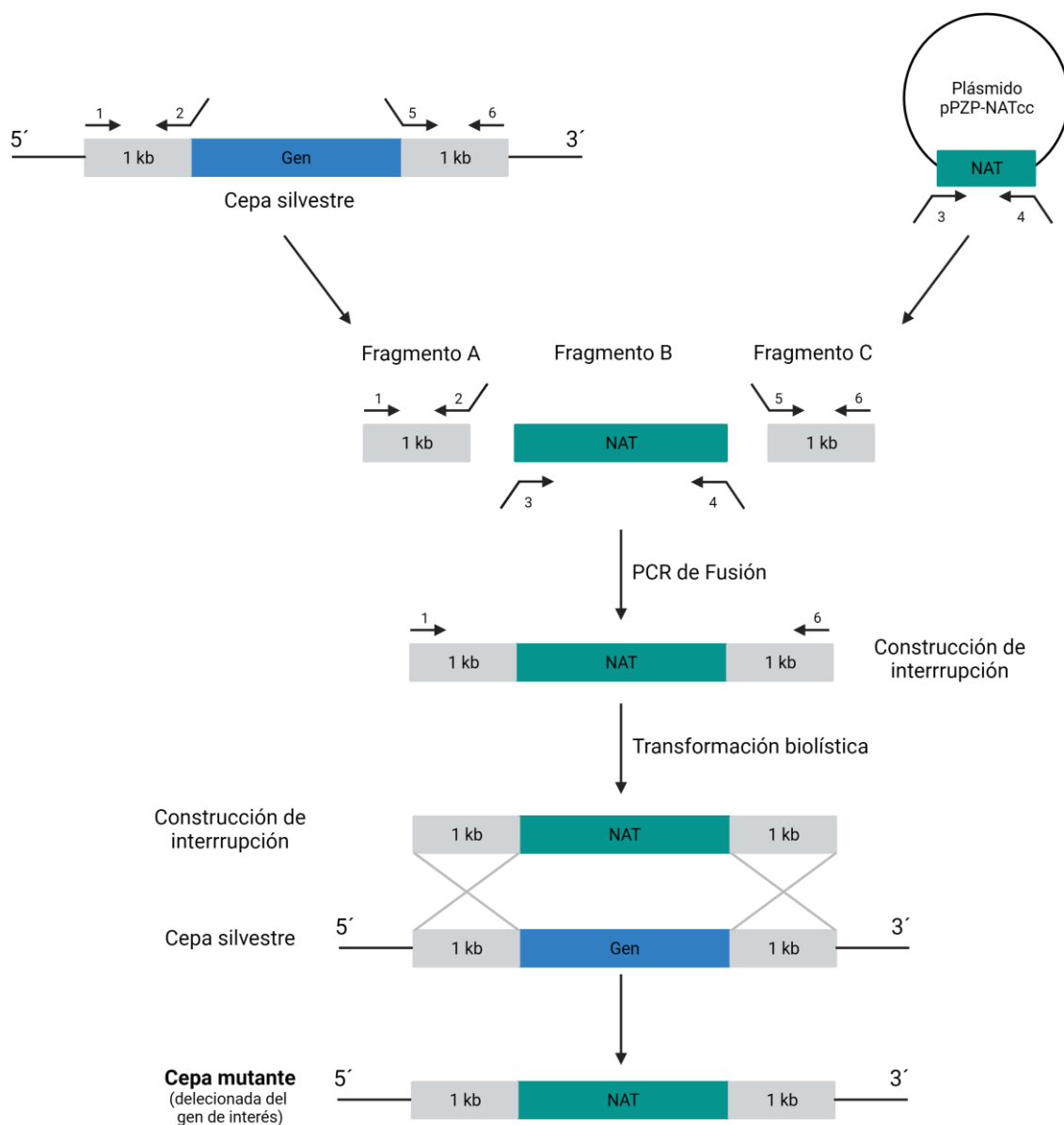


Figura 15. Construcción de mutantes de delección. Los fragmentos A, B y C se obtuvieron mediante amplificación con los oligonucleótidos correspondientes (oligonucleótidos 1–6, diseñados específicamente para cada gen a mutar y detallados en la Tabla 5). El gen *NAT^R* (fragmento B), procedente del plásmido pPZP-NATcc, se unió con las regiones adyacentes del gen a mutar (fragmentos A y C) mediante una PCR de fusión, obteniendo la construcción de interrupción. Tras esto, mediante transformación biolística, la construcción se introdujo en la cepa de interés, y por recombinação homóloga, se obtuvo la cepa mutante o KO con el marcador de selección *NAT^R*. Figura creada con BioRender.com.

5.4.5.1. Mutante *bwc2*

La construcción de los fragmentos A y C se llevó a cabo con la enzima Phusion™ High-Fidelity ADN polimerasa (Thermo Scientific). Para la construcción del fragmento A se utilizaron los oligonucleótidos Yep352-Cn02435_5F (1) y Cn02435-NAT_5R (2), y para el fragmento C, los oligonucleótidos Cn02435-NAT_3F (5) y Yep352-Cn02435_3R (6). La amplificación de estos dos fragmentos se realizó con un ciclo inicial de 2 minutos a 98 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 98 °C y 1 minuto a 72 °C, y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Para el fragmento B se utilizaron los oligonucleótidos NAT-Cn02435_F (3) y NAT-Cn02435_R (4), y se amplificaron como se especifica en el apartado anterior (apartado 5.4.5).

En este caso, utilizando la base de datos FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app>) observamos que en la región 5' anterior al gen *BWC2* (300 pb) había otro gen anotado (*CNAG_12540*), que correspondía a un ARN no codificante y cuya expresión ocurría en la cadena reversa al gen *BWC2*. Por ello, y para interferir lo menos posible con la expresión de este otro gen, decidimos diseñar el sitio de inserción del marcador *NAT^R* a unos 300 pb tras el ATG en la región codificante de nuestro gen. De esta manera, conseguíamos la delección casi total del gen, pero asegurábamos que tras la modificación genética quedarían alrededor de 600 pb de la región promotora del gen *CNAG_12540*, lo cual consideramos suficiente para que su expresión no se viera afectada.

Una vez obtenidos los fragmentos, la PCR de fusión se realizó con la enzima PrimeSTAR HS ADN polimerasa (Takara Bio), cuya mezcla de reacción se describe en el apartado 5.4.3. Los oligonucleótidos utilizados fueron Yep352-Cn02435_5F (1) y Yep352-Cn02435_3R (6), y se añadieron concentraciones equimolares de 0,075 pmoles de cada fragmento A, B y C. Se llevó a cabo un ciclo de PCR inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C y 4 minutos a 72 °C, y se finalizó con un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Tras la PCR de fusión, la construcción de interrupción fue visualizada, purificada y cuantificada como se ha descrito anteriormente.

5.4.5.2. Mutante *cnag_04756*

Los fragmentos A y C se realizaron con la enzima AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems), utilizando los oligonucleótidos Cn04756_5F (1) y NAT-Cn04756_5R (2) para el fragmento A y oligonucleótidos NAT_Cn04756_3F (5) y Cn04756_3R (6) para el fragmento C. La amplificación se realizó en un termociclador con un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, y un ciclo final de 7 minutos a 72 °C. El fragmento B se obtuvo utilizando los oligonucleótidos Cn04756-NAT_F (3) y Cn04756-NAT_R (4) como se describe en el apartado 5.4.5.

La PCR de fusión se realizó con la enzima PrimeSTAR HS ADN polimerasa (Takara Bio), cuya mezcla de reacción se describe en el apartado 5.4.3. Los oligonucleótidos utilizados fueron Cn04756_5F (1) y Cn04756_3R (6), y en este caso se añadieron concentraciones equimolares de 0,15 pmoles de cada fragmento A, B y C. El ciclo de amplificación constó de los siguientes pasos: un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C y 4 minutos a 72 °C, y se finalizó con un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Tras la PCR de fusión, la construcción de interrupción fue visualizada, purificada y cuantificada como se ha descrito anteriormente.

5.4.5.3. Mutante *bwc1*

Los fragmentos A y C se realizaron con la enzima AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems). Se utilizaron los oligonucleótidos CNAG_05181_1 y CNAG_05181_2B para el fragmento A, y CNAG_05181_5 y CNAG_05181_6 para el fragmento C. La amplificación del fragmento A se llevó a cabo con un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 1 minuto a 72 °C, y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72 °C. La amplificación del fragmento C se realizó con el mismo protocolo pero cambiando el anillamiento a 30 segundos y 55 °C (en lugar de 1 minuto a 60 °C). El fragmento B se realizó con la enzima Phusion™ High-Fidelity ADN polimerasa (Thermo Scientific) y los oligonucleótidos CNAG_05181_3B y CNAG_05181_4, según se describe en el apartado 5.4.5.

La PCR de fusión se realizó con la enzima PrimeSTAR® HS ADN polimerasa (Takara Bio), cuya mezcla de reacción se describe en el apartado 5.4.3. Los oligonucleótidos utilizados fueron CNAG_05181_1 y CNAG_05181_6, y en este caso se añadieron concentraciones equimolares de 0,11 pmoles de cada fragmento A, B y C. Se realizó el siguiente ciclo de PCR: un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C y 4 minutos a 68 °C, y finalmente un ciclo de 7 minutos a 68 °C. Todos los fragmentos se visualizaron, purificaron y cuantificaron como se ha descrito anteriormente.

5.4.6. Transformación biolística para la obtención de mutantes

Se siguió el protocolo descrito en (Toffaletti *et al.*, 1993; Davidson *et al.*, 2000), con ligeras variaciones.

Se pesaron 60 mg de bolas de oro de 0,6 µm de diámetro (BioRad) en un tubo de 1,5 mL y se lavaron con 1 mL de etanol absoluto. La mezcla se agitó durante 3 minutos y se centrifugó a 12.000 × *g* durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 1 mL de agua destilada estéril. Las bolas se suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se conservaron a temperatura ambiente selladas con parafilm hasta su uso.

La suspensión de bolas de oro se agitó vigorosamente durante 5 minutos, se repartieron 70 µL en tubos de 1,5 mL, se dejaron decantar y se retiraron 20 µL del sobrenadante. Se añadieron 10 µL del ADN de interés (a una concentración de entre 1–2 µg), 50 µL de 2,5 M CaCl₂ (Sigma-Aldrich) en frío y 10 µL de 1 M espermidina (Sigma-Aldrich) fría. La mezcla se agitó durante 10 minutos, se dejó sedimentar durante 3 minutos, se centrifugó durante 45 segundos a 12.000 × *g* y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se realizó un primer lavado con 500 µL de etanol al 70% y un segundo lavado con 500 µL de etanol absoluto. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las bolas se suspendieron en 40–50 µL de etanol absoluto. Además, se incluyó siempre un control sin ADN, preparado siguiendo este mismo protocolo. Las muestras se conservaron a –20 °C selladas con parafilm hasta su uso.

El día previo a la realización de la transformación biolística las cepas se inocularon en 100 mL de Sabouraud líquido a 30 °C con agitación durante la noche. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 3.500 × *g* durante 10 minutos y el precipitado (aproximadamente 10⁹ células/mL) se suspendió en 5 mL de tampón de regeneración, compuesto por 1M D-sorbitol (Sigma-Aldrich), 1M D-manitol (Panreac), 0,9% YNB sin aminoácidos (BD), 2,6% glucosa (Sigma-Aldrich), 0,0267% extracto de levaduras (BD), 0,054% peptona (BD) y

0,133% gelatina (Sigma-Aldrich). Se sembraron 200 μ L de la suspensión celular en placas de Sabouraud, concentrando las levaduras en el centro de la placa, como se muestra en la Figura 16 B (parte izquierda) y dejando secar aproximadamente durante 1 hora antes de llevar a cabo la transformación biolística.

Tras limpiar el material con etanol absoluto, se colocaron los microcarriers (láminas de color cobre) (BioRad) sobre el soporte metálico o macrocarrier (BioRad) (ver Figura 16 B, parte derecha), y el conjunto se situó sobre papel absorbente y bolas de sílica (Sigma-Aldrich) para eliminar totalmente la humedad antes de su manejo. Se depositaron en el centro del microcarrier, gota a gota, 15 μ L del ADN a insertar, pegado ya a las bolas de oro como se ha explicado anteriormente. Una vez seco, se procedió con la transformación biolística. Se incluyó siempre un control con bolas de oro sin ADN.

La transformación biolística se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para el disparador de partículas PDS-1000/He Particle Delivery System (BioRad) (Figura 16 A) y se utilizaron discos de ruptura de 1.100 o 1.350 psi (BioRad) (Figura 16 C). El macrocarrier junto con el microcarrier, ya con el ADN de interés (Figura 16 D), y la placa de Sabouraud, con la suspensión densa de levaduras seca, se colocaron en el interior del equipo. Por cada cepa a mutar se realizaron 2 o 3 disparos, y se incluyó un disparo control con las bolas de oro sin recubrimiento de ADN.

Tras los disparos, las placas se incubaron a 30 °C durante 4 horas. Al cabo de este tiempo las levaduras se recogieron con 1 mL de PBS estéril y se repartieron en 4 placas de medio Sabouraud sólido (140 μ L por placa) suplementadas con el marcador de selección correspondiente, nourseotricina a 50 μ g/mL o geneticina (G418) a 100 μ g/mL. Finalmente, las placas se incubaron durante 2–5 días a 30 °C para permitir el crecimiento de los mutantes o clones obtenidos.

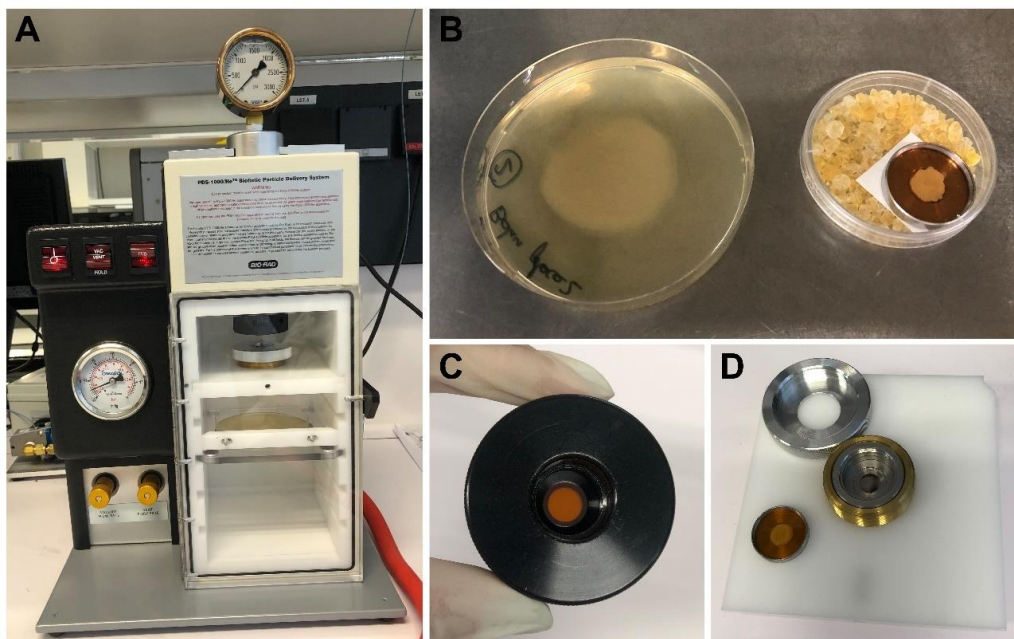


Figura 16. Transformación biolística. A) Equipo disparador de partículas para llevar a cabo la transformación biolística. B) Placas de Sabouraud sólido con la suspensión de levaduras sembrada en el centro de la placa (izquierda), y macrocarriers (pieza metálica) con los microcarriers (lámina de color cobre) conteniendo las bolas de oro recubiertas de ADN, sobre papel absorbente y bolas de sílice (derecha). C) Soporte donde se introduce el disco de ruptura (lámina de color cobre). D) Soporte donde se coloca el macrocarrier con el microcarrier.

5.4.7. Comprobación de los clones obtenidos

Los clones obtenidos se purificaron frente al marcador de resistencia correspondiente sembrándolos en pases sucesivos de placas de Sabouraud sólido suplementadas con nourseotricina 50 µg/mL o geneticina (G418) 100 µg/mL.

Para la comprobación de los mutantes obtenidos se realizaron distintas PCRs, todas ellas con la enzima AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 5.4.3. Los ciclos de amplificación fueron similares, pero con variaciones en la temperatura de anillamiento y en los tiempos de elongación, por ello, las condiciones de amplificación se especifican en cada apartado correspondiente.

5.4.7.1. Comprobación de la reinserción del gen *BWC2*

La reinserción del gen silvestre *BWC2* en el locus “safe haven” de los mutantes complementados se comprobó con oligonucleótidos descritos en el artículo (Arras *et al.*, 2015). Las parejas de oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: UQ2963 y UQ1768, y UQ3348 y UQ2962 (Tabla 5). Para la amplificación se llevó a cabo un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto y 30 segundos a 72 °C, y un ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

5.4.7.2. Comprobación de la interrupción de los distintos genes

La interrupción de los distintos genes se comprobó usando varias estrategias (Figura 17):

- PCRs con oligonucleótidos internos que anillan en la región deletada, y que por tanto solo amplifican en las cepas silvestres no interrumpidas.
- PCRs con oligonucleótidos externos que anillan en la región cromosómica anexa a los fragmentos de la construcción de interrupción y que amplifican bandas de diferente tamaño en las cepas silvestres o interrumpidas.
- PCRs con un oligonucleótido que se une al marcador de selección (oligonucleótido NAT_F) en combinación con un oligonucleótido externo a la construcción de interrupción, de manera que solo se obtiene banda si la construcción de interrupción se ha introducido en la región deseada.

A) Cepa silvestre no interrumpida



B) Mutante interrumpido

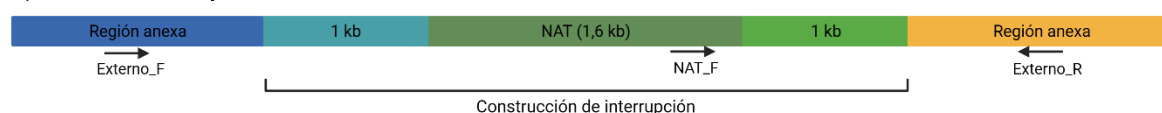


Figura 17. Esquema de las posibles estrategias para la comprobación de los mutantes. A) En la cepa silvestre no interrumpida, el gen silvestre está presente, por lo que los oligonucleótidos internos anillarán (pero no el oligonucleótido NAT_F). Los oligonucleótidos externos también anillarán, generando una banda de un tamaño determinado. B) En el mutante interrumpido, el oligonucleótido NAT_F, interno a la secuencia del *NAT^R*, anillará, pero no los oligonucleótidos internos. Los oligonucleótidos externos también anillarán, generando una banda de un tamaño distinto a la banda generada en la cepa silvestre no interrumpida, permitiendo así su diferenciación. Figura creada con BioRender.com.

5.4.7.2.1. Gen *BWC2*

Para la comprobación de esta interrupción se utilizaron las siguientes parejas de oligonucleótidos: oligonucleótidos internos CNAG_02435_SeqF y CNAG_02435_SeqR, oligonucleótidos externos Cn02435-1152_F y Cn02435+1104_R, y oligonucleótidos Cn02435+1104_R y NAT_F. La amplificación para los oligonucleótidos internos se realizó con un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C, y se finalizó con un ciclo de 7 minutos a 72°C. Las parejas de oligonucleótidos Cn02435-1152_F y Cn02435+1104_R, y Cn02435+1104_R y NAT_F se amplificaron con las mismas condiciones, pero variando el tiempo de elongación, que fue de 4 minutos para los oligonucleótidos externos (Cn02435-1152_F y Cn02435+1104_R) y de 1 minuto y 30 segundos para la pareja Cn02435+1104_R y NAT_F.

5.4.7.2.2. Gen *CNAG_04756*

Se realizaron PCRs usando las mismas estrategias que las descritas en el apartado anterior. Para la pareja de oligonucleótidos NAT_F y seqCNAG_04756_R, la amplificación se realizó con un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 minutos y 30 segundos a 72 °C, y se finalizó con un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Para los oligonucleótidos externos seqCNAG_04756_F y seqCNAG_04756_R, el protocolo de amplificación fue igual al anterior pero con un tiempo de elongación de 5 minutos en lugar de 2 minutos y 30 segundos.

5.4.7.2.3. Gen *BWC1*

En este caso, los oligonucleótidos utilizados fueron NAT_F y CNAG_05181_extR, CNAG_05181_extF y CNAG_05181_extR, y CNAG_05181_intF y CNAG_05181_intR. En cuanto a las amplificaciones, los oligonucleótidos externos CNAG_05181_extF y CNAG_05181_extR se amplificaron mediante un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 6 minutos a 72 °C, finalizando con un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Las condiciones de amplificación para los oligonucleótidos internos CNAG_05181_intF y CNAG_05181_intR fueron iguales a las anteriores pero con un tiempo de elongación de 1 minuto (en lugar de 6 minutos). Para la pareja NAT_F y CNAG_05181_extR se ajustó el tiempo de elongación y la temperatura de anillamiento, realizando un ciclo inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 2 minutos a 72 °C, y un ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

5.4.8. Secuenciación Sanger

Los fragmentos de PCR se purificaron con el kit Illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare Life Sciences) siguiendo el protocolo del fabricante y ambas cadenas se secuenciaron con el kit de secuenciación de ciclos BigDye™ Terminator (Applied Biosystems). Las secuencias se editaron y se ensamblaron utilizando el programa SeqMan (Lasergene, DNASTar).

5.4.9. Secuenciación masiva

Para la secuenciación masiva de las cepas se extrajo el ADN genómico como se especifica en el apartado 5.4.1 y se llevó a cabo una colaboración con el laboratorio del Dr. Toni Gabaldón, del Instituto de Investigación Biomédica (IRB, Barcelona, España), quienes realizaron la secuenciación masiva de las muestras siguiendo el protocolo de Illumina. Este

laboratorio realizó también el análisis bioinformático, identificando mutaciones en diferentes variantes siguiendo protocolos desarrollados por su grupo (ver (Carreté *et al.*, 2018; Papp *et al.*, 2018; Carreté *et al.*, 2019; Arastehfar *et al.*, 2021)).

5.4.10. Extracción y cuantificación del ARN

Las levaduras se cultivaron en las condiciones deseadas y se precipitaron para su posterior suspensión en 750 μL de Trizol frío (Sigma-Aldrich). Las suspensiones se transfirieron a tubos de 2 mL que contenían aproximadamente 500 mg de bolas de Zirconia (Ambion) frías. Posteriormente, se procedió a la rotura mecánica de las levaduras con ayuda de un FastPrep-24™ (MP Biomedicals), alternando 6 ciclos de 30 segundos a velocidad máxima con 1 minuto en hielo. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añadieron 200 μL de cloroformo frío y se agitaron las muestras vigorosamente durante 15 segundos. Se incubó durante 2–3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Se recogió la fase acuosa resultante y se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL. Para la precipitación del ARN se añadieron a la fase acuosa 500 μL de isopropanol, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Se retiró el sobrenadante, dejando el ARN precipitado en el tubo, y se procedió a sus lavados. Se añadió 1 mL de etanol 75%, se agitó brevemente y se centrifugó a $7.500 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Con ayuda de un sistema de vacío, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 5–10 minutos, tiempo tras el cual se suspendieron las muestras en 25–50 μL de agua de PCR y se conservaron a 4°C hasta su uso. El ARN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260/280 y 260/230 nm en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific).

Para la visualización del estado del ARN, en algunos experimentos se procedió a su observación mediante geles de agarosa-formaldehído (resultados no mostrados).

5.4.11. Secuenciación masiva del ARNm (RNA-seq)

Las distintas muestras se centrifugaron a $3.500 \times g$ durante 10 minutos y se eliminaron los sobrenadantes. El sedimento se lavó dos veces con PBS y se congeló a -20°C hasta su procesamiento. Seguidamente, se llevó a cabo la extracción de ARN siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.4.10, y las muestras fueron cuantificadas usando el kit comercial QuantiFluor® RNA (Promega) con un fluorímetro Quantus™ (Promega). La calidad de las muestras se analizó en un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). La preparación de librerías se llevó a cabo usando el kit Illumina Stranded mRNA prep (Illumina), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Brevemente, primero se capturaron los ARNm con bolas magnéticas ligadas a oligo(dT), que posteriormente fueron fragmentados para realizar la síntesis de las dos cadenas de ADNc. Después, se añadieron los adaptadores y los índices (IDT for Illumina RNA UD, Set A, Illumina) mediante ligación. Finalmente, se llevó a cabo una última amplificación de los fragmentos de ADN, tras lo cual se purificaron con bolas magnéticas y se cuantificaron con el kit QuantiFluor® RNA (Promega). La secuenciación se realizó usando un cartucho NovaSeq™ 6000 v1,5 (100 ciclos, “single end”) en la plataforma Illumina NovaSeq™ 6000 (Illumina).

Los resultados del RNA-seq fueron analizados por la unidad de bioinformática del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Madrid, España). Brevemente, se llevó a cabo un análisis usando

la ruta `nf-core/rnaseq` (<https://github.com/nf-core/RNAseq>) escrita en Nextflow (<https://www.nextflow.io/>). Los archivos Fasq, que contenían los datos en bruto, fueron primero analizados para determinar su calidad con el programa FastQC v0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Se utilizó el programa Timgalore! v.0.6.7 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) para eliminar las lecturas de baja calidad y las secuencias de los adaptadores. Las lecturas de buena calidad se alinearon usando el programa STAR v2.7.9a (Dobin *et al.*, 2013) con el genoma de referencia de *C. neoformans* H99, obtenido de la base de datos del NCBI (Genome Assembly CNA3, GCA_000149245.3). El control de calidad de este alineamiento se llevó a cabo con el programa RseqQC v3.0.0. Finalmente, la predicción del transcriptoma y la cuantificación de genes se calcularon utilizando el programa Salmon v1.9.0 (Patro *et al.*, 2017). El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete de R DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Se realizaron dos tipos de expresión diferencial con este paquete: (1) de series temporales, en el que se empleó el diseño $\sim \text{condition} + \text{time} + \text{condition}:\text{time}$, y se utilizó el test de hipótesis LRT (Likelihood ratio test) y el modelo “reducido” $\sim \text{condition} + \text{time}$, donde “time” se corresponde con las horas a tiempo 0h 7h y “condition” se refiere a las distintas cepas (H99-YSB y su mutante *bwc2* (clon234), y KN99 y su mutante *bwc2*); y (2) por pares de grupos, en los que se empleó el diseño $\sim \text{condition}$ y una comparación por grupos tratamiento frente control. Por último, para visualizar el lugar cromosómico donde se alinearon todas las lecturas, los ficheros generados durante el análisis por los programas STAR y Salmon (archivos `.aligned.out.bam`) fueron analizados con el programa SeqMonk (Brabraham Bioinformatics, www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/) usando el genoma de referencia de la cepa H99 mencionado anteriormente (Genome Assembly CNA3, GCA_000149245.3).

5.5. Modelos de interacción hospedador-patógeno

5.5.1. Modelo del lepidóptero *Galleria mellonella*

Se usaron larvas del lepidóptero *G. mellonella* procedentes de la empresa TruLarv™ (BioSystems Technology Ltd, Exeter, Reino Unido), que suministró larvas estandarizadas con aproximadamente el mismo peso (entre 0,2 y 0,4 gramos) y aptas para investigación.

5.5.1.1. Recepción y acondicionamiento

Las larvas se agruparon en placas petri de 90 mm en grupos de 10 larvas y se mantuvieron a 30 °C. El día previo a la infección se incubaron a 37 °C durante 24 horas para acondicionarlas a la temperatura del ensayo.

5.5.1.2. Preparación de los cultivos e infección de las larvas

Las levaduras se cultivaron durante una noche en agitación a 30 °C y posteriormente se lavaron dos veces con PBS estéril. Se prepararon distintos inóculos en PBS con ayuda de un contador celular automático TC20 (BioRad). Se inspeccionaron las larvas y se desecharon las muertas o las que presentaban síntomas de infección (aspecto oscuro o con puntos negros). Se reagruparon en grupos de 10 larvas y se limpió la parte posterior del abdomen de cada larva con un hisopo humedecido en etanol 70%. Una vez limpias, se pasaron a placas petri nuevas para su infección, inyectando 5 µL de la suspensión de levaduras preparada con una jeringa Hamilton con aguja de 26G (Hamilton®) por la última propata derecha de su

abdomen. Las dosis de infección fueron de 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$ y 10^5 células/larva, escogiendo una dosis de infección de 10^5 células/larva para experimentos posteriores. Siempre se llevó un grupo control de larvas inoculadas con 5 μ L de PBS estéril.

5.5.1.3. Curvas de supervivencia

Para cada condición a testar se usaron 20 larvas (repartidas en dos grupos de 10 larvas) y se realizó un seguimiento diario, retirando y contabilizando las larvas muertas y las pupas. Los experimentos se mantuvieron durante aproximadamente 15 días a 37 °C para evaluar diferencias en supervivencia. Los experimentos se realizaron en triplicado y las curvas de supervivencia se realizaron con el programa GraphPad Prism v8.0.2.

5.5.1.4. Extracción de la hemolinfa

Tras la infección, se extrajo la hemolinfa de 5 o 6 larvas de *G. mellonella*. Para ello, con una cuchilla se hizo una pequeña incisión en el abdomen o parte final de cada larva, y la gota de hemolinfa se depositó sobre 100 μ L de PBS frío, que se conservó a 4 °C hasta su análisis. La hemolinfa extraída se utilizó para analizar la carga fúngica de las larvas tras su infección con distintas cepas, que se determinó mediante recuento de UFCs según se describe en el apartado 5.2.2.

5.5.1.5. Actividad lítica de la hemolinfa

Estos ensayos se realizaron en placas de agar con el microorganismo *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich). Para ello, se autoclavó una solución tampón de Na_2HPO_4 (Merck) a 67 mM y pH 6,4 con 1% de agar, se atemperó, se añadieron 1,7 mg/mL de *Micrococcus luteus*, y se prepararon las placas, que se conservaron a 4 °C hasta su uso. El día del experimento se realizaron agujeros a modo de pocillos en el agar de estas placas con la ayuda de puntas de 1 mL y un sistema de bomba de vacío. En cada pocillo se añadieron 3 μ L de la hemolinfa extraída de las larvas de *G. mellonella*. En cada placa se incluyeron tres controles positivos de lisozima (0,25, 0,03 y 0,0039 mg/mL). Las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C, tiempo tras el cual se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon D60 (Nikon). Se incluyó también un control negativo de PBS. El diámetro de los halos se midió con la ayuda del programa Fiji y se calculó la actividad lítica con ayuda de los controles de lisozima y los programas Microsoft Excel (Microsoft) y GraphPad Prism v8.0.2.

5.5.2. Modelo de ratón

5.5.2.1. Cepas de ratón

Se trabajó con ratones macho de la cepa CD1 de 6–8 semanas de edad criados en el estabulario del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Madrid, España). Los animales se organizaron en grupos de 5 o 6 ratones por caja y se mantuvieron de acuerdo con las condiciones descritas en el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero. Para el bienestar animal se incluyó enriquecimiento ambiental en las jaulas (tubos de cartón y virutas de papel). Todos los protocolos animales fueron aprobados por la autoridad competente (PROEX 330/14 y PROEX 299/21).

5.5.2.2. Preparación del inóculo de levaduras

Las levaduras se cultivaron durante una noche en agitación a 30 °C. Al día siguiente, el cultivo se lavó con PBS estéril y se preparó un inóculo de $3,33 \times 10^7$ células/mL en PBS estéril con la ayuda de un contador celular automático TC20 (BioRad).

5.5.2.3. Anestesia intraperitoneal e infección intranasal

Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de xilacina (Xilagesic 2%®, 20 mg/kg) y ketamina (Imalgene®, 50 mg/kg) preparada en PBS estéril. Para ello, se preparó una solución de xilacina (2 mg/mL) y ketamina (5 mg/mL) en PBS estéril, y se administraron 0,1 mL por vía intraperitoneal por cada 10 gramos de peso de ratón. Los ratones anestesiados se infectaron colocando 30 µL de la suspensión de levaduras preparada sobre sus fosas nasales (se infectó con 10^6 células/ratón). Se inocularon grupos de al menos 5 ratones por cada condición y tiempo a analizar. Se llevaron en paralelo ratones control a los que se les administró 30 µL de PBS estéril.

5.5.2.4. Seguimiento del bienestar animal y sacrificio

Se llevó a cabo un control de los animales cada 2–3 días y se valoró su estado de salud según una serie de parámetros (pérdida de peso, aspecto del pelaje, instinto de huida, encorvamiento y abultamiento de la cabeza), lo que permitió establecer criterios de punto final humanitarios. En cualquier caso, los animales se sacrificaron siempre que se observó una pérdida de peso igual o superior al 25%. Los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ o dislocación cervical.

5.5.2.5. Curvas de supervivencia

Se comparó la supervivencia de ratones CD1 infectados con distintas cepas de *C. neoformans*. En estos experimentos no se sacrificó a los animales a no ser que fuera necesario por razones de punto final humanitario. Las infecciones se llevaron a cabo como se ha descrito en los apartados 5.5.2.2 y 5.5.2.3, y se realizó el seguimiento de los ratones para comparar la evolución de la infección. Se siguieron los principios de bienestar animal descritos en el apartado 5.5.2.4. Las curvas de supervivencia de los roedores se representaron mediante el programa GraphPad Prism v8.0.2.

5.5.2.6. Extracción de los órganos

En los días correspondientes, según el experimento, se extrajeron pulmones y cerebro de cada ratón, determinando el peso de cada órgano y dividiéndolos en 3 partes para poder llevar a cabo los distintos análisis que se detallan a continuación.

5.5.2.7. Aislamiento de *C. neoformans* a partir de pulmón y cerebro

La porción de órgano correspondiente para el aislamiento de *C. neoformans* se colocó en filtros de 100 µm (BD Falcon) y se homogeneizó con 5 mL de PBS estéril con ayuda de un émbolo de una jeringa de 5 mL estéril. Se obtuvo un extracto homogeneizado que se conservó a 4 °C y se utilizó para distintos procesos (morfología de las levaduras y determinación de la carga fúngica). El tamaño de las células y la viabilidad se determinaron según se describe en los apartados 5.3.1 y 5.2.2, respectivamente.

5.5.2.8. Histopatología en pulmones

Una pequeña porción de los pulmones de cada ratón se conservó en 10% de formalina (Electron Microscopy Sciences) para analizar la estructura microscópica del pulmón. Las muestras se entregaron a la unidad de anatomía patológica del ISCIII para su procesamiento. Brevemente, las muestras se deshidrataron, se incluyeron en parafina siguiendo protocolos estándar y se realizaron cortes de 3–5 μm que fueron colocados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina/eosina. Se tomaron fotografías con un microscopio Leica Thunder Imager (Leica Microsystems).

5.5.2.9. Cuantificación de la concentración de citoquinas en pulmón y cerebro

La porción de pulmón y cerebro separada para la determinación de la producción de citoquinas se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Se homogeneizaron los órganos en 1,5 mL de PBS con inhibidores de proteasas (Thermo Scientific) con la ayuda de un homogeneizador Politron PT1600E (Kinematica AG) mediante 4 ciclos a máxima velocidad durante 30 segundos con 1 minuto en hielo entre cada ciclo. El extracto se centrifugó a $13.800 \times g$ durante 5 minutos y los sobrenadantes se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Para la determinación de la concentración de citoquinas se usó el kit Luminex® Discovery Assay (R&D Systems) y la tecnología Luminex Xmap utilizando el sistema BioPlex 200 (BioRad). Se midieron las siguientes citoquinas: IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, y IL-17. La concentración de citoquinas se expresó en pg/mg de órgano.

5.6. Microscopía

5.6.1. Microscopía en campo claro y fluorescencia

Para la observación y adquisición de imágenes, tanto en campo claro como de fluorescencia, se utilizaron distintos microscopios ópticos: microscopio Leica DMI 3000B (Leica Microsystems) asociado con una cámara digital Leica DFC7000 T (Leica Microsystems), microscopio Leica DMI 4000B (Leica Microsystems) asociado con una cámara digital DFC360 FX (Leica Microsystems), y microscopio Leica Thunder Imager (Leica Microsystems) con una cámara DFC9000 GTC sCMOS (Leica Microsystems), todos ellos asociados al software Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems). También se utilizó un microscopio Olympus AX70 (Olympus) con una cámara digital QImaging Retiga 1300 y el programa QCapture Suite V2.46 (QImaging). Todas las imágenes fueron procesadas mediante los programas Fiji (Schindelin *et al.*, 2012), Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems) y/o Adobe PhotoShop CS3 (Adobe Systems Incorporated; San Jose, California, EE. UU.).

5.6.2. Microscopía confocal

Algunos experimentos se realizaron con el microscopio confocal STELLARIS 8 (Leica Microsystems). Las imágenes se procesaron con los programas Fiji, LAS X y/o Adobe PhotoShop CS3.

5.6.3. Microscopía electrónica de transmisión

5.6.3.1. Visualización de vesículas extracelulares

Las VEs, obtenidas según se describe en el apartado 5.2.7, fueron analizadas por TEM mediante tinción negativa. Para ello, una alícuota de 5 μL de VEs se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos con 5 μL de PFA al 4%. Una vez fijadas, se incubaron de nuevo durante 5 minutos sobre rejillas de cobre (CF300-Cu, Electron Microscopy Sciences) recubiertas de colodión y carbón que previamente habían sido sometidas a una descarga iónica (Quorum Q150T ES; K100x, Emitech). Se eliminó el exceso de muestra por contacto de las rejillas con papel de filtro de grado 1 (Whatman), se lavaron sobre dos gotas de agua Milli-Q, se eliminó nuevamente el exceso de líquido y se tiñeron 1 minuto sobre una gota de 2% de acetato de uranilo acuoso. Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 G2 estabilizado a 120 kV y equipado con una cámara CCD ("Charge-Coupled Device") FEI Ceta, a una magnificación de 30.000x sobre el detector.

5.6.3.2. Visualización de mitocondrias

Para visualizar estructuras intracelulares se tomaron muestras de levaduras en diferentes condiciones y se fijaron durante 2 horas a temperatura ambiente en 2,5% de PFA con 0,1% de glutaraldehído en 0,1 M de PBS; pH 7,2. A partir de aquí, las muestras fueron procesadas por el servicio de microscopía electrónica del ISCIII, siguiendo protocolos optimizados para la mejor observación de membranas intracelulares. Brevemente, tras la fijación, las células se lavaron con PBS y los posibles aldehídos libres se neutralizaron con 50 mM NH_4Cl en PBS. Las levaduras se embebieron en 12% de gelatina en PBS y se solidificaron en hielo. Posteriormente, se cortaron cubos de 1 mm^3 y se infiltraron con 2,3 M de sacarosa en PBS durante una noche a 4 °C. Los cubos se colocaron en pines de metal y se congelaron tras introducirlos en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes de secciones finas utilizando el equipo cryo-microtomo UC7 (Leica Microsystems) con un espesor nominal de 70 nm, y se recogieron con una mezcla 1:2 de 2% metilcelulosa en agua y 2,3 M de sacarosa en PBS. Después de descongelar, los cortes se depositaron en rejillas de cobre de 100 mesh con una lámina de carbón formvar. Para realizar el contraste de las rejillas, estas se incubaron en PBS durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron con agua y se incubaron durante 5 minutos en hielo con 0,4% acetato de uranilo en 1,8% de metilcelulosa en agua. El exceso de la solución de contraste se retiró secando las rejillas con papel de filtro de grado 1 (Whatman). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Tecnai 12 G2 operado a 120 kV con una cámara CCD FEI Ceta. Para medir la superficie del área de las mitocondrias se tomaron imágenes de todas las mitocondrias de 10 células a una magnificación de 30.000x. Se determinó el área de las mitocondrias mediante el programa Fiji. Se cuantificó también el número de crestas mitocondriales para calcular el número de crestas por área de cada mitocondria.

5.7. Citometría de flujo

5.7.1. Unión del anticuerpo monoclonal 18B7 a la cápsula de *C. neoformans*

Las levaduras se incubaron a 30 °C en agitación durante la noche. Tras este tiempo, las células se lavaron con PBS estéril y se prepararon los inóculos a 10^6 células/mL en PBS estéril en presencia de distintas concentraciones de anticuerpo monoclonal IgG1 18B7

(Casadevall *et al.*, 1992a; Mukherjee *et al.*, 1993) conjugado con Alexa Fluor 488 (Trevijano-Contador *et al.*, 2015), desde 2,5 hasta 0,078 $\mu\text{g}/\text{mL}$, realizando diluciones $\frac{1}{2}$. Para cada cultivo se añadió un control sin anticuerpo. Los cultivos se incubaron durante 30 minutos a 30 °C en oscuridad para permitir la unión del anticuerpo a la cápsula, tiempo tras el cual se fijaron con PFA 4% durante otros 30 minutos. Las suspensiones de levaduras se lavaron con PBS dos veces y se analizaron con un citómetro BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences) y el programa FlowJo V10 (Tree Star, Inc). Se analizaron 10.000 células por condición y se hicieron los experimentos en triplicado en días diferentes.

5.7.2. Detección de especies reactivas de oxígeno

Para la detección de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se usó la sonda fluorescente diacetato de dihidrofluoresceína (DHF, Sigma-Aldrich), que genera fluorescencia verde al reaccionar con las ROS. Las levaduras se cultivaron en medio Sabouraud líquido durante la noche en agitación a 150 r.p.m. y 30 °C. Al día siguiente se prepararon a 5×10^4 células/mL en el medio correspondiente según el experimento y se incubaron en placas de 12 pocillos (Falcon) a 37 °C con una atmósfera de 5% CO_2 . A los distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) se añadió 40 μM DHF (del stock original a 4 mM DHF en 100% DMSO se preparó una dilución de trabajo 1/100 en PBS) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C con 5% CO_2 . Las levaduras se lavaron 2 veces con PBS para quitar el exceso de sonda y se suspendieron en 400 μL de PBS. Como control de la actividad de la DHF, en todos los experimentos se añadió un grupo de células tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AmB durante 1 hora a 37 °C sin CO_2 (resultados no mostrados), añadiendo posteriormente DHF como se ha descrito en este apartado. Además, como control negativo, cada muestra se analizó también sin DHF. Las muestras se analizaron mediante un citómetro BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences), midiendo la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1 y contando 10.000 células por muestra. Los experimentos se repitieron al menos dos veces en días distintos y los datos se analizaron con el programa FlowJo V10 (Tree Star, Inc).

Para normalizar la cantidad de ROS producidas con el tamaño de cada célula, se exportaron los documentos originales del programa FlowJo a un documento .csv que contenía todos los datos de fluorescencia (FL-1) y tamaño (FSC) de cada célula analizada. Se eliminaron aquellas células cuyo valor FSC fue inferior a 50, para quitar posibles restos celulares, y se calculó la ratio (FL-1/FSC \times 10.000). Los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism v8.0.2 y se representó la media geométrica de las poblaciones.

5.7.3. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

Para estimar el potencial de membrana mitocondrial durante la formación de células titanés se utilizó la sonda fluorescente de doble emisión JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina, MitoProbe JC-1, Life Technologies). Esta sonda se acumula en la mitocondria generando fluorescencia roja y verde según el estado del potencial de membrana. JC-1 se encuentra como monómero y emite fluorescencia verde en presencia de un potencial de membrana bajo. Sin embargo, ante un potencial de membrana alto, JC-1 forma agregados y emite fluorescencia roja. Así, cambios en la ratio de fluorescencia roja/verde son indicadores del potencial de membrana de la mitocondria. Se añadió JC-1 a las muestras a una concentración final de 2 μM y se incubó durante 30 minutos a 37 °C con 5% CO_2 . Se midió la fluorescencia verde en el canal FL-1 y la fluorescencia roja en el canal

FL-2 con un citómetro BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences). Se cuantificaron 10.000 células por experimento. Los experimentos se repitieron al menos dos veces en días distintos y los datos se analizaron con el programa FlowJo v10 (Tree Star, Inc).

Para determinar la ratio de fluorescencia roja/verde se exportaron los datos desde el programa FlowJo a un documento .csv que se procesó con Microsoft Excel. Se excluyeron los eventos con fluorescencia menor de 50 para excluir las células no marcadas y se calculó la ratio FL-2 (rojo) / FL-1 (verde) para cada célula. Finalmente, los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism v8.0.2 y se representó la media geométrica de cada muestra.

5.8. Inhibición farmacológica de las células titanes

Para identificar compuestos que inhibieran farmacológicamente la formación de células titanes se desarrolló un protocolo automatizado basado en fluorescencia utilizando una colección de compuestos comercial. En todos estos experimentos se utilizó la variante H99-OZ-3 o H99-3 para poder detectar compuestos que inhibiesen dicha transición.

5.8.1. Colección de Prestwick

Para la búsqueda de compuestos que inhibiesen la inducción de células titanes se usó la colección de compuestos químicos de Prestwick® (Prestwick Chemical Libraries, Domain Therapeutics, Illkirch, Estrasburgo, Francia). Esta colección se compone de 1.520 fármacos conocidos y fuera de patente, aprobados por distintas agencias como la FDA (“Food and Drug Administration”) y la EMA (“European Medicines Agency”). La colección consta de 19 placas de 96 pocillos con los compuestos a 10 mM en 100% DMSO (un compuesto distinto en cada pocillo). Las columnas 1 y 12 de cada placa se encuentran vacías para poder incluir los controles.

5.8.2. Protocolo desarrollado para el cribado de compuestos

Las placas de la colección de Prestwick, con una concentración inicial de 10 mM en 100% DMSO, se diluyeron inicialmente 1/10 con agua destilada estéril en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon), quedando a una concentración intermedia de 1 mM en 10% DMSO. Para la obtención de la placa final, 5 µL de las placas intermedias se llevaron a un volumen final de 100 µL (con agua destilada estéril) en placas de 96 pocillos de fondo plano de vidrio (Greiner), quedando los compuestos a 50 µM y 0,5% DMSO.

Las levaduras se cultivaron durante la noche en Sabouraud líquido a 30 °C en agitación, tras lo cual se prepararon los cultivos a 2×10^4 células/mL en TCM 2x. Cien microlitros de esta suspensión celular se añadieron a los 100 µL de la placa final de compuestos anterior, haciendo una dilución 1/2, siendo por tanto las condiciones finales del ensayo las siguientes: 10^4 células/mL en TCM 1x con los compuestos a 25 µM y 0,25% DMSO. En todas las placas se añadieron los siguientes controles en las columnas 1 y 12 (cuatro pocillos de cada condición control): 1) levaduras en TCM 1x sin compuesto, 2) levaduras en TCM 1x sin suero, 3) levaduras en agua destilada estéril, y 4) levaduras en medio Sabouraud líquido. Todos los controles llevaron 0,25% de DMSO, igual que los compuestos. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C con una atmósfera de 5% CO₂.

Tras la incubación, las levaduras se visualizaron rápidamente bajo el microscopio DMI3000 (Leica microsystems) para controlar que se hubiera dado la titanización y localizar posibles compuestos inhibitorios. Para facilitar la automatización del protocolo, tanto para el análisis de las imágenes como para la medición de los diámetros de las levaduras, se utilizó la lactofucsina (ver apartado de tinciones 5.3.2), un reactivo que permitió la visualización de las levaduras mediante fluorescencia. Este reactivo se une a la superficie de los hongos y proporciona una coloración rosada a las células, pero además, genera una fluorescencia roja visible con filtros de rodamina.

Tras la tinción con lactofucsina, las placas se analizaron con el microscopio automatizado Cytell™ Cell Imaging System (GE Healthcare Life Sciences) usando un objetivo 10x. Se tomaron fotografías con fluorescencia roja (y en campo claro como control), captando 5 campos por pocillo. En total, se obtuvieron 480 imágenes para cada placa de 96 pocillos. Estas fotografías se analizaron de dos maneras. Primero, el propio microscopio Cytell posee unas aplicaciones biológicas preconfiguradas o “BioApps” que llevan a cabo distintos tipos de análisis, permitiendo la identificación de las células y generando unas gráficas de forma automática en las que se representó el tamaño de las levaduras detectadas y la intensidad de fluorescencia de cada una de ellas (ver gráficas en Material Suplementario Figura S2). Por otra parte, las fotografías tomadas por dicho microscopio se exportaron en formato .tiff (16 bits) y se analizaron en los programas Fiji y Microsoft Excel usando unas macros desarrolladas durante esta tesis doctoral (macros descritas en el apartado 5.10.1.1). Esto permitió obtener el área, diámetro medio y desviación estándar de las levaduras tras su incubación en presencia de cada compuesto.

5.8.3. Curvas de inhibición de la titanización

En algunos experimentos se realizaron experimentos de inhibición de la titanización usando compuestos de la colección de Prestwick adquiridos de manera adicional, pero además, también se utilizaron compuestos externos a esta colección (ácido ascórbico y N-acetilcisteína). Los compuestos seleccionados de la colección de Prestwick se adquirieron como polvo (Prestwick Chemical Libraries, Domain Therapeutics) y se disolvieron en 100% DMSO a una concentración de 50 mM, preparando posteriormente una concentración intermedia de 20 mM en 50% DMSO. Las levaduras (10^4 células/mL) se incubaron en TCM en presencia de distintas concentraciones de estos compuestos, empezando por 100 μ M y realizando diluciones $\frac{1}{2}$ hasta 0,1 μ M. Se añadió siempre un control de células en TCM sin compuesto y todas las muestras llevaron 0,25% de DMSO. En el caso del ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), se preparó un stock a 280 mM en TCM y se testó a concentraciones desde 50 mM hasta 0,1 mM. La N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich) se preparó a 610 mM en TCM, y se ensayó entre 305 mM y 0,6 mM, realizando en ambos siempre diluciones $\frac{1}{2}$. Tras la inducción de la titanización en presencia de los distintos compuestos, las células se tiñeron con lactofucsina y se tomaron fotografías de fluorescencia con el microscopio Cytell, que posteriormente se analizaron usando el programa Fiji, como se ha descrito anteriormente.

5.8.4. Viabilidad de las levaduras en presencia de los compuestos

Las células se indujeron en TCM a 5×10^4 células/mL en presencia de distintas concentraciones de compuestos (específicas para cada compuesto) para determinar la viabilidad celular de las levaduras proporcionada por dichos compuestos. Se añadió un

control sin compuesto en todos los casos. Se determinaron las UFCs tal y como se describe en el apartado 5.2.2 a tiempo 0 (nada más añadir el compuesto a las levaduras) y tras 24 horas de incubación. Se llevaron a cabo dos réplicas biológicas en días distintos, cada una con tres réplicas técnicas.

5.9. Estudio del polisacárido de la cápsula

5.9.1. Obtención del exopolisacárido

El exopolisacárido capsular o EPS es aquel que se expulsa al medio de cultivo, por lo que los cultivos se indujeron en los medios correspondientes y tras su obtención, las células se centrifugaron a $3.500 \times g$ durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes, se filtraron con filtros de $0,22 \mu\text{m}$ y se conservaron a 4°C hasta su cuantificación y análisis mediante técnicas de ELISA de captura y RMN.

5.9.2. Análisis del polisacárido GXM

5.9.2.1. Técnica ELISA de captura

Se cuantificó la cantidad de polisacárido GXM de las muestras de EPS mediante un ensayo ELISA de captura, siguiendo protocolos descritos (Casadevall *et al.*, 1992b; Wear *et al.*, 2022). Las placas de microdilución de 96 pocillos (Corning) se recubrieron con $100 \mu\text{L}$ de anticuerpo monoclonal anti-IgM (cabra anti-ratón IgM, Southern Biotech) a $1 \mu\text{g/mL}$ en PBS incubando durante 1 hora a 37°C . Se eliminó el contenido de las placas y los pocillos se bloquearon con $200 \mu\text{L}$ de una solución de 1% BSA (albumina sérica bovina, fracción V, MP Bio) en PBS, incubando de nuevo 1 hora a 37°C . Se descartó el sobrenadante y se añadieron $50 \mu\text{L}$ de anticuerpo monoclonal anti-GXM IgM 2D10 (Casadevall *et al.*, 1994) a $3 \mu\text{g/mL}$. Las placas se incubaron a 4°C durante la noche y tras este tiempo se lavaron 3 veces con PBS con 0,1% de Tween20 en un lavador de placas Dynex Ultra Wash Plus washer (Magellan BioScience). Se preparó una curva estándar con un patrón de EPS conocido, comenzando en $10 \mu\text{g/mL}$ y realizando diluciones seriadas 1/3 hasta un total de 8 puntos. Las muestras de EPS se diluyeron en PBS/BSA 1% y se realizaron diluciones seriadas 1/3 hasta obtener 4 puntos de cada muestra. La solución PBS/BSA 1% se usó como control negativo. Se transfirieron $50 \mu\text{L}$ de cada muestra a las placas de microdilución y se incubaron 1 hora a 37°C , tiempo tras el cual se volvió a lavar 3 veces. Se añadieron $50 \mu\text{L}$ del anticuerpo monoclonal anti-GXM 18B7 IgG1 (Casadevall *et al.*, 1992a; Mukherjee *et al.*, 1993) a $5 \mu\text{g/mL}$ y se incubó 1 hora a 37°C . Se lavaron las muestras 3 veces y se añadieron $50 \mu\text{L}$ de anticuerpo anti-IgG1 conjugado con fosfatasa alcalina (cabra anti-ratón IgG1-AP, Southern Biotech) a $1 \mu\text{g/mL}$. Se incubó 1 hora a 37°C , se volvió a lavar y se añadieron $50 \mu\text{L}$ de una solución de 1 mg/mL de p-nitrofenil fosfato (PNPP, Sigma-Aldrich) en tampón de sustrato de ELISA (1 mM MgCl_2 , $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$, pH 9,7). Las placas se incubaron durante 5–10 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro SpectraMax iD5 (Molecular Devices). La reacción se detuvo cuando el valor más alto de la D.O. en la curva estándar llegó al valor 1. Gracias a la curva estándar del patrón de EPS añadido, se representaron las absorbancias frente a las concentraciones, ajustándolas con un modelo de regresión, y se estimaron las concentraciones de las muestras de EPS.

5.9.2.2. Resonancia magnética nuclear

La técnica de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN o RMN) se utilizó para determinar la estructura del polisacárido GXM en las muestras de EPS. Se analizaron solo las muestras obtenidas tras la inducción de cápsula (en MM) y no muestras inducidas en TCM debido a la presencia de suero en este medio. Las muestras de EPS se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL tras su cuantificación mediante la técnica ELISA, y 200 μL de cada muestra se diluyeron con 300 μL de agua deuterada (D_2O) (Sigma-Aldrich). Todas las muestras incluyeron 5 μL de la solución estándar DSS- d_6 (sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico hexadeuterado, stock 10 mg/mL) para la posterior calibración del desplazamiento químico y para permitir la comparación de la intensidad de los picos de las distintas muestras. Los datos de ^1H -RMN monodimensional se obtuvieron con un equipo Bruker Avance II (600 MHz) (Bruker), equipado con una sonda TCI criogénica de triple resonancia y gradientes de campo pulsado en el eje Z. Los espectros se adquirieron a 60 °C con 128 lecturas. Los datos fueron procesados con el programa TopSpin® (versión 3,5; Bruker) y se realizó la deconvolución de los espectros con el algoritmo de ajuste lineal del programa Mnova (Mestrelab Research S.L.) y una distribución de tipo Lorenciana-Gaussiana con 100 o 500 iteraciones para la identificación de los picos de la región del grupo estructural de reporte ("structural-reporter group" o SRG).

5.10. Técnicas de bioinformática

5.10.1. Macros en Fiji

Se diseñaron distintas macros para el programa Fiji que posibilitaron llevar a cabo el análisis de fotografías de forma automatizada, permitiendo determinar el tamaño de las levaduras de forma rápida, proceso de gran utilidad debido al alto número de imágenes obtenidas en algunos experimentos.

5.10.1.1. Macro para levaduras teñidas con lactofucsina

Las imágenes de las levaduras teñidas con lactofucsina obtenidas con el microscopio Cytell se analizaron con una macro diseñada para el programa Fiji. Se utilizó la opción "batch mode", y la macro diseñada creó una primera máscara localizando las células fluorescentes mediante distintos órdenes, para posteriormente medir el diámetro y el área de cada célula identificada. Los resultados se exportaron a un documento .csv que se analizó con el programa Microsoft Excel (Microsoft), usando la opción de tablas dinámicas. Finalmente se obtuvo el área, el diámetro medio y la desviación estándar de las células, consiguiendo analizar automáticamente el diámetro de alrededor de 250–500 células/pocillo. La macro diseñada se detalla a continuación:

```
run("Set Measurements...", "area feret's limit display redirect=None decimal=1");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
  setAutoThreshold("Triangle dark no-reset");
//run("Threshold...");
  setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity circularity=0.50-1.00 show=Outlines display
exclude include");
saveAs("Results", "F:/(carpeta donde se quiera guardar).csv");
```

5.10.1.2. Macro para los cuerpos celulares de las levaduras en campo claro

También se diseñó una macro en el programa Fiji para automatizar el análisis de los cuerpos celulares de las levaduras en fotografías tomadas en campo claro, donde la cápsula no era visible. En esta macro se localizaron los cuerpos celulares delimitados por la pared celular y se creó una máscara con círculos huecos. Se rellenaron estos huecos para obtener esferas completas y posteriormente se midió el diámetro de dichas esferas. La macro diseñada se detalla a continuación:

```
run("Find Edges");
run("Median...", "radius=1");
setAutoThreshold("Default dark");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area mean feret's redirect=None decimal=1");
run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity pixel circularity=0.60-1.00 show=Masks display
exclude include add");
```

Esta macro presentó algunas limitaciones puesto que células con un tamaño mayor (células gigantes y células de tamaño mediano) eran identificadas correctamente, pero sin embargo, las células más pequeñas, que normalmente solían estar agrupadas, no eran delimitadas de forma correcta y se identificaban como agregados. Por esta razón, no en todos los experimentos en los que se analizó el diámetro del cuerpo celular fue posible la utilización de esta macro, y en algunos experimentos, se llevó a cabo la clásica medición manual con la ayuda del programa Fiji.

5.11. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EE. UU.; www.graphpad.com). Se determinó la normalidad de las muestras usando el test Kolmogorov-Smirnov. Se asumieron las muestras como no normales cuando se obtuvo un valor $p < 0,05$ y se analizaron con pruebas no paramétricas. Se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para la comparación de dos muestras y el test Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos grupos. Para muestras con distribución normal se usó el test t-Student para comparar dos muestras y el test ANOVA para la comparación de más de dos grupos. En todos los casos, un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Las curvas de supervivencia se ajustaron usando el test de Kaplan-Meier, y las diferencias en la supervivencia se evaluaron usando la prueba Log-Rank (Mantel-Cox).

6. Resultados

Las células titanicas son una de las principales características que permiten a *C. neoformans* adaptarse al hospedador, por lo que entender cómo se producen y su contribución en la virulencia de este hongo es de gran interés. En este trabajo se han seguido dos abordajes para caracterizar los mecanismos moleculares que intervienen en la formación de las células titanicas. En el primer abordaje (sección 1), se realizó una caracterización de cepas de referencia isogénicas procedentes de diferentes laboratorios que presentaron distinta capacidad de formar células titanicas *in vitro*. Para profundizar en la asociación de la capacidad de titanización con la virulencia, se recurrió a distintos modelos *in vivo*, tanto modelos de *G. mellonella* como modelos murinos, que permitieron analizar la interacción con el huésped. Además, se estudiaron distintos factores de virulencia, entre ellos la cápsula, que es la primera estructura que entra en contacto con el hospedador durante la infección. Tras esto, se procedió a realizar un análisis genómico de las cepas isogénicas para encontrar genes implicados en la formación de las células titanicas. Mediante la creación de mutantes y la secuenciación masiva del ARNm se han encontrado genes involucrados en la titanización, obteniendo genes inductores y represores de dicho proceso. En el segundo abordaje (sección 2), se llevó a cabo una inhibición farmacológica de la formación de células titanicas mediante el diseño de un ensayo automatizado basado en fluorescencia, lo que permitió llevar a cabo un rastreo fenotípico de una colección de compuestos conocidos. Tras la identificación de compuestos inhibitorios de la titanización y el estudio de su mecanismo de acción, hemos podido establecer una nueva ruta involucrada en la formación de las células titanicas.

6.1. Sección 1. Caracterización de cepas isogénicas que presentan distinta capacidad de formar células titanicas

El grupo del Dr. Óscar Zaragoza ha colaborado a lo largo de los años con distintos laboratorios distribuidos por todo el mundo, por lo que dispone de una colección de cepas de distintas levaduras. En esta colección se encuentran diferentes variantes de la cepa H99 de *C. neoformans*, procedentes de los distintos laboratorios con los que se ha trabajado. La cepa H99 (Perfect *et al.*, 1980) se aisló en 1978 a partir de un paciente de 28 años con la enfermedad de linfoma de Hodgkin, y desde entonces se ha utilizado en múltiples estudios, por lo que se ha convertido en una cepa de referencia cuyo genoma ha sido secuenciado (Janbon *et al.*, 2014). Existen colecciones de mutantes obtenidas en este fondo genético disponibles en la ATCC y en el FGSC, pero además, de ella también se han derivado otras cepas (KN99a y KN99 α) que se utilizan en estudios de genética (Nielsen *et al.*, 2003).

El amplio uso de la cepa H99 en el campo de la investigación en *C. neoformans* ha hecho que esté disponible en múltiples laboratorios, en los cuales se ha mantenido durante décadas. Aunque el uso de cepas de referencia facilita la comparación de resultados entre diferentes grupos de investigación, no impide que exista microevolución en cada uno de estos laboratorios y que se produzcan diferencias genéticas que a lo largo del tiempo resulten en diferencias fenotípicas. Este es el caso de la primera observación de esta tesis doctoral y el origen de este proyecto.

6.1.1. Morfogénesis de *C. neoformans in vitro*

Debido a colaboraciones internacionales, el laboratorio del Dr. Óscar Zaragoza dispone de la cepa H99 procedente de diferentes grupos de investigación: Dr. James Kronstad (JK), Dr. Robin May (RM), Dr. Yong Sun Bahn (YSB), Dra. Jennifer Lodge (JL), Dr. Hiten Madhani (HM), Dr. Maurizio del Poeta (MP) y Dra. Claudia-Marcela Parra-Giraldo (PG). Además, en la propia colección de nuestro grupo, también disponemos de diferentes viales coleccionados a lo largo del tiempo (Dr. Óscar Zaragoza (OZ-1, OZ-2 y OZ-3, que durante este trabajo también serán nombradas como H99-1, H99-2 y H99-3, respectivamente)). Por ello, nos planteamos estudiar la morfogénesis de estas variantes H99 y determinar si existían diferencias entre ellas.

Como se ha mencionado en la introducción, las células titanes obtenidas *in vitro* no alcanzan el gran tamaño de las células obtenidas *in vivo*, por lo que se denominaron “titan-like” (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Todos los ensayos de titanización realizados *in vitro* durante este trabajo generaron células “titan-like”, pero por motivos de claridad nos referiremos a ellas como células titanes.

6.1.1.1. Inducción de células titanes

En estudios previos se ha observado que la titanización depende del fondo genético de las cepas (Zaragoza *et al.*, 2010; Trevijano-Contador *et al.*, 2018), por lo que quisimos investigar la capacidad de formar células titanes que poseían las 10 variantes H99 que teníamos disponibles. Se indujeron todas las variantes en TCM, un medio de inducción de células titanes *in vitro* (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), y se observó que todas ellas aumentaban de tamaño en comparación con el control de no inducción (crecimiento en medio Sabouraud). Sin embargo, cada variante mostró una capacidad de titanización diferente, encontrando algunas variantes H99 que poseían una mayor capacidad de formar células titanes, mientras que otras producían menor cantidad (Figura 18). Por ejemplo, la variante H99-OZ-2 (o H99-2) mostró un perfil de células más pequeñas, con células cuyo cuerpo celular se encontró, de media, entre 5–10 μm . Similar a esta variante fue el comportamiento de las variantes H99-HM, H99-JL y H99-MP. Por otro lado, la variante H99-OZ-1 (o H99-1) mostró una población más heterogénea, con un rango de tamaños alrededor de 5 y 15 μm de diámetro, similar a las variantes H99-YSB, H99-JK, H99-RM y H99-PG. La más llamativa y diferente de las variantes fue la H99-OZ-3 (o H99-3), que formó células de gran tamaño, con la totalidad de sus células con un cuerpo celular entre 10 y 20 μm .

Previo a realizar la inducción en TCM, se hizo un estudio del tamaño de las células de estas variantes en medio Sabouraud (resultados no mostrados) y no se encontraron diferencias. Por ello, y con el fin de simplificar la presentación de los resultados, en las gráficas solo se incluye un control de no inducción de una de las variantes H99.

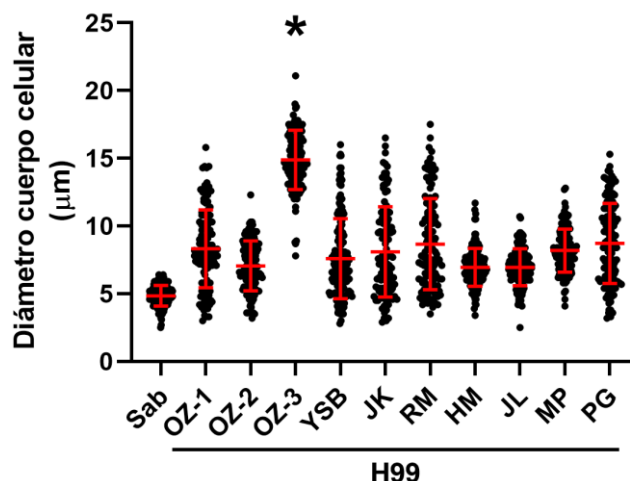


Figura 18. Inducción de células titanes en las distintas variantes H99. Las levaduras se indujeron en TCM a 37 °C y 5% CO₂ y se midieron manualmente los tamaños del cuerpo celular tras su suspensión en tinta china. Se incluyó un control de no inducción (células en medio Sabouraud, Sab). Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar de cada población. Se midieron entre 100–200 levaduras por cada variante. Todas las variantes mostraron diferencias significativas respecto al control Sab ($p < 0,0001$) y la única variante que mostró diferencias significativas con todas las variantes fue H99-OZ-3 (*, $p < 0,0001$); test ANOVA.

Además del cuerpo celular, también se midieron el tamaño total (diámetro del cuerpo celular junto con la cápsula) y el diámetro de la cápsula de todas las variantes. En cuanto al diámetro total (Figura 19 A), se obtuvo una tendencia similar a la obtenida con la medición del diámetro del cuerpo celular, mostrando la variante H99-OZ-3 un mayor tamaño frente al resto. Llamó la atención también la variante H99-OZ-2, cuyo cuerpo celular había mostrado un tamaño menor (Figura 18), pero su diámetro total se igualaba al resto de variantes, indicando que tenía una mayor cápsula. Esto se confirmó al medir los tamaños de la cápsula (Figura 19 B). El resto de las variantes mostraron un diámetro de cápsula similar, pero destacó nuevamente la variante H99-OZ-3 por tener una cápsula más grande que el resto.

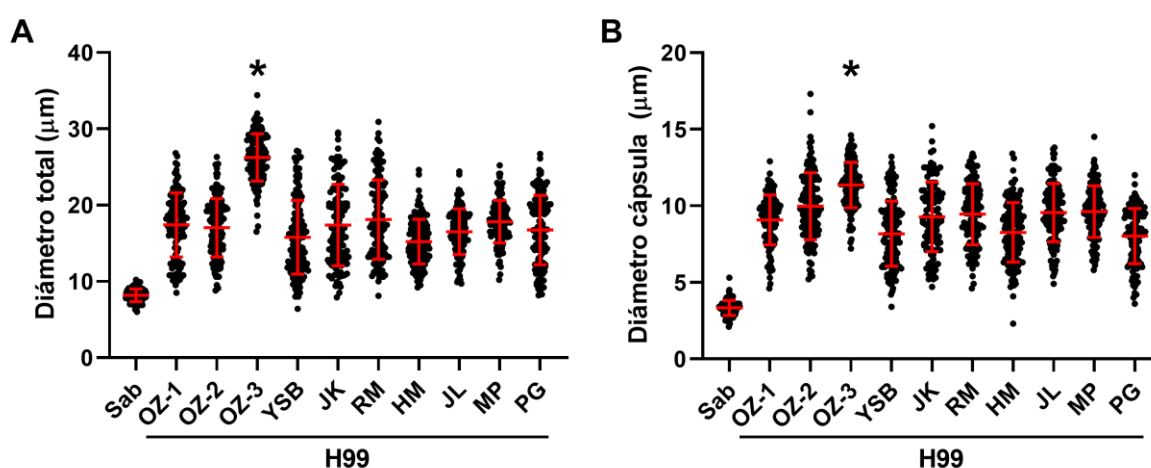


Figura 19. Inducción de células titanes en las distintas variantes H99. Las levaduras se indujeron en TCM y se midió manualmente el diámetro total de la célula (cuerpo celular y cápsula) (A) y el de la cápsula (B) tras su suspensión en tinta china. Se incluyó un control de no inducción (células en medio Sabouraud). Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar. Se midieron entre 100–200 células para cada variante. En ambos casos, todas las variantes mostraron diferencias significativas respecto al control Sab ($p < 0,0001$) y la variante H99-OZ-3 fue la única que mostró diferencias significativas con todas las variantes (*, $p < 0,0001$); test ANOVA.

6.1.1.2. Crecimiento en medio de inducción de cápsula

Cryptococcus neoformans puede aumentar el tamaño de su cápsula en determinados medios sin incrementar significativamente el tamaño del cuerpo celular. Por ello, quisimos estudiar si la variabilidad en la inducción de células titanes se correlacionaba con su capacidad de aumentar la cápsula. Se indujo la cápsula de las distintas variantes como se especifica en el apartado 5.1.2.1 de Materiales y Métodos, en 10% Sabouraud tamponado con MOPS a pH 7,3 (Zaragoza and Casadevall, 2004), y como se muestra en la Figura 20 A, todas las variantes H99 aumentaron el tamaño de la cápsula comparado con el control de no inducción (Sabouraud). La variante H99-OZ-3 presentó una cápsula de mayor tamaño que las demás variantes ($p < 0,0001$). Además del tamaño de la cápsula, también se analizaron el tamaño total y el tamaño del cuerpo celular (Figura 20 B y C, respectivamente). La variante H99-OZ-3 volvió a ser la que mayor tamaño total alcanzó ($p < 0,0001$). El diámetro del cuerpo celular fue más homogéneo, aunque presentó ligeras diferencias entre las variantes.

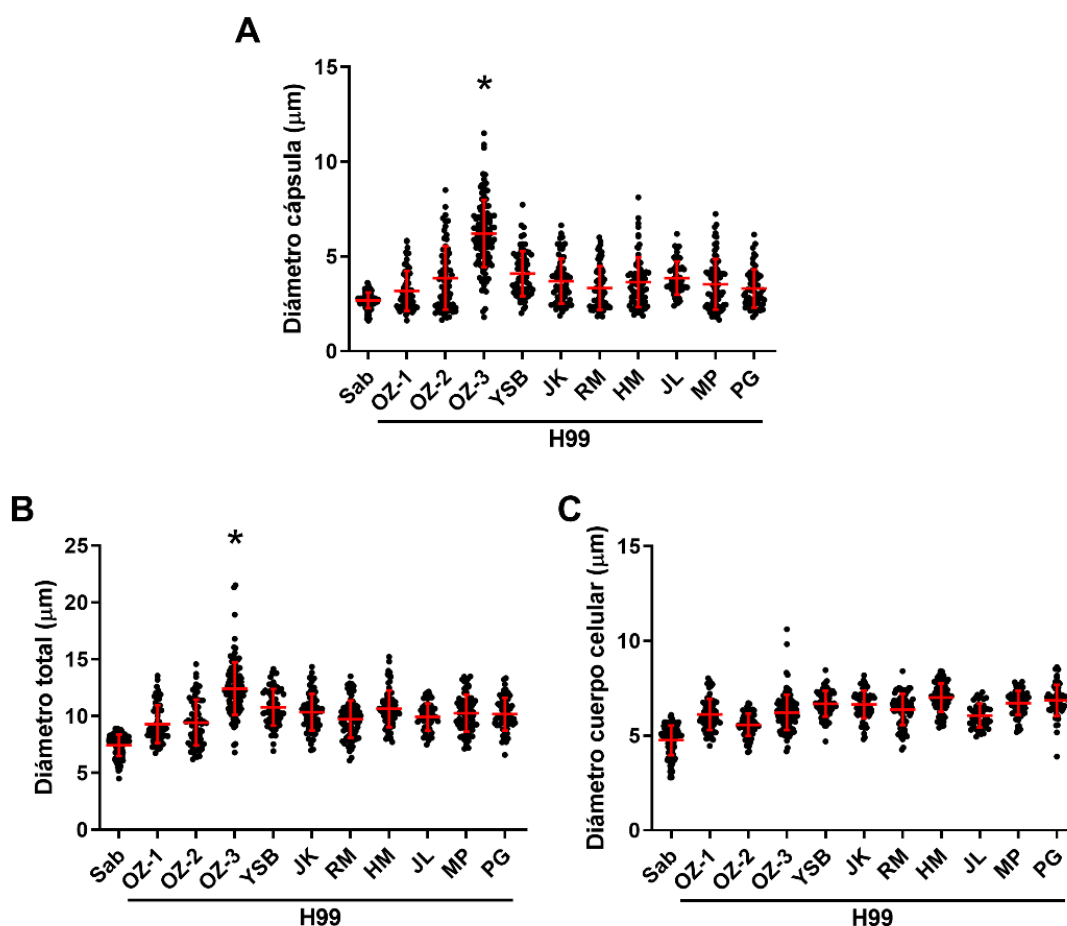


Figura 20. Crecimiento de las variantes H99 en medio de inducción de cápsula. Se indujeron las levaduras (10^6 células/mL) en medio de inducción de cápsula (10% Sabouraud en 50 mM MOPS a pH 7,3) a 37 °C sin agitación, y tras su suspensión en tinta china, se determinó manualmente el diámetro de la cápsula (A), el diámetro total de la célula (B) y el diámetro del cuerpo celular (C). Se incluyó un control de no inducción en medio Sabouraud (Sab). Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar. Se midieron alrededor de 100 células de cada variante. En las gráficas A y B el asterisco muestra diferencias significativas de la variante H99-OZ-3 frente al control Sab y frente al resto de las variantes (*, $p < 0,0001$). En la gráfica C, esta variante presentó diferencias significativas frente al control Sab y frente a todas las variantes ($p < 0,05$) excepto OZ-1, JL y RM ($p > 0,9999$); test ANOVA.

Aunque estas diferencias de comportamiento podían ser esperables debido a trabajos previos (Janbon *et al.*, 2014; Arras *et al.*, 2017), consideramos que el hecho de disponer de estas variantes H99 microevolucionadas, con diferentes fenotipos *in vitro*, podía ser una herramienta muy útil para asociar morfogénesis y virulencia, por lo que decidimos investigar el comportamiento de estas variantes en distintos modelos *in vivo*.

6.1.2. Asociación entre morfogénesis y virulencia

Decidimos aprovechar la capacidad que tienen los microorganismos, y en este caso *C. neoformans*, de mutar espontáneamente para intentar relacionar la morfología de las levaduras con la virulencia que producen en el hospedador. Para ello, primero estudiamos el crecimiento *in vitro* de este hongo, pasando luego a modelos *in vivo* más desarrollados.

6.1.2.1. Crecimiento *in vitro* en medio Sabouraud

A raíz de las diferencias observadas entre las 10 variantes H99 para formar células titanes y para inducir cápsula, se estudió su crecimiento *in vitro* en medio Sabouraud líquido para determinar que las diferencias obtenidas en la morfogénesis no eran debidas a defectos en el crecimiento. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento, midiendo la densidad óptica de los cultivos durante 48 horas e incubando a 30 y 37 °C en presencia y ausencia de agitación (Figura 21). Se observó que todas las variantes presentaron un crecimiento similar a las dos temperaturas, sin diferencias biológicamente significativas, aunque en todos los casos, el crecimiento fue algo menor a 37 °C.

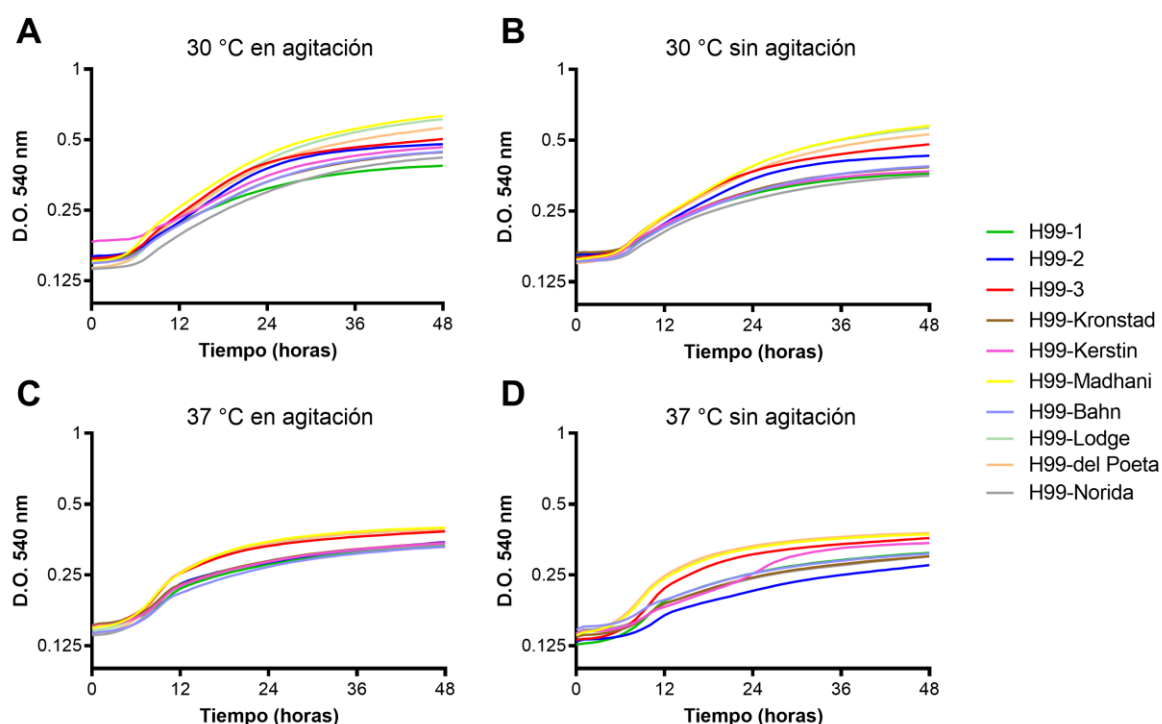


Figura 21. Curva de crecimiento de las variantes H99. Las levaduras se ajustaron a 10^5 células/mL en medio Sabouraud y se repartieron 200 μ L/pocillo en placas de 96 pocillos. Se determinó el crecimiento de las levaduras durante 48 h, midiendo la absorbancia a 540 nm cada 60 minutos. A) Crecimiento a 30 °C en agitación. B) Crecimiento a 30 °C sin agitación. C) Crecimiento a 37 °C en agitación. D) Crecimiento a 37 °C sin agitación. Cada curva se repitió 3 veces en días diferentes y se muestra una réplica representativa.

6.1.2.2. Modelos *in vivo*

A continuación, quisimos estudiar la correlación entre la morfogénesis obtenida *in vitro* y la virulencia, por lo que realizamos dos modelos de infección: *G. mellonella* y modelos murinos.

6.1.2.2.1. Virulencia en el modelo de *Galleria mellonella*

El modelo de *G. mellonella* es un modelo muy utilizado para estudiar la patogénesis de distintos hongos, entre ellos *C. neoformans*, debido a su fácil manejo y su bajo coste, ayudando a minimizar los problemas bioéticos asociados a la experimentación animal con mamíferos (Trevijano-Contador and Zaragoza, 2018). Se estudió la evolución de la infección producida con las 10 variantes H99, reproduciendo el modelo de infección descrito por Mylonakis y sus colaboradores (Mylonakis et al., 2005) y llevando a cabo los experimentos a 37 °C.

6.1.2.2.1.1. Selección de la dosis infectiva

Como se muestra en la Figura 22, inicialmente se testaron distintas dosis de levaduras con las variantes H99-OZ-1, H99-OZ-2 y H99-OZ-3. Estas dosis fueron de 10^5 células/larva (dosis baja, Figura 22 A), $2,5 \times 10^5$ células/larva (dosis intermedia, Figura 22 B) y 5×10^5 células/larva (dosis alta, Figura 22 C). La tasa de mortalidad varió según la dosis de infección, pero en todos los casos se observó que H99-OZ-1 presentó mayor virulencia, H99-OZ-2 virulencia intermedia y H99-OZ-3 fue la variante con menor virulencia, independientemente de la dosis. Se decidió usar en futuros experimentos una dosis de infección baja de 10^5 células/larva.

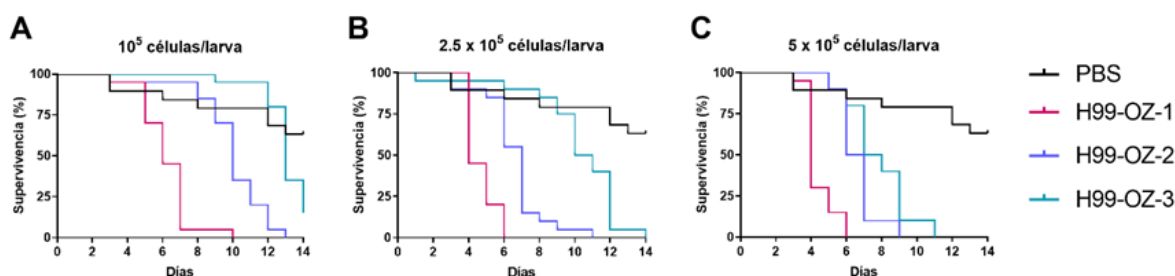


Figura 22. Curvas de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con distintas dosis de *C. neoformans*. Las larvas de *G. mellonella* se infectaron con distintas dosis de las variantes H99-OZ-1, H99-OZ-2 y H99-OZ-3 y se monitorizó su supervivencia durante 14 días a 37 °C. Se incluyó un control de larvas sin infectar, tratadas con PBS. Se escogió la dosis de 10^5 células/larva para sucesivos ensayos.

6.1.2.2.1.2. Curvas de supervivencia en *Galleria mellonella*

Una vez escogida la dosis de infección se estudió la virulencia causada por cada una de las 10 variantes H99 a 37 °C (Figura 23), llevando a cabo la infección de las larvas como se describe en el apartado 5.5.1.2 de Materiales y Métodos. Se observaron diferencias en la supervivencia de las distintas variantes, clasificándolas en distintos grupos de virulencia. Las variantes H99-OZ-1, H99-YSB, H99-JK, H99-RM y H99-PG mostraron una virulencia alta, H99-OZ-2, H99-HM, H99-JL y H99-MP una virulencia intermedia, y H99-OZ-3 una virulencia baja, siendo la que menor virulencia presentó de todas, con una curva de supervivencia similar a la que mostraron las larvas control inoculadas con PBS.

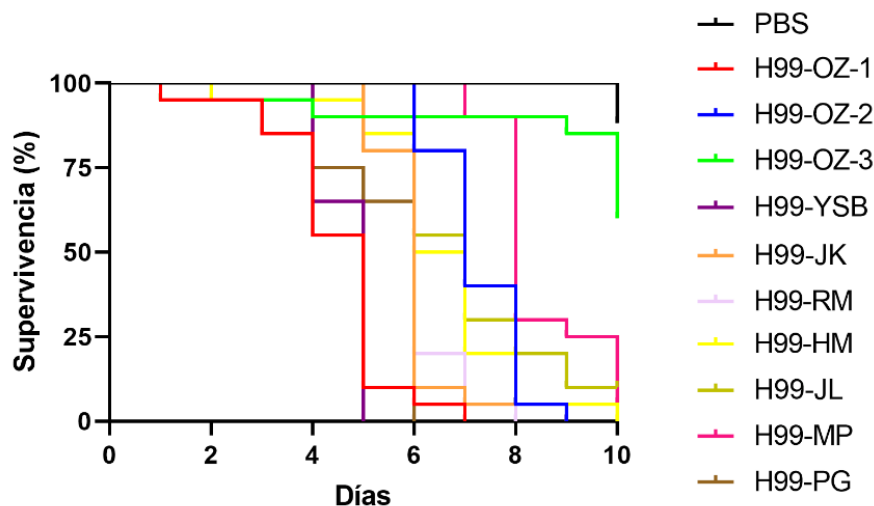


Figura 23. Curva de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con distintas variantes H99. Las larvas de *G. mellonella* se infectaron con 10^5 células/larva y se incubaron a 37°C durante 10 días. Se incluyó un control de larvas inoculadas con PBS. Los experimentos se realizaron en triplicado a tiempos distintos, obteniendo resultados reproducibles. Se representa una de las réplicas.

Tras este experimento, se decidió seleccionar una variante de cada grupo de virulencia para futuros ensayos *in vivo*. Se seleccionaron las variantes H99-OZ-1, H99-OZ-2 y H99-OZ-3, puesto que dichas variantes cubrían los tres grupos de virulencia, pero además, pertenecían al laboratorio del Dr. Óscar Zaragoza. En los siguientes experimentos estas variantes se nombrarán directamente como H99-1, H99-2 y H99-3, respectivamente, por motivos de claridad.

6.1.2.2.1.3. Evaluación de la carga fúngica

Se estudió la carga fúngica en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella* durante tres días de infección con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3, (Figura 24).

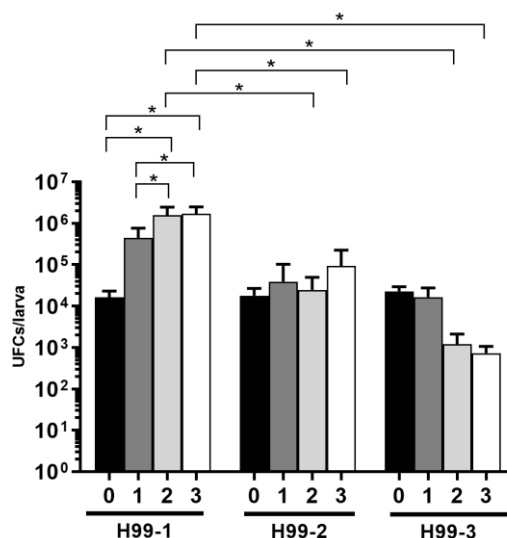


Figura 24. Carga fúngica de las larvas de *G. mellonella*. Se infectaron 5–6 larvas con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 (10^5 células/larva) y se incubaron a 37°C durante 3 días. A cada tiempo (días 0, 1, 2 y 3), se extrajo la hemolinfa de cada larva y se determinó su carga fúngica por recuento de UFCs. Se indica la media y la desviación estándar. En la gráfica se especifican todas las comparaciones que presentaron diferencias significativas (*, $p < 0,0005$), el resto de las comparaciones no mostraron significancia ($p > 0,7$); test ANOVA.

Se observó que las larvas infectadas con H99-1 incrementaron su carga fúngica según evolucionó la infección. Las larvas infectadas con H99-2 mantuvieron la infección constante, manteniendo el recuento de UFCs sin cambios durante los tres días. Sin embargo, las larvas infectadas con H99-3 mostraron una disminución de las UFCs desde día 2, lo que indicó que dichas larvas eran capaces de controlar la infección provocada por esta variante.

6.1.2.2.1.4. Actividad lítica de la hemolinfa

Se estudió la acumulación de péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella* tras 24 horas de infección con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3. Para ello, se determinó la actividad lítica en placas de agar que contenían el microorganismo *Micrococcus luteus*. Como se observa en la Figura 25, las hemolinfas de las larvas de *G. mellonella* infectadas con H99-1 y H99-3 mostraron diferencias en su actividad lítica, presentado la hemolinfa aislada de larvas infectadas con H99-1 una mayor actividad lítica, que podría relacionarse con la mayor virulencia de esta variante obtenida en experimentos previos. Sin embargo, ninguna de ellas mostró tener actividad diferente a la actividad observada en la hemolinfa de larvas infectadas con H99-2. Además, tampoco hubo diferencia significativa entre las larvas infectadas con la variante H99-3 y las larvas control inoculadas con PBS.

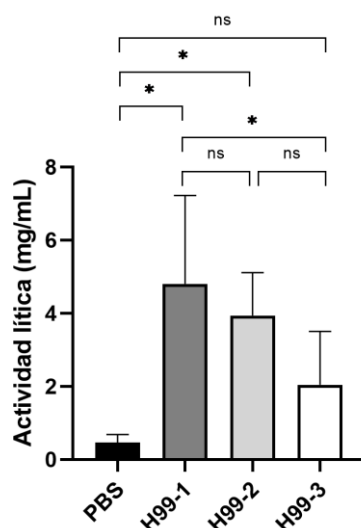


Figura 25. Actividad lítica de la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella* infectadas con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3. Se infectaron grupos de 6 larvas de *G. mellonella* con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 (10^5 células/larva) y se incubaron 24 h a 37 °C. Se incluyeron larvas tratadas con PBS como control. Tras 24 h de infección, se extrajo la hemolinfa y se cuantificó la actividad lítica (ver apartado 5.5.1.5 de Materiales y Métodos). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las muestras (*, $p < 0,05$; test ANOVA).

6.1.2.2.2. Virulencia en modelo de ratón

En siguiente lugar, decidimos investigar si las diferencias de morfología, observadas en modelos *in vitro*, y en virulencia, observadas en el modelo de *G. mellonella*, se reproducían en un modelo de infección en roedores, los cuales tienen una respuesta inmunitaria más parecida a la de los humanos. Estos modelos son más complejos y aportan mayor información sobre el desarrollo de la infección, pero debido a razones bioéticas decidimos ensayar solo las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 puesto que fueron las que mostraron mayores diferencias en virulencia en el modelo de *G. mellonella* y en morfogénesis *in vitro*.

En un experimento preliminar se estudió la evolución de la infección con las tres variantes H99 (H99-1, H99-2 y H99-3) en ratones CD1, realizando un seguimiento de la supervivencia de los animales. Como se muestra en la Figura 26, se obtuvieron perfiles de virulencia muy parecidos a los observados en el modelo de *G. mellonella*. La variante H99-1 mostró una virulencia alta, con un inicio de los síntomas aproximadamente tras 15 días de infección. Estos ratones se sacrificaron según su sintomatología por razones de punto final humanitario antes de llegar a día 30. La infección con H99-2 causó una mortalidad intermedia, sobreviviendo aproximadamente el 50% de los ratones hasta día 40, y llegando solo un 25% hasta el final del experimento (día 65). Sin embargo, los ratones infectados con la variante H99-3 mostraron una supervivencia mayor, llegando más del 50% de los animales hasta día 65 de infección sin presencia de síntomas.

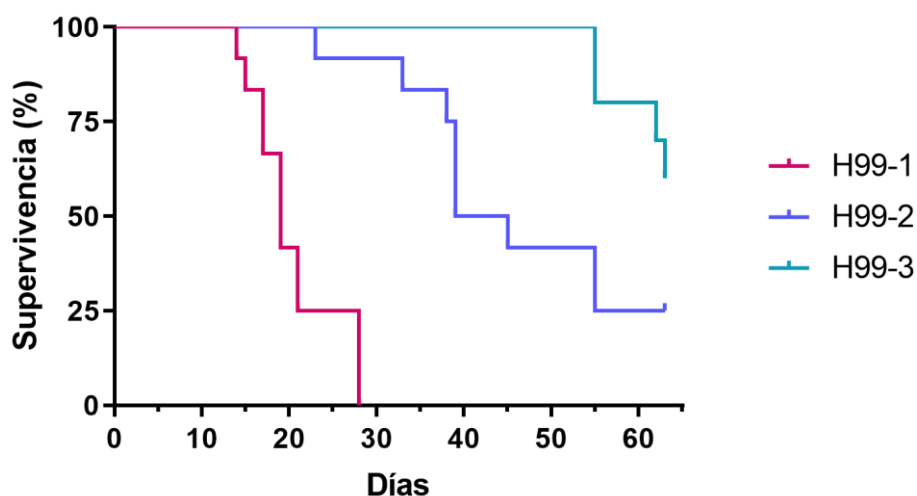


Figura 26. Curva de supervivencia en modelo de ratón CD1 tras infección con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3. Se infectaron 15 ratones CD1 con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 (10^6 levaduras/ratón) y se realizó el seguimiento de la mortalidad de los ratones hasta día 65, sacrificándolos ante la aparición de síntomas por razones bioéticas de punto final humanitario. La variante H99-3 mostró menor virulencia, H99-2 una virulencia intermedia y H99-1 una virulencia alta.

Seguidamente, se estudió también la morfología de las levaduras a día 13 de infección (Figura 27), sacrificando 3 ratones infectados con cada variante H99. Se extrajeron y homogeneizaron los pulmones y se examinó la morfología de las levaduras en preparaciones con tinta china. Al igual que en los experimentos *in vitro*, la variante H99-3 fue la que produjo células de mayor tamaño en los tres parámetros analizados. Sus células tuvieron una media de 50 μm de diámetro total, mientras que H99-1 generó células de alrededor de 20 μm de media, y H99-2, de aproximadamente 25 μm (Figura 27 A). El mayor tamaño total de las levaduras de la variante H99-3 se debió tanto a un mayor diámetro de cuerpo celular como de cápsula (Figura 27 B y C).

A la vista de estos resultados, decidimos profundizar en la infección provocada por las variantes H99-1 y H99-3, puesto que fueron las que proporcionaron mayores diferencias en cuanto a virulencia y morfogénesis *in vivo*. De nuevo, por razones bioéticas y para reducir el número de animales utilizados, en este caso se excluyó la variante H99-2 debido a su virulencia intermedia.

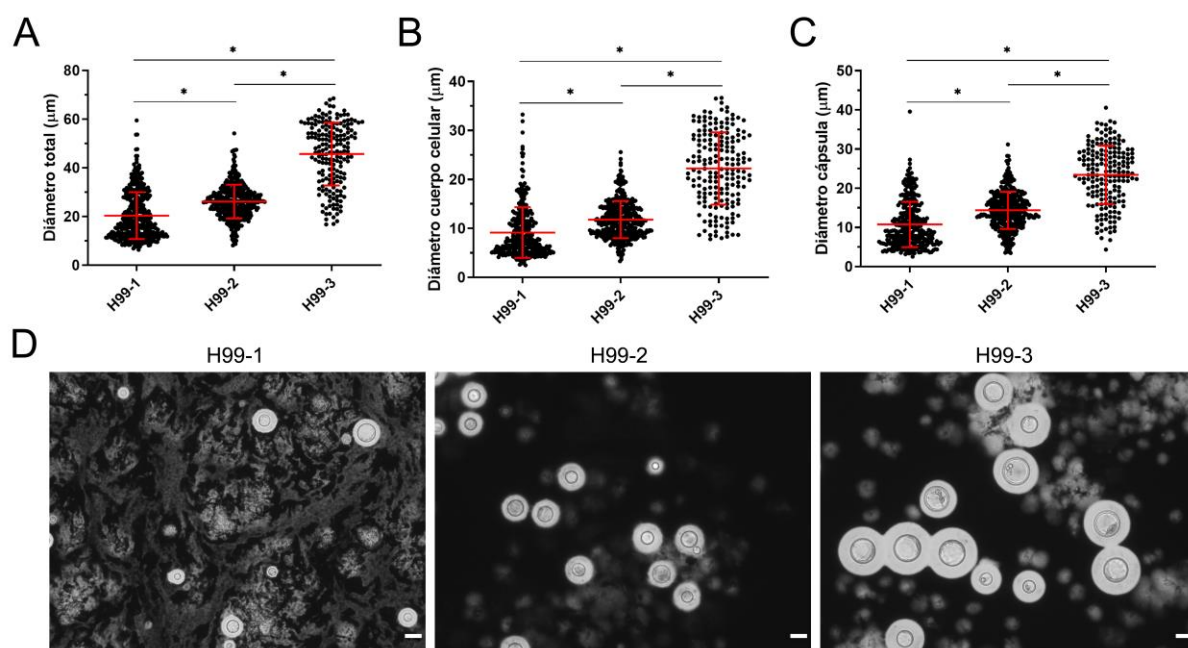


Figura 27. Morfología de las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 en pulmones de ratones CD1. Se infectaron ratones CD1 con las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 (10^6 células/ratón) y se sacrificaron 3 ratones a día 13 de infección. Se estudió la morfología de las levaduras en el pulmón, determinando el diámetro del tamaño total de las levaduras (A), del cuerpo celular (B) y de la cápsula (C). Se midieron aproximadamente 100 células por ratón, contando alrededor de 300 levaduras para cada variante. Las barras rojas representan la media y la desviación estándar. Todas las muestras presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (*, $p < 0,0001$; test Kruskal-Wallis). D) Fotografías de los extractos de pulmón a día 13 suspendidos en tinta china. La barra de escala representa 20 μm .

6.1.2.2.2.1. Caracterización de la infección con H99-1 y H99-3

Se infectaron ratones CD1 con las variantes H99-1 y H99-3, y se estudiaron distintos parámetros de la infección a diferentes tiempos: días 3, 7, 14 (infección tanto con H99-1 como con H99-3) y días 30, 45 y 60 (solo ratones infectados con H99-3 puesto que los ratones infectados con H99-1 tuvieron que ser sacrificados previamente por razones de punto final humanitario). Se hizo un seguimiento de los ratones, controlando su peso y la aparición de síntomas, y a los tiempos correspondientes se extrajeron pulmones y cerebros de cada ratón, que proporcionaron datos de morfología, inflamación, carga fúngica, histopatología y producción de citoquinas. En estos experimentos se incluyeron ratones control inoculados con PBS.

6.1.2.2.2.1.1. Estudio de la morfología de *C. neoformans* en los pulmones

Se analizó la morfología de las levaduras a los distintos días de infección (3, 7, 14, 30, 45, 60), midiendo el tamaño total de la célula, el cuerpo celular y la cápsula (Figura 28 A, B y C, respectivamente). La morfología de las levaduras de los ratones infectados con la variante H99-1 solo pudo medirse hasta día 14, más allá de este tiempo estos ratones comenzaron a desarrollar una enfermedad severa, teniendo que ser sacrificados por razones de punto final humanitario. Sin embargo, los ratones infectados con la variante H99-3 no mostraron signos de enfermedad hasta día 60 de infección.

En ratones infectados con la variante H99-1, el diámetro total de las levaduras y el de la cápsula incrementó ligeramente con el transcurso de la infección, manteniéndose el cuerpo

celular constante durante la duración del experimento. Sin embargo, en la infección con la variante H99-3, los tamaños de los tres parámetros de las levaduras (diámetro total, cuerpo celular y cápsula) aumentaron hasta día 7, y a partir de aquí la media de los tamaños celulares se mantuvo constante hasta día 45. Llamó la atención que a partir de día 30 de infección comenzó a aumentar de manera significativa la población de células de menor tamaño, con un cuerpo celular inferior a $10\ \mu\text{m}$ (Figura 28 B). Esta población fue aumentando a lo largo del tiempo, apareciendo a día 60 una población mayoritaria con un diámetro de cuerpo celular alrededor de $10\ \mu\text{m}$. Esta disminución de tamaño se observó sobre todo en las mediciones del diámetro total y del cuerpo celular (Figura 28 A y B, respectivamente), pero no fue tan llamativo con la cápsula (Figura 28 C).

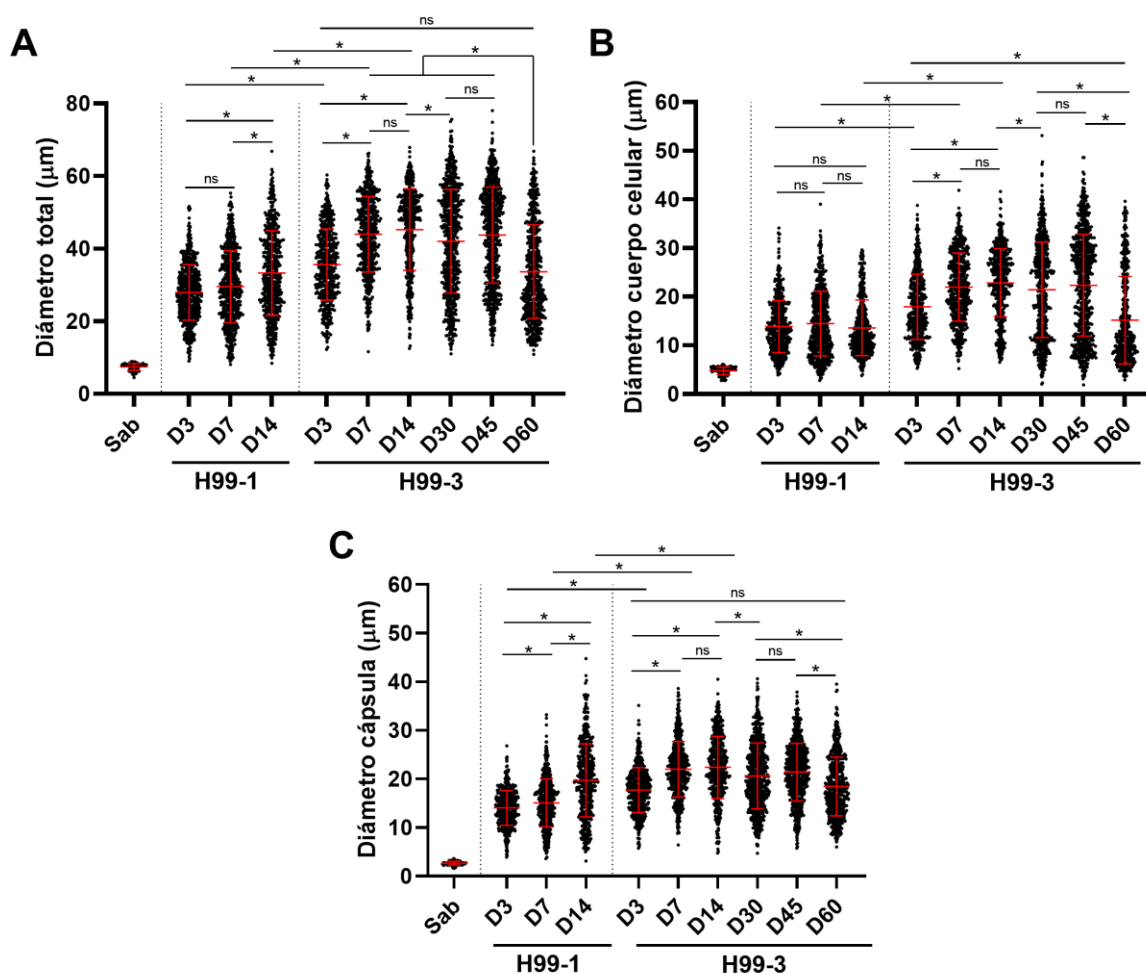


Figura 28. Morfología de las variantes H99-1 y H99-3 en pulmón en el transcurso de la infección de ratones CD1. Se infectaron ratones CD1 con las variantes H99-1 y H99-3 (10^6 células/ratón), y a los distintos días (3, 7, 14, 30, 45, 60) se sacrificaron 6 ratones ($n=6$) infectados con cada variante. Se extrajeron y se homogeneizaron los pulmones, y se visualizaron las levaduras en preparaciones con tinta china. Se midió manualmente el diámetro total de la célula (A), el cuerpo celular (B) y la cápsula (C). Se incluyó en las gráficas un control de levaduras incubadas *in vitro* en medio Sabouraud (Sab) para comparar la diferencia de tamaños obtenidos *in vivo*. Se midieron 150–300 células por cada ratón. Los asteriscos muestran diferencias significativas de las muestras señaladas mediante el test de Kruskal-Wallis (*, $p < 0,05$).

6.1.2.2.1.2. Análisis del peso de pulmones y cerebros

Se analizó la evolución del tamaño de pulmones y cerebros en el transcurso de la infección con ambas variantes, lo cual aporta información sobre el grado de inflamación de estos órganos.

En la Figura 29 A se observa que los pulmones aumentaron de tamaño tras la infección con ambas variantes H99, pero lo hicieron a distintos tiempos. Los ratones infectados con la variante H99-1 mostraron un aumento significativo en el tamaño de sus pulmones a día 14 al compararlos con los ratones control tratados con PBS ($p=0,0128$). Sin embargo, en los ratones infectados con la variante H99-3, este aumento de tamaño no fue significativo hasta el día 45 de infección ($p=0,0011$). Llamó la atención el gran aumento de tamaño de los pulmones que sufrieron algunos ratones infectados con H99-3 tanto a día 45 como a día 60 de infección.

Por el contrario, el peso de los cerebros no sufrió grandes variaciones en el transcurso de la infección, manteniéndose constante y sin síntomas de inflamación en ambas variantes (Figura 29 B).

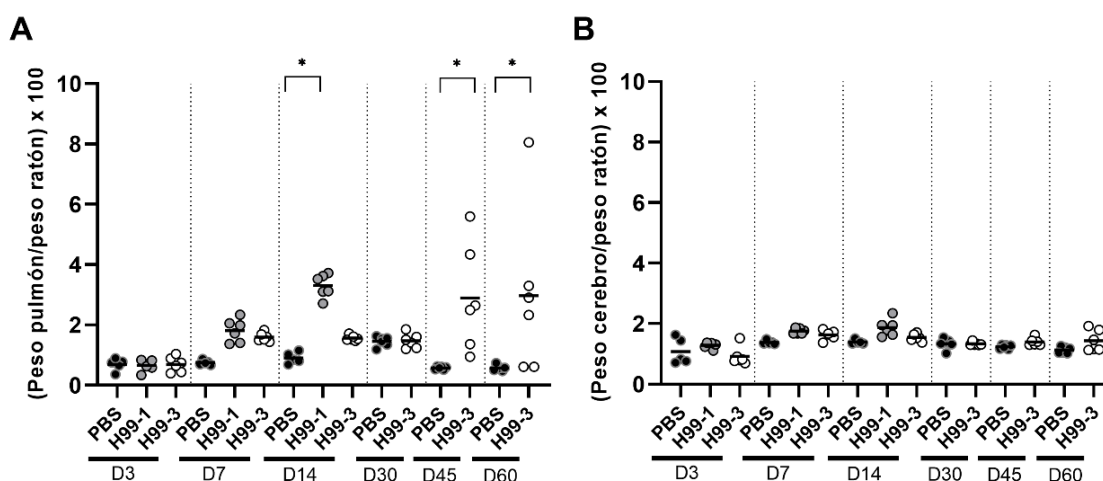


Figura 29. Evaluación de la inflamación en pulmones y cerebros en el transcurso de la infección. Los ratones CD1 se infectaron con las variantes H99-1 y H99-3 (10^6 células/ratón), y a los días correspondientes (3, 7, 14, 30, 45 y 60) se sacrificaron 6 ratones infectados con cada variante H99. Se extrajeron pulmones (A) y cerebros (B) y se normalizó su peso respecto al peso de cada ratón. Los asteriscos señalan las muestras que presentaron diferencias significativas (*, $p<0,05$; test ANOVA), el resto de las comparaciones no mostraron significancia.

6.1.2.2.1.3. Carga fúngica en pulmones y cerebros

Además de analizar la inflamación de ambos órganos, se estudió su carga fúngica, cuantificando el número de UFCs para cada órgano a los distintos tiempos.

En la Figura 30 A se muestra la carga fúngica obtenida en los pulmones. Los ratones infectados con H99-1 mantuvieron una carga fúngica constante, con alrededor de $10^4 - 10^5$ UFCs/mg de pulmón durante todo el experimento, mostrando solo un ligero incremento según prosperaba la infección. Sin embargo, en los ratones infectados con la variante H99-3 se observó que en las fases tempranas (días 3, 7 y 14), los ratones eran capaces de controlar la infección y disminuir el recuento de UFCs (aproximadamente

10^3 UFCs/mg de pulmón). A partir del día 30 de infección se observó que aumentó el número de levaduras en los pulmones, llegando a obtener a días 45 y 60 un recuento de UFCs comparable al obtenido en la infección provocada por H99-1 a día 14. Sorprendentemente, en los días más avanzados (sobre todo a día 60), se observó que había grandes diferencias en la carga fúngica de cada ratón sacrificado, apareciendo ratones con pulmones muy infectados con un alto recuento de UFCs y otros con un menor número de UFCs.

Por su parte, en el cerebro se encontraron levaduras tras la infección con ambas variantes, pero a distintos tiempos (Figura 30 B). Las levaduras de la variante H99-1 aparecieron en este órgano a día 14, mostrando que la diseminación a cerebro coincidía con la aparición de los síntomas en estos ratones. En cuanto a la infección por H99-3, las levaduras comenzaron a aparecer en cerebro a día 30, aunque a este tiempo solo un ratón de los 6 sacrificados presentó diseminación. Sin embargo, a días 45 y 60 de infección todos los ratones sacrificados presentaron recuento de UFCs en este órgano, mostrando diseminación de las levaduras. Esto coincidió con el cambio de la morfología observada sobre todo durante los días 45 y 60, como se ha mostrado en el apartado 6.1.2.2.1.1 (Figura 28 A y B), pudiendo relacionar la aparición de células pequeñas (inferiores a $10\ \mu\text{m}$) con la diseminación de las levaduras hacia el cerebro.

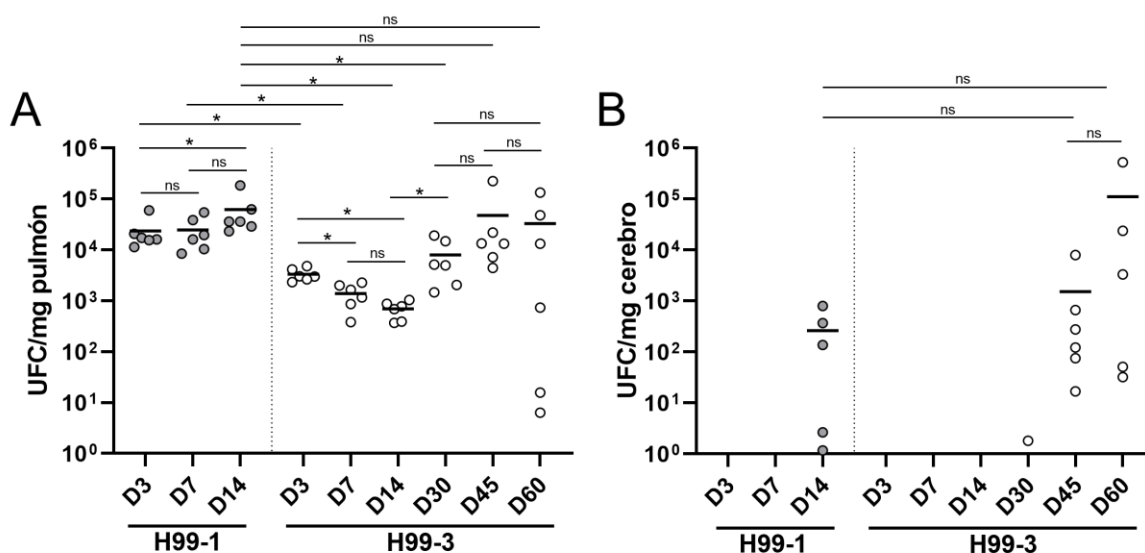


Figura 30. Evolución de la carga fúngica en pulmones y cerebros de ratones infectados con H99-1 y H99-3. Se infectaron ratones CD1 con las variantes H99-1 y H99-3 (10^6 células/ratón) y a los días correspondientes (3, 7, 14, 30, 45 y 60) se sacrificaron 6 ratones infectados con cada variante. Tras homogeneizar los órganos, se cuantificó la carga fúngica mediante recuento de UFCs en pulmones (A) y cerebros (B). Las líneas indican la media de cada población. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,05$; test no paramétrico de Mann-Whitney).

Como se observa en la Figura 31 A y B, a día 45 los ratones infectados con la variante H99-3 no mostraron sintomatología y fueron capaces de sobrevivir a pesar de presentar levaduras en el cerebro. Solo cuando los pulmones y cerebros mostraron una carga fúngica muy elevada (Figura 31 C y D) empezó la sintomatología, comenzando a darse una pérdida de peso en los roedores.

Llamó la atención la gran variabilidad observada en el tamaño y en la carga fúngica de los pulmones de ratones infectados con la variante H99-3 a días 45 y 60. Algunos de los ratones

mostraron una carga fúngica muy alta y una gran inflamación, pesando dichos órganos entre 1 y 1,5 gramos frente a los 200 mg de peso de un pulmón sin infectar (Figura 31 A y C). Estos ratones presentaron mayor carga fúngica en pulmón, y en ellos se empezó a ver una diseminación a cerebro, siendo estos animales los que comenzaron a mostrar una leve aparición de sintomatología (ligera pérdida de peso, Figura 31 B y D). Sin embargo, otros ratones presentaron unos pulmones con un tamaño aproximado de 200 mg, sugiriendo que, o bien habían sido infectados inicialmente con una dosis inferior por error, o que podrían haber controlado la infección de forma más eficiente a pesar de estar infectados con la misma variante.

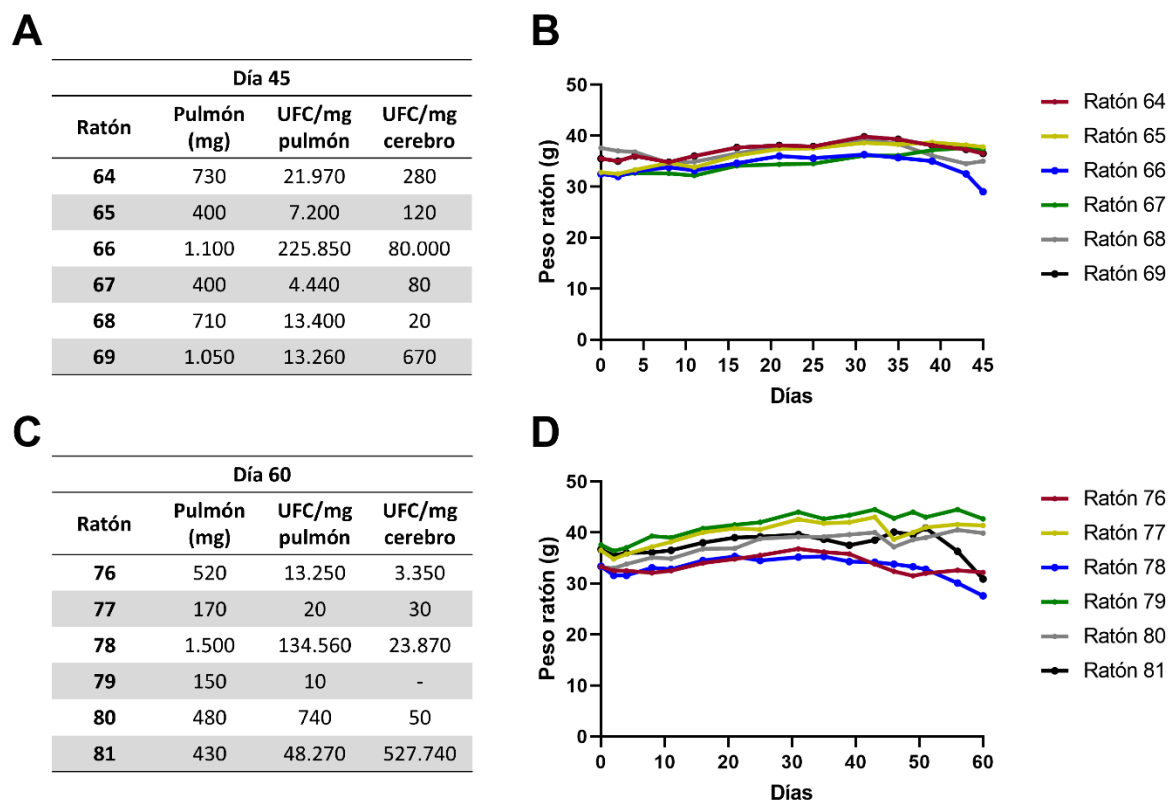


Figura 31. Evolución de la infección a días 45 y 60 en ratones CD1 infectados con H99-3. Datos tras 45 días de infección (A y B) y 60 días de infección (C y D). (A y C) Se especifica el peso de los pulmones de cada ratón y la carga fúngica (UFCs/mg de órgano) en pulmones y cerebro. Para una mayor claridad, estos datos han sido redondeados. (B y D) Evolución de los pesos de cada ratón (g, gramos) a lo largo de la infección.

6.1.2.2.2.1.4. Histopatología en pulmones

Se llevó a cabo el procesamiento de los pulmones de los ratones infectados con ambas variantes H99 para realizar un estudio histopatológico a los diferentes tiempos de la infección y poder así investigar el tipo de respuesta inflamatoria y el reclutamiento celular. La Figura 32 permite comparar la infección entre ambas variantes hasta día 14, observando la evolución de la infección y la aparición de levaduras en pulmón. A días 7 y 14 se pudo observar una gran acumulación de levaduras y células inflamatorias en los ratones infectados con la variante H99-1. Sin embargo, los ratones infectados con la variante H99-3 mostraron una cantidad menor de levaduras a esos tiempos, y en las imágenes de histología se pudo observar que los pulmones tenían un aspecto similar a los pulmones de ratones control (PBS),

apreciando gran cantidad de alveolos no dañados (indicados por la presencia de espacios en blanco).

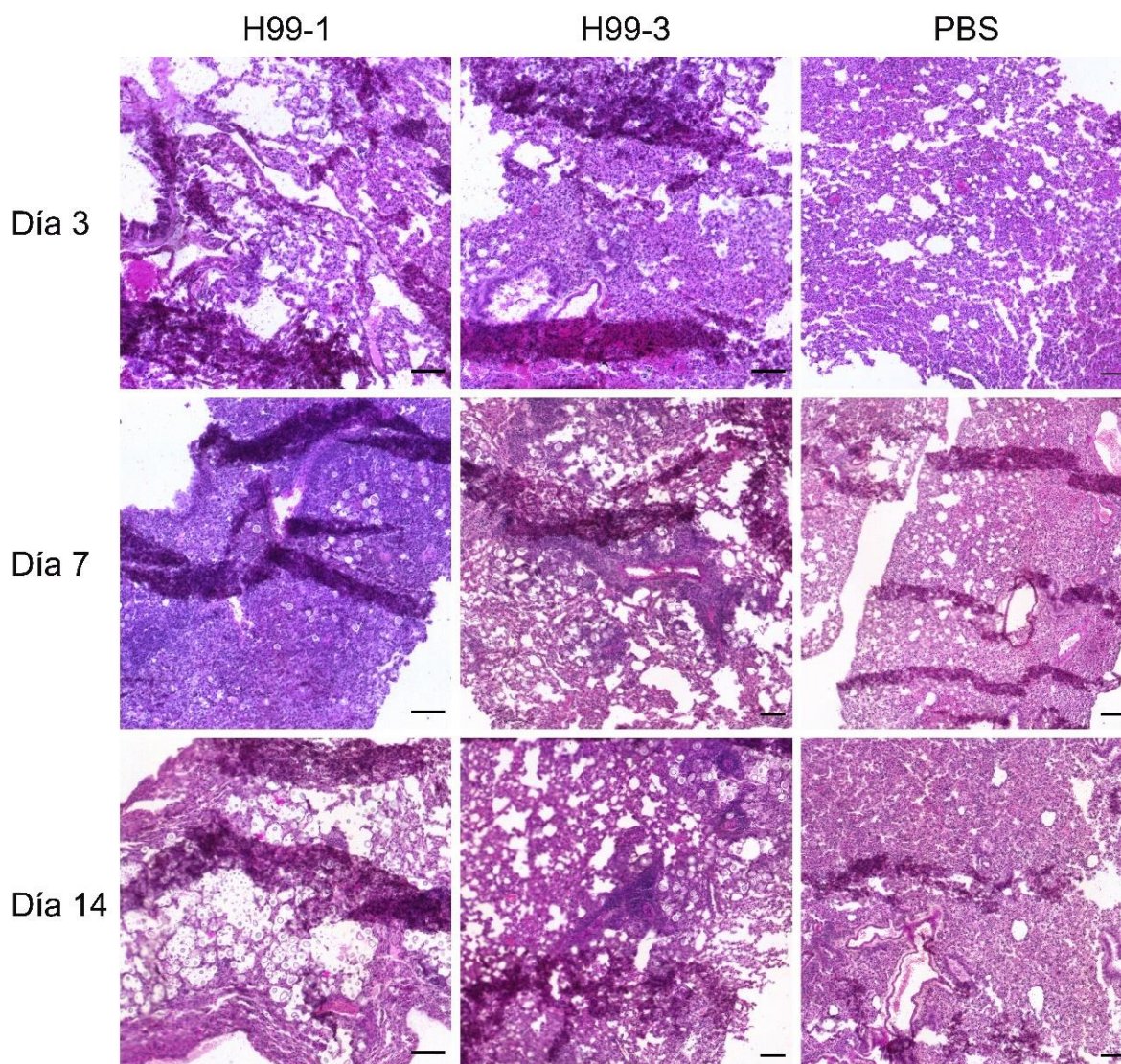


Figura 32. Histopatología de pulmones. Se infectaron ratones CD1 con 10^6 células/ratón de las variantes H99-1 y H99-3, y a los distintos días (3, 7 y 14) se sacrificaron 6 ratones ($n=6$) por cada variante H99. Se extrajeron los pulmones y se conservó una porción en formalina 10% para su estudio histopatológico tras tinción con hematoxilina/eosina. En los pulmones de ratones infectados por la variante H99-1 se observó un incremento en el número de levaduras y en inflamación según progresó la infección, observándose a día 14 una gran presencia de acúmulos de levaduras. Los pulmones infectados con la variante H99-3 presentaron un aspecto similar a los pulmones de ratones control tratados con PBS, mostrando los espacios alveolares no dañados y escasa inflamación. La barra de escala representa $100\ \mu\text{m}$ en todas las imágenes.

Se estudió también la histología de los pulmones infectados con H99-3 a tiempos más tardíos de infección (Figura 33). A diferencia de lo encontrado en los primeros días de infección, a días 30, 45 y 60 se observó una gran infiltración celular y la presencia de un elevado número de levaduras agrupadas en granulomas. Además, también se pudo apreciar la presencia de una población heterogénea de *C. neoformans*, pudiendo observar levaduras de gran tamaño (células titanes) y células mucho más pequeñas (principalmente a día 45, Figura 33).

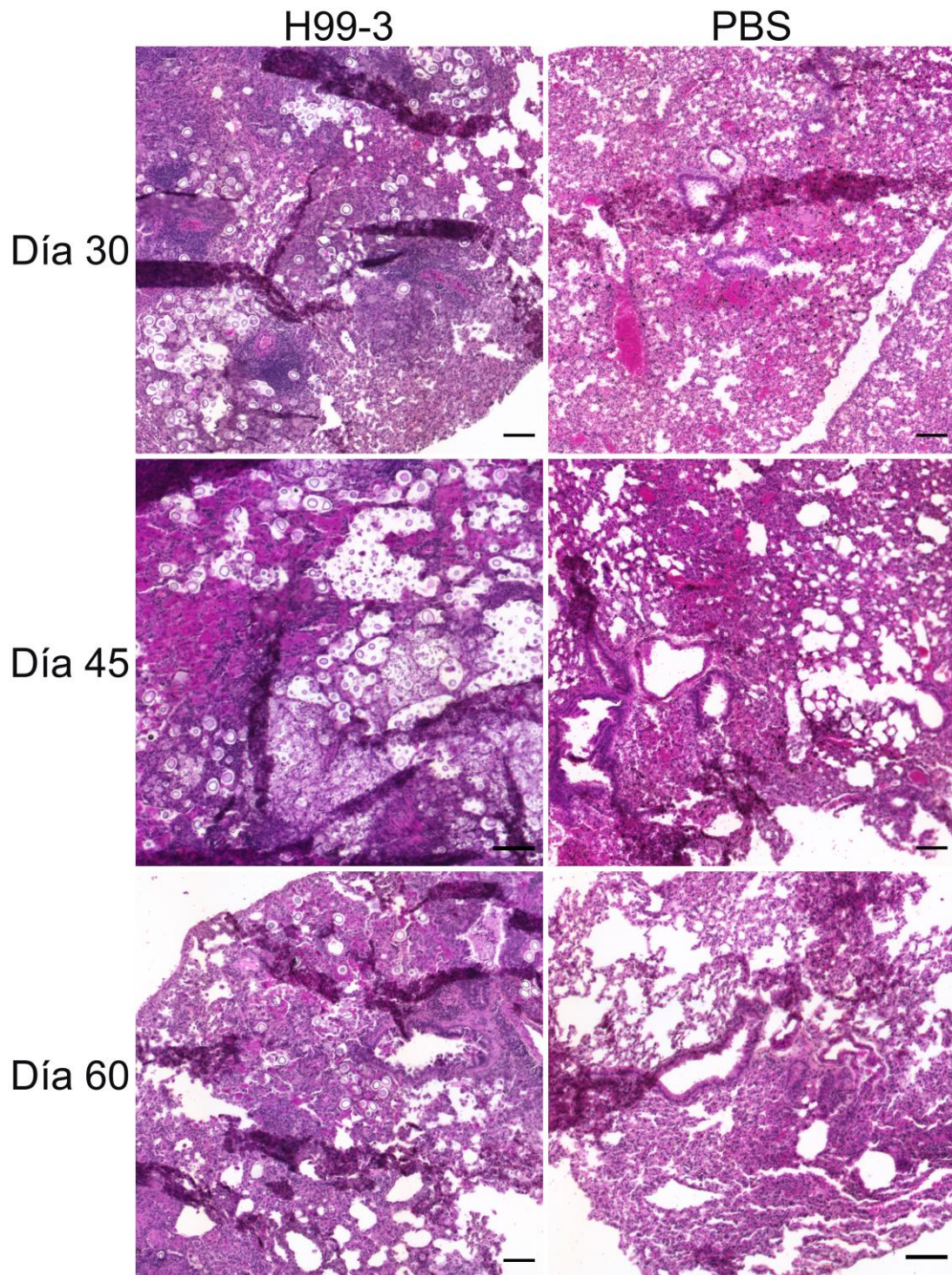


Figura 33. Histopatología de los pulmones tras la infección causada por la variante H99-3. Se infectaron ratones CD1 con la variante H99-3 (10^6 células/ratón), y se sacrificaron 6 animales ($n=6$) a los distintos días (30, 45 y 60). Se extrajeron los pulmones y una porción se conservó en formalina 10% para su estudio histopatológico tras su tinción con hematoxilina/eosina. Se pudo apreciar la presencia de células inflamatorias y los grandes acúmulos de levaduras a los distintos tiempos de infección. Se incluyen fotografías de los pulmones de ratones tratados con PBS como control. La barra de escala representa 100 μm en todas las imágenes.

6.1.2.2.1.5. Cuantificación de la producción de citoquinas

Por último, quisimos investigar la producción de citoquinas en ratones infectados con las variantes H99-1 y H99-3 para estudiar si había diferencias en el tipo de respuesta inmunitaria que inducía cada variante. Se analizaron las citoquinas producidas en pulmón y cerebro, y en ambos casos se estudiaron las siguientes citoquinas: Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12 y GM-CSF), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) y Th17 (IL-17).

6.1.2.2.1.5.1. Producción de citoquinas en pulmón

Los ratones infectados con la variante H99-1 produjeron un pico de determinadas citoquinas a día 7 (TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-6, IL-5), que fue también producido por los ratones infectados con la variante H99-3 pero en menor concentración. En el caso de los ratones infectados con esta variante, la producción de estas mismas citoquinas (excepto IL-5) disminuyó a días 14 y 30 para luego aumentar de nuevo a días 45 y 60 de infección. En el caso de la IL-5, aumentó a días tempranos (3 y 7) en ratones infectados con ambas variantes, pero disminuyó según avanzó la infección y se mantuvo igual que en los ratones control. La acumulación de IL-10 e IL-12 se asemejó a la de los ratones control, con un máximo en la producción a día 60. IL-4 también tuvo una producción similar a la de los ratones control a lo largo de toda la infección.

6.1.2.2.1.5.2. Producción de citoquinas en cerebro

Se determinó también la producción de citoquinas en cerebro, pero esta vez solo se examinaron muestras desde día 14 de infección en adelante, puesto que al no observar diseminación antes de ese tiempo (como se mostró previamente en la Figura 30 B, donde se determinó la carga fúngica en el cerebro), decidimos excluir los días 3 y 7 de este análisis. A día 14 de infección, la producción de citoquinas de los ratones infectados por las variantes H99-1 y H99-3 fue muy similar, observándose diferencias solo en TNF- α e IL-4. A partir de día 30 solo se pudo comparar la producción de citoquinas de los ratones infectados con H99-3 respecto a los ratones control tratados con PBS, observando que la producción de todas las citoquinas producidas por los animales infectados aumentaba ligeramente respecto a los animales control. Llamó la atención la IL-10, que mostró una mayor inducción a día 45 de infección. La concentración de IL-5 fue indetectable en el cerebro de todos los ratones.

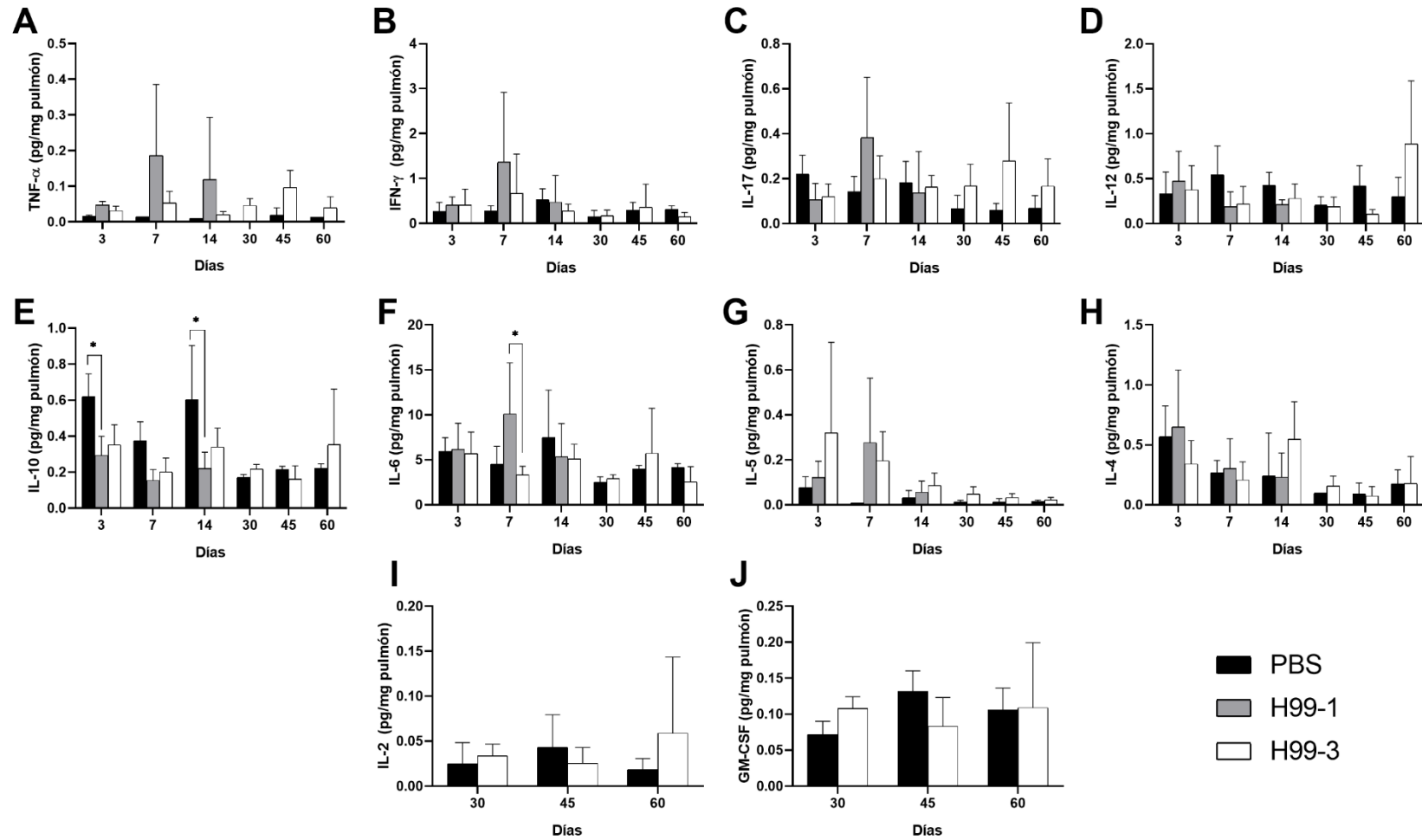


Figura 34. Concentración de citoquinas en pulmón. Se infectaron grupos de 6 ratones CD1 con las variantes H99-1 (barras grises) y H99-3 (barras blancas) (10^6 levaduras/ratón). Como control se trató a los ratones con PBS (barras negras). A cada día correspondiente (3, 7, 14, 30, 45 y 60) se extrajeron y homogeneizaron los pulmones y se determinó la concentración de las distintas citoquinas por mg de pulmón. Se estudiaron las siguientes citoquinas: TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C), IL-12 (D), IL-10 (E), IL-6 (F), IL-5 (G), IL-4 (H), IL-2 (I) y GM-CSF (J). Las barras representan la media y la desviación estándar. Se indican las comparaciones que mostraron diferencias significativas (*, $p < 0,05$), el resto de las comparaciones no presentaron significancia; test ANOVA.

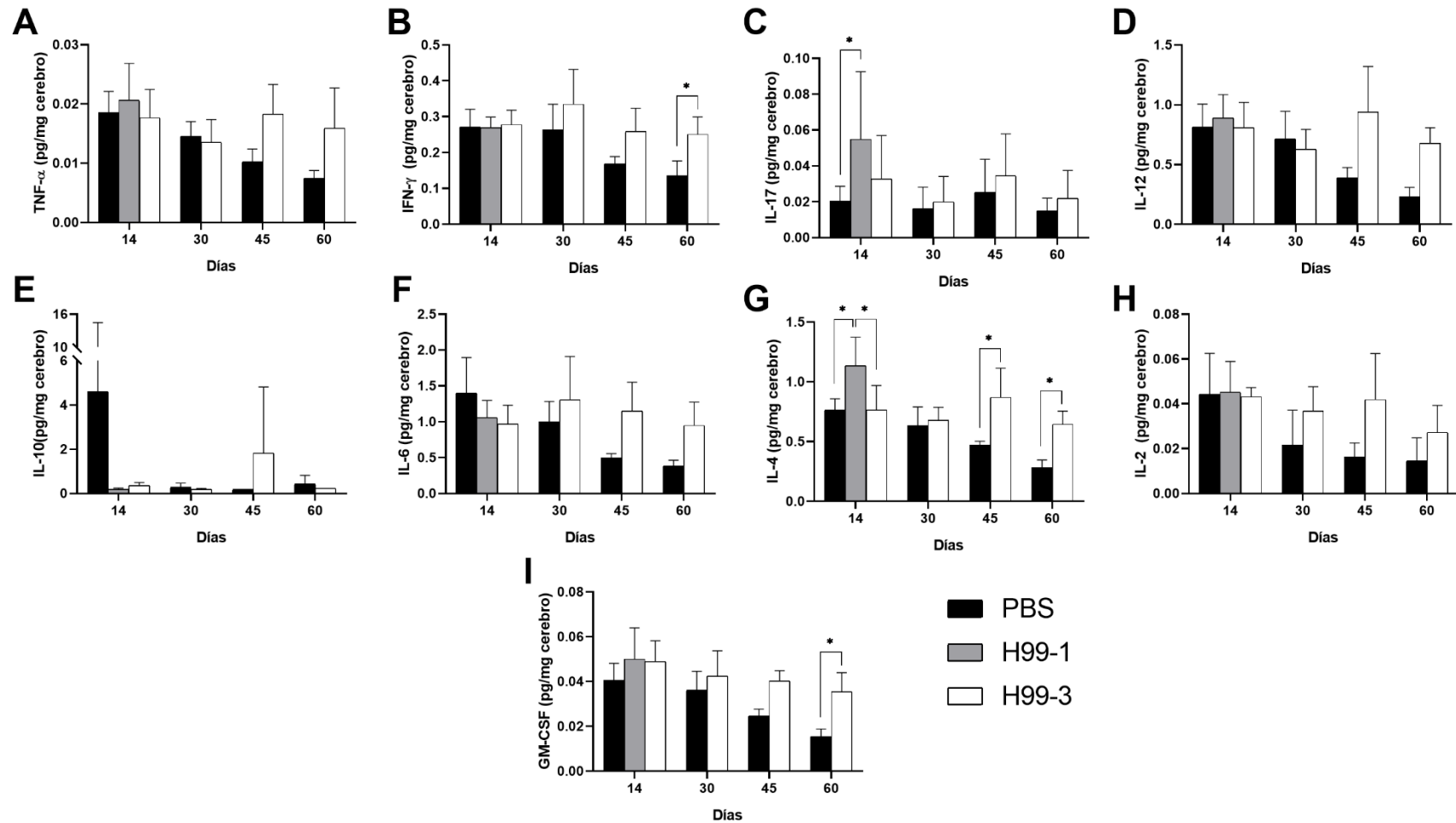


Figura 35. Concentración de citoquinas en cerebro. Se infectaron grupos de 6 ratones CD1 con las variantes H99-1 (barras grises) y H99-3 (barras blancas) con 10^6 levaduras/ratón. Como control se trató a los ratones con PBS (barras negras). A cada día correspondiente (14, 30, 45 y 60) se extrajeron y homogeneizaron los cerebros, y se determinó la concentración de las distintas citoquinas por mg de órgano. Las citoquinas que se estudiaron fueron las siguientes: TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C), IL-12 (D), IL-10 (E), IL-6 (F), IL-5 (G), IL-4 (G), IL-2 (H) y GM-CSF (I). Las barras representan la media y la desviación estándar. Los asteriscos indican las muestras que presentaron diferencias significativas (* , $p < 0,05$), el resto de las comparaciones no presentaron significancia; test ANOVA.

6.1.3. Estudio de la cápsula de *C. neoformans*

La cápsula es el principal factor de virulencia de *C. neoformans* y la principal estructura que es reconocida por el hospedador. Además, el aumento del tamaño de la cápsula es uno de los primeros cambios morfológicos que ocurren durante la infección (Feldmesser *et al.*, 2001a), por lo que decidimos investigar la existencia de posibles diferencias en la estructura capsular entre las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 que pudieran asociarse a las diferencias observadas en virulencia.

6.1.3.1. Unión del anticuerpo 18B7 a la cápsula

La cápsula está dividida en distintas capas y puede presentar diferencias en su estructura, proporcionando diferencias en la unión de distintas moléculas (revisado en (O'Meara and Alspaugh, 2012)). Quisimos estudiar si el anticuerpo monoclonal IgG1 18B7 (anticuerpo que se une al polisacárido GXM de la cápsula) conjugado con un fluoróforo Alexa Fluor 488 se unía de forma distinta a la cápsula de las tres variantes H99. La capacidad de unión de diferentes concentraciones de dicho anticuerpo a la cápsula se analizó mediante citometría de flujo (Figura 36). Tras el análisis estadístico, la variante H99-3 mostró diferencias significativas de unión del anticuerpo a la cápsula a la concentración más alta (2,5 $\mu\text{g/mL}$) frente a las otras dos variantes ($p < 0,0001$). Sin embargo, en el resto de concentraciones probadas (1,25–0,078 $\mu\text{g/mL}$), las tres variantes presentaron una capacidad de unión al anticuerpo similar. Estos resultados sugieren que la variante H99-3 posee cambios estructurales en su cápsula que resultan en un mayor número de epítomos de unión al anticuerpo 18B7 o una mayor exposición de dichos epítomos.

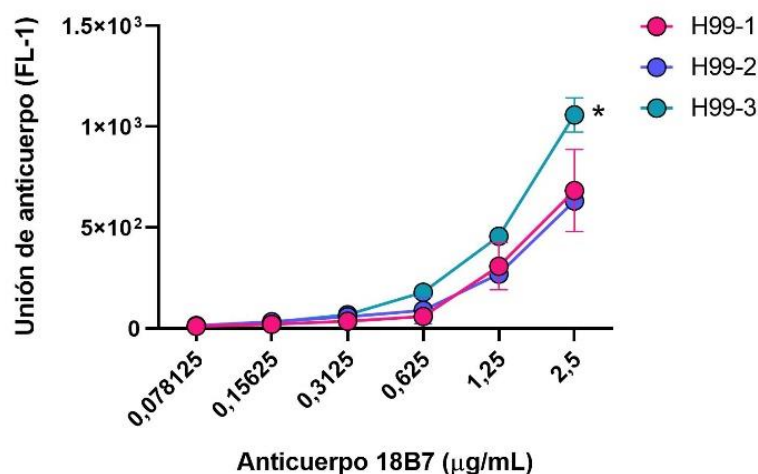


Figura 36. Unión del anticuerpo monoclonal 18B7 a la cápsula de polisacárido. Las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 se incubaron con distintas concentraciones del anticuerpo monoclonal fluorescente 18B7–Alexa Fluor 488 (2,5 a 0,078 $\mu\text{g/mL}$). Se determinó la unión del anticuerpo a la cápsula mediante citometría de flujo, cuantificando la intensidad de fluorescencia (FL-1). Se representa la media geométrica y la desviación estándar de tres réplicas realizadas en días diferentes. Solo se observaron diferencias significativas en la unión del anticuerpo a la variante H99-3 a la mayor concentración (*, $p < 0,0001$), pero no hubo diferencias en el resto de concentraciones ni en las otras dos variantes ($p > 0,05$); test ANOVA.

6.1.3.2. Estudio de la producción de exopolisacárido (EPS)

Para investigar posibles diferencias estructurales de la cápsula se quiso determinar si las tres variantes H99 secretaban la misma cantidad de EPS al medio. Se incubaron las

levaduras en TCM y en medio mínimo (MM). Estos experimentos se realizaron durante una estancia en Estados Unidos, en el laboratorio del Dr. Arturo Casadevall, donde utilizaban de forma rutinaria MM para la inducción de cápsula (descrito en el apartado 5.1.2.1 de Materiales y Métodos). Por esta razón, como control, se incluyó este medio en los estudios del EPS. Se determinó el diámetro de la cápsula de cada variante y se observó que la cápsula producida por las células titanicas poseía un mayor tamaño que las levaduras inducidas en medio de inducción de cápsula (Figura 37 A). Se determinó la concentración de polisacárido expulsado al medio (EPS) mediante un ensayo ELISA de captura (Figura 37 B), y al intentar relacionar el tamaño de la cápsula con la concentración de EPS obtenida, se observó que las células titanicas de las tres variantes H99 expulsaron menor cantidad de EPS que las células incubadas en MM. Estos resultados sugieren que hay una correlación inversa entre el tamaño de la cápsula y la concentración de EPS, y por lo tanto, a mayor tamaño de cápsula, menor cantidad de EPS se secreta al medio.

En el caso de la variante H99-3, la cápsula generada tras su inducción en TCM fue la de mayor tamaño, pero esta variante secretó ligeramente menor cantidad de EPS al medio. Sin embargo, en las células inducidas en medio de inducción de cápsula, a pesar de que la cápsula que se formó en este medio fue similar a las otras variantes, la cantidad de polisacárido secretado por H99-3 fue ligeramente mayor.

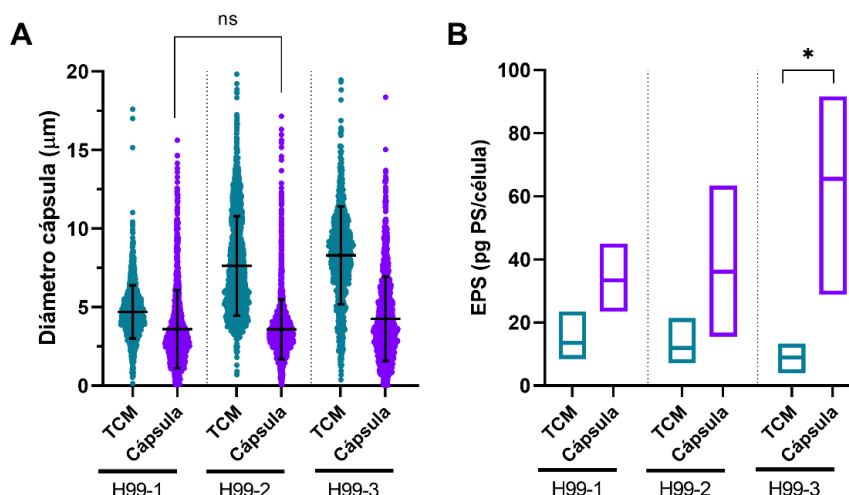


Figura 37. Producción de exopolisacárido (EPS). Las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 se incubaron en TCM para la inducción de células titanicas y en MM para la inducción de cápsula (control). A) Diámetro de la cápsula. Se suspendieron las levaduras en tinta china y se midió el tamaño de la cápsula manualmente. Las líneas indican la media y la desviación estándar de tres réplicas realizadas en días distintos. Todas las muestras mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$), salvo las muestras que se indican (ns, $p > 0,999$); test Kruskal-Wallis. B) Determinación del EPS de cada muestra. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se determinó la concentración de EPS mediante un ensayo ELISA de captura. Se representa la media de tres réplicas realizadas en días distintos. Solo se encontraron diferencias significativas entre las muestras señaladas con asterisco (*, $p = 0,0225$), el resto de las comparaciones no mostraron significancia ($p > 0,05$); test ANOVA. PS, polisacárido.

6.1.3.2.1. Estructura del EPS determinada mediante RMN

Para intentar dilucidar si existían diferencias en el polisacárido de la cápsula de las tres variantes se recurrió al uso de técnicas de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). Brevemente, en esta técnica se aplican campos magnéticos a las muestras con el fin de identificar las señales que proceden de cada uno de los protones de cada molécula.

Dependiendo del entorno químico de cada protón, estos generan una señal característica que se encuentra localizada a un determinado desplazamiento químico (ppm). Además, la integración de cada una de estas señales es proporcional al número de protones a los que corresponde cada señal.

De todas las muestras de EPS, es decir, el sobrenadante de los cultivos, solo pudieron ser analizadas aquellas en las que se indujo la cápsula en MM. La presencia de suero en las muestras genera un gran número de picos en el espectro de RMN, imposibilitando identificar las señales deseadas, por lo que las muestras inducidas en TCM no pudieron ser analizadas debido a la existencia de suero en este medio. Como se ha mencionado anteriormente, estos experimentos se realizaron durante una estancia en el laboratorio del Dr. Arturo Casadevall, por lo que se incluyó como control interno una nueva variante H99 procedente de aquel laboratorio (H99-AC, Arturo Casadevall). En la Figura 38 se puede observar el pico del estándar DSS- d_6 a 0 ppm, incluido en todas las muestras para la calibración de los espectros de RMN. Se localizó la región del grupo estructural de reporte (SRG, por sus siglas en inglés), situado entre 4,8 y 5,4 ppm, zona en la que se encuentran las señales que identifican los polisacáridos GXM de la cápsula. Tras llevar a cabo el análisis de las tres variantes H99 y la variante H99-AC como control, se observó que las cuatro variantes presentaban un perfil parecido, con la misma colección de picos. Sin embargo, la altura de los picos era distinta, lo cual indicó la existencia de diferencias en la cantidad de los motivos GXM, es decir, diferencias en la cantidad de sustituyentes.

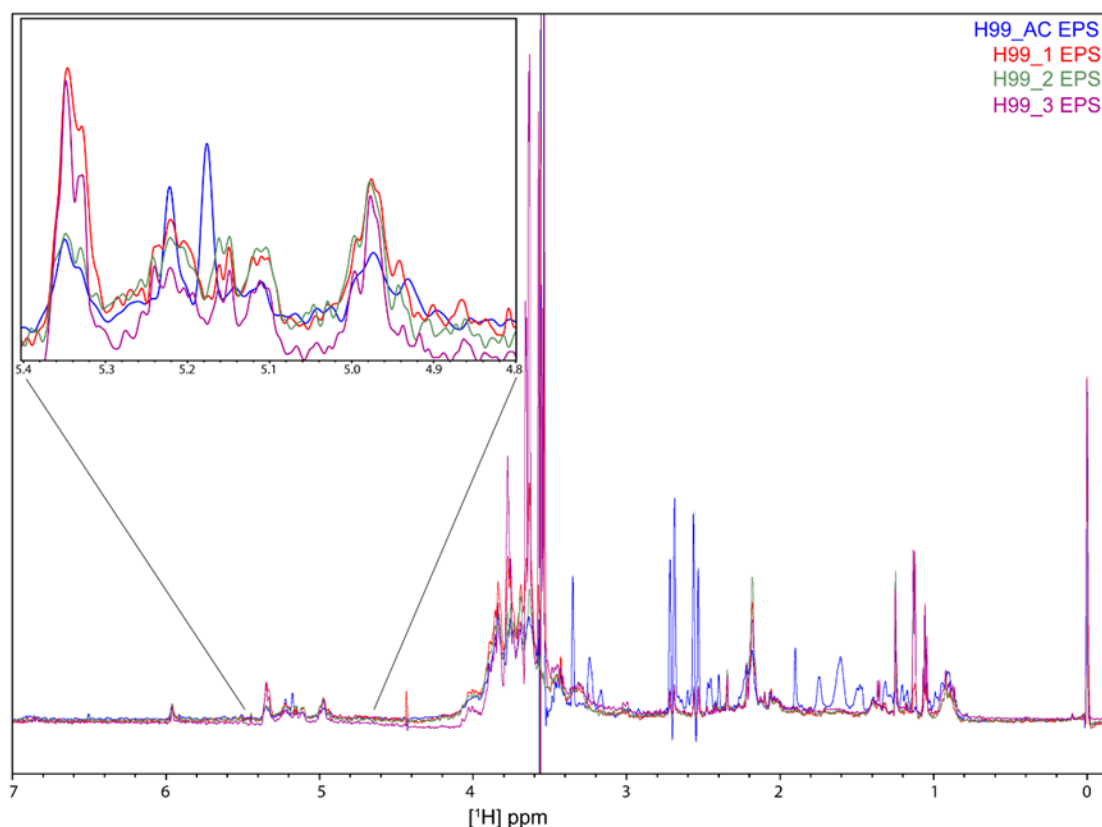


Figura 38. ^1H -RMN del EPS de las distintas variantes H99. Se incubaron las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 en MM y se recogieron los sobrenadantes para el estudio del EPS por RMN. Los sobrenadantes se prepararon como se indica en el apartado 5.9 de Materiales y Métodos. En el análisis se incluyó la variante H99-AC como control. La región SRG (4,8–5,4 ppm) se amplió para una mejor visualización. En esta región se identificaron señales similares para todas las variantes, pero con distinta intensidad, indicando distintos patrones de sustitución del motivo GXM. Todas las muestras contenían el estándar DSS- d_6 a 0 ppm para la calibración de los espectros.

Con el fin de realizar un estudio más detallado de la región SRG, se llevó a cabo una deconvolución de las señales obtenidas. Se identificaron picos comunes a las 4 variantes H99 (Figura 39, picos en rojo), sin embargo, también se encontraron señales distintas para cada una de las variantes, indicando la presencia del mismo motivo GXM pero con distintos patrones de sustitución (Figura 39, picos en azul y verde). Por ejemplo, en H99-AC se observó un pico azul de gran intensidad a 5,176 ppm, mientras que en nuestras variantes H99 la intensidad de este pico disminuyó y aparecieron nuevas señales (Figura 39, picos en verde). Las variantes H99-1 y H99-2 mostraron una gran similitud en la estructura de su cápsula, con patrones similares. Sin embargo, en la variante H99-3 aparecieron dos picos que no se observaron en las otras variantes, un pico a 4,998 ppm y otro a 5,328 ppm, confirmando esto mayores diferencias estructurales de la cápsula de esta variante. Estos resultados, aunque preliminares, sugirieron la posibilidad de una mayor evolución de la variante H99-3.

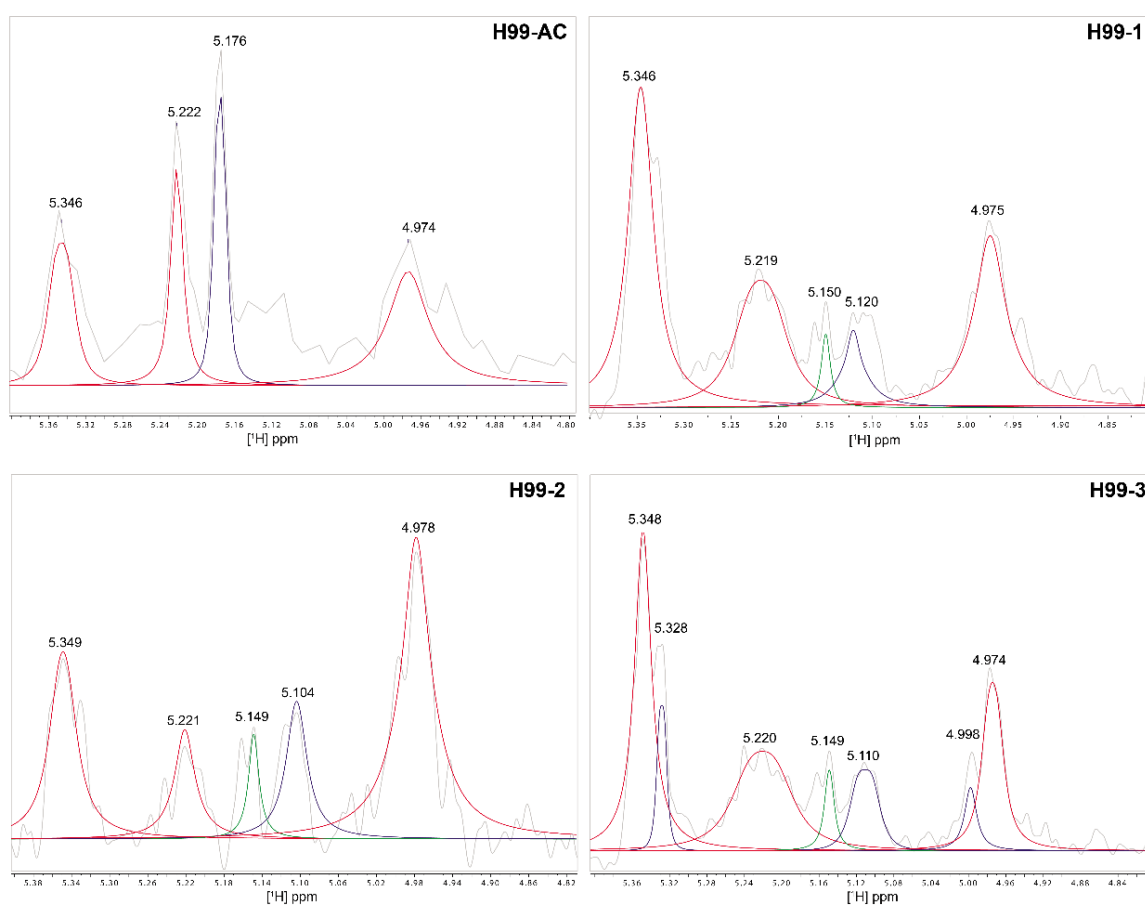


Figura 39. Deconvolución de la región SRG. Mediante algoritmos matemáticos se deconvolucionó la región SRG para analizar más detalladamente los picos obtenidos en el EPS de las distintas variantes H99 tras su análisis por RMN. En la variante H99-AC se observó una señal en azul que disminuyó su intensidad en nuestras variantes. Las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 mostraron una señal en verde que no estuvo presente en la variante H99-AC. La variante H99-3 presentó dos picos distintivos, indicando una mayor diferencia estructural de su cápsula.

6.1.4. Otros fenotipos de virulencia

Debido a las diferencias obtenidas en morfología y virulencia de las variantes H99-1, H99-2 y H99-3, se estudiaron otros parámetros importantes para la patogénesis de *C. neoformans*.

6.1.4.1. Producción de vesículas extracelulares

La producción de VEs se ha relacionado con la síntesis de la cápsula y otros fenotipos relacionados con la virulencia (Rodrigues *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Castelli *et al.*, 2022), por lo que decidimos investigar si había una diferencia en la producción de estas estructuras entre las variantes H99-1, H99-2 y H99-3. Como se observa en la Figura 40, cada variante H99 produjo aproximadamente el mismo número de vesículas, aunque el diámetro de estas vesículas varió ligeramente. Las vesículas producidas por la variante H99-3 mostraron un tamaño ligeramente mayor respecto a la variante H99-1 ($p < 0,05$).

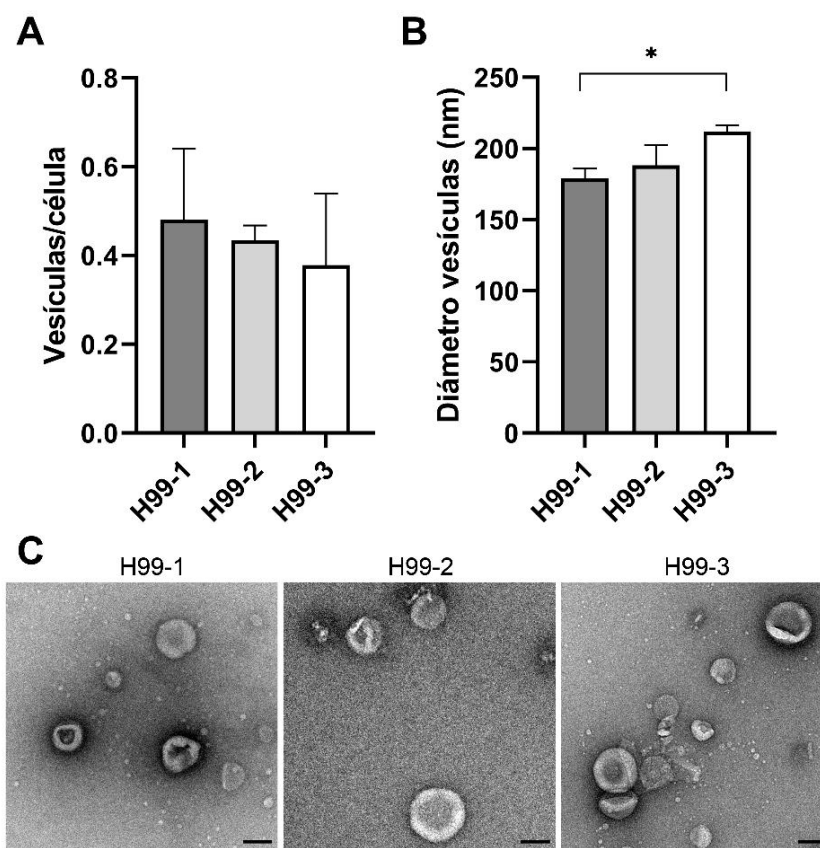


Figura 40. Producción de vesículas en las variantes H99-1, H99-2 y H99-3. Se extrajeron y se cuantificaron las vesículas como se describe en Materiales y Métodos. Se determinó el número de VEs por célula (A) y el diámetro medio de las vesículas en cada variante (B). Estos experimentos se realizaron en triplicado en días distintos y se representan las tres réplicas juntas. Se señalan las muestras que presentaron diferencias significativas (*, $p < 0,05$), el resto de las comparaciones no presentaron significancia ($p > 0,05$); test ANOVA. C) Fotografías de las VEs tomadas mediante TEM. La barra de escala representa 100 nm.

6.1.4.2. Estado metabólico de las levaduras

Se determinó la respiración mitocondrial basal de las levaduras mediante la medición del consumo de oxígeno (OCR), parámetro que aporta información sobre el estado metabólico (Lev *et al.*, 2020). Se analizó la respiración mitocondrial de las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 en un cultivo en Sabouraud en fase estacionaria (24 horas de incubación, Figura 41 A) y en fase logarítmica (5 horas de incubación, Figura 41 B). Los resultados fueron iguales en ambos casos, mostrando que la variante H99-1 poseía una mayor respiración frente a las variantes H99-2 y H99-3, que mostraron tener una respiración similar.

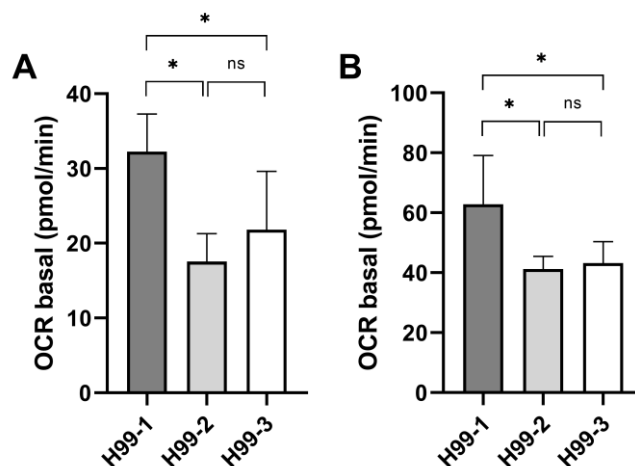


Figura 41. Estado metabólico basal de las variantes H99-1, H99-2 y H99-3. Los cultivos se incubaron en medio Sabouraud a 30 °C en agitación (150 r.p.m.), y se midió el OCR en fase estacionaria (A) y en fase logarítmica (B). Para las levaduras en fase estacionaria, tras 24 h de incubación en medio Sabouraud, los cultivos se ajustaron para su lectura en el Seahorse XFe24 (80.000 células/pocillo). Para las levaduras en fase logarítmica, tras la incubación de 24 h en medio Sabouraud, los cultivos se ajustaron a 10^6 células/mL y se incubaron durante 5 h en agitación a 150 r.p.m. a 30 °C para obtener las levaduras en fase estacionaria. Tras esto, los cultivos se ajustaron para su lectura en el Seahorse XFe24 (80.000 células/pocillo). Estos experimentos se realizaron en triplicado en días distintos, y las barras representan la media y la desviación estándar de las tres réplicas juntas. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (*, $p < 0,0001$; test ANOVA).

6.1.4.3. Secreción de enzimas: ureasa y fosfolipasa

Cryptococcus neoformans posee distintas enzimas que intervienen en su virulencia y le ayudan a sobrevivir, por lo que son importantes factores de virulencia (Cox *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001). Se determinaron las diferencias en cuanto a la producción de ureasa y fosfolipasa C de las variantes H99-1, H99-2 y H99-3, pero no se encontraron diferencias significativas en la secreción de ninguna de estas dos enzimas (Figuras 42 A y B).

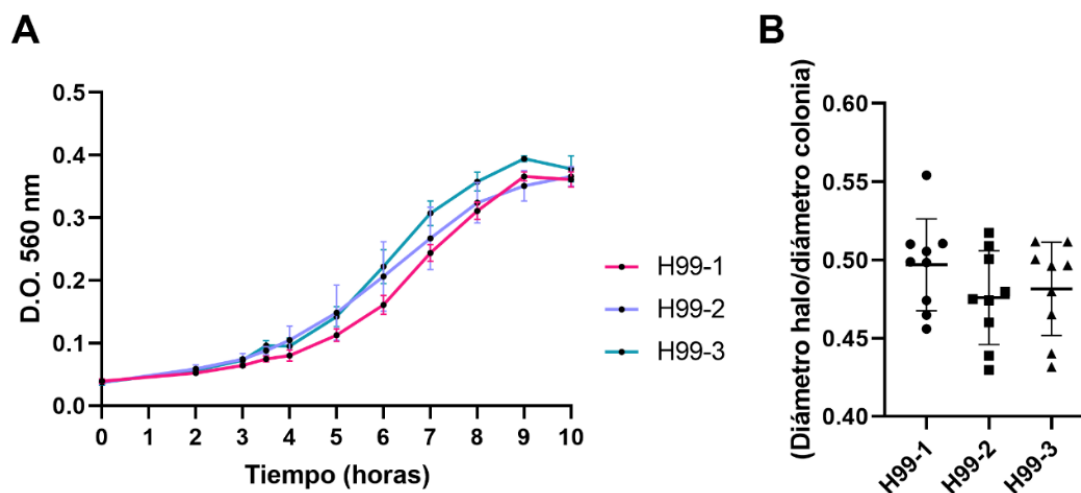


Figura 42. Determinación de la secreción de distintas enzimas. A) Determinación de la actividad ureasa. Las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 se incubaron en medio ureasa (descrito en Materiales y Métodos) en agitación a 30 °C. Cada 60 minutos se extrajeron 100 μ L de los cultivos y se cuantificó la producción de ureasa en el sobrenadante mediante la medición de su absorbancia a 560 nm. Se representa la media de las tres réplicas realizadas y las líneas indican la desviación estándar. B) Determinación de la actividad fosfolipasa C. Se plaquearon gotas de 3 μ L (10.000 levaduras/gota) de las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 en placas con yema de huevo. Se determinó la actividad de la fosfolipasa C midiendo el diámetro de los halos formados tras 3 días de incubación a 30 °C. Para el análisis, se normalizó el tamaño de dichos halos respecto al diámetro de la colonia crecida. Se representa el conjunto de las tres réplicas realizadas y las líneas marcan la media y la desviación estándar. No se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los ensayos ($p > 0,9999$).

6.1.4.4. Análisis de sensibilidad a estrés oxidativo

Se analizó el estrés oxidativo que generó la presencia de H_2O_2 en las distintas variantes H99 a distintos tiempos. Como se observa en la Figura 43, las muestras no demostraron tener diferente viabilidad en presencia de 0,6 mM de H_2O_2 , inhibiéndose el crecimiento de cada variante de igual manera a cada tiempo examinado.

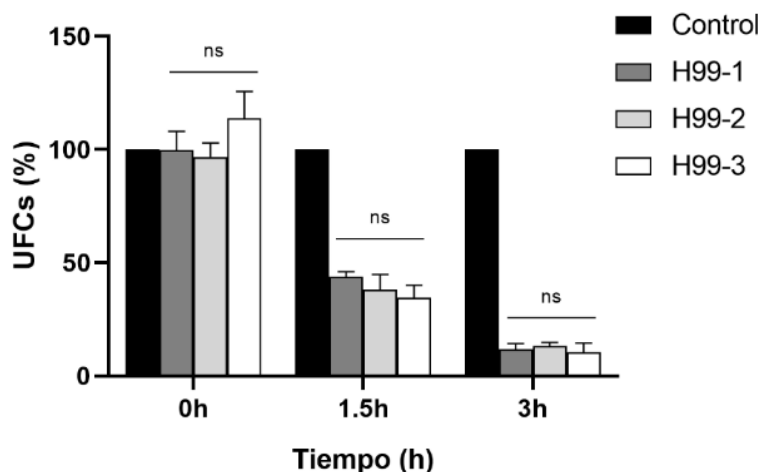


Figura 43. Estrés oxidativo en presencia de H_2O_2 . Las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 se incubaron en presencia de 0,6 mM de H_2O_2 durante distintos tiempos (0, 1,5 y 3 h). Se recogieron las levaduras y se realizó recuento de UFCs para determinar la afectación de cada variante en presencia de H_2O_2 . A todos los tiempos se incluyó un control sin H_2O_2 , y se determinó el porcentaje de UFCs en función de ese control. No se observaron diferencias significativas entre las variantes comparadas en el mismo tiempo (ns, $p > 0,7$), pero sí se observó significancia estadística para cada una de las variantes al comparar su evolución en el tiempo ($p < 0,0025$). Las tres variantes presentaron diferencias significativas respecto al control sin H_2O_2 tanto a tiempo 1,5 h como 3 h ($p < 0,0001$); test ANOVA.

Tras la obtención de estos resultados pudimos concluir que las tres variantes H99-1, H99-2 y H99-3 mostraban una gran diferencia tanto en morfogénesis como en virulencia en los distintos modelos *in vivo* estudiados, obteniendo una correlación inversa entre la formación de células titanés y la virulencia. Sin embargo, al analizar otros parámetros que influyen en la virulencia de *C. neoformans*, como por ejemplo la cápsula, la actividad de distintas enzimas, la producción de vesículas o la respiración mitocondrial, aunque encontramos ciertas diferencias, no había una tendencia que marcara una diferencia clara. La variante H99-3 parecía presentar las mayores discrepancias respecto a las variantes H99-1 y H99-2, pero no en todos los ensayos estudiados.

6.1.5. Mecanismos moleculares involucrados en titanización

Las diferencias morfológicas observadas en las distintas variantes H99 tanto *in vitro* como *in vivo* nos llevaron a realizar un análisis genómico de estas variantes para identificar genes involucrados en virulencia y morfogénesis. El hecho de que todas las variantes provinieran del mismo aislado clínico inicial nos hizo pensar que el número de mutaciones acumuladas en cada laboratorio durante las últimas décadas sería mucho menor que si se comparasen diferentes cepas de referencia o diferentes aislados clínicos con distinta capacidad de formar células titanes, ofreciendo la posibilidad de identificar mutaciones específicas relacionadas con titanización o virulencia. Esto nos proporcionó una herramienta muy útil para profundizar en las bases moleculares del proceso de titanización.

6.1.5.1. Análisis genómico

Para identificar genes involucrados en la morfogénesis de *C. neoformans* se llevó a cabo la secuenciación de los genomas de las diez variantes H99. Este abordaje se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Toni Gabaldón, y mediante herramientas informáticas, nos proporcionaron una lista de las mutaciones que contenía el ADN de cada variante H99. Como se observa en la Figura 44, tras llevar a cabo un análisis de correspondencias múltiples (MCA), las variantes H99 se agruparon en dos poblaciones diferenciadas, sin embargo, la variante H99-3 apareció más alejada de estos grupos, indicando mayores diferencias en el genoma de esta variante comparada con el resto, y siendo, por tanto, la más distinta genéticamente.

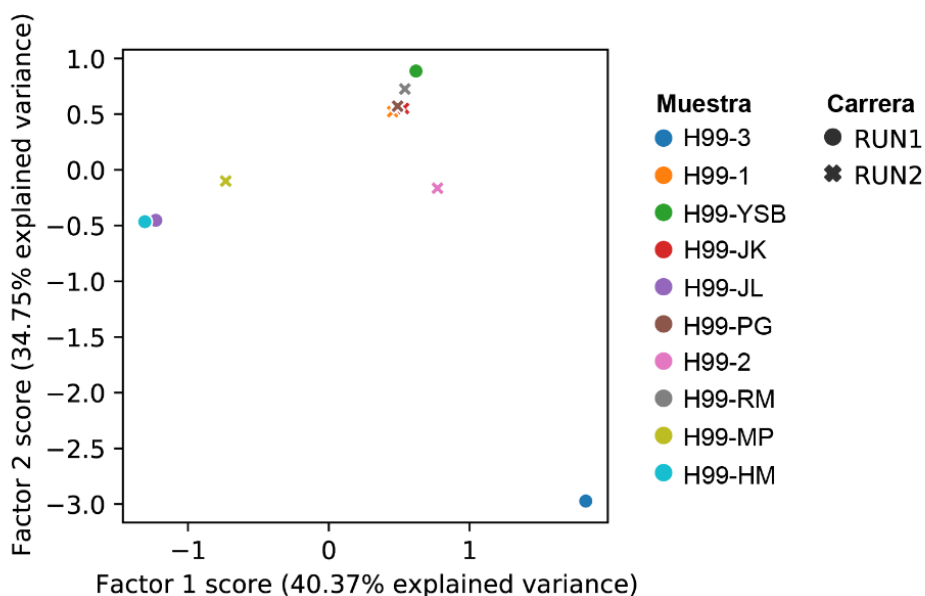


Figura 44. MCA de las 10 variantes H99. Los genomas de las 10 variantes H99 se analizaron mediante secuenciación masiva y los resultados se representaron para determinar la similitud genética de las variantes. Cada variante H99 se representa con un color, y este análisis se llevó a cabo en dos carreras distintas (run1 y run2), representadas con símbolos distintos (círculo y cruz, respectivamente). La variante H99-3 mostró ser la más diferente genéticamente (localizada en la esquina inferior derecha de la gráfica).

A continuación, identificamos las mutaciones que provocaron un cambio en la secuencia de proteínas, sin analizar cambios en intrones o en regiones no codificantes, y las comparamos con la cepa H99 de referencia. Los cambios obtenidos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Mutaciones que generaron cambios en la secuencia de proteínas. Esquema resumen de las mutaciones presentes en el genoma de cada variante H99 que generaron cambios en las proteínas. Los resultados se obtuvieron tras la comparación de cada variante con la cepa de referencia H99.

Gen	Función	H99-1 OZ-1	H99-2 OZ-2	H99-3 OZ-3	H99 YSB	H99 JK	H99 RM	H99 HM	H99 JL	H99 MP	H99 PG
CNAG_01594	Glicina deshidrogenasa										
CNAG_02201	Proteína hipotética										
CNAG_02435	Proteína White Collar 2 Bwc2										
CNAG_03995	Proteína hipotética										
CNAG_04078	Complejo Oligosacariltransferasa subunidad gamma										
CNAG_04139	Proteína hipotética										
CNAG_04684	Proteína transportadora SEC23										
CNAG_04756	Proteína hipotética										
CNAG_05325	Proteína hipotética										
CNAG_05395	Proteína hipotética										
CNAG_06456	Proteína hipotética										
CNAG_06765	Proteína hipotética										
CNAG_07634	Proteína hipotética										

Como se observa en la Tabla 6, todas las variantes H99 analizadas presentaron mutaciones en alguno de sus genes que posteriormente generaron algún cambio en la secuencia de alguna proteína. La variante H99-3 presentó solo una mutación, otras presentaron mutaciones en dos genes (H99-1, H99-2, H99-YSB, H99-JK y H99-RM), y otras en un mayor número de genes (H99-HM, H99-JL, H99-MP y H99-PG). Las variantes H99-1, H99-JK y H99-KN presentaron los mismos genes mutados, y algunas de estas mutaciones fueron también compartidas por alguna otra variante, por ejemplo, H99-2, H99-YSB y H99-PG. Las variantes H99-HM, H99-JL y H99-MP fueron las que mayor número de mutaciones mostraron, presentando similitud entre dichas mutaciones. Las mutaciones específicas encontradas en cada variante se detallan en la Tabla S1 de Material Suplementario.

Hubo algunas mutaciones que aparecieron solo en una variante H99, y de estas, nos llamó la atención la mutación que apareció en el gen *CNAG_02435* o *BWC2*. Este gen solo apareció mutado en H99-3, variante que hasta el momento había mostrado las mayores diferencias genómicas, fenotípicas y de virulencia respecto al resto de H99 estudiadas. Además, al ser esta variante la que mayor capacidad de titanización mostró, este resultado nos sugirió que la mutación del gen *BWC2* podía ser responsable del comportamiento diferencial de esta cepa.

6.1.5.2. Secuenciación del gen *BWC2* en la variante H99-3

Para confirmar los resultados obtenidos en la secuenciación masiva, decidimos, en primer lugar, llevar a cabo la secuenciación del gen *BWC2* en las diferentes variantes de la cepa H99 usando el método clásico de Sanger. Como se observa en la Figura 45 A, en la variante H99-3 se encontró una citosina delecionada en la posición 446 de este gen. Esto generaba un cambio en el marco de lectura de los nucleótidos, formando un triplete de nucleótidos

distinto al original. A partir de esta posición, en la variante H99-3 se formaban 30 aminoácidos distintos a los aminoácidos originales, y en la posición 178 se generaba un codón de parada, obteniéndose una proteína más corta comparada con la obtenida en la H99 de referencia. La proteína silvestre estaba formada por 392 aminoácidos, mientras que la proteína generada en la H99-3 solo poseía 178 residuos (Figura 45 B). Además, el extremo C-terminal de la proteína Bwc2 contenía un dominio de dedos de zinc entre las posiciones 349 y 373 (Yeh *et al.*, 2009), y este dominio estaba ausente en la proteína expresada en la variante H99-3 (Figura 45 B). Los dedos de zinc son un motivo estructural de proteínas que, entre otras funciones, se encargan de la unión al ADN y de la transcripción de genes (Laity *et al.*, 2001; Li and Liu, 2020), por lo tanto, hipotetizamos que la proteína Bwc2 de la variante H99-3 había perdido su capacidad de unión al ADN, y por ello, su función.

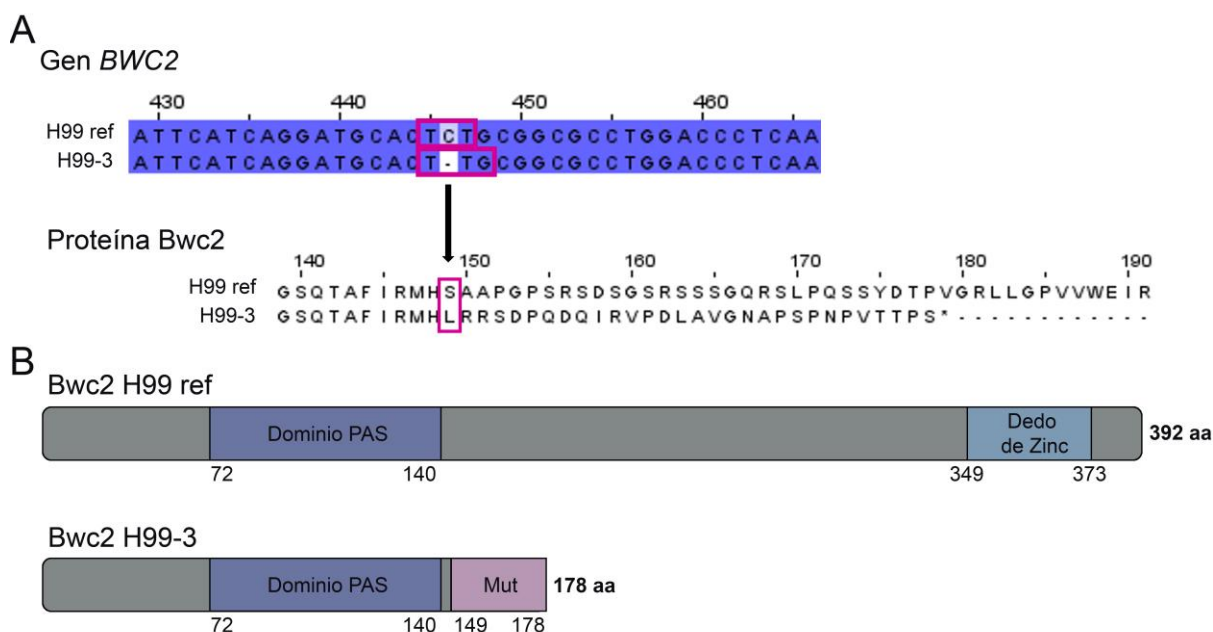


Figura 45. La mutación en el gen *BWC2* de la variante H99-3 genera una proteína truncada. A) El gen *BWC2* de la variante H99-3 posee una delección en la posición 446 que provoca un cambio en el marco de lectura, generando un nuevo aminoácido en la posición 149 de la proteína Bwc2. Se generan 30 aminoácidos nuevos, distintos a los aminoácidos de la cepa H99 de referencia, y en la posición 178 aparece un codon de parada, formándose en la variante H99-3 una proteína de menor tamaño. B) Diagrama que muestra la proteína Bwc2 de la cepa H99 de referencia (arriba) y de la variante H99-3 (abajo). Se muestra el dominio PAS en ambas proteínas, y el dominio de dedos de zinc, ausente en la proteína de la variante H99-3. En la variante H99-3 se muestran los residuos mutados (zona en rosa, Mut). La proteína Bwc2 de la H99 de referencia posee 392 aa, frente a los 178 de la proteína Bwc2 de la variante H99-3. Ref, referencia; aa, aminoácidos.

La proteína Bwc2 es un factor de transcripción que forma el complejo white collar con la proteína Bwc1 (codificada por el gen *CNAG_05181* o *BWC1*) (Lu *et al.*, 2005; Idnurm and Heitman, 2005). Estos genes son homólogos en el hongo ascomiceto *Neurospora crassa* (WC-1 y WC-2) y son los principales genes encargados de la respuesta a la luz (Ballario *et al.*, 1996; Ballario and Macino, 1997). En *C. neoformans* se ha descrito el complejo homólogo Bwc1/Bwc2 (Figura 46), relacionado también con la luz. Este complejo regula procesos de apareamiento, filamentación y virulencia (Lu *et al.*, 2005; Idnurm and Heitman, 2005), y son necesarios ambos genes para que se puedan llevar a cabo dichas funciones (Yeh *et al.*, 2009). Sin embargo, dicho complejo no ha sido previamente relacionado con la formación de células titanes, y debido a los resultados obtenidos en nuestros estudios de morfogénesis y

secuenciación de los genomas, hipotetizamos que podría tener un papel importante en la titanización. Por ello, decidimos llevar a cabo diferentes estrategias para la obtención de mutantes y comprobar la implicación de diferentes genes en la formación de células titanes de *C. neoformans*.

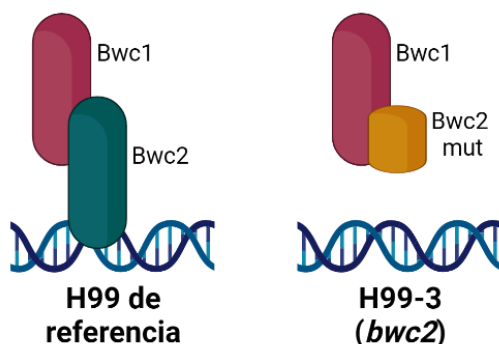


Figura 46. Esquema del complejo white collar (Bwc1/Bwc2). Tanto Bwc1 como Bwc2 contienen dominios PAS por los cuales se da la unión de ambas proteínas. La proteína Bwc2 silvestre contiene la región de dedos de zinc, mediante la cual se da la unión al ADN y la transcripción. La proteína Bwc2 generada en la variante H99-3 es más corta y no posee la región de dedos de zinc, por lo tanto, hipotetizamos que en esta variante no ocurre la unión al ADN y por lo tanto no se lleva a cabo la transcripción. Figura creada con BioRender.com.

6.1.5.3. Implicación del gen *BWC2* en titanización

Para elucidar la implicación del gen *CNAG_02435* o *BWC2* en la formación de células titanes se diseñaron dos estrategias. En la primera se realizó la reinserción del gen *BWC2* en la variante H99-3, que lo tenía mutado. Por el contrario, en la segunda estrategia nos propusimos deletar este gen en una de las variantes H99 que tuviera dicho gen silvestre (cualquiera de las variantes H99 de las que disponíamos salvo la H99-3).

6.1.5.3.1. Reinserción del gen *BWC2* en la variante H99-3

La estrategia para reinserir el gen *BWC2* en el ADN de la variante H99-3 se hizo en distintos pasos, descritos en detalle en el apartado 5.4.4 de Materiales y Métodos. Brevemente, para la obtención del inserto *BWC2* fue necesaria su clonación previa en el vector de clonación pGEM®-T Easy, tras lo cual se obtuvo el inserto *BWC2*, que se volvió a clonar en el plásmido pSDMA57 (Arras *et al.*, 2015), plásmido que contiene el marcador de selección *NEO^R* y que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras. Con la ayuda de este plásmido, el gen *BWC2* se introdujo en el ADN de la variante H99-3 mediante transformación biolística, proceso tras el cual se obtuvieron distintos clones o posibles mutantes (clones 1–25). La comprobación de estos clones se llevó a cabo con oligonucleótidos descritos en el trabajo de Arras y colaboradores (Arras *et al.*, 2015), especificados en la Tabla 5 (UQ2963 y UQ1768; UQ3348 y UQ2962). Se obtuvieron distintos clones positivos (Figura 47) de los cuales se seleccionaron los clones 4, 12, 13, 18, 20 y 21 para llevar a cabo un estudio fenotípico en TCM y comprobar si formaban células titanes.

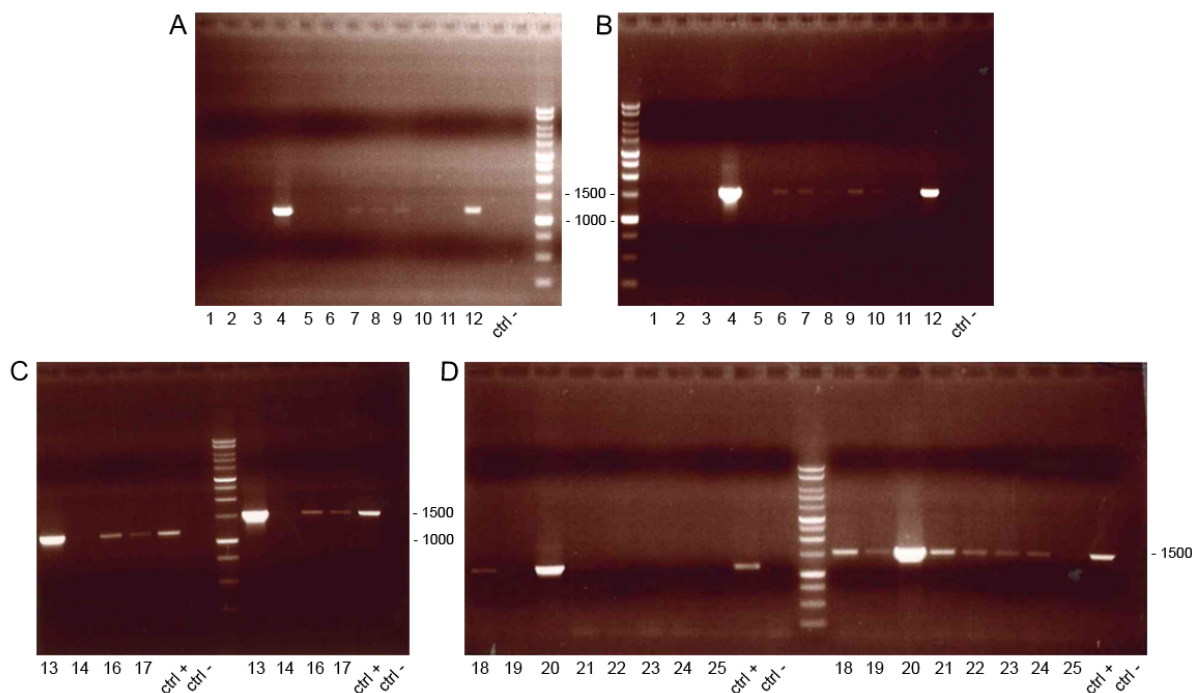


Figura 47. Comprobación de los clones obtenidos tras la reinserción del gen *BWC2* en la variante H99-3. A y B) Comprobación de los clones 1–12 con las parejas de oligonucleótidos UQ2963 y UQ1768 (A); y UQ3348 y UQ2962 (B). C) Comprobación de los clones 13–17 con los oligonucleótidos UQ2963 y UQ1768 (parte izquierda de la imagen) y con los oligonucleótidos UQ3348 y UQ2962 (parte derecha de la imagen). D) Comprobación de los clones 18–25 con los oligonucleótidos UQ2963 y UQ1768 (parte izquierda de la imagen) y con los oligonucleótidos UQ3348 y UQ2962 (parte derecha de la imagen). En todas las imágenes se incluyen controles (control positivo, clon 12 obtenido en la imagen A y B; control negativo, variante H99-3). En todos los casos, la positividad fue mostrada por presencia de banda, generando los oligonucleótidos UQ2963 y UQ1768 una banda de 1.203 pb, y los oligonucleótidos UQ3348 y UQ2962, de 1.514 pb. Se incluyó siempre un marcador del tamaño de 10 kb.

Tras inducir la titanización (Figura 48), se observó gran variabilidad en el fenotipo de estos mutantes. Algunos de estos clones (clones 20 y 21) se comportaron igual que la cepa parental H99-3 ($p > 0,2$; ns), sin embargo, la mayoría mostró diferencias significativas respecto a esta. Los clones más interesantes fueron el 12 y el 18, que mostraron gran diferencia en su capacidad de formar células titanes comparados con la cepa parental H99-3 ($p < 0,0001$). El clon 12 formó una población mayoritaria de células entre 5 y 10 μm , aunque también produjo células con un tamaño de hasta 20 μm . El clon 18 fue el más interesante ya que a pesar de que produjo una pequeña proporción de células con un diámetro de entre 10 y 15 μm , disminuyó drásticamente su capacidad de titanización, generando una población cuyo diámetro se encontró, de media, alrededor de 5 μm , población que fue similar al control de no inducción en medio Sabouraud.

Esta variabilidad en el fenotipo de los distintos clones pudo deberse a que, en esta estrategia, además de añadir la proteína Bwc2 silvestre, la proteína truncada Bwc2 siguió expresándose en los mutantes obtenidos (Figura 49), y desconocemos los efectos que esta última podría estar causando. Por ejemplo, ambas proteínas Bwc2 (la mutada y la no mutada) podrían interactuar con la proteína Bwc1, provocando la gran variabilidad fenotípica obtenida en TCM tras la reinserción. La obtención de estos resultados justificó la realización de otra estrategia.

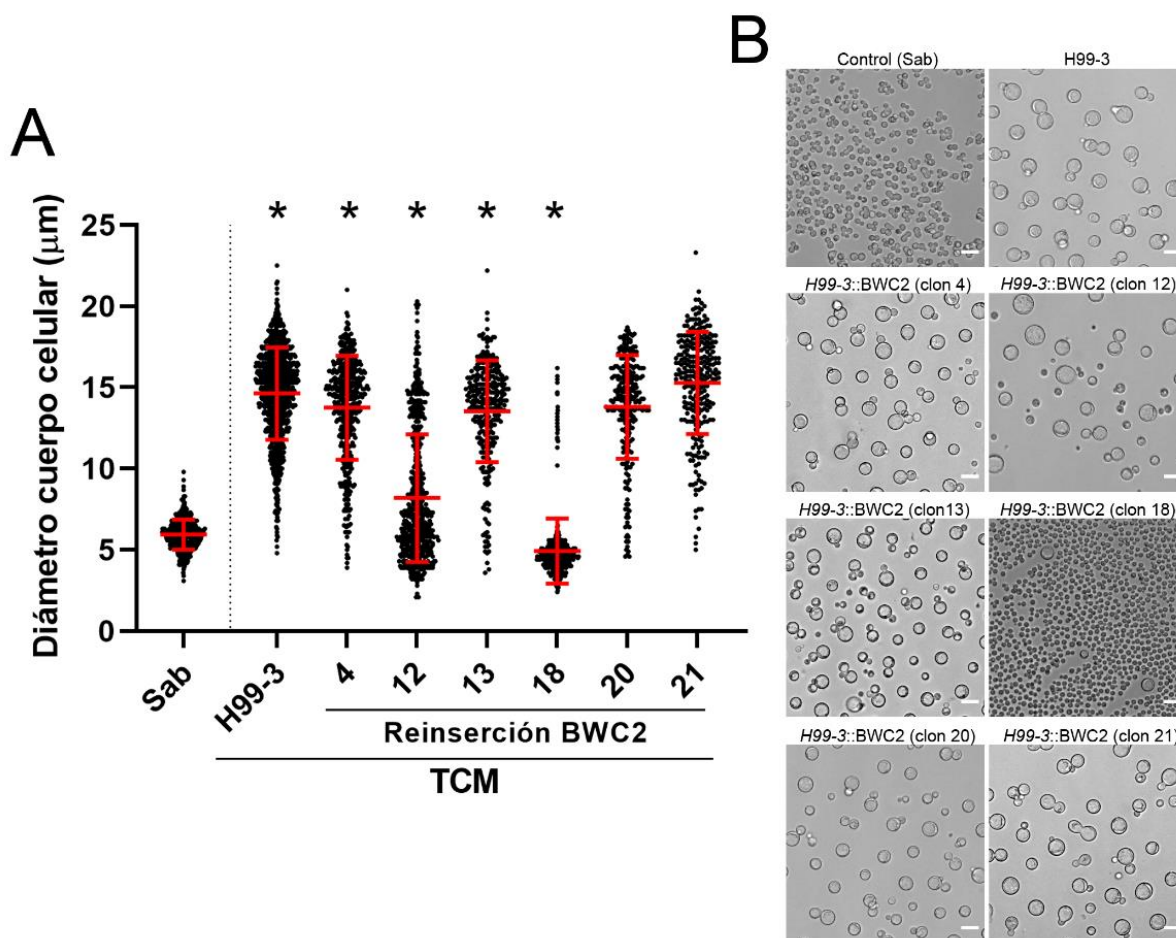


Figura 48. Comprobación fenotípica de la reinsertión del gen *BWC2* en la variante H99-3. Los clones 4, 12, 13, 18, 20 y 21, obtenidos tras la transformación biolística, se indujeron en TCM para estudiar su fenotipo. Se tomaron fotografías en campo claro y se analizó el diámetro del cuerpo celular manualmente. Se midieron un mínimo de 200 levaduras por condición. Se incluyó un control de células incubadas en Sabouraud (células de no inducción). Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las muestras señaladas (*, $p < 0,05$), y todas las cepas fueron estadísticamente diferentes al control Sabouraud ($p < 0,0001$); test Kruskal-Wallis. B) Fotografías en campo claro del cuerpo celular de los distintos clones y su cepa parental H99-3 tras su inducción en TCM. La barra de escala representa 20 µm.

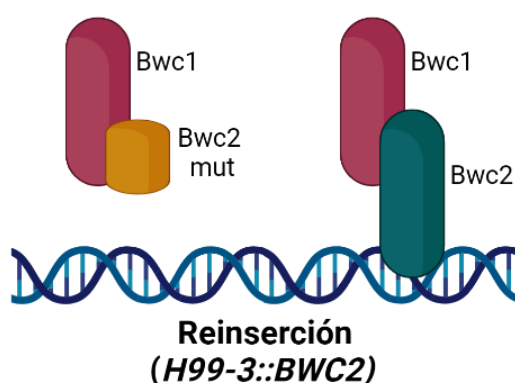


Figura 49. Esquema de los clones transformantes obtenidos. Al llevar a cabo la reinsertión del gen *BWC2* en la variante H99-3 (*H99-3::BWC2*), no se eliminó la proteína truncada (diagrama de la izquierda), pero además, se añadió la proteína Bwc2 silvestre (diagrama de la derecha), presentando los transformantes obtenidos las dos proteínas. La interacción entre ambos complejos white collar pudo explicar el fenotipo variado de los clones en TCM. Figura creada con BioRender.com.

6.1.5.3.2. Delección del gen *BWC2*

En la segunda estrategia decidimos interrumpir el gen *BWC2* en otras variantes H99 que previamente habían mostrado una capacidad intermedia o baja de formar células titanés (Figura 18). Se escogieron las variantes H99-YSB y H99-2, ya que tenían una titanización intermedia y baja, respectivamente. La construcción de interrupción se creó mediante PCR de fusión (Figura 50 A y B), y se introdujo en *C. neoformans* mediante transformación biolística, sustituyendo el gen *BWC2* por el marcador de selección *NAT^R*, procedente del plásmido pPZP-NATcc (Walton *et al.*, 2005), que confirió resistencia a nourseotricina.

6.1.5.3.2.1. Mutante *bwc2* en la variante H99-YSB

En la variante H99-YSB se obtuvo un solo mutante *bwc2* positivo (mutante 234). Se comprobó la correcta integración de este clon con oligonucleótidos que amplificaron una región interna de 400 pb del gen *BWC2* (CNAG_02435_SeqF y CNAG_02435_SeqR) (Figura 50 C). La cepa parental H99-YSB generó una banda del tamaño esperado, sin embargo, el mutante *bwc2* obtenido (mutante 234), al no disponer del gen *BWC2*, no mostró banda. También llevamos a cabo una comprobación con un oligonucleótido externo a la construcción de interrupción (Cn02435+1104_R) y otro correspondiente a una región interna del marcador de selección *NAT^R* (NAT_F) (Figura 50 D). En este caso, la presencia de banda indicó la correcta interrupción, confirmando este clon 234 como mutante *bwc2*.

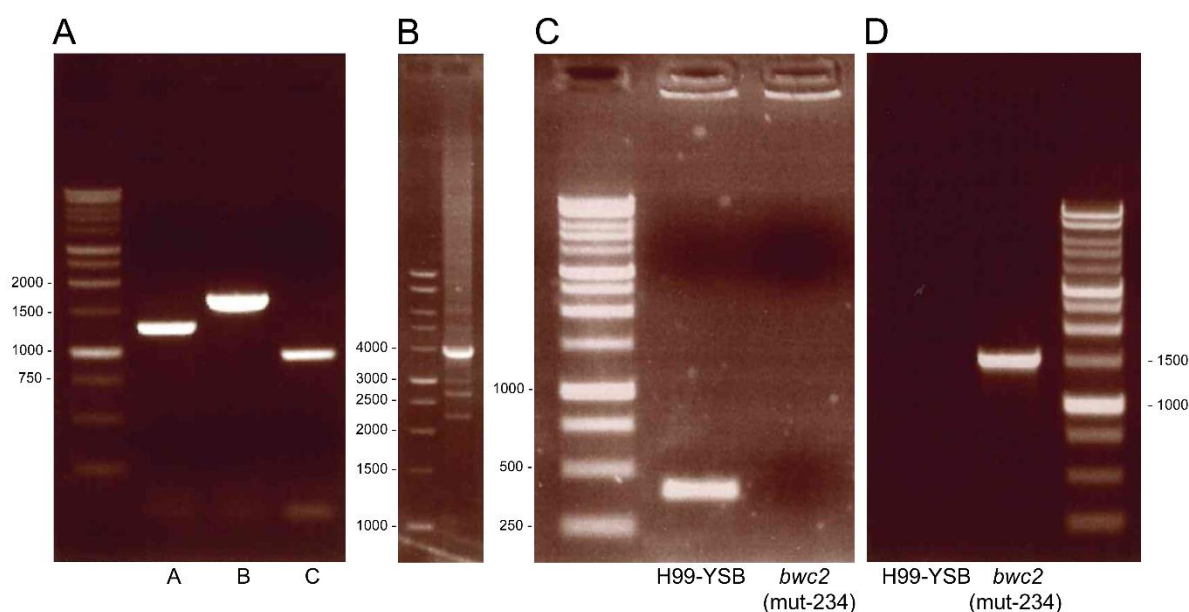


Figura 50. Creación del mutante *bwc2* en la variante H99-YSB. A) Fragmentos obtenidos para la PCR de fusión. Fragmento A, con un tamaño de 1.274 pb (aguas arriba del gen *BWC2*), fragmento B, con un tamaño de 1.634 pb (marcador de selección *NAT^R*, obtenido del plásmido pPZP-NATcc), fragmento C, con 960 pb (aguas abajo del gen *BWC2*). B) Construcción de interrupción obtenida mediante PCR de fusión (tamaño de 3.868 pb). C) Comprobación del clon obtenido con oligonucleótidos internos al gen *BWC2* (CNAG_02435_SeqF y CNAG_02435_SeqR). La ausencia de banda indica la correcta interrupción (*bwc2*, mut-234). D) Comprobación del clon obtenido con un oligonucleótido externo a la construcción de interrupción (Cn02435+1104_R) y un oligonucleótido interno a la región *NAT^R* (NAT_F). La presencia de banda, con tamaño 1.493 pb, indica la correcta interrupción (*bwc2*, mut-234). En ambos casos (C y D) se incluyó la cepa parental (H99-YSB) como control. En todas las imágenes se incluyó un marcador de 10 kb para determinar el tamaño de las bandas.

6.1.5.3.2.2. Mutante *bwc2* en la variante H99-2

En el caso de la variante H99-2, tras obtener la construcción de interrupción (la misma que en el apartado anterior, Figura 51 A y B), se realizó la transformación biolística, y con los clones obtenidos se hicieron distintas PCRs de comprobación. Por un lado, se llevaron a cabo PCRs con oligonucleótidos internos al gen (CNAG_02435_SeqF y CNAG_02435_SeqR), mostrando los clones positivos ausencia de banda (Figura 51 C). Otras PCRs se realizaron con un oligonucleótido externo (Cn02435+1104_R) y un oligonucleótido que se unió al marcador de selección *NAT^R* (NAT_F), teniendo los clones positivos una banda de 1.493 pb (Figura 51 D) y, por último, PCRs con oligonucleótidos externos al gen *BWC2* (Cn02435-1152_F y Cn02435+1104_R), cuyos clones positivos mostraron una banda de 4.238 pb (Figura 51 E). Tras estas comprobaciones se pudo concluir que los clones 9, 12, 13, 29, 36 y 43 fueron positivos y, por tanto, eran mutantes *bwc2*.

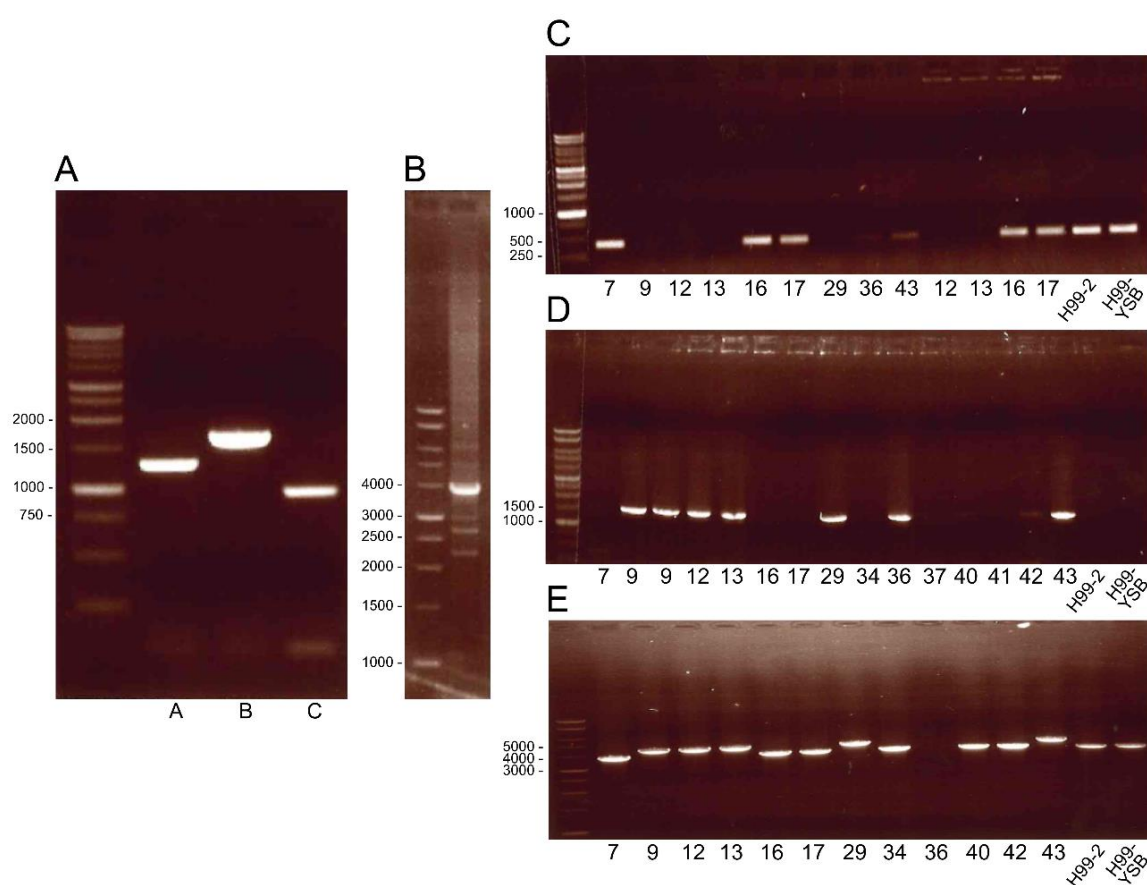


Figura 51. Creación del mutante *bwc2* en la variante H99-2. A) Fragmentos obtenidos para llevar a cabo la PCR de fusión. Fragmento A, con un tamaño de 1.274 pb (aguas arriba del gen *BWC2*), fragmento B, con un tamaño de 1.634 pb (marcador de selección *NAT^R* obtenido del plásmido pPZP-NATcc), fragmento C, de tamaño 960 pb (aguas abajo del gen *BWC2*). B) PCR de fusión de tamaño 3.868 pb. C) Comprobación de clones positivos con oligonucleótidos internos al gen *BWC2* (CNAG_02435_SeqF y CNAG_02435_SeqR). Confirmación de los clones positivos por ausencia de banda. D) Comprobación de clones positivos con un oligonucleótido externo al gen *BWC2* (Cn02435+1104_R) y un oligonucleótido para el marcador de selección *NAT^R* (NAT_F). Positividad mostrada por presencia de banda de 1.493 pb. E) Comprobación de clones positivos con oligonucleótidos externos al gen *BWC2* (Cn02435-1152_F y Cn02435+1104_R). Tamaño de banda de clones positivos, 4.238 pb, y de clones negativos, 3.696 pb. En todas las comprobaciones (C, D y E) se incluyen como control las cepas parentales H99-2 y H99-Y5B. Todas las imágenes llevan un marcador de tamaño de 10 kb.

6.1.5.3.2.3. Fenotipo del mutante *bwc2* en el fondo genético H99

Tras la obtención de distintos mutantes *bwc2* en distintos fondos genéticos H99, se estudió su fenotipo tras su incubación en TCM (Figura 52). El mutante *bwc2* de la variante H99-YSB (mutante 234) aumentó el diámetro de su cuerpo celular de manera similar a la variante H99-3 ($p > 0,9999$; ns). Sin embargo, los mutantes *bwc2* obtenidos en la variante H99-2 (mutantes 9, 12, 13, 29, 36, 43) aumentaron su tamaño al compararlos con su cepa parental H99-2, pero no fueron capaces de alcanzar los tamaños celulares obtenidos con la cepa control de tamaño grande H99-3 o con el mutante *bwc2* obtenido en la variante H99-YSB (mutante 234).

Este resultado, junto con el obtenido en el apartado 6.1.5.3.1 (reinserción del gen *BWC2*), confirmó que el gen *BWC2* estaba relacionado con la formación de células titanes, actuando como un represor de la titanización en *C. neoformans*.

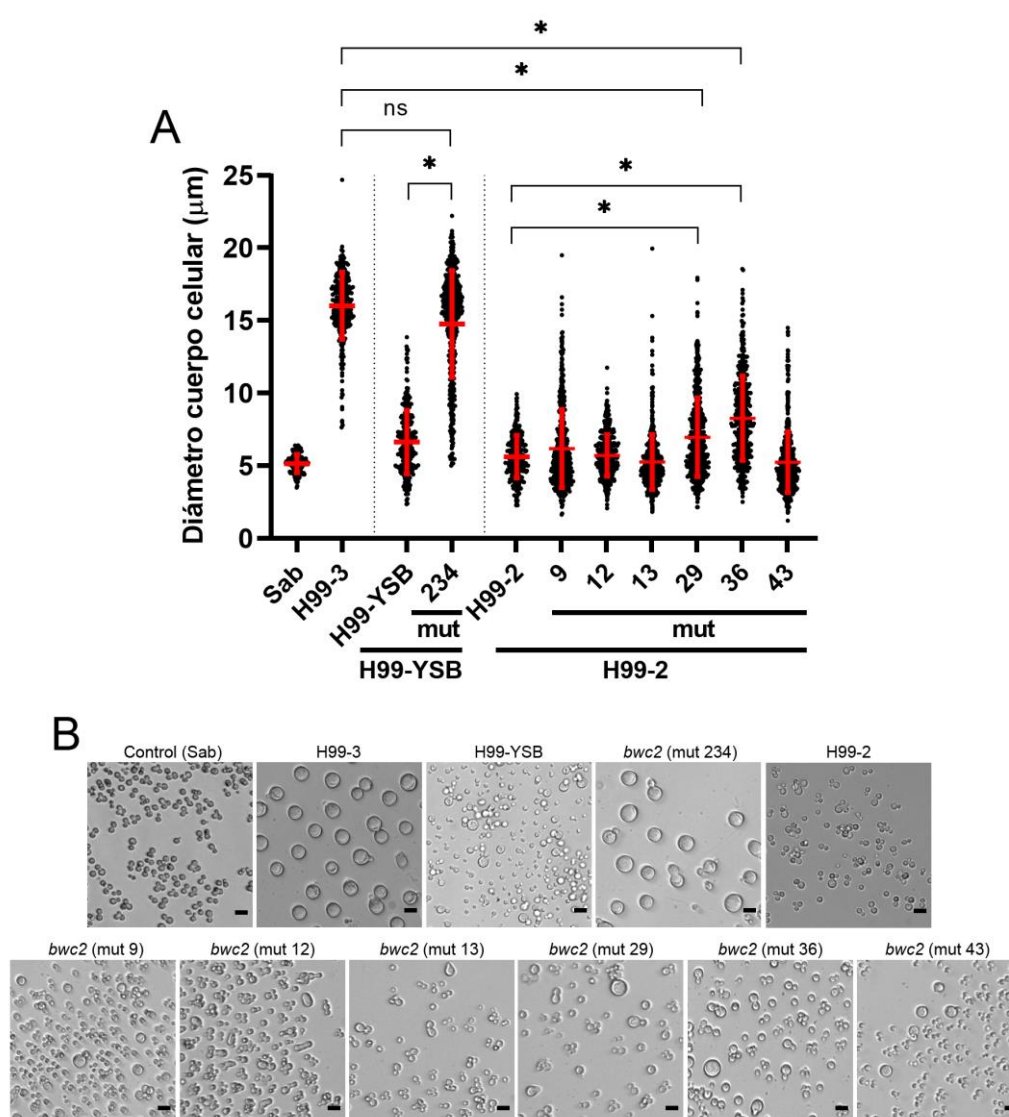


Figura 52. Inducción de células titanes en los mutantes *bwc2*. Las distintas variantes H99 (H99-YSB y H99-2) y sus mutantes *bwc2* se indujeron en TCM. Se añadió un control de tamaño pequeño (levaduras incubadas en Sabouraud) y un control de tamaño grande (H99-3 inducida en TCM). Para su análisis, se tomaron fotografías del cuerpo celular en campo claro. A) Diámetro del cuerpo celular medido manualmente. Se midieron al menos 100 células de cada población. Las barras rojas representan la media y la desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,0001$; test Kruskal-Wallis). B) Fotografías en campo claro de las variantes H99 y sus mutantes *bwc2* incubados en TCM. La barra de escala representa 15 µm.

Además, para asegurar que la introducción de la construcción de interrupción no afectó al crecimiento de los mutantes *bwc2* obtenidos, se estudió su crecimiento en medio Sabouraud líquido durante 48 horas a 30 y 37 °C. Se ensayaron todos los mutantes obtenidos en las dos variantes H99 (resultados no mostrados), pero en la Figura 53 solo se representa uno de cada variante por motivos de claridad de las gráficas. Los mutantes presentaron un crecimiento similar a sus respectivas cepas parentales a cada temperatura.

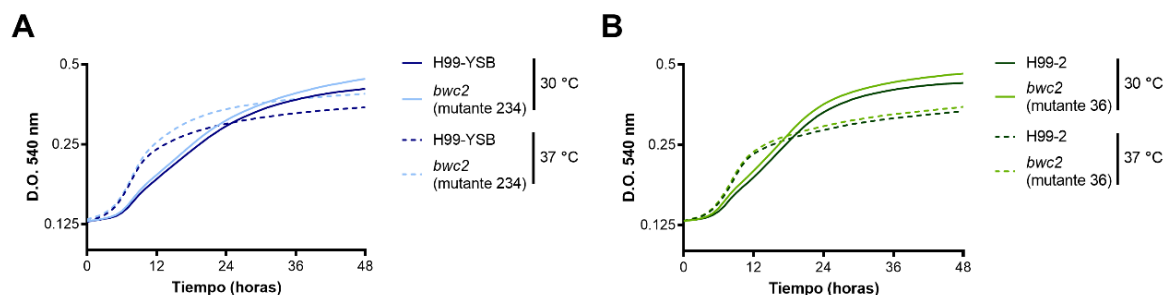


Figura 53. Curva de crecimiento de las variantes H99 y sus mutantes *bwc2*. Crecimiento en medio Sabouraud líquido a 30 y 37 °C con mediciones de absorbancia a 540 nm cada 60 minutos durante 48 horas. Variante H99-YSB (en azul oscuro) y su mutante *bwc2* (mutante 234, en azul claro) (A) y variante H99-2 (en verde oscuro) y su mutante *bwc2* (mutante 36, en verde claro) (B) a 30 °C (línea continua) y 37 °C (línea punteada).

6.1.5.3.2.4. Mutante *bwc2* en el fondo genético KN99

En el repositorio FGSC (McCluskey *et al.*, 2010) existen varias colecciones de mutantes de *C. neoformans* en diferentes fondos genéticos (H99 y KN99, principalmente), los cuales están disponibles para la comunidad científica. Tras revisar la lista de mutantes, comprobamos que tenían disponible el mutante *bwc2* en el fondo genético KN99, por lo que decidimos adquirir este mutante creado de manera independiente y comprobar su fenotipo de titanización en nuestro laboratorio. La cepa KN99 es isogénica a la cepa H99 y se generó mediante cruces para tener aislados de diferente sexo (α y α) idénticos a la cepa H99. Para ello, se creó un mutante en la cepa H99 del gen *CRG1* (*Cryptococcus Regulator of G proteins*) que presentó hipersensibilidad a feromonas, y se cruzó con otra cepa del mismo serotipo pero de sexo opuesto (cepa KN14). De esta manera, en el primer cruce se seleccionó progenie de tipo α con el gen *CRG1* silvestre, y se retrocruzó de nuevo con la cepa original H99 nueve veces más, para obtener finalmente las cepas KN99a y KN99 α (Nielsen *et al.*, 2003).

Como se observa en la Figura 54, se estudió la capacidad de titanización y el crecimiento en medio Sabouraud de estas cepas. Al inducir la formación de células titanes en el mutante *bwc2* del fondo genético KN99 (Figura 54 A y B), se observó que este mutante se comportaba igual que los mutantes obtenidos en nuestro laboratorio mediante transformación biolística, observándose un aumento en la producción de células titanes del mutante *bwc2* respecto a su cepa parental KN99. El cuerpo celular de las células del mutante mostró un diámetro aproximado de 15 μm de media, mientras que el de la cepa parental fue inferior a 10 μm . Por otro lado, su crecimiento en medio Sabouraud fue normal, obteniéndose un crecimiento similar en la cepa mutante y en la parental, y como siempre, mayor crecimiento a 30 °C frente a 37 °C (Figura 54 C).

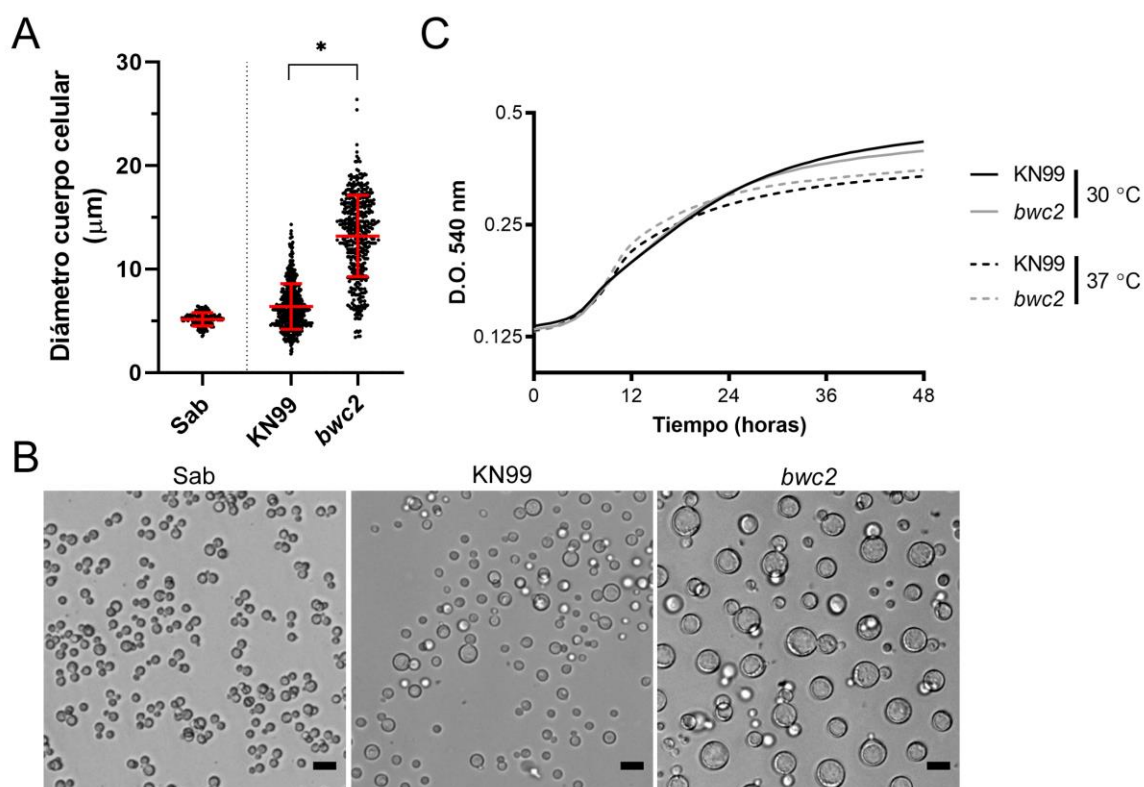


Figura 54. Crecimiento de *C. neoformans* KN99 y su mutante *bwc2*. A) Capacidad de titanización de la cepa parental KN99 y su mutante *bwc2*. Se indujeron las levaduras en TCM y se midió de forma manual el diámetro del cuerpo celular en fotografías de campo claro. Se incluyó un control de no inducción (Sabouraud). Las líneas en rojo marcan la media y la desviación estándar de cada población. El asterisco muestra significancia (*, $p < 0,0001$; test Mann-Whitney); y las dos cepas mostraron diferencias con el control Sab ($p < 0,0001$; test Kruskal-Wallis). B) Fotografías de las cepas en campo claro tras su inducción en TCM. Se incluye un control de no inducción (Sab). La barra de escala corresponde a 15 µm. C) Curvas de crecimiento en Sabouraud líquido durante 48 h a 30 °C (raya continua) y 37 °C (raya discontinua), con la cepa KN99 en color negro y el mutante *bwc2* en color gris.

6.1.5.4. Implicación del gen *CNAG_04756* en titanización

El hecho de que la interrupción del gen *BWC2* tuviera un fenotipo diferente según el fondo genético utilizado (H99-YSB o H99-2, Figura 52) nos hizo pensar que, posiblemente, en alguna de estas variantes había otros genes mutados que podrían estar influyendo en la morfogénesis de *C. neoformans*. En concreto, comprobamos que en la variante H99-2 había otras mutaciones no presentes en las variantes H99-3 o H99-YSB (Tabla 6). Uno de los genes mutados en la variante H99-2 fue el gen *CNAG_04756*, cuya función se desconoce y codifica una proteína hipotética de función desconocida. Esto llevó a plantear si esa mutación podía estar inhibiendo la titanización en la variante H99-2 y provocando que los mutantes *bwc2* obtenidos en esta variante no fueran capaces de recuperar la capacidad de formar células titanes al mutar el gen *BWC2*. Para comprobar esta hipótesis decidimos generar el mutante *cnag_04756* en la cepa H99-3.

6.1.5.4.1. Deleción del gen *CNAG_04756*

Para la obtención del mutante *cnag_04756* se siguió la misma estrategia que para la deleción del gen *BWC2*. Se creó la construcción de interrupción mediante PCR de fusión (Figura 55 A y B) y se realizó la transformación biolística en la variante H99-3. Se obtuvieron tres clones (mutantes 1, 3 y 16) que se comprobaron mediante PCRs con distintas parejas

de oligonucleótidos (Figura 55 C y D). Se llevó a cabo una PCR con un oligonucleótido externo a la construcción de interrupción y con una secuencia interna del marcador de selección *NAT^R*, procedente del plásmido pPZP-NATcc (oligonucleótidos seqCNAG_04756_R con NAT_F, Figura 55 C), y otra con los oligonucleótidos externos seqCNAG_04756_F y seqCNAG_04756_R (Figura 55 D). En ambos casos, los 3 clones obtenidos presentaron la correcta integración de la construcción de interrupción, obteniendo tres mutantes *cnag_04756* de la variante H99-3.

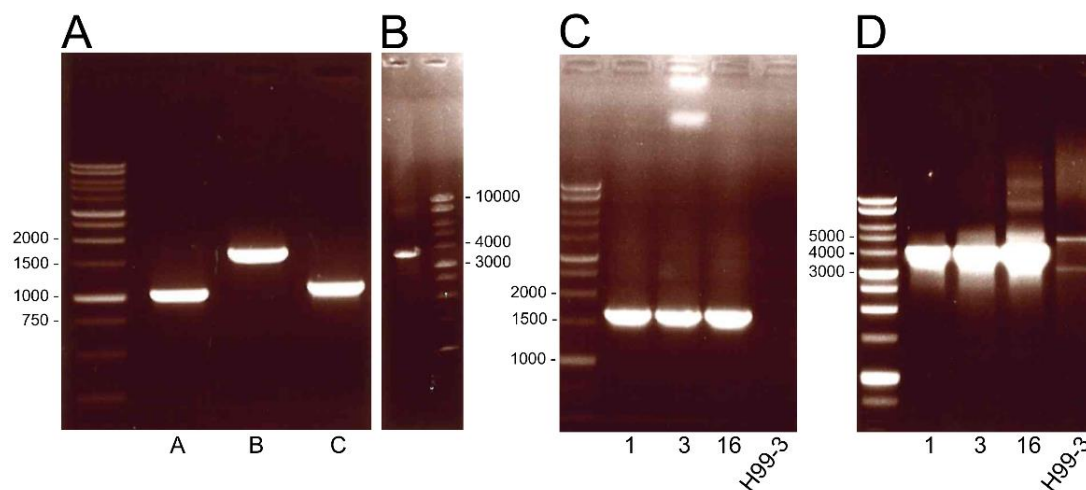


Figura 55. Creación del mutante *cnag_04756* en la variante H99-3. A) Fragmentos creados para la PCR de fusión. Fragmento A, con un tamaño de 1.007 pb (aguas arriba del gen), fragmento B con 1.634 pb (marcador de selección *NAT^R* obtenido a partir del plásmido pPZP-NATcc) y fragmento C, con un tamaño de 1.062 pb (aguas abajo del gen). B) PCR de fusión de tamaño 3.703 pb. C) Comprobación de los clones positivos con el oligonucleótido externo al gen (seqCNAG_04756_R) y el oligonucleótido interno al marcador de selección *NAT^R* (NAT_F). La presencia de banda de 1.608 pb indica clones positivos. D) Comprobación de clones positivos con oligonucleótidos externos al gen *CNAG_04756* (seqCNAG_04756_F y seqCNAG_04756_R). Tamaño de banda de clones positivos, 4.736 pb, y clones negativos, 5.055 pb. En las PCRs de comprobación (C y D) se incluye un control de la cepa parental H99-3. En todas las imágenes se incluye un marcador del tamaño de 10 kb.

Una vez confirmados los mutantes *cnag_04756* mediante distintas PCRs, se estudió su capacidad de titanización. Como se observa en la Figura 56, los tres mutantes mostraron una reducción en la titanización al compararlos con su cepa parental H99-3, presentando un diámetro medio de cuerpo celular de 10 μm , mientras que la cepa parental generó células con un diámetro medio de aproximadamente 15 μm . Esto indicó que el gen *CNAG_04756* también contribuye a la formación de células titanes, pero en este caso actúa como inductor de la titanización.

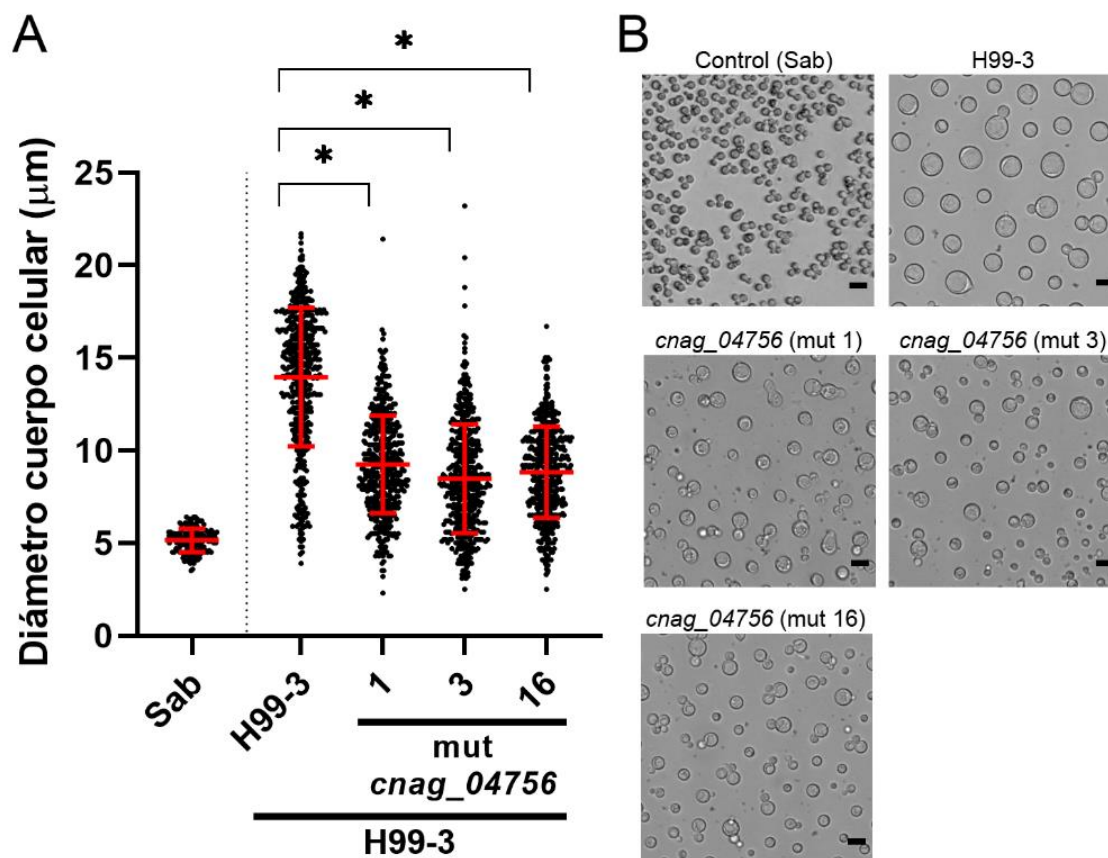


Figura 56. Formación de células titanes en los mutantes *cnag_04756*. La variante H99-3 y los mutantes *cnag_04756* obtenidos tras la transformación biolística se indujeron en TCM. Se añadió un control de tamaño normal (levaduras incubadas en Sabouraud). Se tomaron fotografías del cuerpo celular en campo claro para su análisis. A) Medición manual del diámetro del cuerpo celular. Las barras rojas representan la media y la desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,0001$) y todas las muestras fueron estadísticamente diferentes al control Sab ($p < 0,0001$); test de Kruskal-Wallis. B) Fotografías de las levaduras inducidas en TCM. La barra de escala representa $15 \mu\text{m}$ en todas las imágenes.

Se estudió también si estos mutantes tenían algún defecto de crecimiento en medio Sabouraud. Como se muestra en la Figura 57, no se obtuvieron diferencias entre la cepa silvestre (H99-3) y el mutante (en este caso, el clon 16) ni a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ni a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

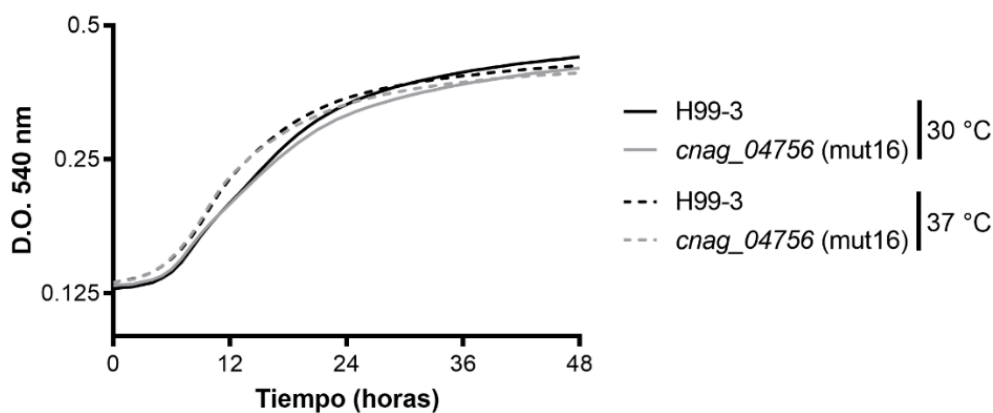
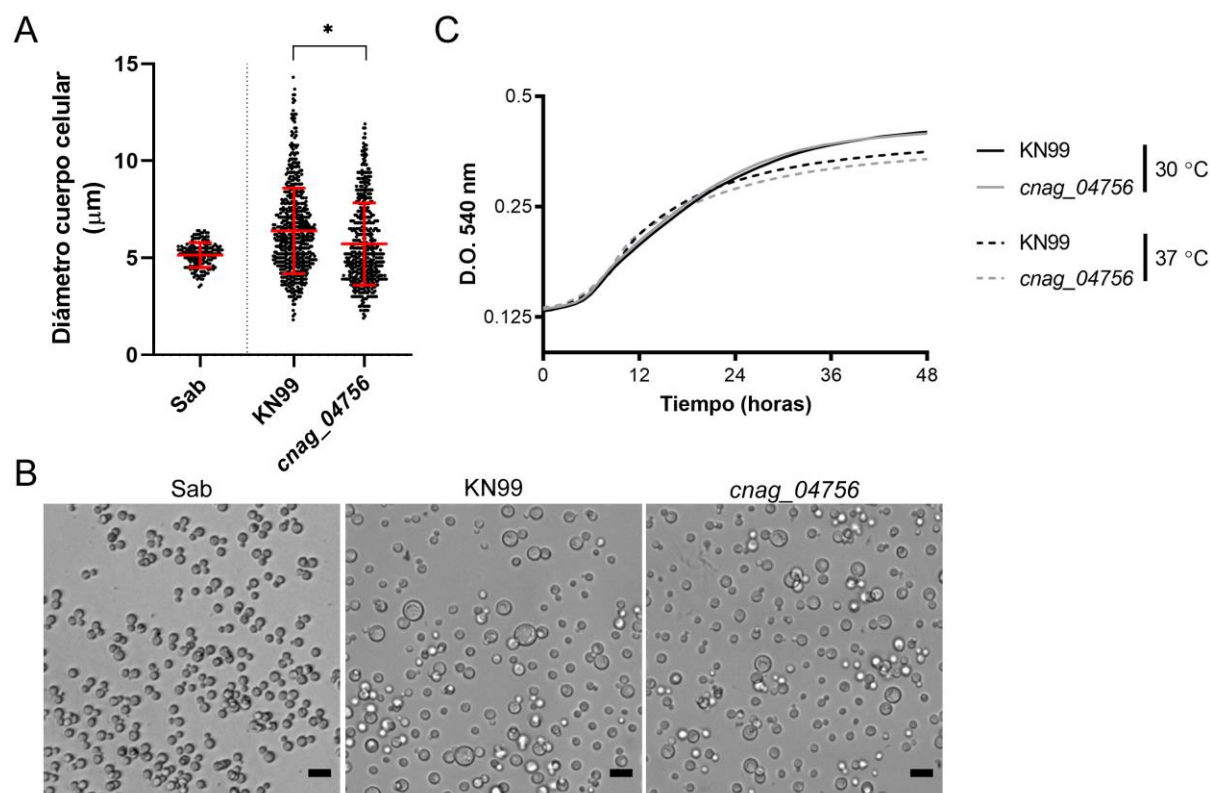


Figura 57. Curva de crecimiento de las levaduras en medio Sabouraud. Las levaduras se incubaron en medio Sabouraud líquido durante 48 h y se midió la densidad óptica a 540 nm cada 60 minutos. Crecimiento a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (línea continua) y a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (línea discontinua). La cepa parental (H99-3) está representada en negro y la cepa mutante *cnag_04756* (mut16) en gris.

6.1.5.4.2. Mutante *cnag_04756* en el fondo genético KN99

Al igual que el mutante *bwc2*, el mutante *cnag_04756* también está disponible en el fondo genético KN99 en una de las colecciones del FGSC, por lo que se adquirió para comprobar su fenotipo. Tras su inducción en TCM (Figura 58 A y B) se observó que el mutante *cnag_04756* disminuyó ligeramente su tamaño respecto a su cepa parental KN99.

Se estudió también el crecimiento en Sabouraud líquido (Figura 58 C), obteniendo un crecimiento ligeramente superior a 30 que a 37 °C, pero la cepa mutante mostró igual crecimiento que la cepa parental a cada temperatura.



6.1.5.5. Implicación del gen *BWC1* en titanización

El hecho de que esté descrito que la proteína Bwc2 forma un complejo con la proteína Bwc1 (*CNAG_05181*) y que ambas son necesarias para regular distintos procesos en *C. neoformans* (Yeh et al., 2009; Verma and Idnurm, 2013) nos hizo plantear la hipótesis de que el gen *BWC1* podía también estar involucrado en la formación de las células titanes.

El mutante *bwc1* se encontraba disponible en la FGSC y lo adquirimos para analizar su fenotipo. Sin embargo, comprobamos que la interrupción de dicho gen no era correcta, por lo

que dicha cepa no se incluyó en los experimentos y decidimos crear el mutante correspondiente en los fondos genéticos H99-YSB y KN99.

Llevamos a cabo la delección del gen *BWC1* siguiendo una estrategia similar a las descritas anteriormente. La construcción de interrupción (Figura 59 A) se introdujo mediante transformación biolística en dos cepas, H99-YSB y KN99, obteniendo mutantes positivos en ambos casos. Se obtuvieron los clones 1 y 8 en el fondo genético de la cepa H99-YSB, y el clon 7 en la cepa KN99, que se comprobaron con distintas PCRs (Figura 59 B, C y D).

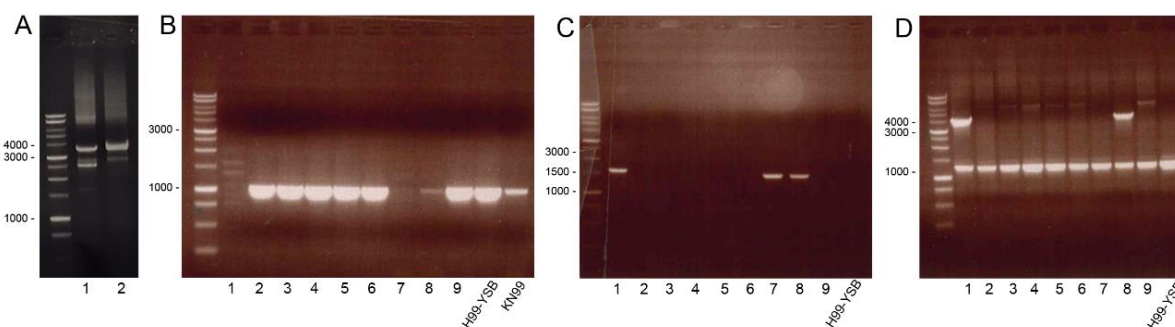


Figura 59. Creación del mutante *bwc1*. Se creó el mutante *bwc1* en las cepas H99-YSB y KN99. A) Construcción de interrupción (3.724 pb) creada mediante PCR de fusión. Carril 1, PCR de fusión realizada con la enzima Phusion HF (no utilizado); carril 2, PCR de fusión con la enzima PrimeStar HS (si utilizada, descrito en Materiales y Métodos). B) Comprobación de clones con oligonucleótidos internos al gen *BWC1* (CNAG_05181_intF1 y CNAG_05181_intR1). Clones positivos indicados por ausencia de banda. C) Comprobación de clones con oligonucleótido CNAG_05181_extR, externo al gen, y oligonucleótido NAT_F, interno en el marcador de selección. Clones positivos indicados por presencia de banda (1.581 pb). D) Comprobación de clones con oligonucleótidos externos al gen *BWC1* (CNAG_05181_extF y CNAG_05181_extR). Los clones positivos muestran una banda de 4.007 pb y los clones negativos, 6.145 pb. En este caso, se amplificó también una banda inespecífica de aproximadamente 1.250 pb en todas las cepas. En todas las comprobaciones se incluyeron controles de las cepas parentales (H99-YSB y/o KN99). En todas las imágenes se incluyó un marcador de tamaño de 10 kb. Los clones 1 y 8 en la cepa parental H99-YSB y el clon 7 en la cepa parental KN99 mostraron ser clones positivos.

Una vez confirmados los mutantes *bwc1* mediante distintas PCRs, se comprobó su fenotipo en TCM (Figura 60). Los tres mutantes obtenidos mostraron significativamente una mayor capacidad de formar células titanes respecto a su cepa parental, lo que permitió concluir que el gen *BWC1* está involucrado en la formación de células titanes, actuando como represor de dicho proceso, igual que lo hace el gen *BWC2*.

Como en los otros mutantes, también se analizó el crecimiento en Sabouraud líquido de los mutantes *bwc1* obtenidos, en este caso solo a 30 °C (Figura 61), obteniendo un crecimiento similar entre la cepa mutante y la cepa parental.

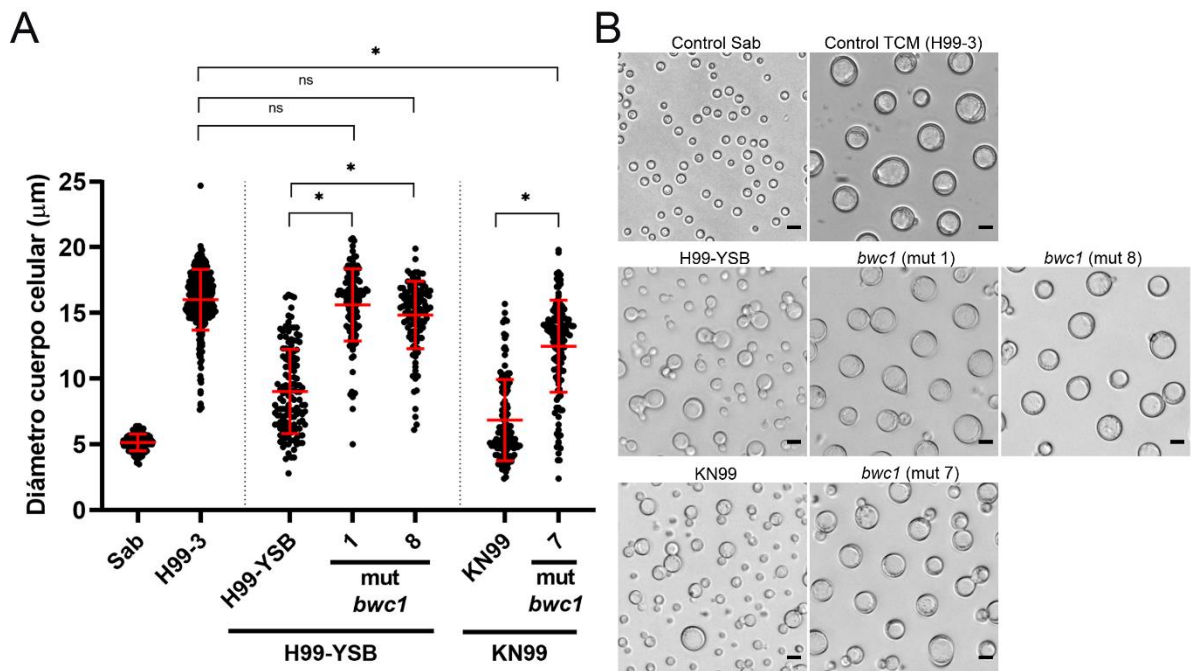


Figura 60. Inducción de células titanes en el mutante *bwc1*. A) Se indujeron las cepas parentales (H99-YSB y KN99) y los mutantes *bwc1* (clon 1 y 8 de la cepa parental H99-YSB, y clon 7, de KN99) en TCM y se comparó su capacidad de titanización midiendo manualmente el diámetro del cuerpo celular. Se incluyó un control de células de tamaño normal, incubadas en Sabouraud (Sab), y un control de tamaño grande (variante H99-3 en TCM). Se midieron al menos 100 levaduras de cada población. Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias entre las muestras (*, $p < 0,0001$) y todas las muestras presentaron diferencias con el control Sab ($p < 0,0001$); test Kruskal-Wallis. B) Fotografías de las cepas en campo claro tras su inducción en TCM. Se incluye un control en Sab. La barra de escala corresponde a 15 μm .

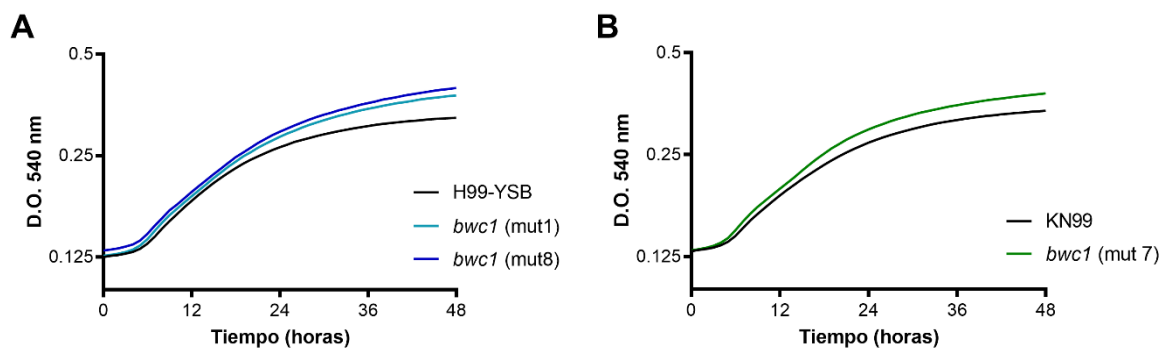


Figura 61. Crecimiento de *C. neoformans* y su mutante *bwc1*. La cepa H99-YSB y sus mutantes *bwc1* (mut 1 y 8) (A) y la cepa KN99 y su mutante *bwc1* (mut 7) (B) se incubaron en Sabouraud líquido durante 48 h a 30 °C con mediciones de absorbancia a 540 nm cada 60 minutos para obtener las curvas de crecimiento. En negro, cepas parentales; en colores, mutantes *bwc1*.

6.1.5.6. Efecto de la luz en la titanización de *C. neoformans*

Como se ha mencionado anteriormente, el complejo Bwc1/Bwc2 de *C. neoformans* forma un factor de transcripción que está involucrado en distintos procesos. Se encarga de responder a la luz, regulando procesos de filamentación y apareamiento (Idnurm and Heitman, 2005; Lu et al., 2005) y, además, genera protección frente a luz ultravioleta (UV) (Verma and Idnurm, 2013). También está involucrado en virulencia, siendo los mutantes *bwc1* y *bwc2* menos virulentos (Idnurm and Heitman, 2005), pero se ha demostrado que este proceso es independiente de la respuesta a la luz (Zhu and Idnurm, 2018).

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral muestran la asociación del complejo Bwc1/Bwc2 con la formación de las células titanes, y quisimos investigar si el fenómeno de titanización también se veía afectado en presencia de una fuente lumínica. Se utilizó luz azul ya que en otros estudios se ha demostrado que el complejo white collar responde a luz azul, y no a luz verde o roja (Idnurm and Heitman, 2005; Lu et al., 2005).

Se incubaron distintas cepas y mutantes *bwc1* y *bwc2* en TCM en presencia y ausencia de luz azul y se determinó el diámetro del cuerpo celular obtenido. Además, se incluyeron levaduras cultivadas en medio Sabouraud como control. Como se observa en la Figura 62, en las cepas inducidas en Sabouraud o en TCM cuyo gen *BWC2* no se encontraba mutado (H99-1, H99-2, H99-YSB, KN99) la luz produjo la formación de células de un tamaño muy homogéneo, siendo el diámetro medio de la población aproximadamente un 15% mayor que el control sin luz. Curiosamente, en estas cepas no encontramos células de un diámetro muy grande, que por el contrario sí aparecieron en las condiciones normales de TCM (ausencia de luz). En cambio, la luz azul inhibió la formación de células titanes en los mutantes *bwc1* y *bwc2*, obteniendo una población con un diámetro medio alrededor de un 30–40% menor que cuando dichas cepas se incubaron en ausencia de luz.

Incluimos también en estos experimentos la cepa B3501 de *C. deneoformans*, que posee alta capacidad de titanización, y se comportó de igual forma que los mutantes, disminuyendo su tamaño en presencia de luz azul. En este caso, la disminución de tamaño fue algo menor que la observada en los mutantes *bwc1* y *bwc2*, siendo las células solo alrededor de un 20% más pequeñas que en oscuridad.

En la Figura 62 B se muestra que en presencia de luz todas las cepas generaron una población de levaduras con tamaños mucho más homogéneos que en oscuridad (control). En la Figura 63 se muestran fotografías en las que se pueden observar los cuerpos celulares de cada cepa en presencia y ausencia de luz.

Por lo tanto, estos resultados mostraron que al inducir la titanización en presencia de luz azul en cepas que poseían los genes *BWC1* y *BWC2* mutados, se obtenía un efecto distinto a aquel observado en las cepas que tenían dichos genes silvestres, pudiendo esto indicar que la luz azul tiene un pequeño efecto inductor sobre la formación de células titanes, para lo cual es necesaria la presencia de los genes *BWC1* y *BWC2* silvestres. Sin embargo, el hecho de que la cepa B3501 mostrara una menor disminución de su diámetro celular en presencia de luz indica que en esta cepa la disminución de tamaño puede ocurrir por razones distintas a la ausencia del complejo Bwc1/Bwc2.

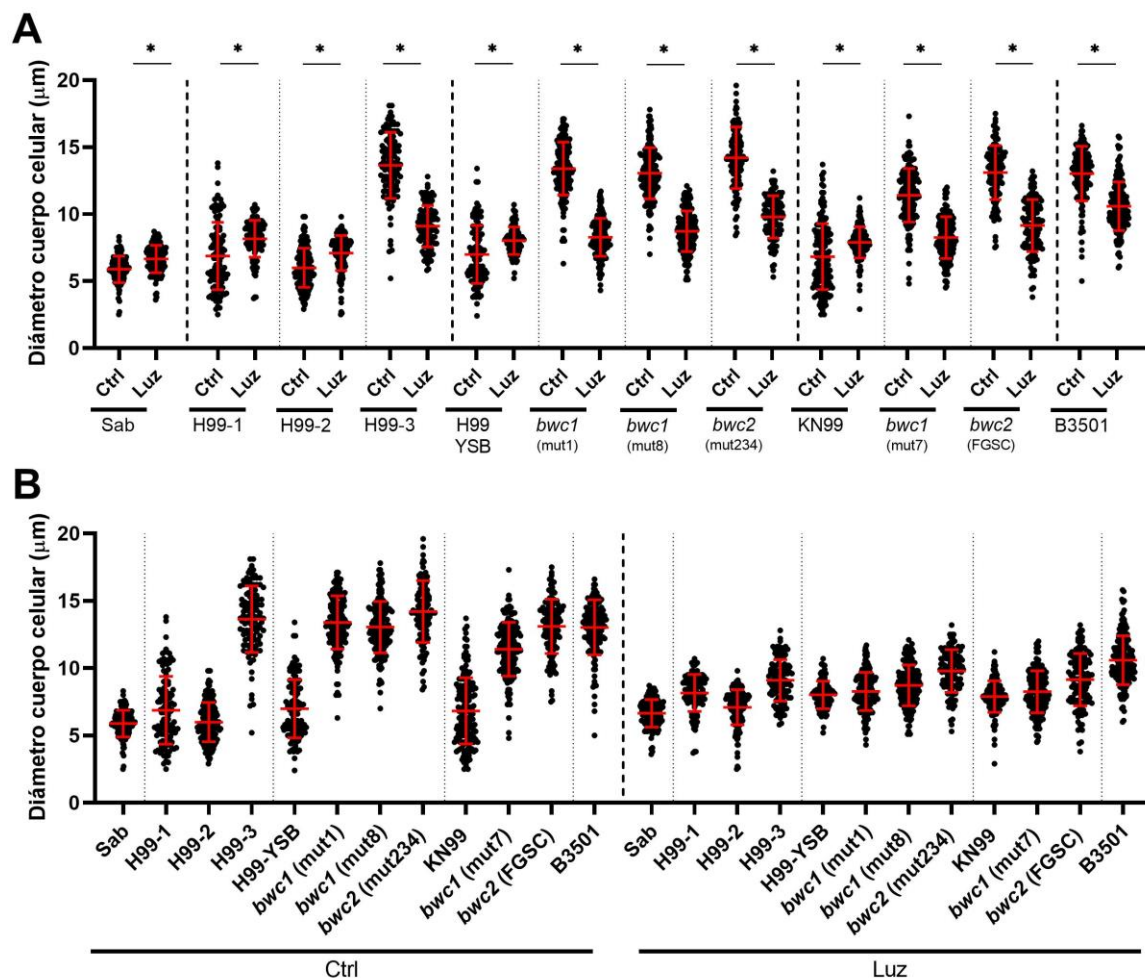


Figura 62. Efecto de la luz azul en la formación de células titanes. Las distintas cepas de *Cryptococcus* spp. y los mutantes *bwc1* y *bwc2* se indujeron en TCM en presencia de una fuente de luz azul (con una intensidad aproximada de 800 luxes). Se añadió siempre un cultivo control con las mismas cepas protegidas de la luz (ctrl) y un control de no inducción en medio Sabouraud (Sab). Se tomaron fotografías en campo claro y se analizaron los diámetros del cuerpo celular manualmente con el programa Fiji. Se midieron al menos 100 células por cada población. Las barras indican la media y la desviación estándar. A) Gráfica en la que se representa cada cepa en condiciones control (ctrl, oscuridad) frente a presencia de luz, para comparar el cambio de tamaño que sufre cada cepa. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las muestras (*, $p < 0,0001$, t-test). B) Gráfica en la que se representan todas las cepas en condiciones control frente a todas las cepas en presencia de luz, para mostrar la homogenización de los tamaños de todas las cepas en presencia de una fuente lumínica.

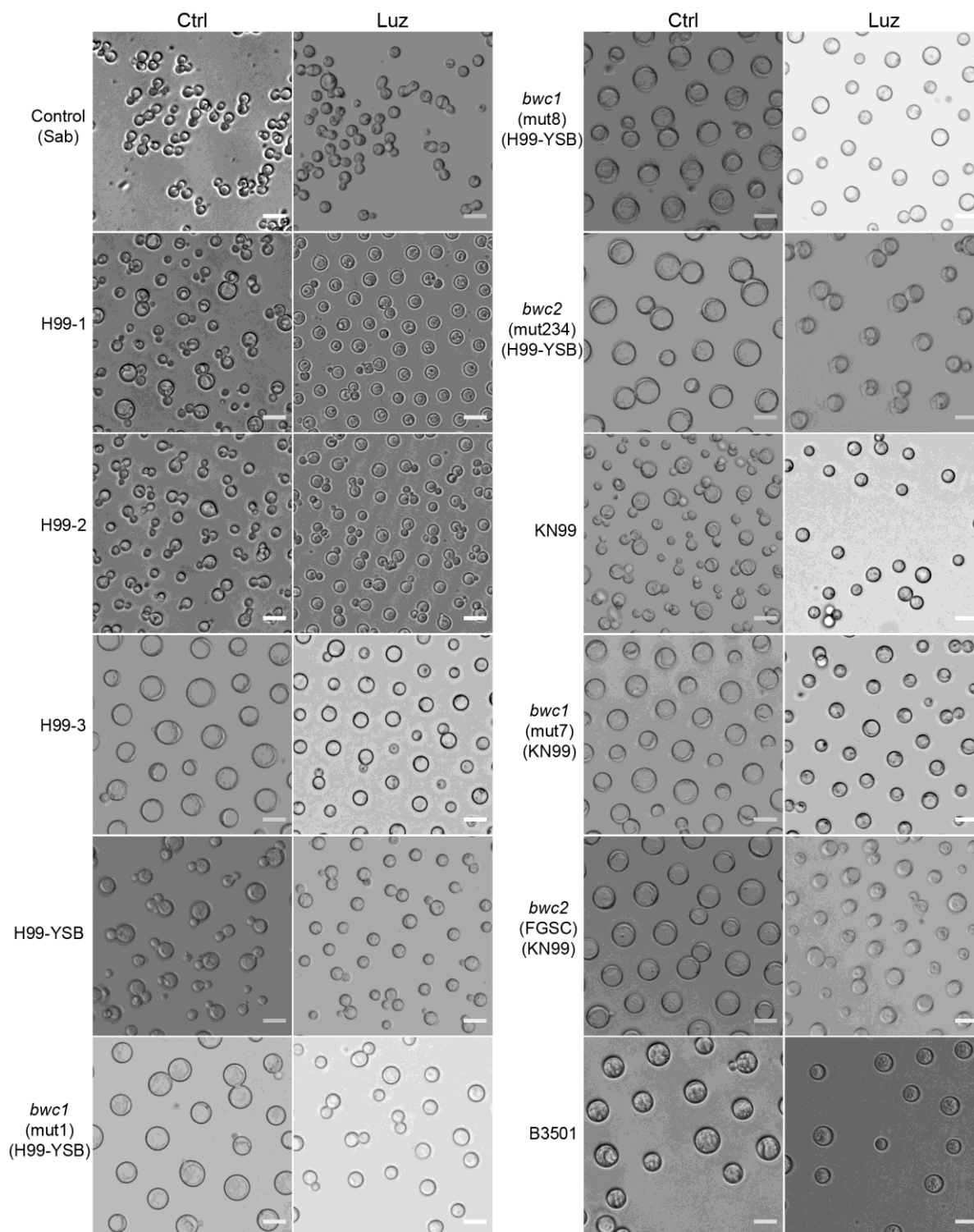


Figura 63. Efecto de la luz en la titanización. Fotografías del cuerpo celular de las distintas cepas de *Cryptococcus* y los mutantes *bwc1* y *bwc2* tras su inducción en TCM en oscuridad (control, ctrl) y en presencia de una fuente de luz azul (con una intensidad aproximada de 800 luxes). Se incluyó un control de no inducción en medio Sabouraud (Sab). La barra de escala representa 15 μ m.

6.1.5.7. Estudio de la expresión génica mediante secuenciación del ARNm

Las diferencias observadas en el fenotipo de las distintas variantes H99 y los mutantes obtenidos nos hicieron plantear la posibilidad de identificar más genes involucrados en la formación de las células titanes. Se llevó a cabo un estudio de la expresión génica durante la formación de estas células mediante técnicas de secuenciación masiva del ARNm (conocido como RNA-seq, debido a sus siglas en inglés).

6.1.5.7.1. Determinación de las condiciones de ensayo

Previo al aislamiento del ARNm se optimizaron las condiciones del experimento. La inducción de células titanes en TCM implica inoculación a una baja concentración celular (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), lo cual es una limitación para obtener un número elevado de levaduras que permitan aislar una cantidad óptima de ARN. Por ello, testamos diferentes inóculos de células en este medio (de 10^4 a $2,5 \times 10^5$ células/mL, resultados no mostrados) y comprobamos que una concentración inicial de 5×10^4 células/mL era la máxima a la cual tenía lugar la formación de células titanes sin observar inhibición por fenómenos de *quorum sensing*. Además, mediante microscopía *in vivo*, se determinaron los tiempos a los cuales se llevaría a cabo el estudio de la expresión génica. Se observó que tras 7 horas de incubación en TCM las células comenzaron a aumentar su tamaño, empezando a formar las células titanes (datos no mostrados), por lo que se decidió comparar las levaduras a tiempo 0 y tras 7 horas de incubación en el medio de titanización.

6.1.5.7.2. RNA-seq

Una vez obtenidas las muestras de las distintas cepas y tiempos en triplicado, se extrajo el ARN utilizando el protocolo de trizol (ver apartado 5.4.10 de Materiales y Métodos), y se llevó a cabo la secuenciación masiva del ARNm mediante la tecnología Illumina, siguiendo las especificaciones descritas por el fabricante. Se realizó el análisis del transcriptoma de las muestras H99-YSB y su mutante *bwc2* (mutante 234) y la cepa KN99 y su mutante *bwc2* (adquirido en el FGSC). Tras el análisis bioinformático, examinamos en primer lugar las lecturas que se alinearon en el gen *BWC2*. Como se puede observar en la Figura S1 de Material Suplementario, en las muestras de las cepas silvestres se obtuvieron múltiples lecturas alineadas en este gen. Además, estas lecturas coincidieron con los exones presentes en este gen, no observándose lecturas en las regiones intrónicas, excepto en el caso del intrón localizado entre los exones 2 y 3, lo cual sugiere que pudiera existir *splicing* alternativo en esta región. En cambio, en ambos mutantes *bwc2*, solo se observó alineamiento de lecturas esporádicas en este gen, posiblemente debido a contaminación residual de ADN genómico en las muestras. Este resultado confirmó la correcta interrupción del gen.

A continuación, se llevó a cabo un análisis cinético para identificar genes que cambiaron su expresión durante la titanización. Todas las cepas mostraron diferencias tanto a tiempo 0 como a tiempo 7 horas y, además, también observamos diferencias de comportamiento entre los dos tiempos. Por ejemplo, el gen que más se sobreexpresó en las dos cepas durante la formación de células titanes fue el gen *CIG1* (resultados no mostrados), el cual ya ha sido descrito en un trabajo anterior de nuestro grupo (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Sin embargo, quisimos centrar nuestro análisis en aquellos genes que específicamente se comportasen de forma distinta durante el tiempo y que además fueran diferentes entre la cepa silvestre y la mutante, descartando así aquellos genes cuyo comportamiento era similar y

cuya regulación, por lo tanto, no dependía de *BWC2*. De esta manera, identificamos una serie de genes cuya magnitud de cambio en expresión fue mayor en las cepas silvestres comparado con los mutantes *bwc2*, y, por el contrario, genes cuya magnitud de cambio fue mayor en las cepas mutantes. El primer grupo de genes correspondería a aquellos que se sobreexpresaron en la cepa silvestre, mientras que el segundo correspondía a los que se sobreexpresaron en la cepa mutante. En el fondo genético de H99-YSB encontramos 13 genes sobreexpresados en la cepa silvestre y 11 genes sobreexpresados en su mutante *bwc2* (Tabla 7). En el fondo genético KN99 identificamos 29 genes sobreexpresados en la cepa silvestre y 25 genes sobreexpresados en su mutante *bwc2* (Tabla 8). Muchos de los genes obtenidos codificaron proteínas hipotéticas y, además, 5 fueron comunes a ambas cepas (señalados en gris en las Tablas 7 y 8), indicando una relación directa de estos genes con el gen *BWC2*. Los genes comunes que más aumentaron la expresión en la cepa silvestre al comparar con la cepa mutante fueron *CNAG_05278* y *CNAG_05279*; y los genes que cambiaron más su expresión en la cepa mutante con respecto a la silvestre fueron *CNAG_04585*, *CNAG_03848* y *CNAG_00165*, siendo el gen *CNAG_04585* el que mayores diferencias mostró en ambas comparaciones (Figura 64).

Tabla 7. Genes obtenidos tras el análisis de H99-YSB y su mutante *bwc2*. Se muestran los genes sobreexpresados o bien en la cepa silvestre o bien en el mutante *bwc2* (mutante 234). En gris se marcan los genes cuyo aumento de expresión coincidió en las cepas parentales H99-YSB y KN99 y en los mutantes *bwc2*.

	Genes	Función	"Fold Change"	p Ajustado
Genes sobreexpresados en la cepa silvestre	<i>CNAG_05278</i>	proteína hipotética	41,4	1,42E-04
	<i>CNAG_05279</i>	proteína hipotética	16,7	1,83E-09
	<i>CNAG_07736</i>	Agn1 (glucano endo-1,3-alfa-glucosidasa)	10,3	1,30E-04
	<i>CNAG_06777</i>	fructosil-aminoácido oxidasa	7,9	1,25E-02
	<i>CNAG_03212</i>	Hcm101 (proteína con dominio "forkhead")	3,6	2,32E-02
	<i>CNAG_03498</i>	metalorreductasa	3,6	2,32E-02
	<i>CNAG_00359</i>	proteína hipotética	3,1	3,88E-02
	<i>CNAG_07449</i>	transportador de aminoácidos	3,1	4,17E-02
	<i>CNAG_07751</i>	MirB (transportador sideróforo de hierro)	2,9	1,90E-02
	<i>CNAG_05901</i>	proteína hipotética	2,6	2,67E-02
	<i>CNAG_01930</i>	endopeptidasa	2,4	1,73E-02
	<i>CNAG_02292</i>	chaperona de cobre	2,1	2,32E-02
	<i>CNAG_01331</i>	proteína hipotética	2,0	1,73E-02
Genes sobreexpresados en <i>bwc2</i>	<i>CNAG_12913</i>	proteína hipotética	0,4	2,32E-02
	<i>CNAG_00165</i>	metiltioadenosina fosforilasa	0,4	2,32E-02
	<i>CNAG_12249</i>	proteína hipotética	0,4	1,73E-02
	<i>CNAG_03848</i>	glutación S-transferasa	0,3	3,06E-02
	<i>CNAG_01742</i>	proteína asociada a aquaporina	0,2	1,57E-05
	<i>CNAG_04016</i>	proteína hipotética	0,2	5,66E-04
	<i>CNAG_04753</i>	gluconolactonasa	0,2	2,32E-02
	<i>CNAG_12822</i>	ARN hipotético	0,2	1,90E-02
	<i>CNAG_07869</i>	proteína hipotética	0,1	1,05E-02
	<i>CNAG_04585</i>	proteína hipotética	0,05	1,60E-47
	<i>CNAG_12255</i>	ARN hipotético	0,02	6,40E-03

Tabla 8. Genes obtenidos tras el análisis de KN99 y su mutante *bwc2*. Se muestran los genes sobreexpresados tanto en la cepa silvestre KN99 como en su mutante *bwc2*. En gris se marcan los genes cuyo aumento de expresión coincidió en las cepas H99-YSB y KN99 y en los mutantes *bwc2*.

	Genes	Función	Fold Change	p Ajustado
Genes sobreexpresados en la cepa silvestre	CNAG_05278	proteína hipotética	248,2	1,19E-22
	CNAG_05279	proteína hipotética	13,7	1,13E-06
	CNAG_05305	proteína hipotética	8,2	8,57E-06
	CNAG_03477	proteína hipotética	7,4	1,97E-05
	CNAG_12363	ARN hipotético	4,4	3,50E-02
	CNAG_06115	fosfatasa ácida	4,4	5,68E-03
	CNAG_00454	proteína hipotética	4,4	3,94E-02
	CNAG_01803	proteína hipotética	4,4	2,82E-02
	CNAG_02561	transportador de espermina	4,1	7,06E-04
	CNAG_05109	proteína que contiene los dominios CBS y PB1	3,9	8,48E-05
	CNAG_06156	proteína hipotética	3,9	6,75E-03
	CNAG_06835	glucosidasa	3,8	9,55E-04
	CNAG_05264	AmyA (alfa-amilasa)	3,6	3,90E-04
	CNAG_05911	proteína hipotética	3,6	1,05E-02
	CNAG_06247	proteína hipotética	3,5	2,07E-02
	CNAG_02424	proteína hipotética	3,5	2,79E-02
	CNAG_04869	carboxilesterasa	3,4	2,53E-03
	CNAG_04183	proteína hipotética	3,1	9,43E-05
	CNAG_02104	SFH5 (proteína de transferencia de fosfatidil inositol)	3,1	1,05E-02
	CNAG_00250	proteína hipotética	3,1	4,53E-02
	CNAG_00487	proteína hipotética	3,0	3,11E-03
	CNAG_00413	protína nuclear	2,9	2,43E-04
	CNAG_01913	proteína hipotética	2,9	1,88E-02
	CNAG_06922	Proteína anon-23da	2,8	1,14E-02
	CNAG_04041	proteína hipotética	2,6	4,53E-02
	CNAG_07520	endopeptidasa	2,5	6,75E-03
	CNAG_06821	componente 4 de la reductasa férrica transmembrana	2,4	3,94E-02
	CNAG_06291	deacetilasa	2,3	1,88E-02
	CNAG_02300	proteína hipotética	2,2	2,98E-03
	Genes sobreexpresados en <i>bwc2</i>	CNAG_07441	proteína hipotética	0,5
CNAG_03003		SFH1 subunidad del complejo de remodelación de la estructura de cromatina	0,5	1,39E-02
CNAG_03555		reductasa de acilglicerona-fosfato	0,4	1,14E-02
CNAG_12392		ARN hipotético	0,4	2,90E-03
CNAG_04669		proteína importadora de la proteína de la matriz mitocondrial	0,4	2,82E-02
CNAG_00165		metiltioadenosina fosforilasa	0,4	2,46E-03
CNAG_05159		proteína hipotética	0,4	1,27E-02
CNAG_05794		ligando mps1	0,4	2,68E-02
CNAG_05812		antiportador potasio:hidrógeno	0,4	3,14E-03
CNAG_06023		proteína hipotética	0,4	2,09E-03

CNAG_05934	proteína hipotética	0,3	1,78E-02
CNAG_06028	proteína hipotética	0,3	4,40E-06
CNAG_03922	proteína hipotética	0,3	1,55E-02
CNAG_05144	anhidrasa carbónica	0,3	5,47E-04
CNAG_02882	proteína hipotética	0,3	1,05E-02
CNAG_03206	endonucleasa III	0,3	1,27E-02
CNAG_03848	glutación S-transferasa	0,3	1,65E-04
CNAG_02910	proteína hipotética	0,3	2,34E-05
CNAG_05340	transportador de monosacárido	0,3	2,02E-02
CNAG_05867	transportador L-fucosa	0,2	1,34E-02
CNAG_03523	miembro 38 de la familia 25 de transportadores de soluto	0,2	1,80E-05
CNAG_07030	proteína hipotética	0,2	3,04E-03
CNAG_06259	transportador MFS, familia SP, simportador general alfa glucósido:hidrógeno	0,2	2,98E-03
CNAG_06918	proteína hipotética	0,1	1,71E-03
CNAG_04585	proteína hipotética	0,1	4,40E-06

Para una mejor comprensión de las diferencias detectadas en nuestro análisis cinético, representamos de manera individual los cambios de expresión en el tiempo de los genes comunes. Como se observa en la Figura 64, los genes *CNAG_05278* y *CNAG_05279* (Figura 64 A y B, respectivamente) aumentaron su expresión considerablemente en las cepas silvestres a las 7 horas, mientras que en las cepas *bwc2* se mantuvieron constantes o solo mostraron un leve incremento de su expresión. Por otro lado, los genes *CNAG_04585*, *CNAG_03848* y *CNAG_00165* (Figura 64 C, D y E, respectivamente) aumentaron significativamente su expresión en la cepa mutante en comparación con el cambio detectado en la cepa parental. De hecho, uno de estos genes (*CNAG_04585*) aumentó su expresión en los mutantes *bwc2*, pero disminuyó su expresión alrededor de cinco veces en las cepas silvestres (Figura 64 C).

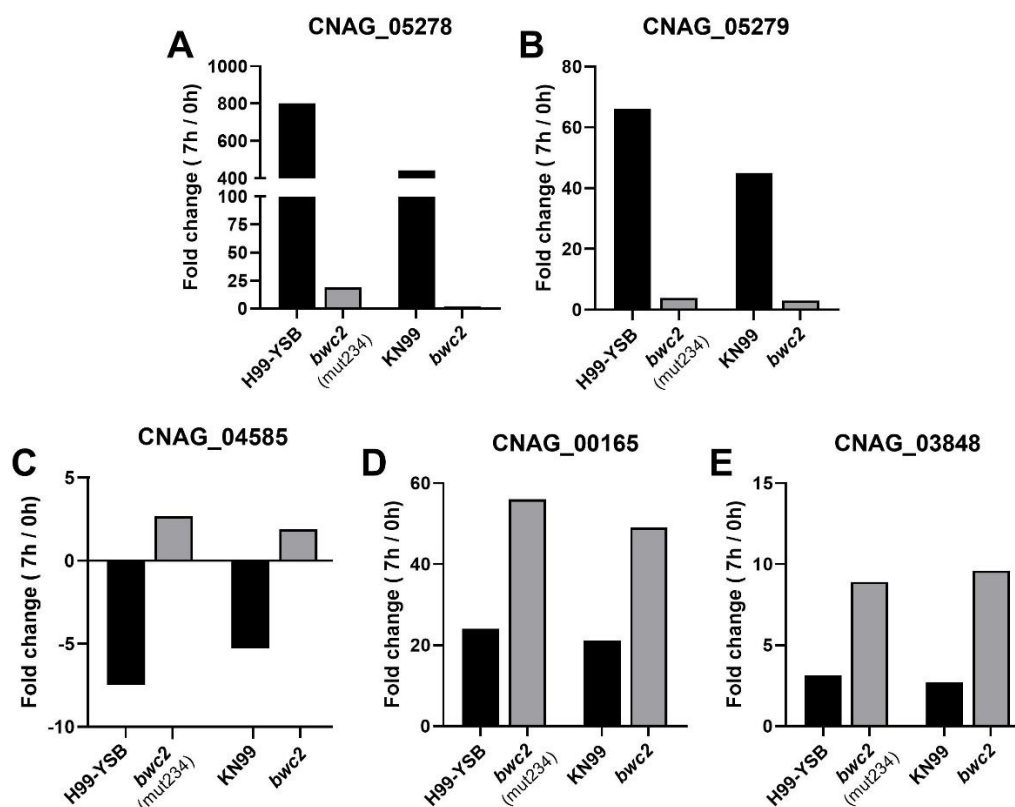


Figura 64. Comparación de la magnitud del cambio (“fold change”) en expresión génica de los genes *CNAG_05278*, *CNAG_05279*, *CNAG_04585*, *CNAG_03848* y *CNAG_00165* entre las cepas silvestres y mutantes *bwc2*. Se indujeron las cepas silvestres H99-YSB y KN99 y sus respectivos mutantes *bwc2* en TCM, y se tomaron muestras a tiempo 0 y 7 h. Tras la realización del RNA-seq, se llevó a cabo el estudio cinético de la expresión génica y se obtuvieron cinco genes comunes que mostraron un comportamiento diferente en la expresión entre las cepas silvestres y mutantes *bwc2*. A y B) Genes sobreexpresados en las cepas silvestres. C, D y E) Genes sobreexpresados en los mutantes *bwc2*.

Por lo tanto, como resumen de esta sección podemos concluir que distintas variantes H99 han sufrido microevolución espontánea, permitiéndonos aprovechar esta característica de los microorganismos en nuestro beneficio para encontrar nuevos mecanismos moleculares implicados en la formación de células titanes. Hemos podido establecer una asociación inversa entre morfogénesis y virulencia, mostrando que la formación de un mayor número de células titanes tiene menor virulencia en un modelo de ratón, posiblemente debido a su imposibilidad para diseminar al cerebro. Además, gracias a esta microevolución, hemos sido capaces de identificar distintos genes que se encuentran involucrados en el desarrollo de las células titanes, encontrando genes represores (*BWC1* y *BWC2*) e inductores (*CNAG_04756*). Mediante el estudio de la expresión génica hemos encontrado otros genes que posiblemente estén también implicados en el proceso de titanización, y cuya regulación está relacionada con el gen *BWC2*, pero dichos genes necesitarán un estudio más detallado en el futuro para poder ser caracterizados. Por último, hemos encontrado una relación entre la formación de células titanes y la luz azul, obteniendo un posible efecto inductor de la luz azul en el proceso de titanización que desaparece cuando el gen *BWC2* está mutado, resultado que también necesitará de un estudio más profundo en el futuro.

6.2. Sección 2: Inhibición farmacológica de las células titanés

La búsqueda de compuestos que proporcionan un fenotipo es un abordaje muy utilizado, puesto que puede aportar mucha información sobre rutas involucradas en distintos procesos. Por ejemplo, la caracterización de los efectos inhibitorios de la rapamicina o del compuesto FK506 permitieron identificar la ruta de las proteínas TOR (“Target of Rapamycin”) o los genes que codifican la β -(1,3)-glucano sintasa, conocidos como FKS (“FK506 Susceptibility”) (Parent *et al.*, 1994; Douglas *et al.*, 1994; Heitman, 2015).

En nuestro caso, se utilizó la colección de compuestos de Prestwick para identificar fármacos que inhibiesen la titanización. Esta colección ha sido muy utilizada en experimentos de reposicionamiento de fármacos tanto en micología como en otras áreas de investigación (Torres *et al.*, 2016; Kanvatirth *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2019; Rossi *et al.*, 2020; Touret *et al.*, 2020), y consta de 1.520 compuestos ya aprobados y de alta seguridad en humanos. Este abordaje ofreció una doble utilidad, por un lado, permitió encontrar nuevas dianas farmacológicas importantes para la titanización, lo que ayudó a identificar nuevos mecanismos de acción involucrados en la formación de las células titanés y, por otro lado, abre camino para, en un futuro, encontrar posibles nuevas terapias basadas en la inhibición de estas células.

Previo al rastreo fenotípico se hizo una estandarización a distintos niveles para crear un protocolo que permitiese la detección de compuestos inhibitorios de la titanización. Se determinó el efecto del DMSO en la formación de las células titanés y se desarrolló un protocolo basado en fluorescencia que permitió medir el tamaño de las células de forma automatizada mediante programas de análisis de imagen.

6.2.1. Efecto del DMSO en *C. neoformans*

Se utilizó la colección química de Prestwick para llevar a cabo la búsqueda de compuestos inhibitorios del proceso de formación de las células titanés. Los compuestos de esta colección se encontraban disueltos en DMSO 100%, por lo que lo primero fue determinar el efecto de este solvente en el crecimiento de *C. neoformans*.

6.2.1.1. Efecto del DMSO durante la titanización de *C. neoformans*

Para poder llevar a cabo el rastreo de los compuestos inhibitorios de la titanización fue necesario determinar si el DMSO causaba algún efecto durante la formación de las células titanés. Para ello, se indujo la titanización en TCM en presencia de distintas concentraciones de DMSO, desde 2% hasta 0,03%, y al comparar con el control de no inducción (Sabouraud), se observó que *C. neoformans* aumentó de tamaño a todas las concentraciones testadas (Figura 65). Sin embargo, concentraciones entre 0,5 y 2% de DMSO provocaron una inhibición significativa del crecimiento celular comparado con el control en medio TCM sin DMSO.

En base a estos resultados, se decidió utilizar una dilución de los compuestos de la colección de Prestwick en la que la concentración final de DMSO fuera 0,25%. Esto supuso realizar una dilución 1/400 de la colección original, por lo que la concentración final de los compuestos en el ensayo fue de 25 μ M.

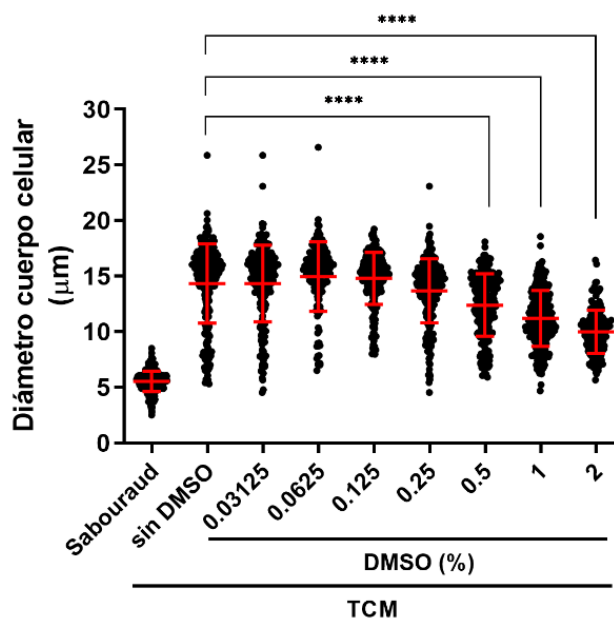


Figura 65. Inducción de células titanes en presencia de DMSO. Las levaduras (H99-3) se incubaron en TCM en presencia de distintas concentraciones de DMSO (2–0,03125%). Se añadió un control de células en medio Sabouraud y un control en TCM, ambos sin DMSO. Se midió manualmente el diámetro del cuerpo celular de al menos 100 levaduras en fotografías tomadas en campo claro. Las barras rojas indican la media y la desviación estándar de cada población. (****, $p < 0,0001$; test de Kruskal-Wallis). El experimento se llevó a cabo en triplicado en días diferentes y se representa una de las réplicas.

6.2.1.2. Crecimiento de *C. neoformans* en presencia de DMSO

También se determinó si el DMSO ejercía algún efecto en el crecimiento de *C. neoformans*. Para ello, se realizó una curva de crecimiento en medio Sabouraud líquido con distintas concentraciones de DMSO, incluyendo una concentración más elevada como control del efecto del DMSO (5%) y un control sin DMSO. Se midió la densidad óptica durante 48 horas a 37 °C, y como se observa en la Figura 66, concentraciones de DMSO iguales o inferiores al 2% no inhibieron el crecimiento de *C. neoformans* de manera significativa.

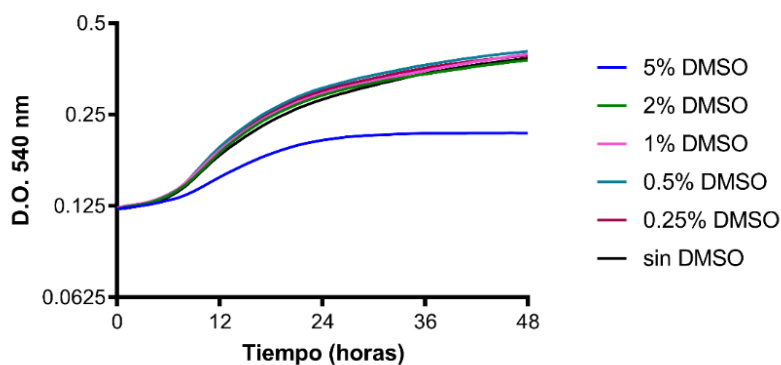


Figura 66. Curva de crecimiento de *C. neoformans* en presencia de DMSO. La variante H99-3 se incubó en medio Sabouraud líquido con distintas concentraciones de DMSO y se midió el crecimiento a 540 nm cada 60 minutos durante 48 h a 37 °C sin agitación. Concentraciones inferiores a 2% de DMSO no ejercieron efecto en el crecimiento de *C. neoformans*, mientras que concentraciones del 5% de DMSO si mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento.

6.2.2. Estandarización del protocolo para el cribado de compuestos

Se quiso desarrollar un ensayo basado en fluorescencia que permitiese la rápida visualización, identificación y medición del diámetro de las levaduras de *C. neoformans*. Las imágenes de fluorescencia pueden analizarse de forma automática más fácilmente que las imágenes en campo claro, por lo que era importante encontrar un reactivo de tinción que permitiese visualizar las levaduras con fluorescencia para poder automatizar el proceso.

Se valoraron distintas opciones para obtener tinciones fluorescentes, como por ejemplo el uso de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos. Esta opción habría dado muy buenos resultados, pero los anticuerpos monoclonales tienen un coste elevado, lo que habría aumentado de forma considerable el coste total del proceso. Otra opción fue utilizar el reactivo de tinción calcofluor white, que se une a la quitina de la pared celular de *C. neoformans* y genera una fluorescencia azul. El problema de este fluorocromo es que su fluorescencia se fotoblanquea muy rápido, complicando la visualización del tamaño de las levaduras. Además, según los niveles de quitina de la pared celular, la fluorescencia generada puede ser muy baja, creando inconsistencia en los resultados. Por ello, se buscó un reactivo que proporcionase una fluorescencia reproducible y con un bajo coste.

6.2.2.1. Lactofucsina como reactivo de visualización

En los laboratorios de micología se usa un reactivo llamado lactofucsina que permite la visualización de las estructuras fúngicas. Se utiliza sobre todo en hongos filamentosos, y se une inespecíficamente a su superficie, permitiendo su visualización con un tono rojizo o rosado en microscopio de campo claro. Además, también proporciona una fluorescencia roja que se puede ver con filtros de rodamina.

Se investigó el uso de este reactivo en *C. neoformans* y se observó que generaba una fluorescencia roja, permitiendo diferenciar el tamaño de células control incubadas en Sabouraud líquido frente a las células titanes inducidas en TCM (Figura 67). Se testaron diferentes concentraciones de lactofucsina (resultados no mostrados) y se observó que a concentraciones próximas a 5 µg/mL las células titanes presentaron una fluorescencia roja brillante que incluía la cápsula. El cuerpo celular y la cápsula también podían identificarse en campo claro ya que el reactivo produjo un cambio en el índice de refracción que permitió visualizar la cápsula sin necesidad de recurrir al método estándar de visualización de esta estructura (tinción con tinta china) (Figura 67 A, panel central).

Se estudió si la tinción con lactofucsina proporcionaba el mismo tamaño celular al comparar con la tinción con tinta china y, como se muestra en la Figura 67 B, el diámetro de las células detectadas mediante fluorescencia con lactofucsina era menor que el diámetro de las células suspendidas en tinta china. Esto podía deberse a un aumento del empaquetamiento capsular, el cual era visible en campo claro (Figura 67 A, panel central). Este fenómeno se observó incluso cuando las células estaban suspendidas solo en ácido láctico, el solvente de la fucsina ácida (resultados no mostrados). A pesar de estas diferencias en tamaño, la tinción con lactofucsina permitió distinguir las células titanes frente a las células control, mucho más pequeñas, por lo que se decidió utilizar este colorante fluorescente como reactivo de tinción para llevar a cabo una estrategia de análisis de imagen que proporcionara el tamaño de las levaduras de forma automática.

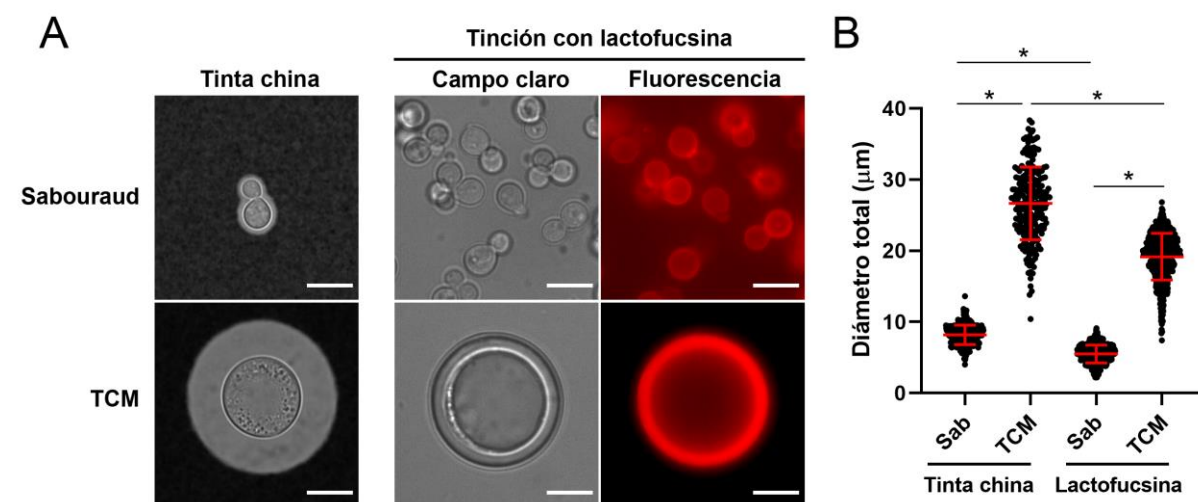


Figura 67. Tamaño de *C. neoformans* con distintos protocolos de visualización. A) Morfología de las levaduras incubadas en medio no inductor (Sabouraud, panel superior) y en medio inductor de la titanización (TCM, panel inferior), con tinta china (panel izquierdo) y lactofucsina (panel derecho). La barra de escala representa 10 µm. B) Diferencias de tamaño tras la suspensión de las levaduras en tinta china o lactofucsina, visualizadas en campo claro y fluorescencia, respectivamente. Se midió manualmente el diámetro total de las células, incluyendo la cápsula. Las líneas rojas marcan la media y la desviación estándar de cada población. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,0001$; t-test).

6.2.2.2. Rastreo fenotípico de los compuestos de la colección de Prestwick

Se llevó a cabo el cribado de la colección de Prestwick a una dilución 1/400 de las placas iniciales (concentración final de 25 µM con 0,25% de DMSO). Para la preparación de las placas se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.8.2 de Materiales y Métodos, y las placas se inocularon con 10^4 células/mL de levaduras en TCM y se incubaron 18 h a 37 °C y 5% CO₂. Se observaron bajo el microscopio en campo claro para una rápida comprobación de la inhibición del crecimiento, donde se hizo una primera identificación de compuestos que causaron efecto en la titanización de *C. neoformans*. A continuación, se añadió lactofucsina para teñir las levaduras, y las placas se analizaron mediante un microscopio automatizado Cytell, donde se tomaron fotografías de fluorescencia con el filtro de rodamina (fluorescencia roja). Tras la adquisición de las imágenes, se midió el tamaño de las células de dos maneras distintas: 1) usando las opciones de análisis de imagen del propio microscopio Cytell, utilizando una de las aplicaciones biológicas preinstaladas (“BioApps”) (cuyos resultados se muestran en la Figura S2 de Material Suplementario) y 2) con una estrategia de análisis de imagen basada en los programas Fiji y Excel (ver Materiales y Métodos). En total, se midieron alrededor de 250–500 células por cada pocillo.

6.2.3. Identificación y categorización de los compuestos

Con las macros diseñadas en los programas Fiji y Excel se procedió a la identificación de las levaduras y a la medición de su tamaño de forma automatizada. Se obtuvo la media del diámetro de todas las células medidas en presencia de cada compuesto, y en función de esta medida, se clasificaron los compuestos en dos grupos: 1) compuestos que generaron células con un tamaño celular inferior o igual a 10 µm, y 2) compuestos que provocaron la formación de células con un diámetro mayor de 10 e inferior o igual a 15 µm. Siguiendo esta clasificación se identificaron 99 compuestos, entre los cuales se encontraron antifúngicos conocidos como

anfotericina B, voriconazol, itraconazol, fluconazol, nistatina y terbinafina. También se identificaron algunos compuestos que ya habían mostrado actividad inhibitoria frente a *C. neoformans* en cribados realizados previamente con la misma colección de compuestos (Butts *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2020). Todos estos compuestos se descartaron, obteniendo finalmente 61 compuestos potencialmente interesantes como inhibidores de la formación de las células titanicas (ver Tabla S2 de Material Suplementario para la lista completa). Como se puede observar en la Figura 68, los compuestos pertenecían a diferentes clases terapéuticas, incluyendo antimicrobianos, compuestos para endocrinología, metabolismo, sistema nervioso central, dermatología, alergología, oncología y reumatología, entre otros.

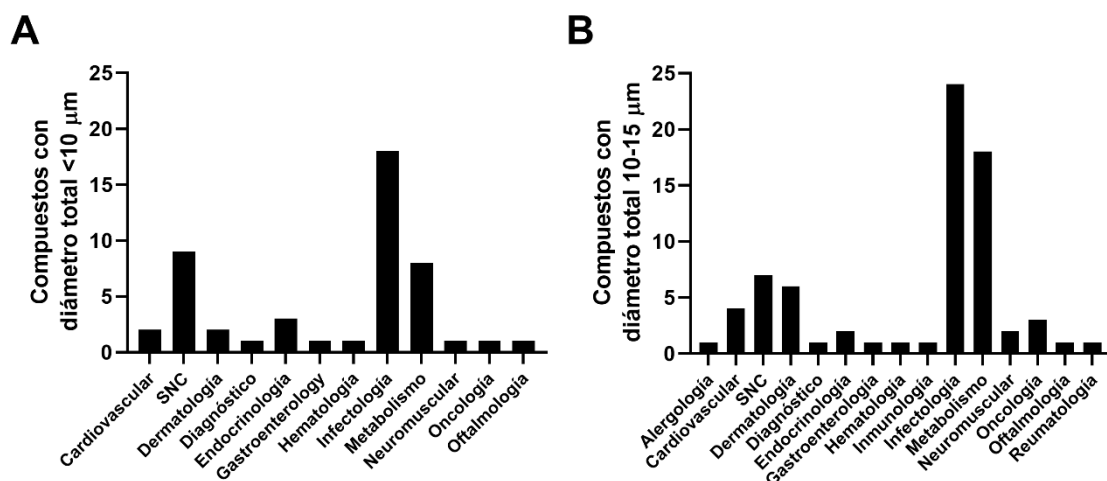


Figura 68. Clases terapéuticas a las que pertenecen los compuestos obtenidos tras el cribado de fármacos. Tras la incubación en TCM y el análisis de los resultados, los compuestos se organizaron en dos grupos según la media del tamaño celular de las levaduras tras su incubación en presencia de dichos compuestos. Compuestos que generaron levaduras con un tamaño total inferior a 10 µm (A), y entre 10–15 µm (B). En ambos casos, las áreas de infectología y metabolismo fueron las más repetidas.

6.2.4. Selección de compuestos

De los 61 compuestos identificados, se seleccionaron 10 basándose en los tamaños de las levaduras que generaron tras su inducción en TCM (especificados en la Tabla S2 de Material Suplementario) y en su mecanismo de acción (descrito en detalle en el apartado 7.4 de Discusión). Nos llamó la atención que un número elevado de los compuestos obtenidos tenían propiedades antioxidantes o ejercían un efecto en la mitocondria. Por ello, los compuestos seleccionados fueron los siguientes: isotretinoína, ácido retinoico, mitoxantrona, pentamidina, alexidina, clioquinol, metirapona, sertralina, ebselen y antimicina A. La metirapona, isotretinoína, ácido retinoico y antimicina A causaron una inhibición intermedia, como se observa en la Figura 69. El resto de los compuestos, es decir la alexidina, pentamidina, ebselen, mitoxantrona, sertralina y clioquinol, generaron levaduras de un tamaño más pequeño, algunos incluso inferior al control de no inducción (Sabouraud).

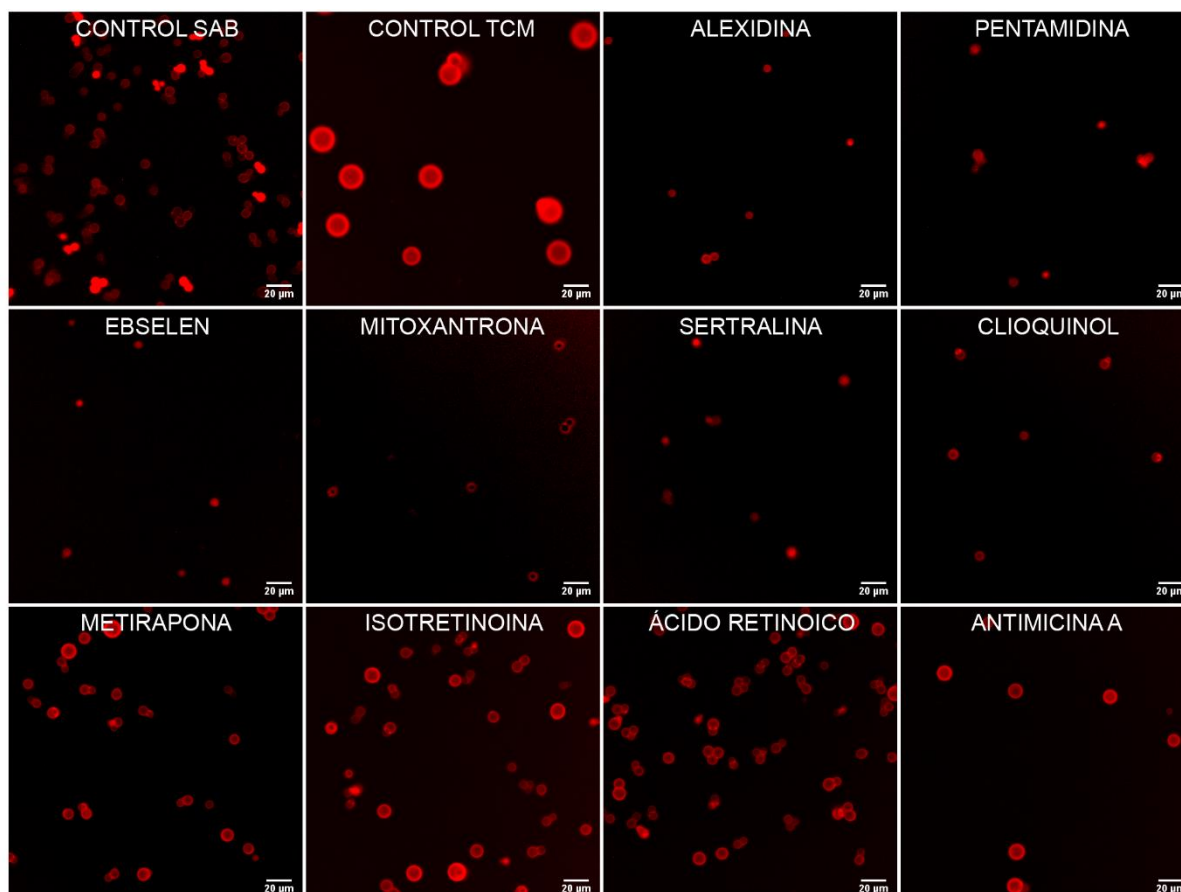


Figura 69. Levaduras teñidas con lactofucsina tras su incubación en presencia de los compuestos seleccionados. Las levaduras se indujeron en TCM en presencia de los distintos compuestos y posteriormente se tiñeron con lactofucsina para su visualización. Se observaron los distintos tamaños de las levaduras con una fluorescencia roja. Se incluyó el control de no inducción en Sabouraud (Sab) y el control de inducción en TCM. La barra de escala representa 20 µm.

6.2.5. Confirmación de compuestos

Para confirmar el efecto inhibitorio de los compuestos seleccionados se realizaron curvas de crecimiento en TCM con distintas concentraciones de dichos compuestos, partiendo de 100 µM hasta 0,1 µM, y realizando diluciones $\frac{1}{2}$ con una concentración constante de 0,25% de DMSO (Figura 70). Se confirmó que todos los fármacos seleccionados inhibían la formación de células titanicas. Casi todos mostraron una inhibición lineal entre 6 y 100 µM. Metirapona, isotretinoína, ácido retinoico y antimicina A mostraron un perfil de inhibición más gradual comparado con el resto de los compuestos seleccionados, generando células con un diámetro alrededor de 10 µm a concentraciones altas (100–25 µM). A estas concentraciones, pentamidina, ebselen, sertralina y clioquinol mostraron una mayor inhibición de la titanización, formando células con un diámetro celular inferior a 10 µm. Estos cuatro compuestos presentaron un perfil similar. En el caso de la mitoxantrona, concentraciones de entre 100 y 6 µM inhibieron completamente la titanización. La alexidina fue el compuesto que mostró un mayor efecto, inhibiendo la formación de las células titanicas incluso a concentraciones inferiores a 1 µM.

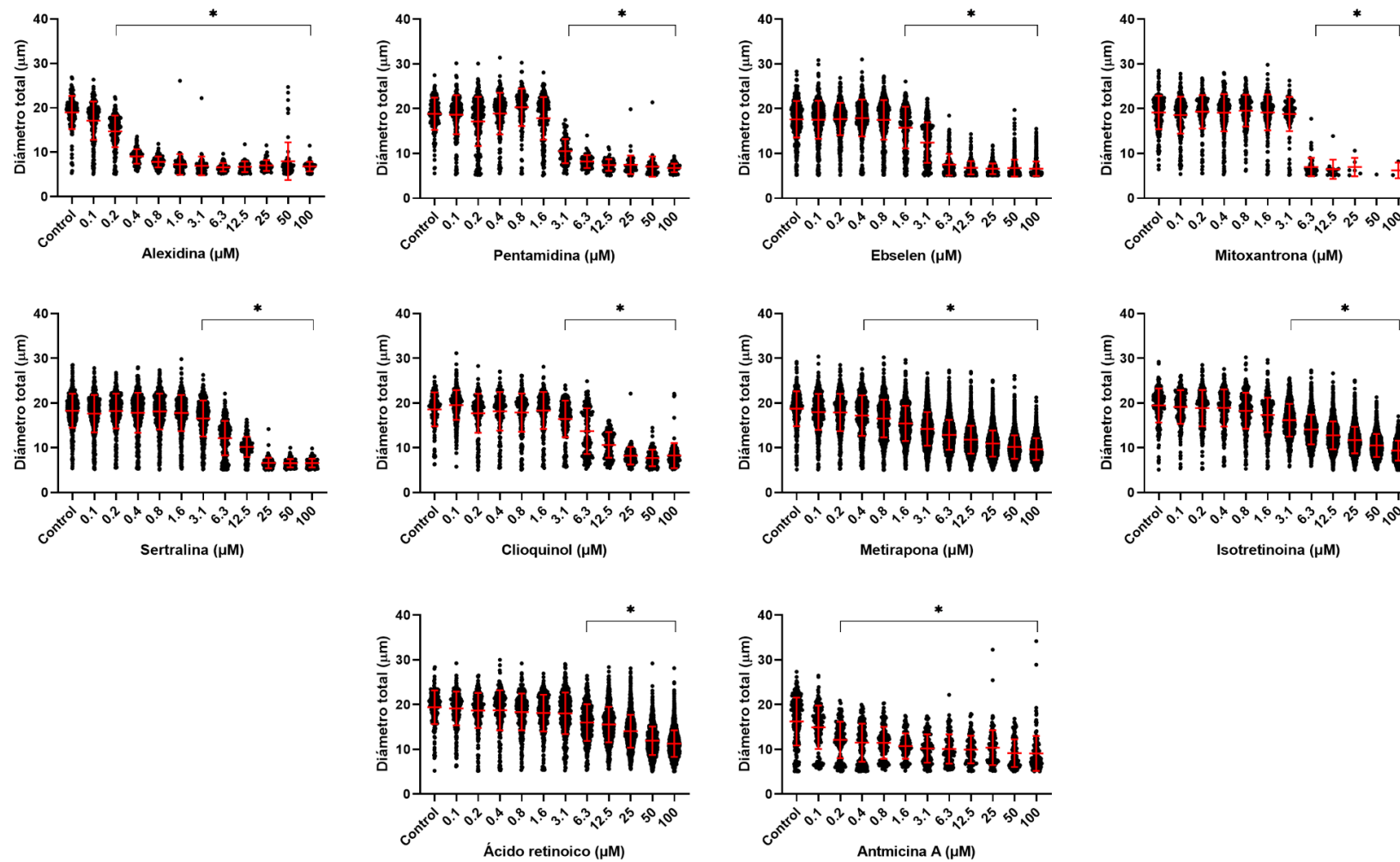


Figura 70. Tamaño de las levaduras de *C. neoformans* en presencia de distintas concentraciones de los compuestos seleccionados. Se indujo la titanización en presencia de distintas concentraciones de cada compuesto, añadiendo un control sin compuesto en todos los experimentos. Las levaduras se tiñeron con lactofucsina, se tomaron imágenes con el microscopio Cytell y se midieron los diámetros totales de las levaduras en el programa Fiji con ayuda de la macro diseñada (apartado 5.10.1.1 de Materiales y Métodos). Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar de la población. El experimento se realizó en duplicado en días diferentes. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,05$; test Kruskal-Wallis).

6.2.6. Efecto de los compuestos en la viabilidad de *C. neoformans*

Para descartar que el efecto inhibitorio observado en presencia de cada compuesto se debiese a un efecto fungicida, se analizó la viabilidad de las levaduras en presencia de distintas concentraciones de cada compuesto, realizando posteriormente un recuento de las UFCs. Se seleccionaron distintas concentraciones de cada compuesto según los tamaños de las levaduras obtenidos en las gráficas de la Figura 70. Se escogió una concentración que causara una mayor inhibición del tamaño de las levaduras (25 μM , común para todos los compuestos) y otra que causara una inhibición intermedia (variable según el compuesto).

Como se observa en la Figura 71, la metirapona, isotretinoína, ácido retinoico y antimicina A se ensayaron solo a 25 μM , puesto que tenían un perfil de inhibición moderado y la media del tamaño celular obtenido en presencia de dicha concentración fue superior a 10 μm (Figura 70). Ninguno de ellos inhibió la viabilidad de las levaduras tras 24 horas de exposición, por lo que la inhibición observada no fue atribuida a efectos fungicidas.

El resto de los compuestos (alexidina, pentamidina, ebselen, mitoxantrona, sertralina y clioquinol) presentaron un efecto más drástico durante la inducción de células titanicas, generando células con un diámetro medio inferior a 10 μm a la concentración de 25 μM (Figura 70). Por esta razón, estos compuestos se testaron también a una concentración inferior, específica para cada compuesto (alexidina a 0,2 μM , pentamidina a 2 μM , ebselen a 3,1 μM , mitoxantrona a 5 μM , y sertralina y clioquinol a 6,3 μM , ver Figura 71). A 25 μM , todos excepto el clioquinol, produjeron una reducción en el número de UFCs. Sin embargo, a la concentración más baja, inhibieron la inducción de las células titanicas sin reducir el número de UFCs, a excepción del ebselen, que mostró una inhibición de la viabilidad de las levaduras del 88,9% respecto al control en TCM de 24 horas.

Estos resultados mostraron que la inhibición de las células titanicas en presencia de estos compuestos no se debía a un efecto fungicida, sino a la propia inhibición de la titanización.

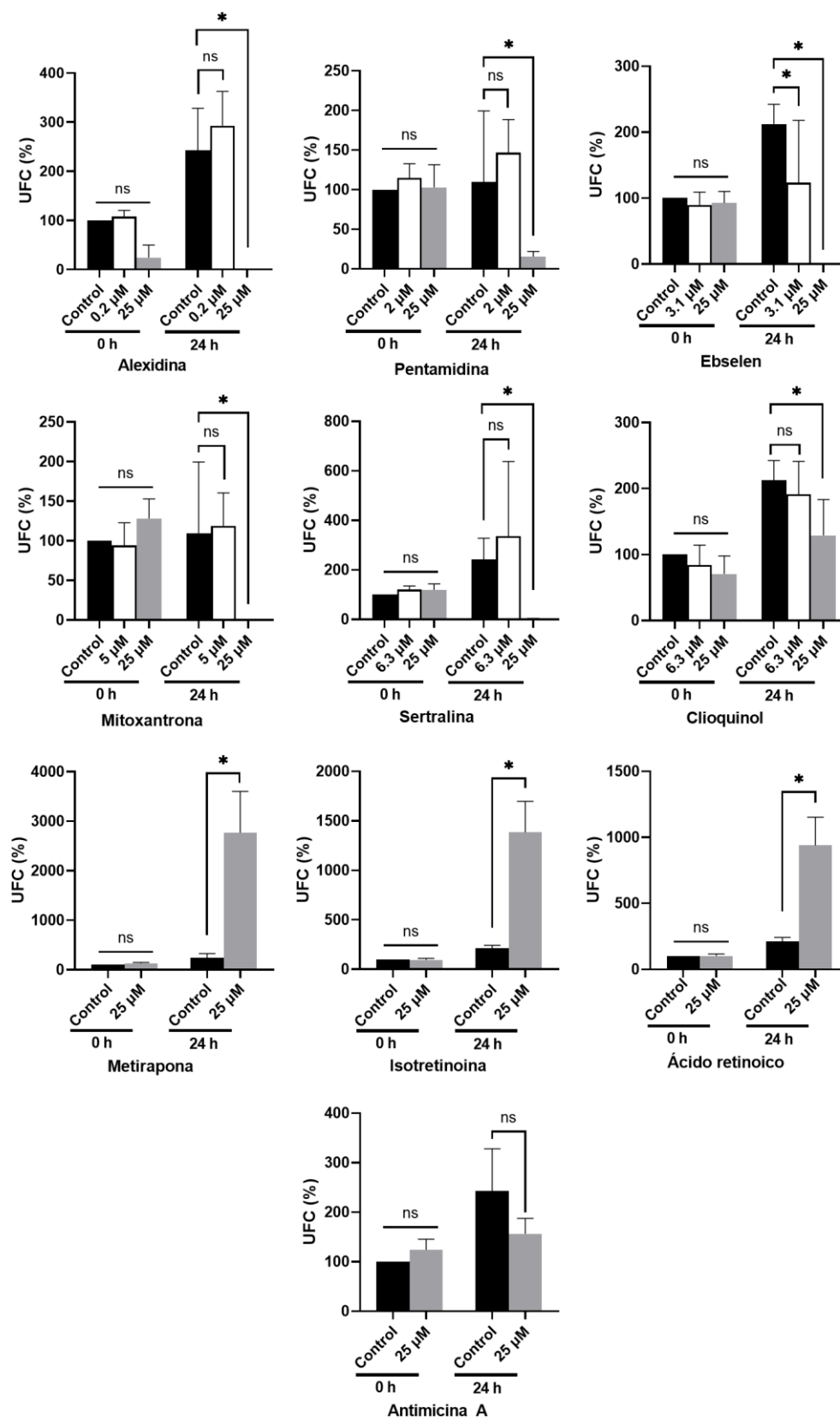


Figura 71. Efecto de los compuestos en la viabilidad de *C. neoformans*. Se indujeron las células titanes en presencia de distintas concentraciones de cada compuesto y se determinó la viabilidad de las levaduras a 0 y 24 h mediante recuento de UFCs. A ambos tiempos se incluyó un control de células en TCM sin compuesto. Se normalizaron todos los datos respecto al recuento de UFCs a tiempo 0 sin compuesto. Las barras representan la media y la desviación estándar de cada población. A tiempo 0 h no se encontraron diferencias significativas entre las muestras y el control sin compuesto (ns, $p > 0,9$). Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,05$).

6.2.7. Efecto de otros antioxidantes: ácido ascórbico y N-acetilcisteína

Algunos de los compuestos seleccionados tras el cribado de la colección de Prestwick poseían propiedades antioxidantes, como el ácido retinoico o la isotretinoína (Dbouk *et al.*, 2019; Cosio *et al.*, 2021), ambos con el mismo perfil de inhibición (Figura 70). Por ello, nos preguntamos si otros compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico y la N-acetilcisteína (Peng *et al.*, 2018; Magalhães *et al.*, 2020), podrían tener un efecto similar. Se indujeron las células titanicas en presencia de distintas concentraciones de estos compuestos y se observó como afectaban al tamaño de las levaduras (Figura 72). El ácido ascórbico se testó en un rango de concentraciones de entre 50 y 0,1 mM, mientras que la N-acetilcisteína se probó entre 305 y 0,6 mM, siempre realizando diluciones 1/2. Ambos mostraron un efecto inhibitorio de las células titanicas a concentraciones altas, aunque la inhibición fue más pronunciada en la N-acetilcisteína, que produjo una inhibición de la titanización a todas las concentraciones analizadas.

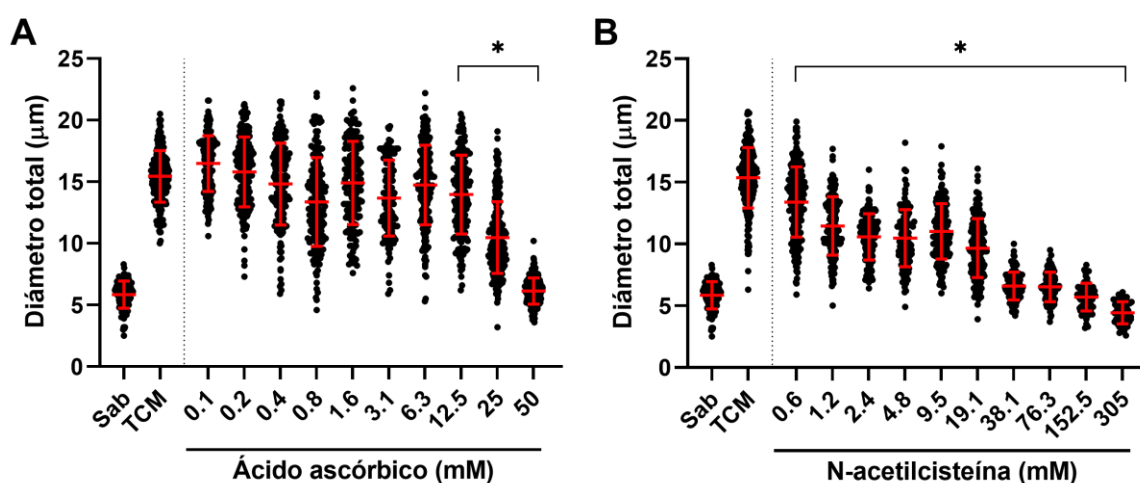


Figura 72. Inducción de células titanicas en presencia de ácido ascórbico y N-acetilcisteína. Se indujo la formación de células titanicas en TCM en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico (A) y N-acetilcisteína (B) y se tiñeron con lactofucsina para su visualización y análisis. Se midió manualmente el diámetro total de las levaduras (cápsula junto con cuerpo celular). En ambos casos se incluyó un control de no inducción (Sabouraud) y otro en TCM, ambos sin compuesto. Las barras rojas representan la media y la desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas frente al control en TCM (*, $p < 0,005$). En (A), todas las concentraciones de ácido ascórbico, salvo 50 mM ($p > 0,9$), mostraron diferencias significativas frente al control Sab ($p < 0,0001$). En (B), las concentraciones de 305 a 38,1 mM de N-acetilcisteína no presentaron diferencias frente al control Sab ($p > 0,9$), pero el resto de concentraciones si mostraron significancia frente a dicho control ($p < 0,0001$). Test Kruskal-Wallis.

6.2.8. Detección de ROS durante la formación de células titanicas

El hecho de que compuestos antioxidantes inhibiesen la formación de células titanicas nos llevó a plantear la hipótesis de que los radicales libres endógenos, es decir, producidos de forma natural por las células, podían participar en este proceso.

Para comprobar esta hipótesis, se midió la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, "Reactive Oxygen Species") que se producían durante la formación de las células titanicas usando la sonda fluorescente diacetato de dihidrofluoresceína (DHF), la cual genera fluorescencia verde en presencia de radicales libres de oxígeno. Se estimó la cantidad de ROS a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) en células incubadas en TCM y Sabouraud tras

la adición de DHF durante 30 minutos a 37 °C y 5% CO₂. Durante la incubación de las levaduras en TCM se encontró una acumulación gradual de ROS que mostró una fluorescencia mayor a las 24 horas (Figura 73, panel inferior). Por el contrario, las células incubadas en medio Sabouraud presentaron, en comparación, menor cantidad de ROS a todos los tiempos analizados (Figura 73, panel superior). Además, se observó que tras 3 horas de incubación en estas condiciones no inductoras aparecía una población de levaduras que tenían una mayor cantidad de ROS, incluso mayor a la detectada en células inoculadas en TCM. Esta población era menor cuando las células se incubaban en DHF durante 30 minutos a 37 °C sin CO₂ (resultados no mostrados), por lo que el CO₂ podía estar causando estrés en una subpoblación de células.

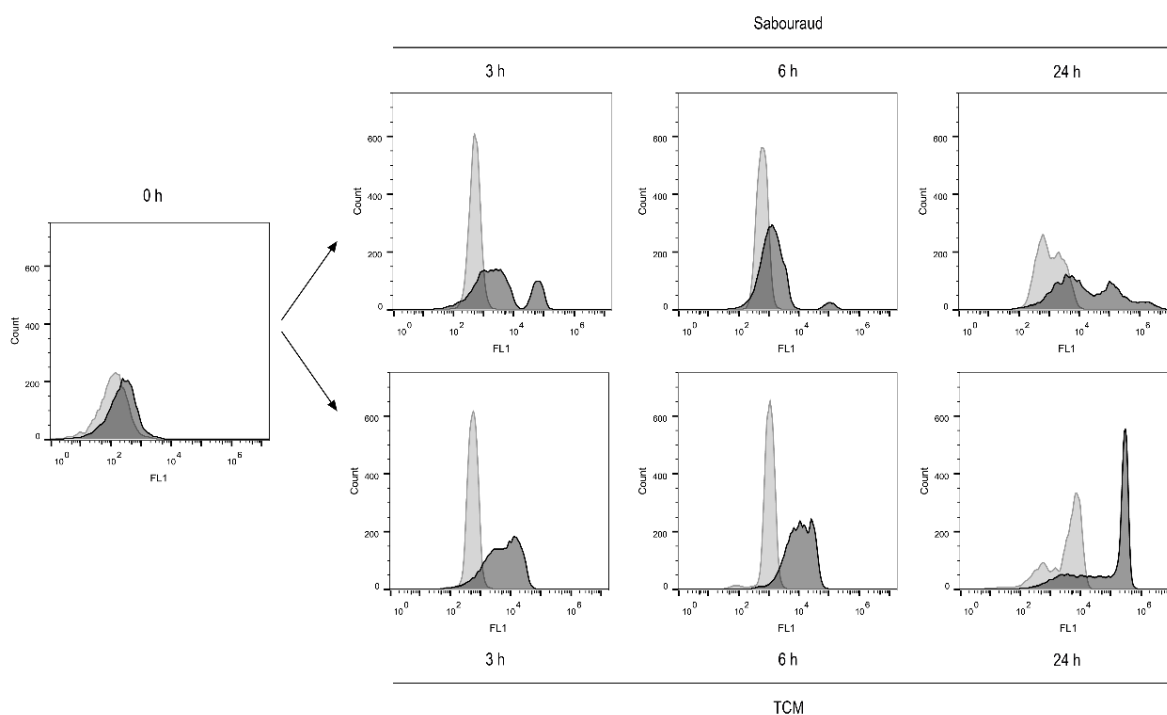


Figura 73. Detección de ROS endógenas durante la formación de las células titanes. Las levaduras se incubaron en medio Sabouraud (panel superior) y en TCM (panel inferior) a 37 °C y 5% CO₂. La acumulación de ROS se cuantificó mediante citometría de flujo a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) tras la adición de 40 μM DHF (histograma gris oscuro). A todos los tiempos se llevó en paralelo una muestra sin DHF como control (histograma gris claro). A tiempo 0 se añadió un control con AmB 1 μg/mL para confirmar la detección de ROS con la DHF (resultado no mostrado). Eje X, FL-1 o fluorescencia verde; eje Y, número de células ("count"). Se analizaron 10.000 células por cada muestra. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en días distintos y se expone una réplica representativa.

Podría interpretarse que la mayor cantidad de ROS detectada en las células titanes se debe simplemente a que las células son más grandes en TCM. Por ello, se reanalizaron los datos de la citometría y se normalizó el valor de fluorescencia (FL-1) por el valor de "forward scatter" (FSC) en cada célula, el cual depende del tamaño celular. Al normalizar la fluorescencia por el tamaño de las levaduras se pudo observar la subpoblación de células de Sabouraud con una mayor acumulación de ROS (Figura 74 A), sobre todo a tiempos 3 y 24 horas, pero, aun así, al determinar la media geométrica, la cantidad de ROS siguió siendo mayor en los cultivos TCM (Figura 74 B), mostrando que durante la titanización hay una mayor acumulación de ROS.

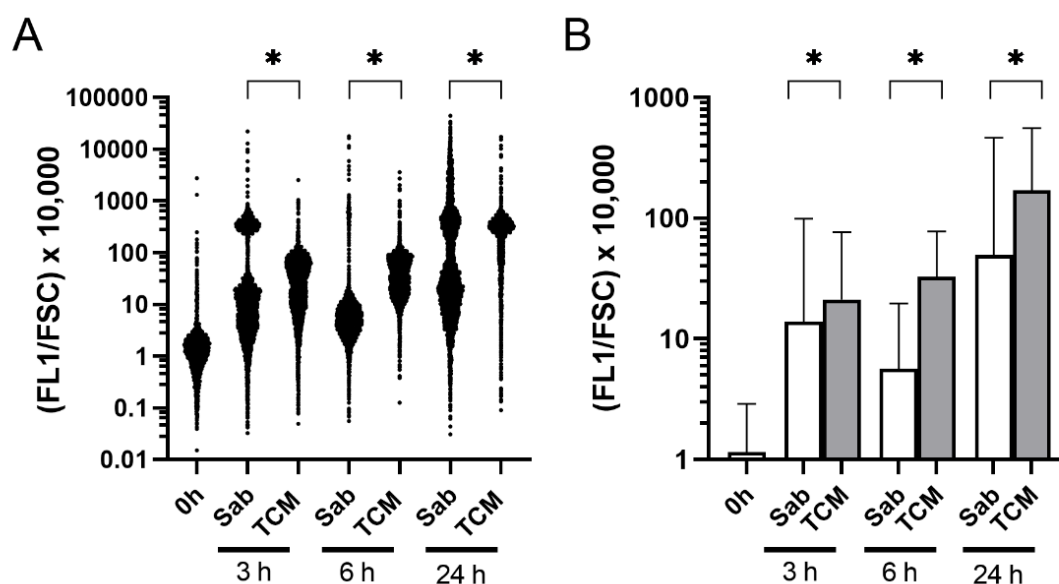


Figura 74. Normalización por tamaño de las ROS endógenas. Las levaduras se incubaron en medio Sabouraud y en TCM a 37 °C y 5% CO₂. La acumulación de ROS se cuantificó mediante citometría de flujo a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 h) tras la adición de 40 μM DHF. La señal de fluorescencia (FL-1) se normalizó por el tamaño de cada levadura (FSC) y se multiplicó por 10.000 para obtener números enteros. Representación de los resultados en diagrama de puntos (“scatter plot”) (A) y barras (B). En (B) las barras muestran la media geométrica y la desviación estándar geométrica de cada población. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo (*, $p < 0,0001$). Las muestras en Sab y en TCM mostraron diferencias significativas a todos los tiempos comparados ($p < 0,0001$); test Kruskal-Wallis.

6.2.9. Detección de ROS durante la titanización en presencia de ácido retinoico

Se quiso también estudiar como variaban las ROS durante la inducción de células titanes en presencia de 25 μM de ácido retinoico (AR), por lo que se indujo la titanización en presencia de este compuesto. A los distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) se añadió la sonda fluorescente DHF para analizar la acumulación de ROS mediante citometría de flujo.

A 3 horas ya se pudo observar una reducción de ROS en el cultivo que contenía AR frente al cultivo sin dicho antioxidante (Figura 75 A). Esta tendencia también se mantuvo a 6 y 24 horas, confirmando que el efecto inhibitorio del AR durante la titanización se correlaciona con una menor acumulación de ROS.

Al igual que en el apartado anterior, en estos experimentos también se normalizó la fluorescencia FL-1 respecto al tamaño de cada célula (FSC), e igualmente se confirmó una mayor acumulación de ROS en los cultivos TCM sin AR comparado con los cultivos que se indujeron en presencia de dicho antioxidante, que mostraron menor acumulación de ROS (Figura 75 B).

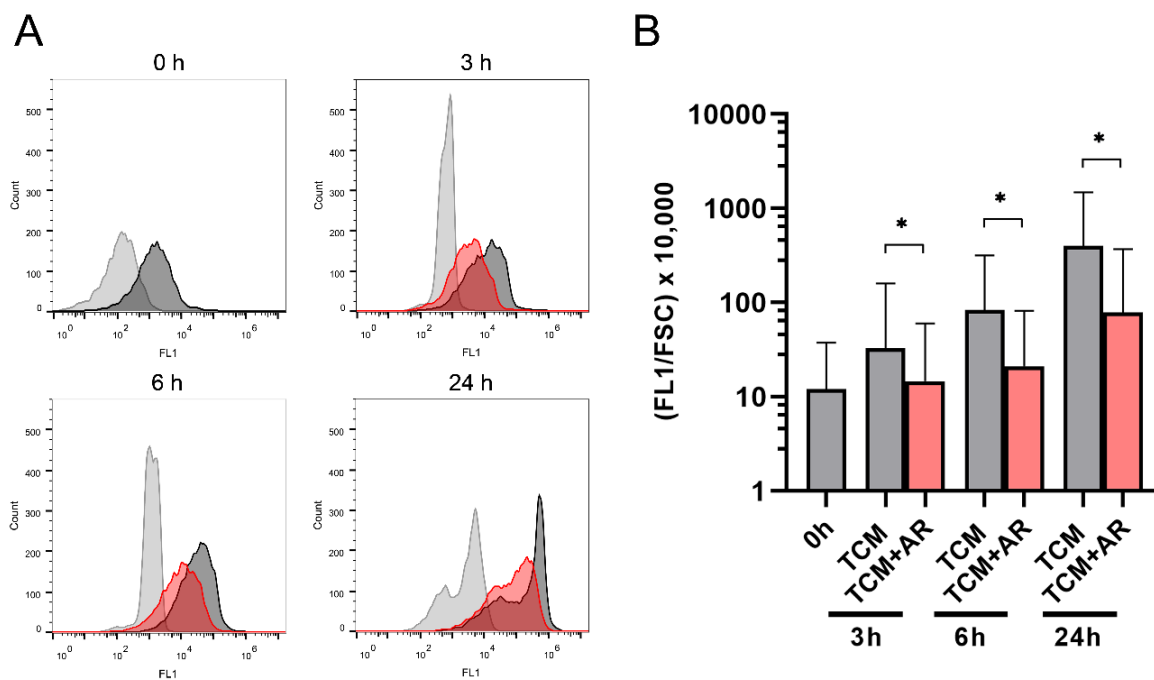


Figura 75. Efecto del ácido retinoico en la producción de ROS durante la titanización. A) Se indujo la formación de células titanés en presencia de 25 μM ácido retinoico (AR, histograma rojo) y sin AR (histograma gris oscuro). Una muestra sin DHF y sin AR se llevó en paralelo como control (histograma gris claro). La producción de ROS se cuantificó mediante citometría de flujo tras la adición de 40 μM DHF a tiempos 0, 3, 6 y 24 h. Eje X, FL-1 o fluorescencia verde; eje Y, número de células ("count"). B) Normalización de la producción de ROS (FL-1) respecto al tamaño de las levaduras (FSC) y multiplicado por 10.000 para obtener números enteros. Las barras muestran la media geométrica y la desviación estándar geométrica de la población. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,005$). Las muestras en TCM y en TCM + AR mostraron diferencias significativas a todos los tiempos comparados ($p < 0,0001$); test Kruskal-Wallis. Se contaron 10.000 células por cada muestra. Los experimentos se llevaron a cabo en duplicado en días distintos y se muestra un experimento representativo.

6.2.10. Estudio de la mitocondria durante la formación de células titanés

Las ROS se producen mayoritariamente en la mitocondria como subproductos de la cadena transportadora de electrones, por lo que se quiso evaluar la funcionalidad de este orgánulo en profundidad. Se estudiaron el potencial de membrana mitocondrial, la respiración mitocondrial y la morfología mitocondrial durante la formación de células titanés mediante distintas técnicas.

6.2.10.1. Detección del potencial de membrana mitocondrial

Se midió el potencial de membrana mitocondrial usando la sonda fluorescente JC-1 en células cultivadas en Sabouraud o TCM. Este reactivo es una sonda fluorescente de doble emisión que emite fluorescencia verde y roja según se encuentre el potencial de membrana. En presencia de un potencial de membrana bajo, la sonda JC-1 está en forma de monómero y emite fluorescencia mayoritariamente verde. Sin embargo, cuando la mitocondria está en estado normal, el potencial de membrana es alto y JC-1 forma agregados que generan una fluorescencia roja. Por lo tanto, la despolarización de la membrana genera una disminución en la fluorescencia roja, lo que produce una disminución en la proporción de fluorescencia roja/verde. Tras estudiar la fluorescencia a los distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 h) se observó que la señal era distinta en ambos medios. En los cultivos de TCM (Figura 76, panel inferior) se obtuvo un aumento tanto de la fluorescencia verde como de la fluorescencia roja tras 3 y

6 horas de incubación, que aumentó más tras 24 horas, sugiriendo que durante la titanización se da un aumento de la actividad mitocondrial. Este incremento no se observó en los cultivos de Sabouraud.

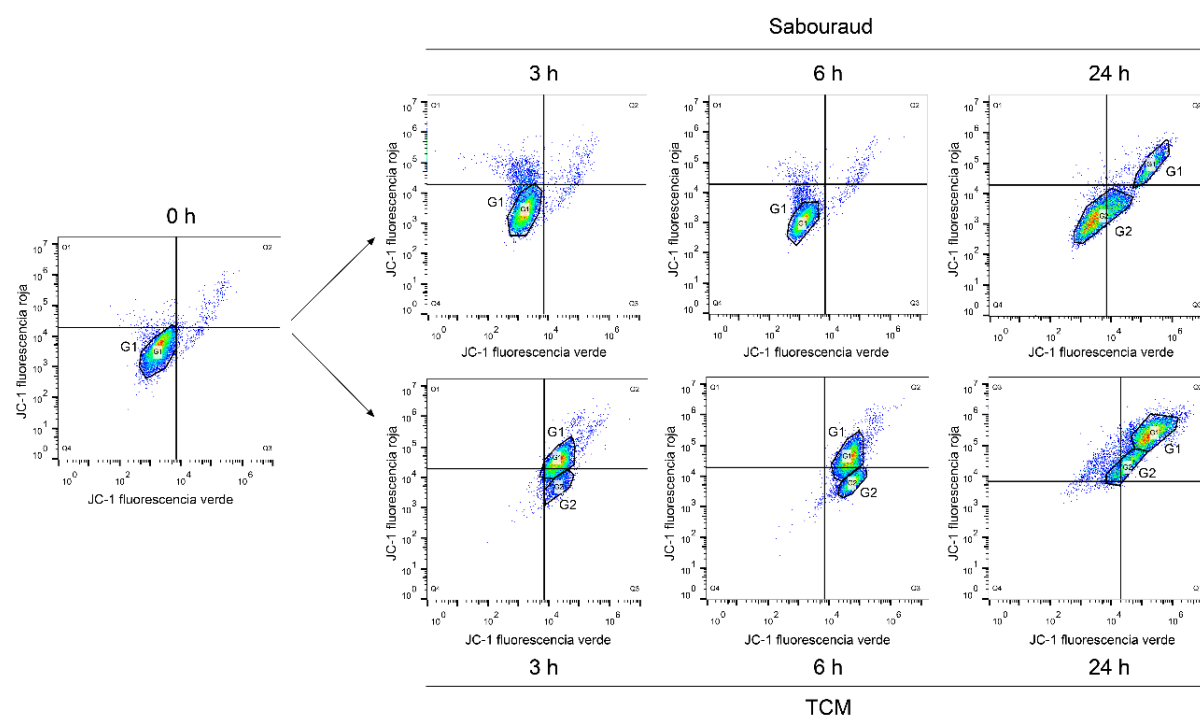


Figura 76. Determinación del potencial de membrana mediante JC-1. Las levaduras se incubaron en medio Sabouraud y en TCM a 37 °C y 5% CO₂, y el potencial de membrana mitocondrial se midió mediante citometría de flujo a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 h) tras la adición de 2 μM JC-1. Se midió la fluorescencia verde (canal FL-1) en el eje X y la fluorescencia roja (FL-2) en el eje Y. La muestra a tiempo 0 se utilizó para determinar los cuadrantes de todas las gráficas. A los distintos tiempos se diseñaron subgrupos (G1 y G2) para analizar poblaciones específicas. Se contaron 10.000 células por condición. Los experimentos se llevaron a cabo en duplicado en días diferentes y se muestra una réplica representativa.

Además, como se observa en la Figura 76, durante la formación de las células titanes se obtuvieron distintas poblaciones que se separaron en dos subpoblaciones (Grupo 1, G1 y grupo 2, G2), y se encontró que había una despolarización parcial de la mitocondria en ambas. Como se muestra en la Tabla 9, las células cultivadas en Sabouraud a 3 y 6 horas tenían una ratio similar al del subgrupo G1 de las células en TCM en esos mismos tiempos de incubación. Sin embargo, el subgrupo G2 de las células en TCM poseía una ratio menor en ambos tiempos. Tras 24 horas de incubación, la ratio de fluorescencia roja/verde fue mayor en los cultivos de TCM frente los cultivos de Sabouraud (ratio roja/verde total de 0,92 frente 0,58, respectivamente), indicando que en las células titanes hay mayor actividad mitocondrial que en las células normales incubadas en Sabouraud.

Tabla 9. Ratios de fluorescencia roja/verde tras la tinción con JC-1 durante la formación de células titanes. Las intensidades de fluorescencia se analizaron con los programas Excel y GraphPad Prism 8, y se calculó la ratio de fluorescencia roja/verde de cada población. Se calculó la media geométrica de toda la población (números en negrita) y la de las subpoblaciones generadas en la Figura 76 (G1 y G2, números en cursiva).

Ratio de fluorescencia roja/verde con JC-1		
Tiempo	Sabouraud	TCM
0 h	1.96	1.96
3 h	1.42	1.35 <i>G1 – 1.60</i> <i>G2 – 0.42</i>
6 h	1	0.62 <i>G1 – 0.91</i> <i>G2 – 0.25</i>
24 h	0.58 <i>G1 – 0.50</i> <i>G2 – 0.58</i>	0.92 <i>G1 – 1.48</i> <i>G2 – 0.97</i>

6.2.10.2. Respiración mitocondrial

Para medir el estado metabólico de los cultivos se recurrió al equipo Seahorse XFe24, un equipo que mide la respiración mitocondrial mediante la determinación del consumo de oxígeno de las células.

6.2.10.2.1. Optimización del ensayo: densidad celular

Para determinar la respiración mitocondrial en el Seahorse XFe24 se necesita una confluencia celular de aproximadamente el 80–90% y una monocapa homogénea en el fondo del pocillo. Las células titanes tienen un tamaño diferente a las células cultivadas en medio Sabouraud, por lo que hizo falta estandarizar el número de células de cada condición para asegurar que las medidas de respiración se tomaran en una zona lineal (Figura 77).

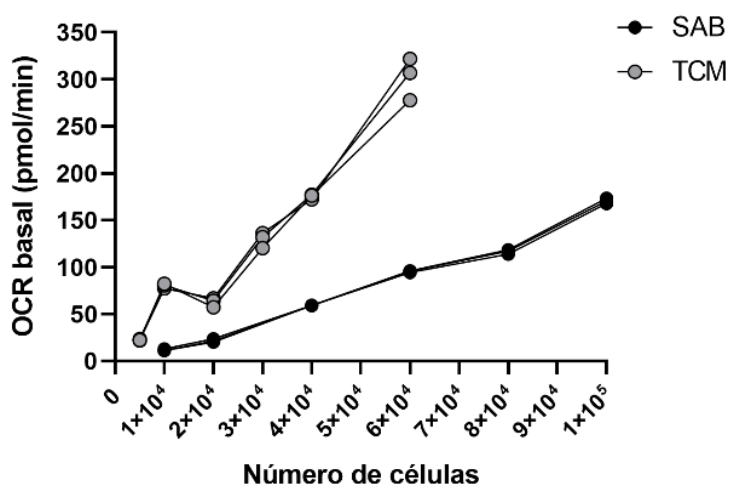


Figura 77. Optimización del número de células. Se sembraron en las placas del Seahorse distinto número de células cultivadas durante 24 h en Sabouraud (células normales) y TCM (células titanes) (desde 10.000 hasta 100.000 células/pocillo), y se determinó el número óptimo de células de cada cultivo para obtener un OCR alrededor de 50–150 pmol/min. Para las células inducidas en Sabouraud se seleccionó una concentración celular de 80.000–100.000 células/pocillo y para las células titanes, entre 30.000–40.000 células/pocillo. Este experimento se repitió dos veces en días diferentes y se muestra una réplica representativa.

6.2.10.2.2. Respiración mitocondrial durante la formación de células titanés

Se analizó la respiración mitocondrial en cultivos control de Sabouraud y cultivos de TCM con y sin 25 μM de ácido retinoico a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas). Los resultados mostraron que las células incubadas en TCM presentaron siempre un mayor consumo de oxígeno comparado con el consumo de las células incubadas en Sabouraud. Además, como se observa en la Figura 78, las células en TCM aumentaron su consumo de oxígeno significativamente con el tiempo, llegando a alrededor de 1.000 pmoles/min a las 24 horas. Curiosamente, las células titanés inducidas en presencia de ácido retinoico no aumentaron tanto la respiración, mostrando un perfil de respiración más similar al de las células incubadas en Sabouraud.

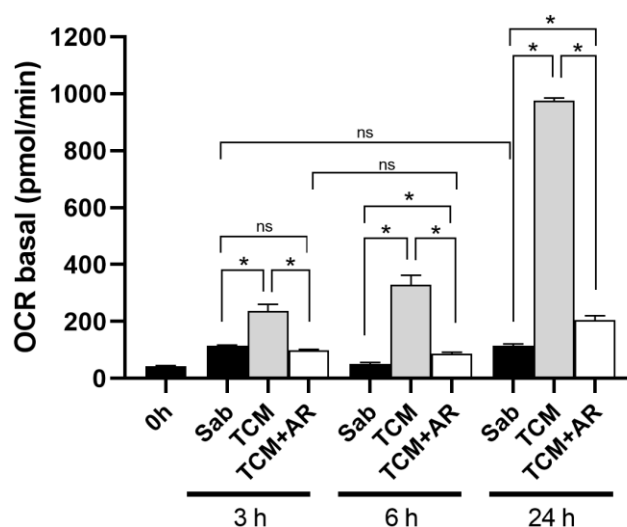


Figura 78. Respiración mitocondrial. Consumo de oxígeno basal (OCR) durante distintos tiempos (0, 3, 6, 24 h) en células control de Sabouraud (negro), TCM (gris claro) y TCM con 25 μM de ácido retinoico (AR) (blanco). Resultados normalizados por 100.000 células. Las barras indican la media y la desviación estándar de las muestras. Los experimentos se realizaron por triplicado en días independientes, con dos réplicas técnicas por cada experimento, y se muestra una réplica representativa. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las poblaciones (*, $p < 0,0005$). Al comparar cada condición a los distintos tiempos, todas las comparaciones mostraron significancia ($p < 0,0001$) salvo las muestras que se indican ($p > 0,05$); test ANOVA.

6.2.10.3. Morfología de la mitocondria durante la formación de células titanés

A continuación, decidimos ahondar en los cambios mitocondriales durante la titanización, para lo cual utilizamos diferentes técnicas. Se observó la organización de las mitocondrias mediante tinción con el fluoróforo MitoTracker mediante microscopía confocal y, además, se estudió la ultraestructura de este orgánulo mediante microscopía electrónica de transmisión.

6.2.10.3.1. Tinción con MitoTracker

Para visualizar el entramado mitocondrial durante la formación de células titanés se realizó una tinción con la sonda fluorescente MitoTracker™ Red CMXRos. La tinción de *C. neoformans* con esta sonda produce distintos patrones de fluorescencia que corresponden a diferentes organizaciones de las mitocondrias en la célula, conformaciones que se han relacionado con distintos estados metabólicos y respuestas a estrés (Chang and Doering, 2018). Se han descrito varios patrones de tinción con MitoTracker: difuso, tubular y fragmentado. Un patrón difuso indica un estado sano de la mitocondria, el patrón tubular

indica una situación de estrés, aumentando la capacidad de resistencia, y el patrón fragmentado se da por inhibición de la fusión de las mitocondrias.

Como muestra la Figura 79, tras llevar a cabo una tinción con MitoTracker a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas) se obtuvo una conformación de las mitocondrias diferente en las células incubadas en Sabouraud frente a las células incubadas en TCM. Las células incubadas en medio Sabouraud mostraron un patrón fragmentado que se mantuvo a lo largo de todos los tiempos del ensayo. Sin embargo, a las 3 horas, las células titanes empezaron a mostrar una conformación distinta a la obtenida a tiempo 0, y a las 6 y 24 horas se pudo observar mayoritariamente un patrón tubular, relacionado con una mayor resistencia a estrés (Chang and Doering, 2018).

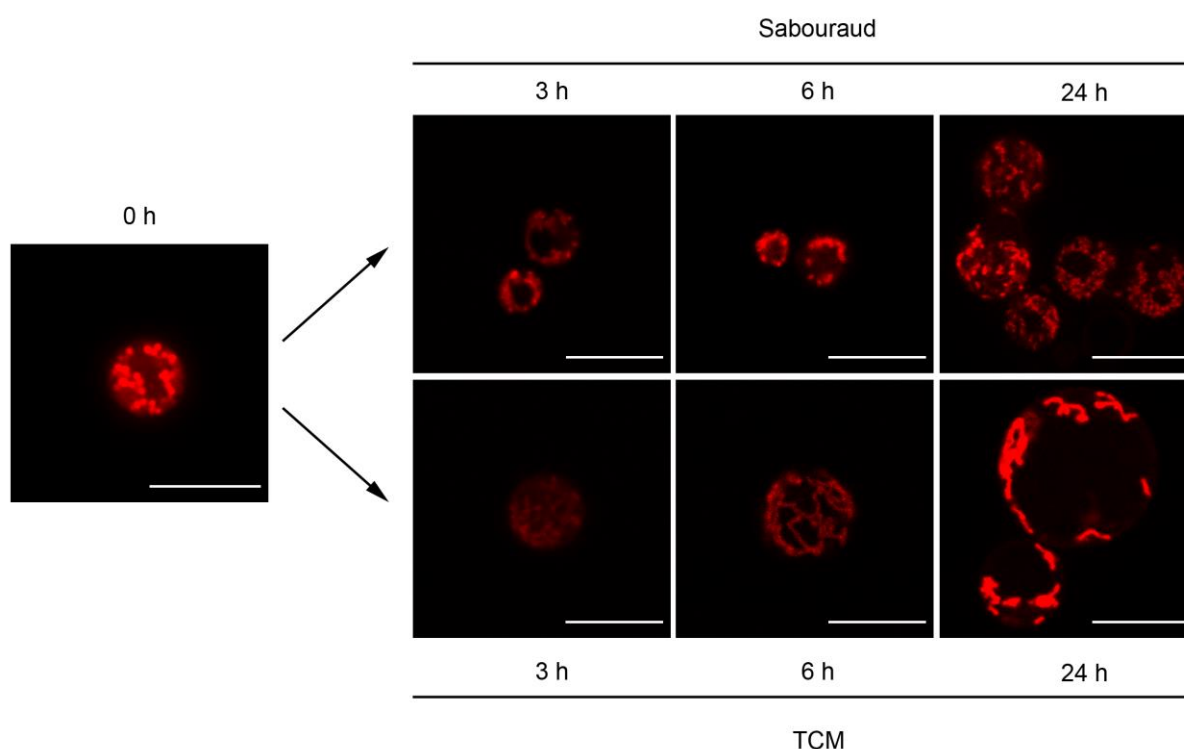


Figura 79. Morfología de la mitocondria. Las células se incubaron en Sabouraud (panel superior) y en TCM (panel inferior) y se tiñeron con 40 nM de la sonda fluorescente MitoTracker™ Red CMXRos a los distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 h) para observar la morfología mitocondrial. Fotografías tomadas mediante microscopía confocal. Todas las fotografías muestran una barra de escala de 10 µm.

Además, nos planteamos si los antioxidantes eran capaces de revertir la morfología tubular de las células titanes una vez estas ya se habían formado, por lo que se estudió el efecto del ácido retinoico en la mitocondria de células titanes ya formadas. Se indujo la titanización en condiciones normales, y tras 24 horas de inducción, se añadió ácido retinoico a 25 µM, incubando de nuevo durante 24 horas más (tiempo total de incubación de las células titanes de 48 horas). Tras este tiempo, se añadió MitoTracker, y como se puede observar en la Figura 80, tanto las células incubadas sin ácido retinoico como las que habían estado 24 horas en presencia de este compuesto seguían presentando una morfología tubular, sugiriendo que el ácido retinoico ejerce su efecto inhibitorio durante el desarrollo inicial de las células titanes y no en etapas más avanzadas.

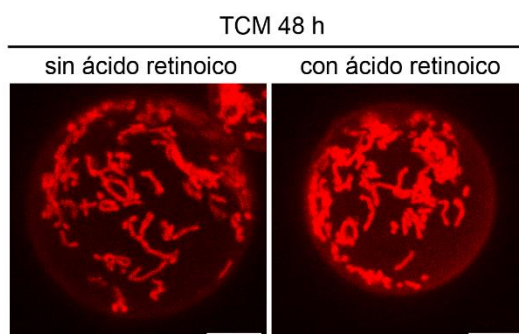


Figura 80. Morfología mitocondrial de células titanes en presencia de ácido retinoico. Las células titanes ya formadas se incubaron con y sin ácido retinoico durante 24 h (tiempo total de incubación de 48 h) y se analizó la morfología mitocondrial con 40 nM MitoTracker™ Red CMXRos. Fotografías tomadas mediante microscopía confocal, realizando la proyección máxima. La barra de escala representa 5 μm .

6.2.10.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

Debido a los cambios físicos y morfológicos observados en la mitocondria, tanto por citometría de flujo como por microscopía confocal, se decidió hacer microscopía electrónica de transmisión para observar la ultraestructura de este orgánulo en células titanes y en células de tamaño normal. Se utilizó un protocolo optimizado para la mejor visualización de membranas intracelulares (ver Materiales y Métodos, apartado 5.6.3.2).

Las células titanes mostraron una vacuola de gran tamaño, ya descrita anteriormente en este tipo de células (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010), más grande que la vacuola encontrada en las células incubadas en Sabouraud (Figura 81 A y B). Además, en las células titanes se observaron también mitocondrias más grandes que las observadas en las células control (Figura 81 E), con un gran número de crestas mitocondriales, compactas y con una organización más irregular (Figura 81 D). Las mitocondrias de las células incubadas en Sabouraud no presentaron un aspecto tan compacto y mostraron más espacios entre sus membranas (Figura 81 C). Como se muestra en la Figura 81 F y G, se estudió el número de mitocondrias y de crestas mitocondriales, siendo las mitocondrias de las células incubadas en TCM aproximadamente un 21,7% más grandes que las de las células control (Tabla 10). Además, el número de crestas/mitocondria y crestas/área mitocondrial fue aproximadamente el doble en las células titanes.

Tabla 10. Diferencias en las mitocondrias de cultivos Sabouraud y cultivos TCM. Tras la incubación de las levaduras en Sabouraud y TCM, se tomaron fotografías mediante TEM y se cuantificó el tamaño y el número de crestas mitocondriales ($n > 40$ para cada condición). En la tabla se muestra la media y la desviación estándar. En total se analizaron 58 mitocondrias para las células control incubadas en Sabouraud y 106 mitocondrias para las células titanes. Se determinaron las diferencias significativas mediante el test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunn's para comparaciones múltiples.

	Sabouraud	TCM	Ratio (TCM/Sab)	Valor p
Área mitocondrial (μm^2)	0,17 \pm 0,13	0,21 \pm 0,11	1,22	< 0,0001
Crestas mitocondriales/ mitocondria	3,7 \pm 1,9	9,1 \pm 4,5	2,5	< 0,0001
Crestas mitocondriales/ área mitocondrial (μm^2)	25,6 \pm 13,9	46,3 \pm 16,8	1,8	< 0,0001

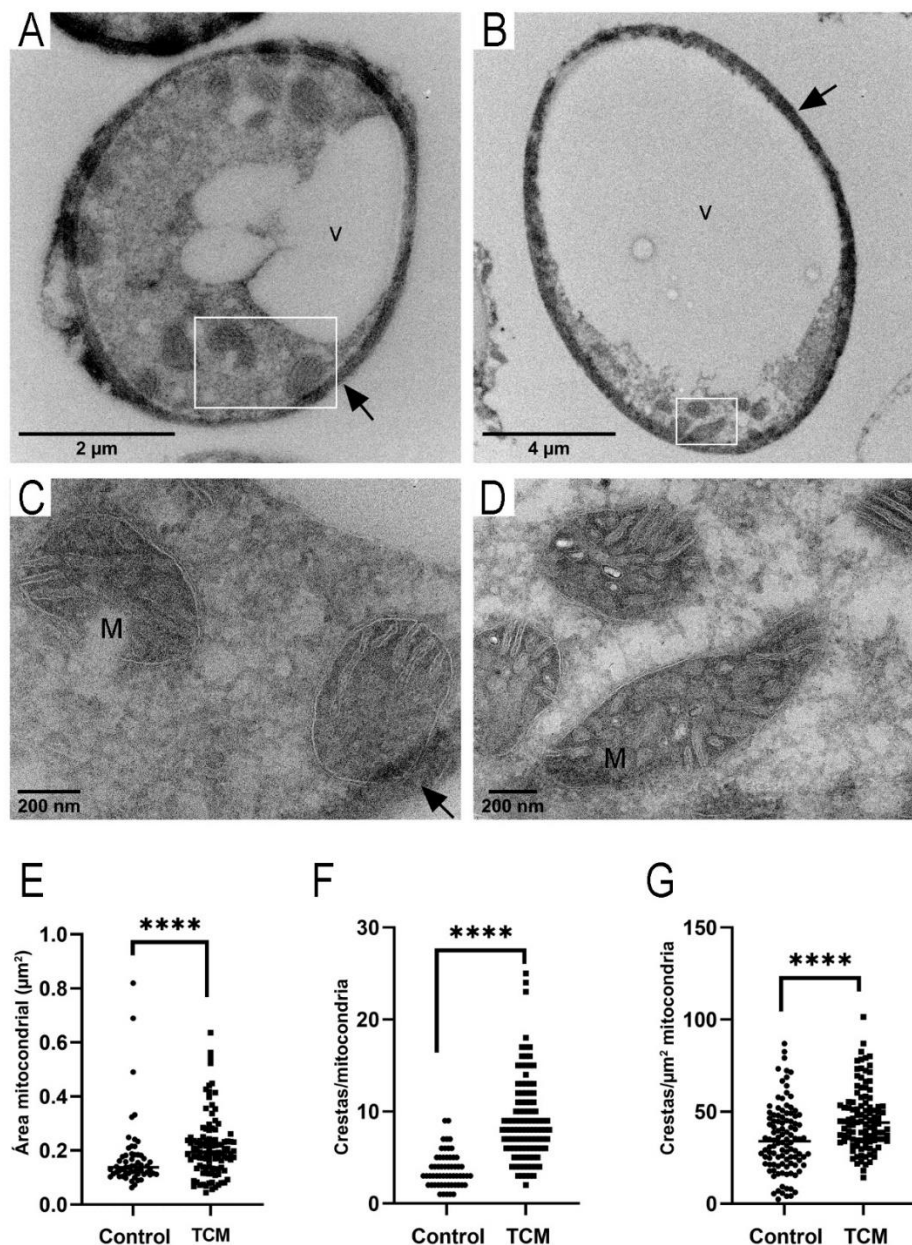


Figura 81. Morfología de la mitocondria por TEM. Las levaduras se incubaron en Sabouraud y TCM y se prepararon para su análisis por TEM (ver Materiales y Métodos). A) Célula control incubada en Sabouraud. B) Célula titán inducida en TCM. El cuadrado en cada imagen señala las mitocondrias, que se detallan en C) y D). Morfología de la mitocondria con mayor magnificación de las células control (C) y de las células titanes (D). Las flechas indican un desprendimiento de la pared celular. M, mitocondria; V, vacuola. (E, F y G) Cuantificación del área de cada mitocondria (E), número de crestas mitocondriales por mitocondria (F), y número de crestas por área mitocondrial (μm^2) (G). Los asteriscos muestran diferencias significativas (****, $p < 0,0001$; test de Mann-Whitney).

6.2.11. Efecto del ácido retinoico en la titanización de distintas cepas de *Cryptococcus*

Se quiso estudiar si el efecto inhibitorio del ácido retinoico en la titanización se reproducía en otras cepas de *Cryptococcus* spp. Para ello, se usaron las cepas *C. deneoformans* B3501 y *C. deuterogattii* R265, cepas que ya habían mostrado anteriormente una capacidad de titanización (Zaragoza *et al.*, 2010; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Como se observa en la Figura 82, el ácido retinoico inhibió la titanización en todos los casos de forma significativa, igual que lo hizo con la cepa H99 de *C. neoformans*.

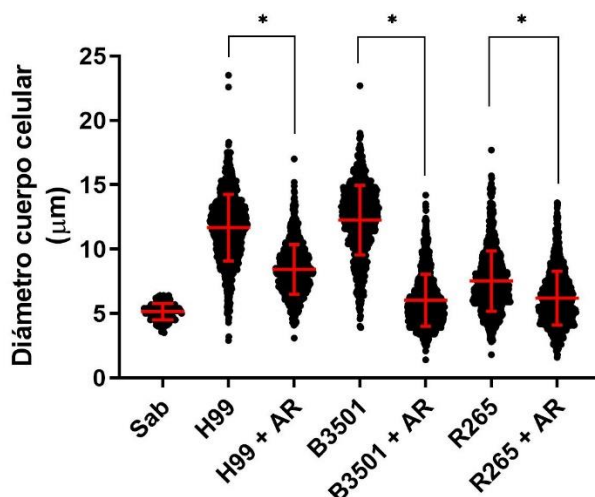


Figura 82. Efecto del ácido retinoico en la formación de células titanes en distintas cepas de *Cryptococcus* spp. Se indujeron distintas cepas (*C. neoformans* H99, *C. deneoformans* B3501 y *C. deuterogattii* R265) en TCM en presencia y ausencia de 25 μ M ácido retinoico (AR). Se incluyó un control de células de tamaño normal incubadas en Sabouraud (Sab). Se midió el diámetro del cuerpo celular de las levaduras de forma manual en fotografías de campo claro. Se analizaron al menos 100 células por condición. Los experimentos se realizaron en triplicado en días distintos, y se representan los resultados de las tres réplicas juntas. Las líneas rojas muestran la media y la desviación estándar de cada población. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*, $p < 0,0001$) y todas las muestras presentaron diferencias respecto al control Sab ($p < 0,0004$); test de Kruskal-Wallis.

Por lo tanto, y como resumen, en esta sección desarrollamos un protocolo que permitió inhibir farmacológicamente la titanización, y gracias a ello, identificamos distintos compuestos cuyo mecanismo de acción llevó a hipotetizar una posible función de las ROS en la formación de las células titanes. La implicación de los radicales libres de oxígeno se estudió mediante la realización de distintos ensayos, analizando la acumulación de ROS, el potencial de membrana, el consumo de oxígeno o la morfología mitocondrial, y se pudo confirmar que la acumulación de radicales libres endógenos es una señal que inicia la formación de las células titanes y ocurre tras un aumento de la actividad mitocondrial.

6.2.12. Detección de ROS en cepas con diferente capacidad de titanización

Para intentar integrar los resultados obtenidos en las dos secciones de este trabajo se llevó a cabo la detección de ROS en distintas cepas de *Cryptococcus* spp. Tal y como se ha descrito anteriormente, las diferentes variantes H99 de *C. neoformans* procedentes de distintos laboratorios tienen diferente capacidad de formar células titanes y, por ello, se investigó si en estas cepas había una correlación entre la formación de las células titanes y la cantidad de ROS acumulados.

Se estudió la acumulación de ROS en las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 horas), teniendo cada una de estas variantes distinta titanización *in vitro* (H99-3 tiene alta titanización, H99-1 tiene titanización intermedia y H99-2 tiene titanización baja, Figura 18). Como se observa en la Figura 83, las tres variantes acumularon mayor cantidad de ROS al ser incubadas en TCM frente a su incubación en Sabouraud. En las tres variantes se obtuvo una acumulación similar de ROS a 3 y 6 horas, sin embargo, a las 24 horas se observó un incremento de ROS en la variante H99-3.

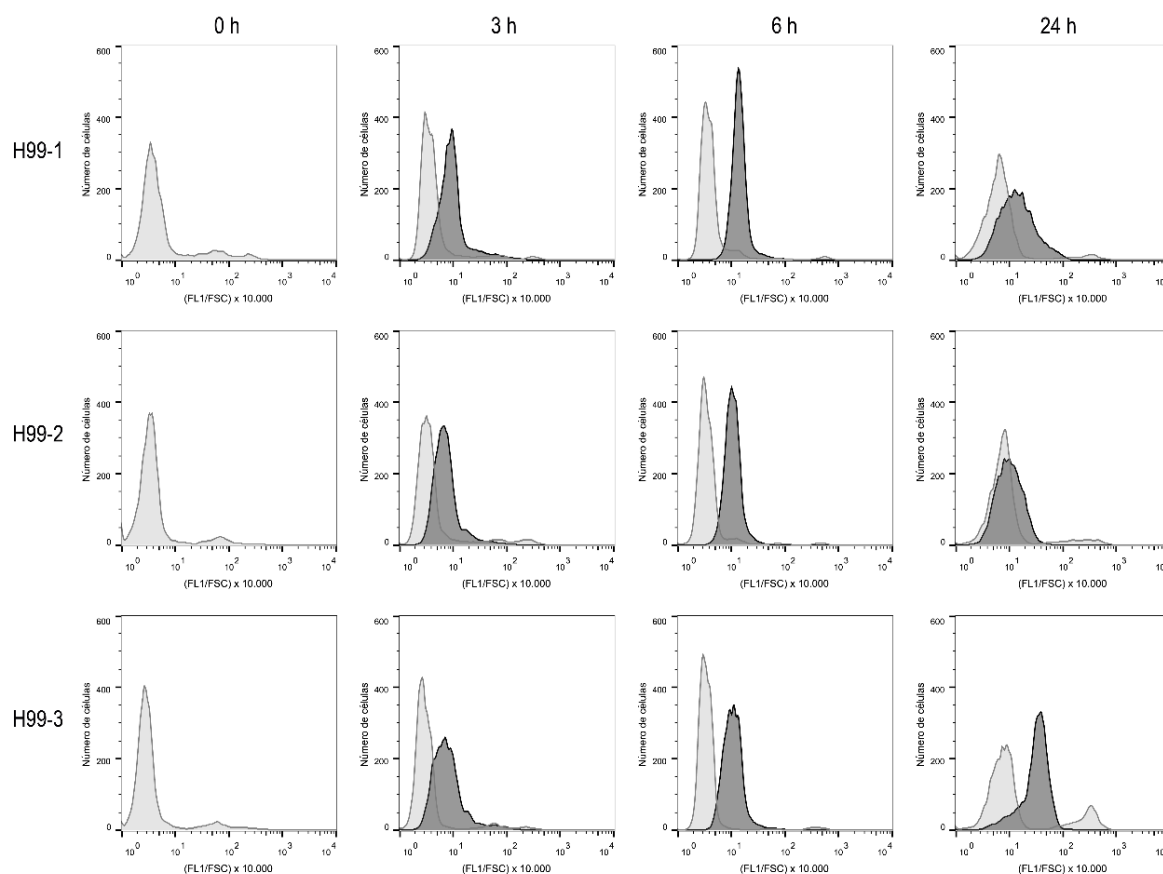


Figura 83. Acumulación de ROS en levaduras incubadas en Sabouraud y TCM. Las variantes H99-1, H99-2 y H99-3 se incubaron en medio Sabouraud (histograma gris claro) y en TCM (histograma gris oscuro) y se determinó la acumulación de ROS en ambos cultivos por citometría de flujo mediante la adición de 40 μm DHF a distintos tiempos (0, 3, 6 y 24 h). Los datos de fluorescencia se normalizaron por el tamaño de las levaduras (FL-1/FSC) y se multiplicaron por 10.000 para obtener números enteros. Se contaron 10.000 células por condición. La acumulación de ROS fue siempre superior en los cultivos de TCM frente los cultivos Sabouraud.

Además, se examinó si el mutante *bwc2* también inducía una acumulación de ROS en comparación con cepas silvestres. Para ello, se utilizaron las cepas H99-YSB y KN99, y sus

respectivos mutantes *bwc2*, cuya capacidad de titanización es elevada. También se incluyó la cepa B3501 de *C. deneoformans*, que igualmente tiene alta capacidad de formar células titanes. Este ensayo se llevó a cabo solo tras 24 horas de incubación, e igual que en el caso anterior, los cultivos en TCM mostraron mayor acumulación de ROS que los cultivos de Sabouraud. En todos los casos, las cepas que titanizan con un porcentaje menor o intermedio (H99-1, H99-2, H99-YSB, KN99) presentaron menor acumulación de ROS que las cepas que tienen una titanización elevada (H99-3, mutantes *bwc2* y B3501) (Figura 84).

El hecho de no encontrar diferencias en la producción de ROS a tiempos cortos podría explicarse de diferentes maneras. En primer lugar, es posible que a tiempos cortos todavía no se estén induciendo todas las señales necesarias para la formación de células titanes. Por otra parte, hay que considerar también que todas las variantes H99 analizadas inducen la formación de células titanes comparadas con el medio no inductor Sabouraud (Figura 18), al igual que los mutantes *bwc2* y la cepa B3501, por lo que es posible que en todas las cepas se produzcan las señales necesarias para la titanización, pero que aún así haya diferencias fenotípicas que dependan de la presencia de otros mecanismos, como por ejemplo los descritos en este trabajo dependientes del complejo transcripcional white collar.

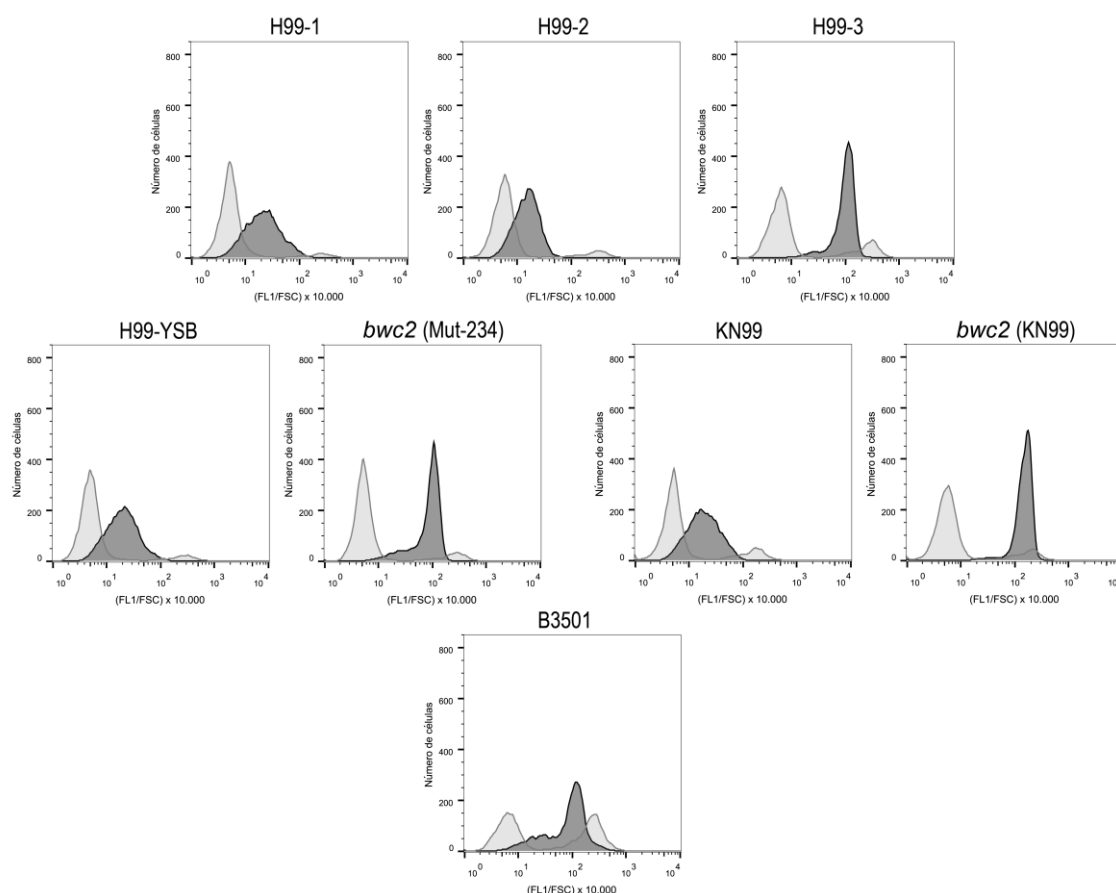


Figura 84. Acumulación de ROS tras 24 h de incubación en Sabouraud y TCM. Las distintas cepas se incubaron en medio Sabouraud (histograma gris claro) y en TCM (histograma gris oscuro) durante 24 h, tiempo tras el cual se añadieron 40 μm DHF y se determinó la acumulación de ROS por citometría de flujo. Los datos de fluorescencia se normalizaron por el tamaño de las levaduras (FL-1/FSC) y se multiplicaron por 10.000 para obtener números enteros. Se contaron 10.000 células por condición.

7. Discusión

Cryptococcus neoformans es una levadura patógena que supone un modelo excelente para estudiar la virulencia fúngica. A diferencia de otros hongos, *C. neoformans* posee una cápsula de polisacárido y es un patógeno intracelular facultativo, características que contribuyen a la evasión de la respuesta inmunológica generada por el hospedador y a su gran capacidad de adaptación. Pero además, uno de los fenotipos más característicos de esta levadura es su capacidad de cambiar de tamaño, tanto *in vitro* como *in vivo*. Durante la infección, aparece una población heterogénea con levaduras de muy diversos tamaños, desde las que se han denominado micro-células, con un diámetro de 1–2 μm , hasta células titanes, de hasta 100 μm (Feldmesser *et al.*, 2001a; Zaragoza, 2011). También se han descrito células con forma irregular o acúmulos de cápsula de polisacárido que se expulsan al medio, aunque su función es aún desconocida (Fernandes *et al.*, 2018; Stempinski *et al.*, 2023). En los últimos años, el estudio de las células titanes ha sido una de las áreas de interés en el campo del estudio de hongos patógenos humanos, no solo por la espectacularidad que supone el aumento de tamaño que experimentan, sino también porque su formación es un reto para el sistema inmunitario.

La plasticidad mostrada por *C. neoformans* durante la infección también contribuye a entender como diferentes fenotipos intervienen en los distintos procesos de la infección (persistencia, diseminación, latencia, etc), por lo que el estudio de la morfogénesis es un proceso fundamental para entender la patogénesis de este hongo. Durante esta tesis doctoral nos hemos propuesto varios objetivos relacionados con la caracterización de las células titanes, y se resumen principalmente en entender su función durante la virulencia e identificar mecanismos moleculares que regulan su formación.

7.1. Asociación entre morfogénesis y virulencia

La infección de *C. neoformans* es, probablemente, adquirida en la infancia (Goldman *et al.*, 2001), quedando el hongo en estado de latencia hasta que aparece un estado de inmunosupresión, momento en el cual se desarrolla la infección (Alanio, 2020). Este hongo es capaz de permanecer durante largos periodos de tiempo en el hospedador, necesitando adaptarse al nuevo ambiente para sobrevivir. Este periodo puede durar meses o incluso años, y en este tiempo, *C. neoformans* puede sufrir mecanismos de selección que le llevan a sufrir procesos de microevolución. El término microevolución se refiere a cambios hereditarios que se acumulan durante un periodo relativamente corto (Altamirano *et al.*, 2020), y hay evidencias de que *C. neoformans* sufre microevolución tanto *in vitro* como *in vivo* (Franzot *et al.*, 1998; Fries and Casadevall, 1998; Blasi *et al.*, 2001; Ormerod *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014; Janbon *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Sullivan *et al.*, 1996; Arras *et al.*, 2017).

La cepa H99 de *C. neoformans* se aisló por primera vez en 1978, procedente de un paciente de 28 años con la enfermedad de Hodgkin, por el Dr. John Perfect, de la Universidad de Duke (Carolina del Norte, EE. UU.) (Perfect *et al.*, 1980). Desde entonces, se ha convertido en una cepa de referencia que se ha usado globalmente para estudiar la patogénesis de *C. neoformans*. El estudio de esta cepa y otras cepas de referencia ha permitido avanzar en el conocimiento de la biología de esta levadura, además de ayudar a entender cómo causa enfermedad y cuáles son sus mecanismos de virulencia más relevantes durante la infección (Jackson *et al.*, 2023). Estudios genéticos posteriores han mostrado la aparición de variación genética entre cepas H99 compartidas entre distintos laboratorios, surgiendo cepas

relacionadas pero con diferencias tanto genotípicas como fenotípicas (Janbon *et al.*, 2014; Arras *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2022).

En la colección de levaduras del grupo del Dr. Zaragoza disponíamos de la cepa H99 proveniente de diferentes laboratorios de todo el mundo. Gracias a los recientes protocolos de titanización *in vitro* descritos (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), al comienzo de este trabajo observamos que estas distintas variantes poseían diferencias en su capacidad de formar células titanicas *in vitro*, hecho que planteó distintas cuestiones que fueron objeto de estudio en esta tesis doctoral. En primer lugar, consideramos que aunque este comportamiento era paradójico, también ofrecía una oportunidad para abordar diferentes aspectos de la virulencia de *C. neoformans*, permitiendo ahondar en la relación entre la capacidad de titanización y la virulencia. Además, ya que todas estas cepas provenían del mismo aislado clínico inicial, las diferencias genéticas entre ellas serían menores que las encontradas entre diferentes aislados clínicos, lo que permitiría asociar determinados genes con un fenotipo concreto. Llamó especialmente nuestra atención la diferencia de comportamiento observada en diferentes viales de esta cepa conservados en nuestro laboratorio, las variantes H99-1, H99-2 y H99-3, y en particular esta última, por su especial capacidad de formar células titanicas *in vitro*, por lo que procedimos a investigar si las diferencias morfológicas obtenidas *in vitro* se correlacionaban con virulencia en distintos modelos animales.

Inicialmente, se estudió la virulencia de las 10 variantes H99 en el insecto lepidóptero *G. mellonella*. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en micología para estudiar la patogénesis de distintos hongos, puesto que los hemocitos de las larvas de *G. mellonella* desarrollan una respuesta inmunitaria innata similar a la observada en las células fagocíticas de mamíferos (revisado en (Trevijano-Contador and Zaragoza, 2018)). Comprobamos que las distintas variantes H99 poseían distintos perfiles de virulencia, permitiendo su agrupación en tres grupos: virulencia alta, intermedia y baja. Las diferencias en virulencia entre las variantes no se asociaron a diferencias de crecimiento *in vitro* (Figura 21). Llamó la atención la baja virulencia de la cepa H99-3 respecto al resto de variantes estudiadas. Distintos estudios han descrito ya diferencias de virulencia en variantes H99. Por un lado, Janbon *et al.* observaron que estas cepas evolucionaron hacia una reducción de su virulencia (Janbon *et al.*, 2014), como se ha visto que ocurre en otros microorganismos. Sin embargo, otros autores observaron que algunas de estas variantes H99 evolucionaron hacia una hipervirulencia (Arras *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2022). La secuenciación de los genomas de estas variantes permitió identificar mutaciones comunes, relacionando el aumento de virulencia con una delección de 734 pb en el gen *SFG29*. Este gen codifica la proteína Sgf29, un componente del complejo de acetilación de histonas SAGA involucrado en controlar la transcripción de genes mediante la remodelación de la cromatina, y su pérdida se ha asociado con una reducción de la acetilación en la histona H3K9 a lo largo del genoma (Arras *et al.*, 2017). Además, también se han identificado mutaciones en este mismo gen en aislados clínicos de pacientes (Arras *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en *G. mellonella* sugirieron una correlación inversa entre titanización y virulencia, por lo que decidimos reproducir estos resultados en un modelo murino, centrándonos en las variantes H99-1 (usada previamente en nuestro laboratorio y cuyo comportamiento es virulento) y H99-3. De nuevo, comprobamos que la cepa de mayor titanización era menos virulenta en este modelo. Otros autores han observado que la

titanización obtenida *in vitro* coincide con la obtenida *in vivo* (Dambuza *et al.*, 2018), y en nuestro caso, pudimos comprobar que de manera similar a como habíamos observado *in vitro*, la variante H99-3 también tenía mayor capacidad de titanización *in vivo*. La menor virulencia de esta cepa en comparación con la cepa H99-1 se asoció a una menor carga fúngica, un retraso en la diseminación al cerebro y una variación temporal en la producción de citoquinas proinflamatorias. De manera general, la mortalidad de los ratones estuvo asociada a un aumento en la carga fúngica, presencia de una población de levaduras de tamaño pequeño y normal, baja proporción de células titanes y diseminación al cerebro. La principal diferencia en los animales infectados con estas dos variantes fue el momento en el que se observaron estos fenómenos. Mientras que en ratones infectados con H99-1 ocurrieron a tiempo cortos, en animales infectados con H99-3 no se observaron hasta los 45–60 días de infección. Distintos autores han demostrado una relación entre la aparición de células de menor tamaño y un aumento en la mortalidad. Fernandes *et al.* observaron que la presencia de una población de levaduras de *C. neoformans* mayoritariamente pequeña se relacionaba con una mayor diseminación a cerebro y un aumento de la presión intracraneal (Fernandes *et al.*, 2018), y Denham *et al.* mostraron que las células pequeñas que aparecían en el transcurso de la infección predominaban en el cerebro (Denham *et al.*, 2018), estando un aumento de la carga fúngica en este órgano asociada con una mayor mortalidad (Bicanic *et al.*, 2009; Mukaremera *et al.*, 2019).

El comportamiento de la variante H99-3 fue inesperado, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que aunque durante los primeros días de infección esta cepa indujo células titanes de manera muy eficiente, a tiempos más largos (45–60 días) la población de levaduras de tamaño normal (no titán) aumentó de manera significativa, igual que ocurre en la cepa H99-1 a tiempos cortos de infección. Curiosamente, en ambos casos se observó una respuesta proinflamatoria basada en TNF- α , IFN- γ e IL-17 cuando la población de células titanes era relativamente menor. El estudio del tamaño de las levaduras *in vivo* mostró que existe una correlación inversa entre la diseminación al cerebro y la presencia de células titanes en el pulmón, confirmando que dichas células tienen capacidad reducida de escapar de los pulmones y cruzar otras barreras, como la BHE, debido a su gran tamaño.

Nuestros estudios de infección mostraron otro aspecto que añade un grado de complejidad a la comprensión de la importancia de la morfogénesis en la virulencia de *C. neoformans*. Mientras que todos los ratones infectados con la variante H99-1 mostraron un comportamiento muy similar, con aparición de una sintomatología clínica en todos los animales al mismo tiempo, esto no ocurrió en los ratones infectados con la cepa que inducía mayor titanización, encontrando gran variabilidad a tiempos largos de infección. Algunos de estos animales desarrollaron síntomas de enfermedad, pero otros permanecieron asintomáticos durante todo el periodo de estudio. Además, al sacrificarlos, algunos ratones habían eliminado la infección casi por completo, mostrando sus pulmones un tamaño similar a los pulmones de los ratones control, sin signos de inflamación. Los animales infectados con la variante H99-3 que presentaron alta carga fúngica, inflamación en el pulmón y diseminación al cerebro mostraron menos síntomas clínicos (pérdida de peso y mortalidad) que los observados en ratones infectados con la cepa virulenta (H99-1). Todo esto sugiere que existen diferencias individuales en la respuesta inmunitaria de diferentes ratones que influyen en la morfogénesis de *C. neoformans*.

Hasta la fecha, la relación que existe entre la formación de células titanes y su patogenicidad no está bien caracterizada, encontrando resultados contradictorios en la literatura. Por un lado, se ha descrito que las células titanes son responsables de la persistencia de *C. neoformans* en el hospedador puesto que su gran tamaño inhibe su fagocitosis (Zaragoza *et al.*, 2010; Chrisman *et al.*, 2011; García-Rodas *et al.*, 2011). Además, confieren mayor resistencia a su progenie y favorecen su diseminación, por lo que su presencia se ha relacionado con una mayor virulencia (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Okagaki and Nielsen, 2012; Crabtree *et al.*, 2012). Mukaremera y colaboradores no encontraron relación entre la capacidad de titanizar de distintos aislados clínicos y el grado de virulencia de estos (Mukaremera *et al.*, 2019), aunque si observaron una tendencia en la que cepas de menor virulencia formaban mayor cantidad de células titanes que cepas de mayor virulencia. Igualmente, Dambuza *et al.* describieron que cepas con distinta titanización afectaban de forma distinta a ratones infectados (Dambuza *et al.*, 2018). Por su parte, Fernandes *et al.* relacionaron fenotipos de mayor tamaño celular con etapas tempranas de infección, asociando la aparición de células de menor tamaño con etapas más tardías y con una sintomatología más severa, sugiriendo una transición de células titanes a levaduras de tamaño normal según progresa la enfermedad (Fernandes *et al.*, 2018). Más recientemente se ha identificado un factor de transcripción (Pdr802) que reprime la formación de células titanes, y su mutante *pdr802* presenta mayor capacidad de titanización y menor diseminación y virulencia (Reuwsaat *et al.*, 2021).

Tras caracterizar la infección causada por las variantes H99-1 y H99-3 en modelos de ratón y observar que cada una tenía una virulencia distinta, evaluamos otros factores de virulencia que pudieran influir en el comportamiento de cada variante y explicar así las diferencias obtenidas en la supervivencia de los ratones. De entre los principales, nos planteamos estudiar la cápsula de polisacárido, puesto que es el principal rasgo fenotípico de *C. neoformans* y su principal factor de virulencia (McClelland *et al.*, 2006). Es el primer componente que entra en contacto con el hospedador, pudiendo cambiar su estructura y su tamaño, por lo que es una estructura altamente dinámica que juega un papel fundamental en la infección (Feldmesser *et al.*, 2001a). Quisimos investigar si diferencias en la cápsula de estas variantes podían estar interviniendo en la virulencia de *C. neoformans*. Nuestros resultados mostraron que la cepa H99-3 presentaba motivos estructurales diferentes a las otras cepas estudiadas. Por el momento, desconocemos las implicaciones de las diferencias estructurales encontradas, pero cabe la posibilidad de que la cápsula de este aislado sea reconocida de manera diferente por el hospedador, y con ello se pueda explicar su reducida virulencia. Además, esta cepa con mayor capacidad de titanización secretó menor cantidad de EPS al medio, lo cual está de acuerdo con la idea de que la formación de células titanes requiere no solo del crecimiento del cuerpo celular, sino también de la cápsula (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Por otro lado, la variante H99-1 secretó mayor cantidad de EPS al medio, lo que pudo concordar con su mayor virulencia en el modelo murino. Puesto que estas levaduras aumentaron el tamaño de la cápsula en el transcurso de la infección, pero mantuvieron el cuerpo celular constante, pudieron, por tanto, secretar mayor cantidad de polisacárido que podría contribuir a la virulencia. El polisacárido de la cápsula tiene múltiples efectos *in vivo*, interviniendo en la respuesta inmunitaria y pudiendo provocar la muerte celular (Tucker and Casadevall, 2002; Zaragoza *et al.*, 2009), por lo que creemos que estos

resultados concuerdan con el hecho de que las células titanes tengan menor virulencia e induzcan una menor respuesta inmunitaria.

Se investigaron también otros factores de virulencia, como la producción de vesículas, diferencias en respiración, la secreción de distintas enzimas o la resistencia a factores de estrés, pero no observamos una diferencia significativa en la expresión y acumulación de estos factores que pudiera explicar las diferencias en virulencia de las variantes estudiadas.

Por todo ello, creemos que nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la formación de células titanes produce una ventaja adaptativa sobre el hospedador para perdurar durante largos periodos de tiempo, pero estas células no participan directamente en los principales procesos que causan enfermedad, siendo la diseminación al cerebro el más importante. Los abordajes genómicos demostraron que el principal gen alterado en la variante con mayor capacidad de titanización era el factor de transcripción *Bwc2*, y trabajos previos habían demostrado que mutantes carentes de esta proteína eran avirulentos (Idnurm and Heitman, 2005; Zhu and Idnurm, 2018). Aunque por limitaciones de tiempo no hemos podido realizar modelos animales con mutantes *bwc2*, creemos que nuestros resultados aportan nuevo conocimiento sobre el defecto de virulencia observado en este mutante.

Para entender exactamente la relación entre células titanes, virulencia y respuesta inmunitaria son necesarios más estudios, por ejemplo, con otros fondos genéticos y ratones KO deficientes en determinadas citoquinas, como por ejemplo TNF- α o IL-17. Además, estos resultados plantean que es necesario conocer en profundidad la estructura de las células titanes y cómo se reconocen, es decir, conocer la estructura de la cápsula, su reconocimiento por distintos receptores o la unión con distintos anticuerpos, puesto que esto podría también explicar su comportamiento *in vivo*.

7.2. Mecanismos moleculares involucrados en la formación de células titanes

En la segunda parte de este trabajo nos propusimos ahondar en los mecanismos moleculares que regulan la formación de las células titanes, para lo cual utilizamos dos estrategias diferentes. Por un lado, decidimos realizar la secuenciación y el análisis de los genomas de las diez variantes H99 mencionadas anteriormente. Por otra parte, nos propusimos identificar compuestos que inhibieran el crecimiento celular y la formación de las células titanes.

7.2.1. Análisis genómico de las variantes de la cepa H99

El desarrollo de la secuenciación masiva y el análisis detallado de los genomas completos de los microorganismos ha supuesto un hito en múltiples campos, como por ejemplo en epidemiología, o en el campo de la evolución e identificación de genes involucrados en determinados fenotipos. Sin embargo, la búsqueda de genes implicados en diferentes procesos a través de este abordaje posee una limitación, y es que diferentes cepas o aislados clínicos pueden presentar mucha variación génica, dificultando el establecimiento de causalidad entre genotipos y fenotipos. En nuestro caso, planteamos que el hecho de disponer de variantes procedentes de la misma estirpe parental, pero microevolucionadas en diferentes laboratorios, disminuiría de manera significativa estas diferencias y, por lo tanto, sería más probable encontrar genes involucrados en fenotipos de interés. Por ello, y con este

planteamiento, nos propusimos llevar a cabo el análisis genómico de las distintas variantes H99. Debido a la falta de conocimiento de las herramientas bioinformáticas necesarias para realizar estos análisis, decidimos llevarlos a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Toni Gabaldón (IRB, Barcelona), expertos en genómica evolutiva y análisis de genomas fúngicos.

De acuerdo con nuestra hipótesis, el análisis de las mutaciones que producían cambios en la secuencia de proteínas reveló que las diferencias entre las variantes analizadas eran relativamente bajas, aunque todas ellas poseían alguna mutación. Este análisis nos permitió identificar un gen, el gen *BWC2*, que apareció afectado solo en la variante con mayor capacidad de titanización, la H99-3. *Bwc2* es un factor de transcripción que se une a la proteína *Bwc1* para formar el complejo white collar, complejo que funciona como fotorreceptor y responde a la luz azul y UV (Lu *et al.*, 2005; Idnurm and Heitman, 2005). Se ha descrito que este complejo reprime el apareamiento y la filamentación, genera protección frente a la luz UV (Lu *et al.*, 2005; Idnurm and Heitman, 2005) e interviene en procesos de virulencia (Idnurm and Heitman, 2005; Zhu and Idnurm, 2018), pero hasta el momento no se ha relacionado con la formación de células titanas. Para investigar la implicación de este gen en el proceso de titanización, llevamos a cabo diferentes abordajes que incluyeron la complementación del gen silvestre en la cepa H99-3, su interrupción en otros fondos genéticos e incluso la adquisición de mutantes disponibles en colecciones comerciales.

La reinserción del gen *BWC2* en la cepa H99-3 resultó en una menor capacidad de formar células titanas, lo que supuso la primera confirmación del papel de este gen en la titanización. Sin embargo, encontramos algunos transformantes en los que la reintroducción del gen silvestre no produjo este efecto. Aunque desconocemos la razón de la diferencia de comportamiento entre los diferentes mutantes obtenidos, creemos que se debe al hecho de que la variante H99-3 produce una proteína truncada. Así, en las cepas reinsertadas se expresarían tanto la proteína nativa como la truncada, no pudiéndose descartar que la proteína alterada pudiera seguir interaccionando con la otra proteína del complejo white collar, *Bwc1*, y, por lo tanto, producir una recuperación parcial del fenotipo. El grado de expresión de las proteínas *Bwc2* truncadas y silvestres podría explicar que los diferentes transformantes obtenidos tras la transformación biolística mostraran diferentes fenotipos de titanización. Por esta razón, decidimos llevar a cabo la delección del gen *BWC2* en diferentes fondos genéticos, además de incluir en nuestro estudio el mutante *bwc2* que adquirimos de la colección de *C. neoformans* del FGSC. De esta manera, pudimos confirmar que la ausencia de este gen resultó en una mayor formación de células titanas. Siguiendo una estrategia similar, comprobamos que la otra proteína del complejo white collar, *Bwc1*, también participaba en la formación de células titanas de igual manera que *Bwc2*. Ambos mutantes presentaron el mismo fenotipo, aumentando su titanización, lo que nos permitió confirmar la implicación del complejo white collar en la formación de las células titanas.

Sin embargo, encontramos que el efecto de la interrupción del gen *BWC2* dependía del fondo genético utilizado, lo que sugirió que existían otras variables involucradas en la titanización. De hecho, encontramos que el fondo genético en el que la interrupción de *BWC2* no resultaba en un fenotipo de mayor producción de células titanas tenía alterado otro gen, *CNAG_04756*, lo que nos llevó a plantear si dicho gen podía tener un papel en la titanización. Esto fue corroborado cuando llevamos a cabo la interrupción de este gen en el fondo genético

H99-3, comprobando que este mutante perdía de manera significativa la capacidad de formar células titanés.

Por todo ello, nuestros resultados señalan nuevos elementos de función opuesta involucrados en la titanización, y sugieren que el complejo white collar Bwc1/Bwc2 es represor de la formación de células titanés, mientras que el gen *CNAG_04756* es necesario para que ocurra este proceso. Las funciones del complejo white collar son conocidas en distintos organismos (Bahn *et al.*, 2007), sin embargo, el gen *CNAG_04756* codifica una proteína de función desconocida, por lo que serán necesarios futuros estudios para conocer en detalle su papel en este proceso y en la biología de *C. neoformans*.

El complejo white collar está formado por las proteínas white collar 1 (WC-1) y white collar 2 (WC-2), y fue por primera vez caracterizado en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Ballario *et al.*, 1996). Se encuentra conservado en distintas especies fúngicas, incluyendo ascomicetos, basidiomicetos y Mucormycotina (previamente denominados zygomycetos) (Bahn *et al.*, 2007), siendo el principal fotorreceptor de estos hongos. La luz controla una gran cantidad de procesos fisiológicos y de desarrollo en distintos organismos, y en *N. crassa*, este complejo responde a estímulos de luz UV y luz azul, interviniendo en diversas funciones, como la regulación de los ciclos circadianos (a través de la expresión del gen *FRQ*), apareamiento, conidiación o producción de pigmentos carotenoides (Liu *et al.*, 2003). Ambas proteínas WC-1 y WC-2 contienen dominios PAS (Per-Arnt-Sim), dominios utilizados como sensores de señal, además de una región de dedos de zinc tipo GATA que lleva a cabo la unión al ADN y permite que el complejo funcione como factor de transcripción. WC-1 tiene tres dominios PAS, siendo el dominio del extremo N-terminal un dominio LOV ("Light-Oxygen-Voltage"), es decir, un dominio especializado en sentir luz, oxígeno y voltaje. Este dominio funciona como fotorreceptor para el cromóforo FAD (dinucleótido de flavina y adenina) (He *et al.*, 2002), que transfiere la señal en presencia de luz para que se inicie la transcripción de genes. WC-2 contiene un solo dominio PAS por el cual se une al dominio PAS del extremo C-terminal de WC-1, y ambos se unen al ADN por sus regiones de dedos de zinc (Froehlich *et al.*, 2002). *Cryptococcus neoformans* posee un complejo white collar similar, formado por Bwc1/Bwc2 (Idnurm and Heitman, 2005), pero la estructura de estas proteínas varía ligeramente. La proteína Bwc1 posee también tres dominios PAS, pero no posee la región de unión al ADN. Por ello, en este caso, Bwc1 se une igualmente a la proteína Bwc2 mediante su dominio PAS del extremo C-terminal, formando el complejo white collar, pero la unión al ADN se produce a través de la región de dedos de zinc de la proteína Bwc2 (Yeh *et al.*, 2009). Tras esta unión, se inicia la transcripción de diferentes genes en función de las condiciones lumínicas. El modelo propuesto para *C. neoformans* se muestra en la Figura 85 (Idnurm and Heitman, 2005). En ausencia de luz, el complejo Bwc1/Bwc2 se une al ADN y provoca una leve represión basal de los genes involucrados en apareamiento y filamentación, pero, sin embargo, se estimulan los genes involucrados en virulencia. Curiosamente, la función de este complejo transcripcional en la regulación de genes relacionados con la virulencia es independiente del dominio fotosensible (Zhu and Idnurm, 2018), indicando que Bwc1/Bwc2 también regulan procesos no relacionados con la respuesta a la luz. En presencia de luz, el cromóforo FAD capta los fotones de la luz, provocando un cambio conformacional de las proteínas que estimula una mayor represión de los genes involucrados en apareamiento y filamentación, y además, activa genes encargados de

generar resistencia frente a la luz UV, promoviendo protección a través de un proceso que requiere a la endonucleasa Uve1 (Idnurm and Heitman, 2005; Verma and Idnurm, 2013).

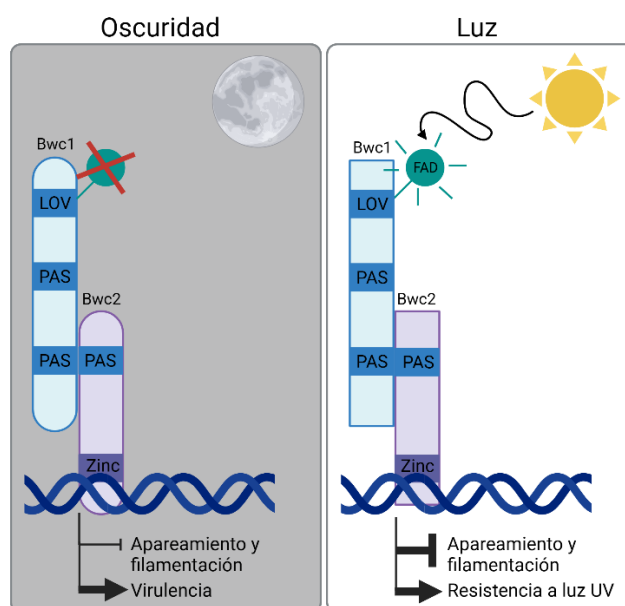


Figura 85. Esquema del complejo Bwc1/Bwc2 en *C. neoformans*. Bwc1 está formado por dos dominios PAS y un dominio LOV, mientras que Bwc2 posee un dominio PAS y una región de dedos de zinc mediante la cual el complejo se une al ADN para llevar a cabo la transcripción. En la oscuridad (panel izquierdo), hay una leve inhibición basal de los genes que regulan apareamiento y filamentación, y una estimulación de los genes que regulan virulencia. Sin embargo, en presencia de luz (panel derecho), el cromóforo FAD capta los fotones de la luz, lo cual provoca un cambio conformacional en el complejo Bwc1/Bwc2 y aumenta la represión de genes involucrados en apareamiento y filamentación, además de inducir los genes involucrados en protección frente a luz UV. El grosor de las líneas indica la magnitud de la transcripción. Figura creada con BioRender.com.

En la literatura se ha descrito que cepas mutantes *bwc1* o *bwc2* tienen menor capacidad patogénica (Idnurm and Heitman, 2005), lo que está de acuerdo con nuestros resultados, ya que la variante H99-3, la única que mostró tener la proteína Bwc2 truncada, manifestó menor virulencia en los modelos animales estudiados.

El hecho de que la actividad y función de Bwc1/Bwc2 en apareamiento y resistencia a luz UV dependan de la presencia de luz nos hizo plantear la hipótesis de que la formación de las células titanes podría ocurrir de forma diferente en condiciones de luminosidad y oscuridad. Para comprobar esta hipótesis, realizamos experimentos de inducción de células titanes en presencia de una lámpara LED que emitía luz de color principalmente azul. Estos experimentos los realizamos induciendo diferentes cepas de *C. neoformans* en TCM, incluyendo distintas variantes de la cepa H99 que mostraban una población celular con tamaños heterogéneos, así como los mutantes *bwc1* y *bwc2*, que generaban mayoritariamente una población de células titanes. Los resultados mostraron un fenómeno paradójico, ya que en presencia de una fuente de luz se producía una uniformidad en los tamaños celulares de todas las cepas, tanto silvestres como mutadas, planteando diferentes cuestiones sobre la titanización. En primer lugar, el hecho de que en una cepa concreta existan células que responden de manera diferente bajo las mismas condiciones confirma que la formación de células titanes está regulada por múltiples factores, lo cual está de acuerdo con la literatura (Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Hay que considerar que en cultivos no sincronizados puede existir una gran

variabilidad de las condiciones en las que se encuentra cada célula, pudiendo poseer diferencias en su estado metabólico, estar en distintas fases del ciclo celular, factores epigenéticos, edad de las levaduras y número de veces que han gemado, o incluso diferencias en el número de orgánulos que poseen (como mitocondrias o vesículas). Además, también pueden encontrarse diferencias estructurales, como son la composición de la pared celular o el tamaño y estructura de la cápsula. Por ello, el hecho de encontrar variabilidad intercelular como respuesta a un mismo estímulo en una misma cepa podría considerarse esperable. A pesar de que esta variabilidad supone una complejidad adicional para interpretar los fenotipos observados, también ofrece una posibilidad para diseñar futuros estudios (por ejemplo, secuenciación de ARN en célula única) que permitan identificar los elementos reguladores de la formación de las células titanes con mayor precisión.

El efecto de la luz en estas condiciones puede considerarse como paradójico ya que parece tener efectos contrarios en diferentes células de una misma cepa. Por un lado, en presencia de luz hay una menor proporción de células de menor tamaño, pero también se forma una menor proporción de células titanes, obteniendo una población de un tamaño intermedio. Los efectos que ejerce la luz utilizada en las células no son conocidos, y puede que no simplemente afecten a la estructura y actividad del complejo Bwc1/Bwc2, sino que posiblemente vayan más allá. De hecho, es posible que la exposición prolongada a la luz cause otros efectos, como una acumulación de radicales libres, que podrían tener un efecto tóxico en una parte de la población celular. Por ello, los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten proponer que la luz podría tener un efecto activador del crecimiento celular y con ello favorecer la titanización. El hecho de que en ausencia de Bwc1 o Bwc2 la luz inhiba este proceso apoya la idea de que estos factores de transcripción regulan la formación de células titanes en función de las condiciones lumínicas. Podría plantearse que estos mutantes son más sensibles a los posibles efectos tóxicos de la luz, siendo, por ejemplo, hipersensibles a radicales libres, y por tanto, tener menor capacidad de titanización en condiciones lumínicas debido a ese efecto tóxico. Sin embargo, nuestros resultados no han mostrado que la variante H99-3 sea más sensible a un estrés oxidativo (H₂O₂, Figura 43). Otro aspecto que podría estar interfiriendo en estos resultados podría ser la cápsula. Las células titanes, por lo general, tienen una cápsula más gruesa y densa que las levaduras de tamaño normal (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010), y esto podría interferir en la temperatura individual de cada célula bajo una fuente de luz, lo cual podría llevar a fenotipos distintos.

Estos resultados podrían llevar a plantear cuestiones tales como si *C. neoformans* podría comportarse de forma distinta durante el día o la noche, o incluso si podría haber variaciones en la incidencia o virulencia de este hongo en regiones geográficas donde el día o la noche sean más largos. Por todo ello, los resultados obtenidos deben tomarse como preliminares, pero teniendo en cuenta que *C. neoformans* es una levadura ambiental expuesta a ciclos de luz que varían en función de la región geográfica, hacen prioritario continuar las investigaciones en esta línea.

7.2.2. Expresión génica durante la formación de células titanes

Con el objetivo de entender los mecanismos por los cuales Bwc2 reprime la formación de las células titanes, decidimos realizar un análisis de expresión génica mediante RNA-seq en las cepas silvestres H99-YSB y KN99 y sus respectivos mutantes *bwc2*. La expresión génica

puede ser muy variable y diferente entre cepas de diferente fondo genético en las mismas condiciones, por ello, decidimos utilizar distintas cepas silvestres y sus correspondientes mutantes isogénicos para posteriormente comparar los resultados obtenidos en cada caso y seleccionar los genes que se comportasen de igual forma. En este análisis identificamos genes que durante la titanización se inducían de manera similar en las cepas silvestres y mutantes *bwc2*, como es el caso del gen *CIG1*. Este gen codifica una proteína quelante de hierro y ya se había descrito anteriormente que su expresión aumenta durante la formación de células titanes (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). De esta manera, confirmamos que la limitación de hierro es también un factor que favorece el aumento del tamaño celular en *C. neoformans*. Curiosamente, se ha descrito que el complejo Bwc1/Bwc2 regula en respuesta a la luz la expresión de dos genes que codifican proteínas relacionadas con el hierro y la síntesis del grupo hemo, que son Cft1 (un transportador de hierro de alta afinidad) y Hem15 (una ferroquelatasa mitocondrial que cataliza la conversión de moléculas de porfirina en grupos hemos) (Idnurm and Heitman, 2010). En nuestro caso, solo el gen *HEM15* vió reducida su expresión en ausencia de *BWC2* (alrededor de 4 veces, resultado no mostrado), pero al igual que *CIG1*, este cambio se observó en todas las comparaciones y a todos los tiempos, no atribuyéndolo por tanto al proceso de titanización.

Sin embargo, en nuestro análisis nos centramos en aquellos genes que se comportaron de forma diferente entre las cepas silvestres y mutantes, teniendo no solo en cuenta las comparaciones a los dos tiempos analizados (0 y 7 horas), sino también el comportamiento cinético. Identificamos genes que se sobreexpresaron en la cepa parental y que podrían considerarse como represores de la formación de las células titanes (*CNAG_05278* y *CNAG_05279*), y otros que se expresaron más en ausencia de *BWC2*, con lo que podrían tener función activadora de este proceso (*CNAG_04585*, *CNAG_03848*, *CNAG_00165*). De estos, solo dos codificaron proteínas conocidas, el gen *CNAG_03848*, que codifica una enzima glutatión S-transferasa, y el gen *CNAG_00165*, que codifica una metiltioadenosina fosforilasa. Curiosamente, los genes que no aumentaron su expresión en el mutante *bwc2* se encuentran contiguos en el genoma y codificados en cadenas opuestas separados por 1,4 kb, lo que sugiere que podrían compartir regiones que regulen la expresión génica en sus promotores (Figura 86).

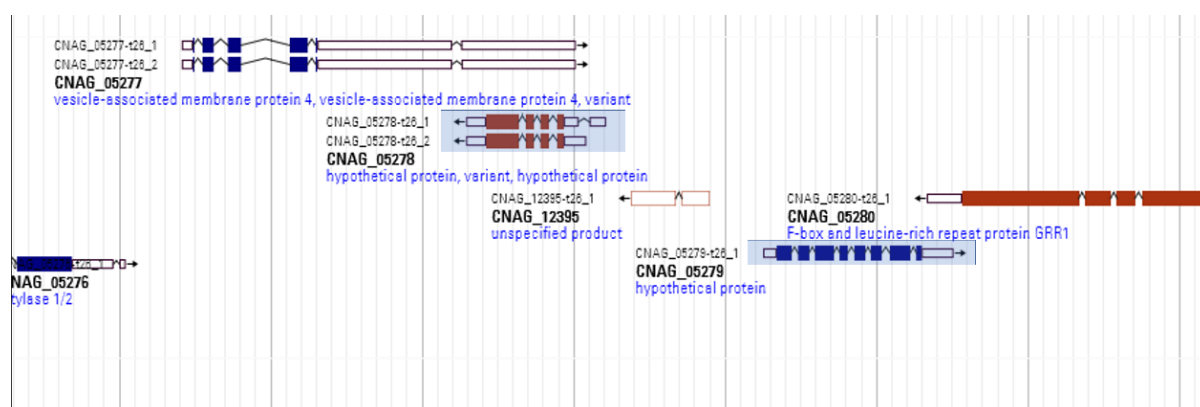


Figura 86. Esquema de la localización en el genoma de *C. neoformans* de los genes que se encuentran sobreexpresados en la cepa parental. En los resultados del RNA-seq se obtuvieron dos genes consecutivos (*CNAG_05278* y *CNAG_05279*) que se encuentran sobreexpresados en las cepas parentales. Al estudiar su localización en el genoma de *C. neoformans*, se observó que estaban separados por 1,4 kb en cadenas opuestas, pudiendo compartir sus promotores.

Nos pareció muy interesante la posible implicación en el proceso de titanización de la glutatión S-transferasa (GST), enzima que participa en el metabolismo del glutatión (Wangsanut and Pongpom, 2022). El glutatión es un compuesto formado por la unión de los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina que tiene propiedades antioxidantes y que contribuye a mantener la homeostasis celular, protegiendo a las células frente a daños oxidativos. Puede encontrarse en estado reducido (GSH) u oxidado (GSSH), y está en distintos compartimentos, como son el citosol, la mitocondria, retículo endoplásmico, membrana plasmática y núcleo (Raza, 2011). La GST se encarga de conjugar GSH con compuestos xenobióticos y tóxicos para su posterior detoxificación y eliminación, por lo que el aumento de su expresión en el mutante *bwc2* podría indicar que la célula se encuentra en condiciones de estrés. Además de la GST, en la ruta del GSH/GSSH existen otras cuatro enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión: γ -glutamylcisteína sintasa (GSH1), glutatión sintasa (GSH2), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR). Algunas de estas enzimas han sido relacionadas con las transiciones morfológicas que ocurren en distintos hongos (Wangsanut and Pongpom, 2022). Por ejemplo, los mutantes *gpx3* y *gps2* de *C. albicans* presentan defectos en la formación de hifas (Patterson *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). En *C. neoformans* se ha descrito que el mutante *gsh2* pierde la capacidad de formar cápsula o producir melanina y tiene defectos de crecimiento a 37 °C (Attarian, 2016), indicando que el glutatión juega un papel importante en la virulencia de este hongo. Por ello, la implicación de la GST en la formación de las células titanes es un resultado interesante que será objeto de estudio en un futuro.

7.3. Inhibición farmacológica de las células titanes

En la última parte del trabajo planteamos una estrategia alternativa para identificar procesos reguladores involucrados en la formación de las células titanes. Trabajos previos de nuestro laboratorio han utilizado colecciones de fármacos no sometidos a patente (“off-patent”) para identificar nuevas actividades antifúngicas (De Oliveira *et al.*, 2019; Rossi *et al.*, 2020). Pero además, este abordaje ha sido ampliamente usado, no solo en micología (Butts *et al.*, 2013; Siles *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Wiederhold *et al.*, 2017; Wall *et al.*, 2019; Wall *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2022), sino también en otros ámbitos de la biomedicina, por ejemplo para buscar nuevas terapias frente a enfermedades raras o desatendidas (Juárez-López and Schcolnik-Cabrera, 2021) o incluso en cáncer (Weth *et al.*, 2023), puesto que las técnicas de reposicionamiento ofrecen grandes ventajas frente al desarrollo de un fármaco nuevo, disminuyendo el coste y el tiempo de comercialización.

En este trabajo utilizamos la colección de Prestwick para realizar una búsqueda de compuestos inhibitorios de la titanización. Dicha colección está constituida por 1.520 compuestos con estructuras y dianas conocidas, aprobados para una gran diversidad de enfermedades como cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, trastornos psiquiátricos, etc. Esta aproximación nos permitió buscar compuestos con función y propiedades conocidas que pudieran ayudar a entender posibles mecanismos moleculares involucrados en la formación de las células titanes.

Previo a realizar el rastreo de fármacos, llevamos a cabo una estandarización del ensayo, observando que el DMSO (solvente en el que estaban preparados los compuestos) inhibía el proceso de titanización a concentraciones entre 0,5 y 1% sin afectar a la viabilidad celular.

Las fibras de la cápsula de polisacárido se unen a la pared celular mediante uniones no covalentes, y el DMSO es capaz de alterar dichas uniones y eliminar la cápsula de las células (Gates *et al.*, 2004; Maxson *et al.*, 2007b; Maxson *et al.*, 2007a), por ello, es posible que para que ocurra la formación de células titanicas se requiera una cápsula intacta que pueda unir nuevas fibras de polisacárido. Sin embargo, no se puede descartar que el DMSO ejerza algún otro efecto en las células que interfiera con el proceso de titanización.

Para llevar a cabo la búsqueda de compuestos inhibitorios desarrollamos un método que permitió tanto adquirir como analizar imágenes de manera automática. La tinción con tinta china es el método de visualización clásico de las levaduras de *C. neoformans* y permite visualizar en campo claro la cápsula y el cuerpo celular. Sin embargo, el análisis de estas imágenes mediante programas informáticos no es obvio, puesto que la mayoría de los programas desarrollados se basan en imágenes de fluorescencia. Por ello, decidimos utilizar un marcaje fluorescente para facilitar el posterior flujo de análisis. Una idea inicial fue la tinción de las células con anticuerpos monoclonales fluorescentes, pero estos tienen un precio elevado, lo que aumentaría considerablemente el coste de todo el proceso. También se planteó el uso de sondas fluorescentes, como por ejemplo el calcofluor white, que tiñe la quitina de la pared celular, pero este reactivo a veces genera una fluorescencia poco intensa que además sufre fotoblanqueo muy rápidamente. Buscamos un marcaje alternativo que solucionara las limitaciones mencionadas y decidimos utilizar la lactofucsina, un colorante que se une a la pared de los hongos de manera inespecífica. Durante la estandarización de la tinción comprobamos que el diámetro de las células teñidas con lactofucsina era ligeramente menor que el diámetro de las células en tinta china. A pesar de esta limitación, la lactofucsina permitió diferenciar los distintos tamaños celulares obtenidos, siendo capaz de distinguir células pequeñas, incubadas en medio no inductor (Sabouraud), frente a células más grandes, obtenidas tras su inducción en TCM.

Tras llevar a cabo nuestro ensayo, identificamos cerca de 100 compuestos inhibitorios, algunos de los cuales ya habían sido descritos como antifúngicos frente a *C. neoformans*. Se encontraron alrededor de 60 compuestos con actividad frente a este hongo que no habían sido previamente descritos, por lo que se consideró que inhibían de forma selectiva el desarrollo de las células titanicas. Se obtuvieron una gran diversidad de compuestos de distintas clases terapéuticas y con múltiples usos, confirmando que la formación de las células titanicas no depende de un solo factor, sino que se basa en la inducción de múltiples mecanismos moleculares y rutas de señalización que posiblemente se solapen (Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018).

Para eliminar la posibilidad de que el efecto inhibitorio de estos compuestos se debiera a un efecto fungicida, seleccionamos 10 compuestos y evaluamos su actividad en detalle mediante curvas de dosis-respuesta y ensayos de muerte celular. De esta manera, confirmamos que todos los compuestos seleccionados (isotretinoína, ácido retinoico, mitoxantrona, pentamidina, alexidina, clioquinol, metirapona, sertralina, ebselen y antimicina A) poseían un efecto inhibitorio selectivo de la titanización a concentraciones en las que la viabilidad celular no se veía afectada, por lo que consideramos que la caracterización detallada de su mecanismo de acción podría revelar nuevos mecanismos involucrados en la formación de células titanicas.

La alexidina es uno de los compuestos que inhibió la titanización de manera más efectiva. Este compuesto ya se ha obtenido previamente en ensayos de reposicionamiento de fármacos con especies de *Candida* spp. y *Aspergillus* spp., pero no frente a *Cryptococcus* spp. (Mamouei *et al.*, 2018). Es un agente antibacteriano que inhibe la producción extracelular de polisacárido y disminuye la adhesión de los microorganismos. *Cryptococcus neoformans* secreta polisacárido capsular al medio (Cherniak *et al.*, 1980; Goldman *et al.*, 1994), por lo que es posible que la alexidina interfiera con esta expulsión e impida la titanización. Además, tiene como diana una fosfatasa mitocondrial (PTPMT1) (Doughty-Shenton *et al.*, 2010), pudiendo afectar a la mitocondria e intervenir así en la formación de células titanes. También inhibe la acción de otras fosfolipasas secretadas (Ganendren *et al.*, 2004).

El clioquinol se comercializó inicialmente como un agente antimicrobiano para tratar distintas enfermedades intestinales, pero en los años 70 se eliminó su formulación oral del mercado ya que se asoció a un síndrome neurodegenerativo, aunque se continuó con su uso tópico. Recientemente se está estudiando como terapia potencial frente enfermedades como Alzheimer o Parkinson (Pippi *et al.*, 2019), y ha mostrado actividad frente a diferentes hongos (You *et al.*, 2018; Pippi *et al.*, 2018; De Chaves *et al.*, 2020). Inhibe la transición morfológica de levaduras a hifas en *C. albicans* y controla la homeostasis de metales como zinc, hierro y cobre (You *et al.*, 2020), además de ser capaz de afectar a la pared celular (Pippi *et al.*, 2019). También puede interferir con la duración de diferentes partes del ciclo celular (Yan *et al.*, 2018), por lo que altera el crecimiento celular y podría alterar de esta manera la formación de las células titanes.

El ebselen es un antiinflamatorio que contiene selenio en su estructura. Se encuentra en ensayos clínicos frente a un amplio número de patologías, como por ejemplo artritis, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, trastorno bipolar, cáncer, e incluso SARS-CoV-2 (Singh *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2023). Presenta actividad antibacteriana (Thangamani *et al.*, 2015; Gustafsson *et al.*, 2016), la cual puede estar relacionada con la inhibición de la síntesis de proteínas, y en un modelo de ratones con Alzheimer se ha visto que puede ejercer su efecto terapéutico protegiendo la función mitocondrial (Li *et al.*, 2022). Posee múltiples mecanismos de acción, y ha demostrado comportarse como un compuesto antioxidante, reduciendo el número de especies reactivas de oxígeno (Azad and Tomar, 2014; Noguchi, 2016; Wang *et al.*, 2020). Recientemente ha mostrado un efecto fungicida frente a distintos hongos, entre ellos *Cryptococcus* spp. y *Candida* spp. (Thangamani *et al.*, 2017; Wall *et al.*, 2018; De Oliveira *et al.*, 2019).

La mitoxantrona es un anticancerígeno que inhibe la topoisomerasa II, enzima que se encuentra en muchos hongos y que permite el desdoblamiento del ADN para que este pueda usarse en la replicación y la transcripción (Steverding *et al.*, 2012). Provoca un arresto en el ciclo celular (Khan *et al.*, 2010), y dado que las células titanes se forman por un proceso de endorreduplicación, puede que esta alteración en el ciclo celular sea el mecanismo por el cual este compuesto inhibe la titanización. Además, inhibe selectivamente el transportador de calcio mitocondrial (MCU) (Arduino *et al.*, 2017), que tiene un homólogo en *C. neoformans* (CNAG_00107) (Prole and Taylor, 2012), pudiendo indicar que la mitoxantrona podría ejercer su efecto de inhibición de células titanes a través de una alteración en la mitocondria.

La pentamidina ha sido utilizada como antiparasitario y antifúngico (Del Poeta *et al.*, 1998), e interfiere en la replicación del ADN. Puede inhibir las topoisomerasas mitocondriales y reducir las concentraciones de ATP en *Pneumocystis carinii* y *Trypanosoma* spp. (Shapiro and Englund, 1990; Dykstra and Tidwell, 1991; Cushion *et al.*, 1997), y recientemente se ha identificado en distintos estudios frente a especies del complejo *C. neoformans* (Ortiz *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2022). De Oliveira *et al.* describieron que este compuesto reduce significativamente la cápsula de *Cryptococcus* spp., mientras que Ortiz *et al.* mostraron que inhibe la germinación de las esporas. Además, este compuesto ha mostrado disminuir las especies reactivas de nitrógeno producidas por el IFN- γ durante distintos procesos inflamatorios (Chattopadhyay *et al.*, 2023), mecanismo mediante el cual podría estar inhibiendo la formación de células titanes.

La metirapona se usa en endocrinología e inhibe la enzima 11 β -hidroxilasa (Rossi, 1983; Daniel *et al.*, 2015), una enzima que se encuentra en el interior de la membrana mitocondrial y que pertenece al grupo de enzimas de citocromo P450, encargándose de la biosíntesis del cortisol.

La antimicina A es un antibiótico que se aisló por primera vez de *Streptomyces* spp. y tiene propiedades antifúngicas (Labs *et al.*, 2016). Es un inhibidor del complejo III de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, lo que sugiere que la titanización requiere el funcionamiento de la cadena respiratoria.

La sertralina es un antidepresivo perteneciente al grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, y ha mostrado gran actividad frente a los hongos, en especial hacia *C. neoformans*. Interviene en la síntesis de proteínas, alterando su traducción (Zhai *et al.*, 2012), por lo que podría interrumpir la síntesis de proteínas necesarias para la titanización. Además, tiene como diana la membrana lipídica (Rainey *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012) e induce la formación de acúmulos de lípidos (Breuer *et al.*, 2022).

El ácido retinoico es un compuesto queratolítico usado en dermatología utilizado para tratar problemas de la piel, igual que la isotretinoína. Ambos se encuentran dentro del grupo de los retinoides, siendo análogos de la vitamina A (Cosio *et al.*, 2021). Actúan a nivel de la regulación génica, uniéndose a proteínas que se unen al ADN y modifican así la expresión. Ambos son antioxidantes, y se ha demostrado el gran efecto que tienen frente a distintos hongos tanto *in vitro* como *in vivo* (Cosio *et al.*, 2021), pudiendo ser potentes candidatos para una nueva terapia antifúngica.

Entre estos compuestos seleccionados llamó la atención que se encontraron varios que presentaron actividad antioxidante, y otros que, de alguna manera, ejercían un efecto en la mitocondria. Esto fue corroborado al ensayar otros antioxidantes no incluidos en la colección de Prestwick, como el ácido ascórbico y la N-acetilcisteína, que causaron una inhibición del crecimiento de las levaduras similar a los compuestos mencionados. Por ello, hipotetizamos que la formación de células titanes podía requerir una acumulación endógena de radicales libres. En este sentido, y de acuerdo con esta hipótesis, observamos una mayor acumulación de ROS en las células durante el proceso de titanización frente a los cultivos incubados en condiciones no inductoras o en cultivos TCM en presencia del antioxidante ácido retinoico.

Los radicales libres se forman mayoritariamente en la mitocondria como subproductos de la cadena transportadora de electrones (Warris and Ballou, 2019), por lo que argumentamos

que durante la titanización podría haber un aumento significativo de la actividad mitocondrial. Para investigar este aspecto, realizamos diferentes abordajes paralelos. En primer lugar, y mediante tinción con MitoTracker, observamos que la formación de células titanes está asociada a un cambio en la organización mitocondrial, apareciendo un patrón tubular. El patrón tubular de la mitocondria se obtiene tras la fusión de este orgánulo y está asociado con una mayor resistencia a estrés y virulencia (Chan, 2006; Ma *et al.*, 2009; Chang and Doering, 2018). De acuerdo con estos resultados, también observamos que durante la titanización hay un aumento de la respiración, del potencial de membrana mitocondrial, del tamaño de las mitocondrias y del número de crestas mitocondriales. La acumulación de ROS ocurrió antes de observar cambios en el patrón de organización mitocondrial, sugiriendo que las ROS son una señal temprana para iniciar la formación de las células titanes.

Es razonable pensar que el drástico aumento de tamaño que se produce en las células titanes implica un incremento significativo en la síntesis de componentes celulares. Sin embargo, estas células contienen una vacuola de gran tamaño que ocupa gran parte del volumen citoplasmático (Zaragoza *et al.*, 2010), postulándose que la titanización no requiere una síntesis masiva de los componentes citoplasmáticos (Veses *et al.*, 2008). Nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis, ya que el aumento de actividad mitocondrial no parece ser debido a un incremento significativo en el número de mitocondrias. Sin embargo, el simple aumento del volumen de la pared celular y de la cápsula que sufren las células titanes (Zaragoza *et al.*, 2010) precisa de la síntesis de una gran cantidad de material *de novo*, lo que creemos que requiere un aumento de la actividad mitocondrial y de la disponibilidad energética de la célula.

También es posible pensar que la limitación de nutrientes del medio TCM podría estar induciendo una respuesta de estrés, con la consiguiente acumulación de radicales libres. Una gran cantidad de hongos llevan a cabo cambios morfológicos, por ejemplo formando hifas o pseudohifas, y estas transiciones normalmente aparecen como respuesta a una situación de estrés provocada por distintos estímulos, como un aumento de temperatura, presencia de suero o limitación de nutrientes (revisado en (Trevijano-Contador *et al.*, 2016)). De esta manera, la formación de las células titanes supone un cambio morfológico en *C. neoformans* inducido por el estrés que le genera el ambiente que le rodea.

En las células tiene que haber un equilibrio entre la síntesis de radicales libres y su detoxificación, obteniendo una concentración de radicales libres adecuada para el desarrollo de la célula. Los radicales libres poseen múltiples funciones según la concentración a la que se encuentren (Warris and Ballou, 2019). A concentraciones elevadas pueden producir daño celular en ADN, lípidos o proteínas, provocando procesos de apoptosis. Sin embargo, también están involucrados en distintas rutas de señalización (D'Autréaux and Toledano, 2007; Finkel, 2011; Farrugia and Balzan, 2012), participando en la homeostasis y proporcionando efectos beneficiosos. Pueden inducir autofagia (Azad *et al.*, 2009), proceso que induce la célula para obtener energía de otros compartimentos del hongo. La hipótesis de que la autofagia pueda ser necesaria para la formación de células titanes supone una nueva línea de trabajo que precisará ser investigada en detalle en el futuro.

Los resultados obtenidos en esta sección están en concordancia con una publicación reciente que demuestra que la titanización se inhibe en presencia del compuesto antioxidante MnTBAP (Zhou *et al.*, 2021), un compuesto mimético de la enzima superóxido dismutasa que

convierte el superóxido endógeno en H₂O₂, que es posteriormente eliminado por las catalasas fúngicas. Estos resultados confirman la importancia de las especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno durante la formación de células titanes.

Además, creemos que los resultados obtenidos en esta parte del trabajo pueden tener una significancia biológica *in vivo*. Durante la infección por *C. neoformans*, el hospedador induce múltiples mecanismos para defenderse, entre ellos la producción de ROS por las células fagocíticas. Las células titanes tienen una mayor resistencia a factores de estrés (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010), por lo que es posible que esta producción de ROS inicial tras la infección induzca una ruta de señalización que produzca un aumento del tamaño de las levaduras, generando así mayor resistencia en el nuevo ambiente.

7.4. Integración de los resultados obtenidos en las distintas secciones

Durante la realización de esta tesis doctoral hemos llevado a cabo varias estrategias que han revelado nuevos elementos activadores y represores de la formación de células titanes, y aportamos las primeras evidencias de la influencia de la luz en la morfogénesis de *C. neoformans*. Además de las mostradas en este trabajo, hasta el momento se han descrito distintas rutas necesarias para la formación de las células titanes, siendo una de las más importantes la regulada por la ruta del AMPc y la PKA (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Okagaki *et al.*, 2011; Hommel *et al.*, 2018), aunque también se han descrito otras, como la ruta de la PKC (Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan que el aumento de radicales libres como consecuencia de un incremento en la actividad mitocondrial pueda suponer una señal de estrés que resulte en una respuesta de adaptación, con la consiguiente formación de células titanes. Por lo tanto, será necesario investigar en el futuro la posible relación del balance oxidativo de la célula y dichas rutas durante la titanización. Un aspecto a tener en cuenta en nuestro trabajo es que los experimentos de inhibición farmacológica se realizaron usando una variante de la cepa H99 (H99-3), que posteriormente supimos que tenía la alteración del gen *BWC2*. Por ello, podría argumentarse que los efectos inhibidores de los antioxidantes son específicos en esta cepa. Sin embargo, fuimos capaces de demostrar que el ácido retinoico también inhibe la titanización en otros fondos genéticos y especies, como por ejemplo en la cepa B3501 de *C. deneoformans* y en la cepa R265 de *C. deuterogattii*.

El complejo transcripcional Bwc1/Bwc2 regula de manera negativa la formación de células titanes, lo cual abre múltiples preguntas. Aunque desconocemos la manera exacta mediante la cual estas proteínas participan en la titanización, mediante un abordaje transcriptómico hemos identificado proteínas de función desconocida que podrían ser posibles efectores y que serán objeto de estudio en futuras investigaciones. Es posible que exista una interrelación entre los genes regulados por Bwc1/Bwc2 y el metabolismo oxidativo de la célula. En este sentido, también hemos identificado que proteínas involucradas en el metabolismo del glutatión, concretamente la glutatión S-transferasa (GST), están reguladas por este complejo transcripcional. Las GSTs participan en múltiples procesos que protegen a la célula frente al estrés, y existen múltiples isoformas con diferente localización, por lo que el aumento de expresión en el mutante *bwc2* posiblemente puede ser un mecanismo compensatorio en respuesta al aumento de factores de estrés que inducen la titanización. Por ello, será

necesario profundizar si mutaciones en el complejo Bwc1/Bwc2 suponen un cambio en el balance oxidativo y en la producción de ROS.

El hecho de que la regulación génica de Bwc1/Bwc2 dependa de la luz también abre futuras perspectivas en el campo de la micología. En el contexto de esta tesis, hay que considerar que la exposición prolongada a la luz utilizada (azul) puede tener otros efectos, como acumulación de ROS o cambios en la temperatura intracelular, entre otros. Aun así, proponemos dos posibles mecanismos mediante los cuales las ROS y la luz podrían estar influyendo en la formación de células titanes (Figura 87 y Figura 88, respectivamente).

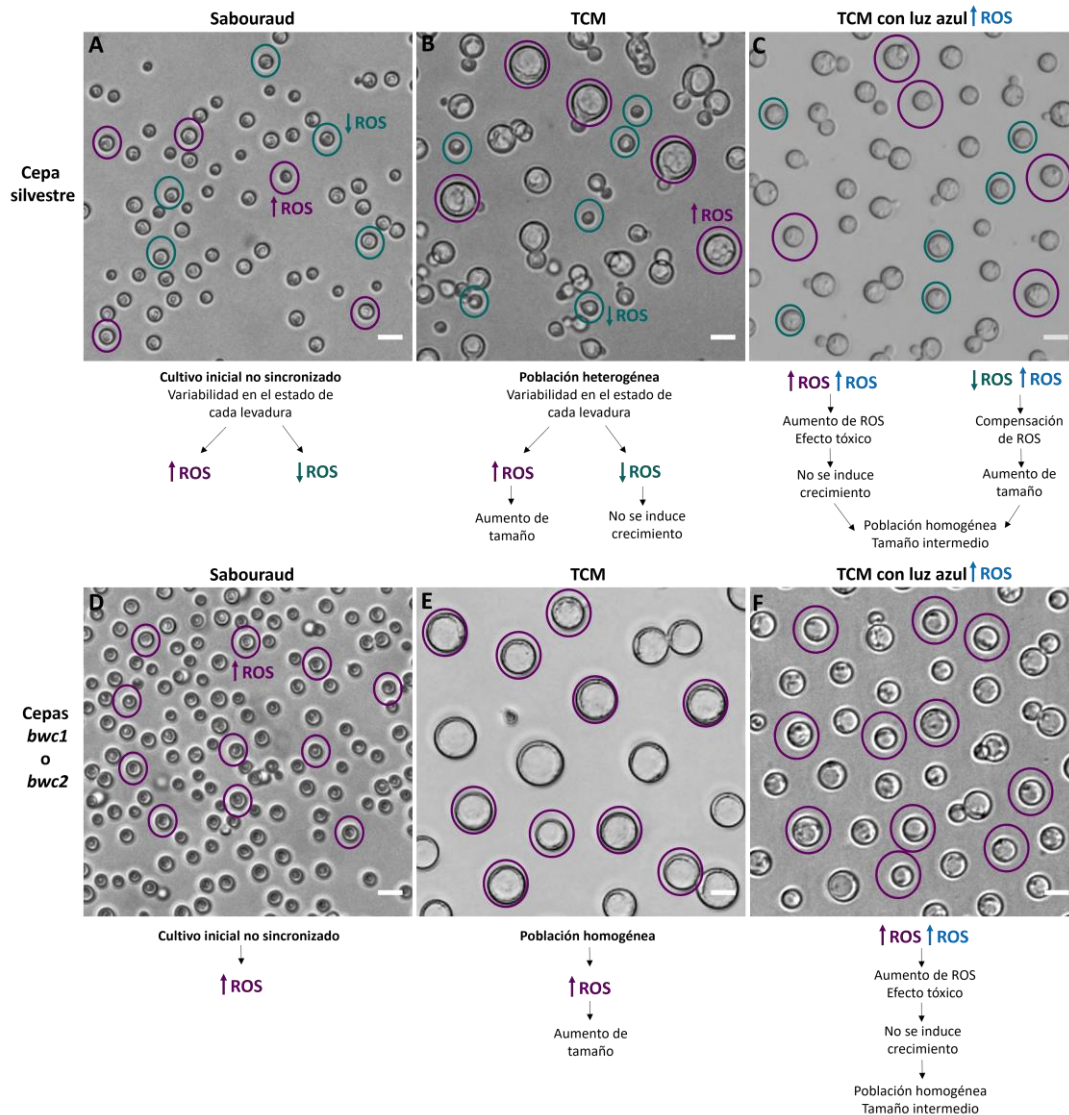


Figura 87. Hipótesis sobre la titanización mediada por ROS. Panel superior, cepa silvestre. A) En un cultivo inicial de Sabouraud la población se encuentra no sincronizada, con levaduras en distintos estados, presentando algunas mayor contenido en ROS que otras. B) Al incubar las células en TCM se induce la titanización, que requiere una acumulación de ROS, por lo que las células que tenían mayores cantidades de estas moléculas crecerán, mientras que las que contenían menos mantendrán el mismo tamaño. C) La presencia de una fuente lumínica podría generar ROS, provocando un efecto tóxico en las células con mayor acumulación inicial de estas especies e inhibiendo su crecimiento; mientras que en levaduras que tenían una baja acumulación de ROS inicial, inducirán el crecimiento. Panel inferior, cepas mutantes *bwc1* o *bwc2*. D) Debido a la mutación en dichas cepas, la población es más homogénea y todas las levaduras producen mayor cantidad de ROS de forma natural. E) Al inducir las células en TCM, la gran mayoría de células aumenta su tamaño, formando células titanes. F) En presencia de luz azul, se generan ROS que ejercen un efecto tóxico en las levaduras, impidiendo el crecimiento. Color morado, alta acumulación de ROS; color verde, baja acumulación de ROS; color azul, ROS generadas por una fuente de luz azul.

Cuando las células se incuban en medio no inductor (Sabouraud), todas las levaduras tienen el mismo tamaño, sin embargo, cuando se incuban en TCM, se forma una población heterogénea con células de distintos tamaños. Creemos que cada célula individual podría tener una acumulación de ROS distinta según su estado metabólico, lo que supondría una señal para cambiar de tamaño. Así, levaduras con menor capacidad de acumular ROS no aumentarían de tamaño de manera significativa tras su inducción en TCM. En cambio, aquellas células con mayor capacidad de producir y acumular radicales libres tendrían también mayor capacidad de formar células titanes. En el caso de los mutantes *bwc1* y *bwc2*, la población generada tras su inducción en TCM es mayoritariamente de células titanes, por lo que dichas mutaciones estarían generando una acumulación de ROS endógenas en todas las células del cultivo. En esta hipótesis, una fuente lumínica generaría ROS, y un exceso de estas moléculas podría llevar a un efecto tóxico. Esto haría que las células con mayor acumulación de ROS tuvieran una hiperacumulación de estos compuestos, generando toxicidad y provocando que las células no consiguieran alcanzar el tamaño que consideramos como titán. Sin embargo, en la población celular que acumula menor cantidad de ROS, la luz provocaría un aumento de estos compuestos, señal que induciría su crecimiento. Este sería un mecanismo de acción de la luz independiente del complejo Bwc1/Bwc2, y debido a una acumulación de ROS (Figura 87).

Otra posible hipótesis es que la luz ejerza su efecto mediante un mecanismo dependiente del complejo Bwc1/Bwc2 (Figura 88). La presencia de luz podría cambiar la estructura del complejo white collar, pudiendo activar la expresión de genes activadores o reprimir la expresión de genes represores de la titanización. Así, en la oscuridad, en ausencia de Bwc1 o Bwc2, no se produciría dicha represión y los mutantes *bwc1* y *bwc2* aumentarían su capacidad de titanizar (lo que coincide con el fenotipo observado). Por el contrario, en presencia de luz, el complejo white collar Bwc1/Bwc2 cambiaría su conformación, evitándose la represión de estos genes e induciendo el crecimiento celular. Los niveles de expresión de *BWC1* y *BWC2* podrían ser diferentes en cada célula, lo que podría explicar la heterogeneidad de la población.

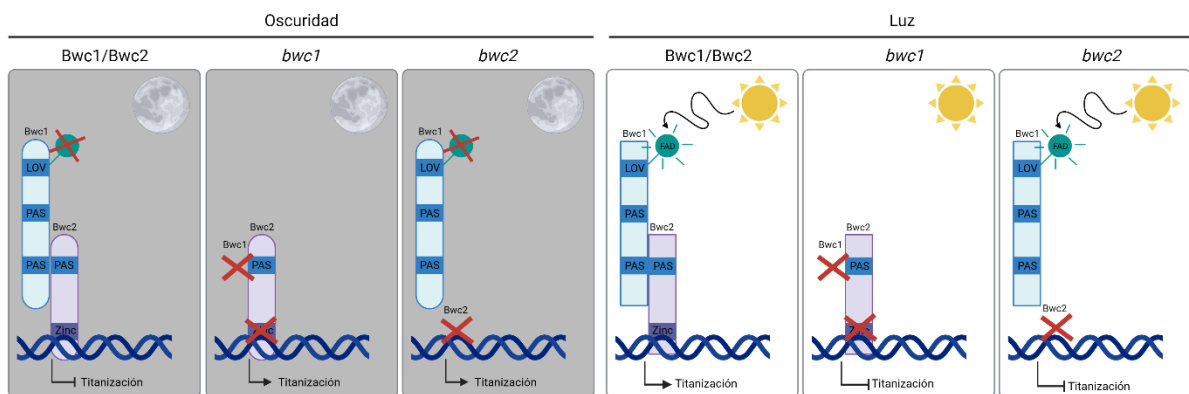


Figura 88. Hipótesis sobre la titanización mediada por luz a través del complejo white collar. En oscuridad (panel izquierdo), el complejo white collar, con sus dos subunidades Bwc1 y Bwc2, se une al ADN, llevando a cabo la transcripción de genes encargados de reprimir la titanización. En ausencia de cualquiera de las subunidades (*bwc1* o *bwc2*), la transcripción no se lleva a cabo y se induce la titanización. En presencia de una fuente de luz (panel derecho), el complejo white collar cambia de conformación y lleva a cabo la transcripción de genes involucrados en titanización. Por el contrario, en ausencia de cualquiera de las proteínas del complejo (mutantes *bwc1* o *bwc2*), no se lleva a cabo la transcripción, inhibiéndose el crecimiento celular y la titanización. Figura creada con BioRender.com.

Ambas teorías podrían ser válidas y, de hecho, es posible que ambos mecanismos ocurran de manera simultánea. El hecho de que los mutantes *bwc1* y *bwc2* generen una población celular homogénea al inducir su crecimiento en TCM lleva a pensar que la hipótesis más correcta podría ser la segunda. Sin embargo, se dispone de resultados preliminares que indican que la luz tiene un efecto inhibitorio en la cepa silvestre B3501, que también tiene una alta capacidad de titanización, al igual que los mutantes *bwc1/bwc2*, lo cual podría apoyar la primera hipótesis. Por todo ello, no es descartable que ambos mecanismos puedan ocurrir simultáneamente, sugiriendo que la titanización es un proceso multifactorial en el que participan múltiples señales y mecanismos moleculares (Dambuza *et al.*, 2018; Hommel *et al.*, 2018; Trevijano-Contador *et al.*, 2018). Se precisarán futuros estudios para confirmar el mecanismo de acción de la luz y profundizar en los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral.

En conclusión, este trabajo sugiere que la producción de ROS juega un papel esencial en la señalización involucrada en la formación de células titanes y que cambios en el balance oxidativo (como los producidos por un aumento de la actividad mitocondrial, cambios en la expresión de genes regulados por *Bwc2* o incluso la mera exposición a la luz) tienen un impacto en la capacidad de aumentar el tamaño celular como respuesta al estrés. En general, nuestros resultados resaltan la complejidad de las rutas que regulan este proceso, y se precisan nuevos abordajes para entender como estos elementos se integran, y en particular, como resultan en cambios en el principal proceso que determina el aumento de tamaño celular, que es la regulación del ciclo celular. Se ha descrito que las células titanes *in vivo* son poliploides y que se forman por endorreducción (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010). En nuestras condiciones *in vitro*, estudios previos han mostrado que no hay un aumento significativo en el contenido de ADN (Trevijano-Contador *et al.*, 2018), y se cree que el aumento de tamaño se produce por una elongación o parada en fases G_1 o G_2 del ciclo celular (Altamirano *et al.*, 2021). Por todo ello, consideramos que otra de las líneas prioritarias a abordar en el futuro será elucidar como los mediadores descritos regulan los principales efectores que determinan el tamaño celular (ciclina, CDK, etc).

Por último, la posibilidad de inhibir la formación de estas células supone una estrategia con potencial terapéutico, y la profundización en el estudio de los compuestos identificados en este trabajo podría dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a luchar contra la criptococosis. Las células titanes son difíciles de eliminar de los pulmones debido a su gran tamaño y ofrecen una ventaja adaptativa para *C. neoformans*, por lo que fármacos que causen la inhibición de su formación podrían aumentar la actividad de los antifúngicos y disminuir el riesgo a sufrir enfermedades graves.

8. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La microevolución *in vitro* que sufre la cepa de referencia H99 de *C. neoformans* produce variantes con diferente capacidad de titanización y virulencia.
2. La mayor capacidad de formar células titanes se asocia a una menor virulencia en modelos animales.
3. El complejo transcripcional Bwc1/Bwc2 es un represor de la formación de células titanes.
4. Los genes *CNAG_05278*, *CNAG_05279*, *CNAG_04585*, *CNAG_03848* y *CNAG_00165* cambian su expresión durante la titanización a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción Bwc2.
5. El gen *CNAG_04756* codifica una proteína de función desconocida que actúa como un elemento inductor de la titanización.
6. La luz azul influye en la titanización de *C. neoformans*, presentando simultáneamente un efecto activador y represor del crecimiento celular en diferentes cepas y condiciones.
7. La titanización de *C. neoformans* requiere un aumento de la actividad mitocondrial y una acumulación de radicales libres.

CONCLUSIONS

1. *In vitro* microevolution of H99 *C. neoformans* reference strain has originated different variants with different titanization capacity and virulence.
2. The higher capacity to form titan cells is associated with a decreased virulence in animal models.
3. The transcriptional white collar complex Bwc1/Bwc2 is a titan cell repressor.
4. The *CNAG_05278*, *CNAG_05279*, *CNAG_04585*, *CNAG_03848* and *CNAG_00165* genes change their expression during titanization through a mechanism dependent on the transcription factor Bwc2.
5. The *CNAG_04756* gene encodes a protein of unknown function that acts as a titanization-inducing element.
6. Blue light influences the titanization process of *C. neoformans*, showing both an activating and repressing effect in different strains and conditions.
7. Titanization requires an increase of mitochondrial activity as well as an accumulation of free radicals.

9. Bibliografía

- Alanio, A. (2020) Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. *JCI* **130**: 3353–3360.
- Albuquerque, P., Nicola, A.M., Nieves, E., Paes, H.C., Williamson, P.R., Silva-Pereira, I., and Casadevall, A. (2013) Quorum Sensing-Mediated, Cell Density-Dependent Regulation of Growth and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* **5**: e00986-13.
- Ali, F., Alom, S., Ali, S.R., Kondoli, B., Sadhu, P., Borah, C., et al. (2023) Ebselen: A Review on its Synthesis, Derivatives, Anticancer Efficacy and Utility in Combating SARS-COV-2. *Mini Rev Med Chem* **14**.
- Almeida, F., Rodrigues, M.L., and Coelho, C. (2019) The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front Microbiol* **10**: 214.
- Almeida, F., Wolf, J.M., and Casadevall, A. (2015) Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **14**: 1173–1185.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R., and Heitman, J. (1997) *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein α subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* **23**: 3206–3217.
- Altamirano, S., Jackson, K.M., and Nielsen, K. (2020) The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. *Biosci Rep* **40**: BSR20190337.
- Altamirano, S., Li, Z., Fu, M.S., Ding, M., Fulton, S.R., Yoder, J.M., et al. (2021) The Cyclin Cln1 Controls Polyploid Titan Cell Formation following a Stress-Induced G₂ Arrest in *Cryptococcus*. *mBio* **12**: e0250921.
- Alvarez, M., and Casadevall, A. (2006) Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. *Curr Biol* **16**: 2161–2165.
- Alvarez, M., and Casadevall, A. (2007) Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol* **8**: 16.
- Aminnejad, M., Diaz, M., Arabatzis, M., Castañeda, E., Lazera, M., Velegriaki, A., et al. (2012) Identification of Novel Hybrids Between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia* **173**: 337–346.
- Apidianakis, Y., Rahme, L.G., Heitman, J., Ausubel, F.M., Calderwood, S.B., and Mylonakis, E. (2004) Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and Role of the Innate Immune Response. *Eukaryot Cell* **3**: 413–419.
- Arastehfar, A., Lass-Flörl, C., Garcia-Rubio, R., Daneshnia, F., Ilkit, M., Boekhout, T., et al. (2020) The Quiet and Underappreciated Rise of Drug-Resistant Invasive Fungal Pathogens. *J Fungi* **6**: 138.
- Arastehfar, A., Marcet-Houben, M., Daneshnia, F., Taj-Aldeen, S.J., Batra, D., Lockhart, S.R., et al. (2021) Comparative genomic analysis of clinical *Candida glabrata* isolates identifies multiple polymorphic loci that can improve existing multilocus sequence typing strategy. *Stud Mycol* **100**: 100133–100133.
- Arduino, D.M., Wettmarshausen, J., Vais, H., Navas-Navarro, P., Cheng, Y., Leimpek, A., et al. (2017) Systematic Identification of MCU Modulators by Orthogonal Interspecies Chemical Screening. *Mol Cell* **67**: 711-723.e7.
- Arras, S.D.M., Chitty, J.L., Blake, K.L., Schulz, B.L., and Fraser, J.A. (2015) A Genomic Safe Haven for Mutant Complementation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* **10**: e0122916.

- Arras, S.D.M., Ormerod, K.L., Erpf, P.E., Espinosa, M.I., Carpenter, A.C., Blundell, R.D., *et al.* (2017) Convergent microevolution of *Cryptococcus neoformans* hypervirulence in the laboratory and the clinic. *Sci Rep* **7**: 17918.
- Attarian, R. (2016) Analysis of the Roles of a Monothiol Glutaredoxin and Glutathione Synthetase in the Virulence of the AIDS-Associated Pathogen *Cryptococcus neoformans*. Doctoral dissertation. University of British Columbia.
- Azad, G.K., and Tomar, R.S. (2014) Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep* **41**: 4865–4879.
- Azad, M.B., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2009) Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment. *Antioxid Redox Signal* **11**: 777–790.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**: 57–69.
- Ballario, P., and Macino, G. (1997) White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol* **5**: 458–462.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., and Macino, G. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**: 1650–1657.
- Benedict, K., Jackson, B.R., Chiller, T., and Beer, K.D. (2019) Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clin Infect Dis* **68**: 1791–1797.
- Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., and Howard, D.H. (1977) Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* **105**: 582–586.
- Bicanic, T., Muzoora, C., Brouwer, A.E., Meintjes, G., Longley, N., Taseera, K., *et al.* (2009) Independent Association between Rate of Clearance of Infection and Clinical Outcome of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Analysis of a Combined Cohort of 262 Patients. *Clin Infect Dis* **49**: 702–709.
- Blackwell, M. (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* **98**: 426–438.
- Blasi, E., Brozzetti, A., Francisci, D., Neglia, R., Cardinali, G., Bistoni, F., *et al.* (2001) Evidence of Microevolution in a Clinical Case of Recurrent *Cryptococcus neoformans* Meningoencephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 535–543.
- Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J.W., Hop, W.C.J., Abeln, E.C.A., *et al.* (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **147**: 891–907.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R., and Denning, D. (2017) Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi* **3**: 57.
- Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E.E., Diaz, M.R., Spanjaard, L., Dromer, F., *et al.* (2006) Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res* **6**: 599–607.
- Breuer, M.R., Dasgupta, A., Vasselli, J.G., Lin, X., Shaw, B.D., and Sachs, M.S. (2022) The Antidepressant Sertraline Induces the Formation of Supersized Lipid Droplets in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Fungi* **8**: 642.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* **4**: 165rv13.

- Brunke, S., Mogavero, S., Kasper, L., and Hube, B. (2016) Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology* **32**: 89–95.
- Busse, O. (1894) Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Zuchtung [About parasitic cell enclosures and their cultivation]. *Zentralbl Bakteriol* **16**: 175–180.
- Butts, A., DiDone, L., Koselny, K., Baxter, B.K., Chabrier-Rosello, Y., Wellington, M., and Krysan, D.J. (2013) A Repurposing Approach Identifies Off-Patent Drugs with Fungicidal Cryptococcal Activity, a Common Structural Chemotype, and Pharmacological Properties Relevant to the Treatment of Cryptococcosis. *Eukaryot Cell* **12**: 278–287.
- Cannon, G.J., and Swanson, J.A. (1992) The macrophage capacity for phagocytosis. *J Cell Sci* **101**: 907–913.
- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Gómez-Molero, E., Angoulvant, A., Bader, O., Fairhead, C., and Gabaldón, T. (2019) Genome Comparisons of *Candida glabrata* Serial Clinical Isolates Reveal Patterns of Genetic Variation in Infecting Clonal Populations. *Front Microbiol* **10**: 112.
- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Pegueroles, C., Gómez-Molero, E., Saus, E., Iraola-Guzmán, S., *et al.* (2018) Patterns of Genomic Variation in the Opportunistic Pathogen *Candida glabrata* Suggest the Existence of Mating and a Secondary Association with Humans. *Curr Biol* **28**: 15–27.e7.
- Casadevall, A. (2012) Amoeba Provide Insight into the Origin of Virulence in Pathogenic Fungi. *Adv Exp Med Biol* **710**: 1–10.
- Casadevall, A. (2020) Climate change brings the specter of new infectious diseases. *J Clin Invest* **130**: 553–555.
- Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R.J.B., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., and Wear, M.P. (2019) The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence* **10**: 822–831.
- Casadevall, A., DeShaw, M., Fan, M., Dromer, F., Kozel, T.R., and Pirofski, L.A. (1994) Molecular and idiotypic analysis of antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infect Immun* **62**: 3864–3872.
- Casadevall, A., Mukherjee, J., Devi, S.J.N., Schneerson, R., Robbins, J.B., and Scharff, M.D. (1992a) Antibodies Elicited by a *Cryptococcus neoformans*-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Have the Same Specificity as Those Elicited in Infection. *J Infect Dis* **165**: 1086–1093.
- Casadevall, A., Mukherjee, J., and Scharff, M.D. (1992b) Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods* **154**: 27–35.
- Casadevall, A., and Perfect, J.R. (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM Press., Washington DC.
- Casadevall, A., and Pirofski, L. (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **1**: 17–24.
- Casadevall, A., and Pirofski, L. (2015) What Is a Host? Incorporating the Microbiota into the Damage-Response Framework. *Infect Immun* **83**: 2–7.
- Castelli, R.F., Pereira, A., Honorato, L., Valdez, A., De Oliveira, H.C., Bazioli, J.M., *et al.* (2022) Extracellular Vesicle Formation in *Cryptococcus deuterogattii* Impacts Fungal Virulence and Requires the *NOP16* Gene. *Infect Immun* **90**: e00232-22.
- Chan, D.C. (2006) Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell* **125**: 1241–1252.

- Chang, A.L., and Doering, T.L. (2018) Maintenance of Mitochondrial Morphology in *Cryptococcus neoformans* Is Critical for Stress Resistance and Virulence. *mBio* **9**: e01375-18.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J. (1994) Complementation of a Capsule-Deficient Mutation of *Cryptococcus neoformans* Restores Its Virulence. *Mol Cell Biol* **14**: 4912–9.
- Chang, Y.C., Stins, M.F., McCaffery, M.J., Miller, G.F., Pare, D.R., Dam, T., *et al.* (2004) Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infect Immun* **72**: 4985–95.
- Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F., and Dromer, F. (2009) Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 120–127.
- Chattopadhyay, A., Joseph, J.P., Jagdish, S., Chaudhuri, S., Ramteke, N.S., Karhale, A.K., *et al.* (2023) High throughput screening identifies auranofin and pentamidine as potent compounds that lower IFN- γ -induced Nitric Oxide and inflammatory responses in mice: DSS-induced colitis and *Salmonella typhimurium*-induced sepsis. *Int Immunopharmacol* **122**: 110569.
- Chen, J., Korostyshevsky, D., Lee, S., and Perlstein, E.O. (2012) Accumulation of an Antidepressant in Vesiculogenic Membranes of Yeast Cells Triggers Autophagy. *PLoS One* **7**: e34024.
- Chen, S.H.M., Stins, M.F., Huang, S.-H., Chen, Y.H., Kwon-Chung, K.J., Chang, Y., *et al.* (2003) *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**: 961–970.
- Chen, Y., Farrer, R.A., Giamberardino, C., Sakthikumar, S., Jones, A., Yang, T., *et al.* (2017) Microevolution of Serial Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. *mBio* **8**: e00166-17.
- Chen, Y., Shi, Z.W., Strickland, A.B., and Shi, M. (2022) *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The Battle between Host and Pathogen. *J Fungi* **8**: 1069.
- Cherniak, R., Jones, R.G., and Reiss, E. (1988) Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by ^{13}C -N.M.R. spectroscopy. *Carbohydr Res* **172**: 113–138.
- Cherniak, R., Reiss, E., Slodki, M.E., Plattner, R.D., and Blumer, S.O. (1980) Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Mol Immunol* **17**: 1025–1032.
- Cherniak, R., and Sundstrom, J.B. (1994) Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **62**: 1507–1512.
- Cherniak, R., Valafar, H., Morris, L.C., and Valafar, F. (1998) *Cryptococcus neoformans* Chemotyping by Quantitative Analysis of ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Glucuronoxylomannans with a Computer-Simulated Artificial Neural Network. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**: 146–159.
- Choi, J., Vogl, A.W., and Kronstad, J.W. (2012) Regulated expression of cyclic AMP-dependent protein kinase A reveals an influence on cell size and the secretion of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **85**: 700–715.
- Chrisman, C.J., Albuquerque, P., Guimaraes, A.J., Nieves, E., and Casadevall, A. (2011) Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. *PLoS Pathog* **7**: e1002047.

- Chun, C.D., Brown, J.C.S., and Madhani, H.D. (2011) A Major Role for Capsule-Independent Phagocytosis-Inhibitory Mechanisms in Mammalian Infection by *Cryptococcus neoformans*. *Cell Host Microbe* **9**: 243–251.
- Cordero, R.J.B., and Casadevall, A. (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev* **31**: 99–112.
- Cosio, T., Gaziano, R., Zuccari, G., Costanza, G., Grelli, S., Di Francesco, P., *et al.* (2021) Retinoids in Fungal Infections: From Bench to Bedside. *Pharmaceuticals* **14**: 962.
- Coste, A., Frérou, A., Raute, A., Couturaud, F., Morin, J., Egreteau, P.-Y., *et al.* (2021) The extent of aspergillosis in critically ill patients with severe influenza pneumonia: a multicenter cohort study. *Crit Care Med* **49**: 934–942.
- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C.A., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., *et al.* (2001) Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**: 166–175.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2000) Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect Immun* **68**: 443–448.
- Crabtree, J.N., Okagaki, L.H., Wiesner, D.L., Strain, A.K., Nielsen, J.N., and Nielsen, K. (2012) Titan Cell Production Enhances the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **80**: 3776–3785.
- Cruickshank, J.G., Cavill, R., and Jelbert, M. (1973) *Cryptococcus neoformans* of Unusual Morphology. *Appl Microbiol* **25**: 309–312.
- Cushion, M.T., Chen, F., and Kloefer, N. (1997) A cytotoxicity assay for evaluation of candidate anti-*Pneumocystis carinii* agents. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 379–384.
- Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., *et al.* (2007) Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS One* **2**: e457.
- Dambuza, I.M., Drake, T., Chapuis, A., Zhou, X., Correia, J., Taylor-Smith, L., *et al.* (2018) The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. *PLoS Pathog* **14**: e1006978.
- Daniel, E., Aylwin, S., Mustafa, O., Ball, S., Munir, A., Boelaert, K., *et al.* (2015) Effectiveness of Metyrapone in Treating Cushing's Syndrome: A Retrospective Multicenter Study in 195 Patients. *J Clin Endocrinol Metab* **100**: 4146–4154.
- D'Autréaux, B., and Toledano, M.B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 813–824.
- Davidson, R.C., Blankenship, J.R., Kraus, P.R., De Jesus Berrios, M., Hull, C.M., D'Souza, C., *et al.* (2002) A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology* **148**: 2607–2615.
- Davidson, R.C., Cruz, M.C., Sia, R.A.L., Allen, B., Alspaugh, J.A., and Heitman, J. (2000) Gene Disruption by Biolistic Transformation in Serotype D Strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* **29**: 38–48.
- Dbouk, N.H., Covington, M.B., Nguyen, K., and Chandrasekaran, S. (2019) Increase of reactive oxygen species contributes to growth inhibition by fluconazole in *Cryptococcus neoformans*. *BMC Microbiol* **19**: 243.

- De Chaves, M.A., Ferreira Do Amaral, T., Monteiro Da Silva Rodrigues Coutinho, N., Fernanda Andrzejewski Kaminski, T., Teixeira, M.L., Flavio Souza De Oliveira, L., *et al.* (2020) Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. *Mycoses* **63**: 1069–1082.
- De Oliveira, H.C., Castelli, R.F., Alves, L.R., Nosanchuk, J.D., Salama, E.A., Seleem, M., and Rodrigues, M.L. (2022) Identification of four compounds from the Pharmakon library with antifungal activity against *Candida auris* and species of *Cryptococcus*. *Med Mycol* **60**: myac033.
- De Oliveira, H.C., Monteiro, M.C., Rossi, S.A., Pemán, J., Ruiz-Gaitán, A., Mendes-Giannini, M.J.S., *et al.* (2019) Identification of Off-Patent Compounds That Present Antifungal Activity Against the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. *Front Cell Infect Microbiol* **9**: 83.
- Del Poeta, M., Schell, W.A., Dykstra, C.C., Jones, S., Tidwell, R.R., Czarny, A., *et al.* (1998) Structure-In Vitro Activity Relationships of Pentamidine Analogues and Dication-Substituted Bis-Benzimidazoles as New Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2495–2502.
- Denham, S.T., Verma, S., Reynolds, R.C., Worne, C.L., Daugherty, J.M., Lane, T.E., and Brown, J.C.S. (2018) Regulated Release of Cryptococcal Polysaccharide Drives Virulence and Suppresses Immune Cell Infiltration into the Central Nervous System. *Infect Immun* **86**: e00662-17.
- Denning, D.W. (2006) The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J* **27**: 615–626.
- Dixon, D.M., Polak, A., and Walsh, T.J. (1989) Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **57**: 1452–1456.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., *et al.* (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21.
- Doughty-Shenton, D., Joseph, J.D., Zhang, J., Pagliarini, D.J., Kim, Y., Lu, D., *et al.* (2010) Pharmacological Targeting of the Mitochondrial Phosphatase PTPMT1. *J Pharmacol Exp Ther* **333**: 584–592.
- Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., *et al.* (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12907–12911.
- Drgona, L., Khachatryan, A., Stephens, J., Charbonneau, C., Kantecki, M., Haider, S., and Barnes, R. (2014) Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**: 7–21.
- Dromer, F., Ronin, O., and Dupont, B. (1992) Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J Med Vet Mycol* **30**: 395–397.
- D'Souza, C.A., Alspaugh, J.A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2001) Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Controls Virulence of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* **21**: 3179–3191.
- Dykstra, C., and Tidwell, R. (1991) Inhibition of topoisomerases from *Pneumocystis carinii* by aromatic dicationic molecules. *J Protozool* **38**: 78S-81S.
- Dykstra, M.A., Friedman, L., and Murphy, J.W. (1977) Capsule size of *Cryptococcus neoformans*: control and relationship to virulence. *Infect Immun* **16**: 129–135.

- Dylağ, M., Colon-Reyes, R.J., and Kozubowski, L. (2020) Titan cell formation is unique to *Cryptococcus* species complex. *Virulence* **11**: 719–729.
- Dylağ, M., Colón-Reyes, R.J., Loperena-Álvarez, Y., and Kozubowski, L. (2022) Establishing Minimal Conditions Sufficient for the Development of Titan-like Cells in *Cryptococcus neoformans/gattii* Species Complex. *Pathogens* **11**: 768.
- Esher, S.K., Zaragoza, O., and Alspaugh, J.A. (2018) Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **113**: e180057.
- Evans, E.E. (1950) The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immunol* **64**: 423–30.
- Farrugia, G., and Balzan, R. (2012) Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Front Oncol* **2**: 26912.
- Feldmesser, M., Kress, Y., and Casadevall, A. (2001a) Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* **147**: 2355–2365.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., and Casadevall, A. (2000) *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. *Infect Immun* **68**: 4225–4237.
- Feldmesser, M., Tucker, S., and Casadevall, A. (2001b) Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **9**: 273–278.
- Fernandes, K.E., Brockway, A., Haverkamp, M., Cuomo, C.A., Van Ogtrop, F., Perfect, J.R., and Carter, D.A. (2018) Phenotypic Variability Correlates with Clinical Outcome in *Cryptococcus* Isolates Obtained from Botswanan HIV/AIDS Patients. *mBio* **9**: e02016-18.
- Fernandes, K.E., Fraser, J.A., and Carter, D.A. (2022) Lineages Derived from *Cryptococcus neoformans* Type Strain H99 Support a Link between the Capacity to Be Pleomorphic and Virulence. *mBio* **13**: e00283-22.
- Finkel, T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J cell Biol* **194**: 7–15.
- Franzot, S.P., Mukherjee, J., Cherniak, R., Chen, L.-C., Hamdan, J.S., and Casadevall, A. (1998) Microevolution of a Standard Strain of *Cryptococcus neoformans* Resulting in Differences in Virulence and Other Phenotypes. *Infect Immun* **66**: 89–97.
- Franzot, S.P., Salkin, I.F., and Casadevall, A. (1999) *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *J Clin Microbiol* **37**: 838–840.
- Frases, S., Nimrichter, L., Viana, N.B., Nakouzi, A., and Casadevall, A. (2008) *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide and Exopolysaccharide Fractions Manifest Physical, Chemical, and Antigenic Differences. *Eukaryot Cell* **7**: 319–327.
- Freitas, G.J.C., Ribeiro, N.Q., Gouveia-Eufrasio, L., Emidio, E.C.P., Guimarães, G.M., César, I.C., et al. (2023) Antimalarials and amphotericin B interact synergistically and are new options to treat cryptococcosis. *Int J Antimicrob Agents* **62**: 106807.
- Friedman and Schwartz (2019) Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi* **5**: 67.
- Fries, B.C., and Casadevall, A. (1998) Serial Isolates of *Cryptococcus neoformans* from Patients with AIDS Differ in Virulence for Mice. *J Infect Dis* **178**: 1761–1766.

- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002) White Collar-1, a Circadian Blue Light Photoreceptor, Binding to the *frequency* Promoter. *Science* **297**: 815–819.
- Fromtling, R.A., Shadomy, H.J., and Jacobson, E.S. (1982) Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **79**: 23–29.
- Ganendren, R., Widmer, F., Singhal, V., Wilson, C., Sorrell, T., and Wright, L. (2004) In Vitro Antifungal Activities of Inhibitors of Phospholipases from the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1561–1569.
- García-Barbazán, I., Trevijano-Contador, N., Rueda, C., Andrés, B. de, Pérez-Tavárez, R., Herrero-Fernández, I., *et al.* (2016) The formation of titan cells in *Cryptococcus neoformans* depends on the mouse strain and correlates with induction of Th2-type responses. *Cell Microbiol* **18**: 111–124.
- García-Barbazán, I., and Zaragoza, Ó. (2021) Polyenes and Amphotericin B. In *Encyclopedia of Mycology*. Zaragoza, Ó., and Casadevall, A. (eds). Elsevier, Oxford. pp. 421–426.
- García-Hermoso, D., Janbon, G., and Dromer, F. (1999) Epidemiological Evidence for Dormant *Cryptococcus neoformans* Infection. *J Clin Microbiol* **37**: 3204–3209.
- García-Rodas, R., Casadevall, A., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., and Zaragoza, O. (2011) *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. *PLoS One* **6**: e24485.
- García-Rodas, R., and Zaragoza, O. (2012) Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**: 147–161.
- García-Solache, M.A., and Casadevall, A. (2010) Global Warming Will Bring New Fungal Diseases for Mammals. *mBio* **1**: e00061-10.
- Gates, M.A., Thorkildson, P., and Kozel, T.R. (2004) Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* **52**: 13–24.
- Gaylord, E.A., Choy, H.L., and Doering, T.L. (2020) Dangerous Liaisons: Interactions of *Cryptococcus neoformans* with Host Phagocytes. *Pathogens* **9**: 891.
- Gazzoni, A.F., Severo, C.B., Barra, M.B., and Severo, L.C. (2009) Atypical Micromorphology and Uncommon Location of Cryptococcosis: A Histopathologic Study Using Special Histochemical Techniques (One Case Report). *Mycopathologia* **167**: 197–202.
- Gerik, K.J., Bhimireddy, S.R., Ryerse, J.S., Specht, C.A., and Lodge, J.K. (2008) *PKC1* Is Essential for Protection against both Oxidative and Nitrosative Stresses, Cell Integrity, and Normal Manifestation of Virulence Factors in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **7**: 1685–1698.
- Gerstein, A.C., Fu, M.S., Mukaremera, L., Li, Z., Ormerod, K.L., Fraser, J.A., *et al.* (2015) Polyploid Titan Cells Produce Haploid and Aneuploid Progeny To Promote Stress Adaptation. *mBio* **6**: e01340-15.
- Giamberardino, C.D., Schell, W.A., Tenor, J.L., Toffaletti, D.L., Palmucci, J.R., Marius, C., *et al.* (2022) Efficacy of APX2039 in a Rabbit Model of Cryptococcal Meningitis. *mBio* **13**: e02347-22.
- Giles, S.S., Dagenais, T.R.T., Botts, M.R., Keller, N.P., and Hull, C.M. (2009) Elucidating the Pathogenesis of Spores from the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 3491–3500.

Gintjee, T.J., Donnelley, M.A., and Thompson, G.R. (2020) Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *J Fungi* **6**: 28.

Girish Kumar, C.P., Prabu, D., Mitani, H., Mikami, Y., and Menon, T. (2010) Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. *Mycoses* **53**: 262–264.

Gold, J.A.W., Ahmad, F.B., Cisewski, J.A., Rossen, L.M., Montero, A.J., Benedict, K., *et al.* (2023) Increased Deaths From Fungal Infections During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic—National Vital Statistics System, United States, January 2020–December 2021. *Clin Infect Dis* **76**: e255–e262.

Goldman, D., Lee, S.C., and Casadevall, A. (1994) Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. *Infect Immun* **62**: 4755–4761.

Goldman, D.L., Khine, H., Abadi, J., Lindenberg, D.J., Pirofski, L., Niang, R., and Casadevall, A. (2001) Serologic Evidence for *Cryptococcus neoformans* Infection in Early Childhood. *Pediatrics* **107**: e66–e66.

Grahl, N., Shepardson, K.M., Chung, D., and Cramer, R.A. (2012) Hypoxia and Fungal Pathogenesis: To Air or Not To Air? *Eukaryot Cell* **11**: 560–570.

Granger, D.L., Perfect, J.R., and Durack, D.T. (1985) Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* **76**: 508–516.

Gustafsson, T.N., Osman, H., Werngren, J., Hoffner, S., Engman, L., and Holmgren, A. (2016) Ebselen and analogs as inhibitors of *Bacillus anthracis* thioredoxin reductase and bactericidal antibacterials targeting *Bacillus* species, *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* **1860**: 1265–1271.

Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., *et al.* (2015) Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* **78**: 16–48.

Hagen, F., Lumbsch, H.T., Arsic Arsenijevic, V., Badali, H., Bertout, S., Billmyre, R.B., *et al.* (2017) Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. *mSphere* **2**: e00238-17.

Hamed, M.F., Araújo, G.R.D.S., Munzen, M.E., Reguera-Gomez, M., Epstein, C., Lee, H.H., *et al.* (2023) Phospholipase B Is Critical for *Cryptococcus neoformans* Survival in the Central Nervous System. *mBio* **14**: e02640-22.

Havlickova, B., Czaika, V.A., and Friedrich, M. (2008) Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* **51**: 2–15.

He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002) White Collar-1, a DNA Binding Transcription Factor and a Light Sensor. *Science* **297**: 840–843.

Heinisch, J.J., and Rodicio, R. (2018) Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev* **42**: fux051.

Heiss, C., Stacey Klutts, J., Wang, Z., Doering, T.L., and Azadi, P. (2009) The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains β -d-glucuronic acid. *Carbohydr Res* **344**: 915–920.

Heitman, J. (2015) On the Discovery of TOR As the Target of Rapamycin. *PLoS Pathog* **11**: e1005245.

- Heitman, J., Kozel, T.R., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., and Casadevall, A. (eds) (2011) *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington DC.
- Heung, L.J., Luberto, C., Plowden, A., Hannun, Y.A., and Del Poeta, M. (2004) The Sphingolipid Pathway Regulates Pkc1 through the Formation of Diacylglycerol in *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* **279**: 21144–21153.
- Hoenigl, M., Seidel, D., Sprute, R., Cunha, C., Oliverio, M., Goldman, G.H., *et al.* (2022) COVID-19-associated fungal infections. *Nat Microbiol* **7**: 1127–1140.
- Hoenigl, M., Sprute, R., Egger, M., Arastehfar, A., Cornely, O.A., Krause, R., *et al.* (2021) The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs* **81**: 1703–1729.
- Homer, C.M., Summers, D.K., Goranov, A.I., Clarke, S.C., Wiesner, D.L., Diedrich, J.K., *et al.* (2016) Intracellular Action of a Secreted Peptide Required for Fungal Virulence. *Cell Host Microbe* **19**: 849–864.
- Hommel, B., Mukaremera, L., Cordero, R.J.B., Coelho, C., Desjardins, C.A., Sturny-Leclère, A., *et al.* (2018) Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. *PLoS Pathog* **14**: e1006982.
- Hu, G., Chen, S.H., Qiu, J., Bennett, J.E., Myers, T.G., and Williamson, P.R. (2014) Microevolution During Serial Mouse Passage Demonstrates *FRE3* as a Virulence Adaptation Gene in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* **5**: e00941-14.
- Huang, S.-H., Wu, C.-H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., Brown, R.J., and Jong, A. (2012) *Cryptococcus neoformans*-Derived Microvesicles Enhance the Pathogenesis of Fungal Brain Infection. *PLoS One* **7**: e48570.
- Idnurm, A., and Heitman, J. (2005) Light Controls Growth and Development via a Conserved Pathway in the Fungal Kingdom. *PLoS Biol* **3**: e95.
- Idnurm, A., and Heitman, J. (2010) Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi. *Microbiology* **156**: 2393–2407.
- Jackson, K.M., Ding, M., and Nielsen, K. (2023) Importance of Clinical Isolates in *Cryptococcus neoformans* Research. *J Fungi* **9**: 364.
- Janbon, G., Ormerod, K.L., Paulet, D., Byrnes, E.J., Yadav, V., Chatterjee, G., *et al.* (2014) Analysis of the Genome and Transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Reveals Complex RNA Expression and Microevolution Leading to Virulence Attenuation. *PLoS Genet* **10**: e1004261.
- Jongwutiwes, U., Kiertiburanakul, S., and Sungkanuparph, S. (2007) Impact of Antiretroviral Therapy on the Relapse of Cryptococcosis and Survival of HIV-Infected Patients with Cryptococcal Infection. *Curr HIV Res* **5**: 355–360.
- Juárez-López, D., and Schcolnik-Cabrera, A. (2021) Drug Repurposing: Considerations to Surpass While Re-directing Old Compounds for New Treatments. *Arch Med Res* **52**: 243–251.
- Kanvatirth, P., Jeeves, R.E., Bacon, J., Besra, G.S., and Alderwick, L.J. (2019) Utilisation of the Prestwick Chemical Library to identify drugs that inhibit the growth of mycobacteria. *PLoS One* **14**: e0213713.
- Kaplan, W., Bragg, S.L., Crane, S., and Ahearn, D.G. (1981) Serotyping *Cryptococcus neoformans* by immunofluorescence. *J Clin Microbiol* **14**: 313–317.

- Khan, S.N., Lal, S.K., Kumar, P., and Khan, A.U. (2010) Effect of mitoxantrone on proliferation dynamics and cell-cycle progression. *Biosci Rep* **30**: 375–381.
- Kidd, S.E., Bach, P.J., Hingston, A.O., Mak, S., Chow, Y., MacDougall, L., *et al.* (2007) *Cryptococcus gattii* Dispersal Mechanisms, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis* **13**: 51–57.
- Kim, K., Zilbermintz, L., and Martchenko, M. (2015) Repurposing FDA approved drugs against the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **14**: 32.
- Klengel, T., Liang, W.-J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J.R., *et al.* (2005) Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence. *Curr Biol* **15**: 2021–2026.
- Köhler, J.R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2017) Fungi that Infect Humans. *Microbiol Spectr* **5**: 5.3.08.
- Kondorosi, E., Roudier, F., and Gendreau, E. (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol* **3**: 488–492.
- Kozel, T., and Gotschlich, E. (1982) The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol* **129**: 1675–1680.
- Kozubowski, L., and Heitman, J. (2012) Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 78–94.
- Kwon-Chung, K.J. (1976) Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the Sexual State of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **68**: 821–833.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., and Rhodes, J.C. (1982a) Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**: 25–38.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., Wickes, B.L., Meyer, W., Cuomo, C.A., Wollenburg, K.R., *et al.* (2017) The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* **2**: e00357-16.
- Kwon-Chung, K.J., Boekhout, T., Fell, J.W., and Diaz, M. (2002) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota*, *Hymenomycetes*, *Tremellomycetidae*). *Taxon* **51**: 804–806.
- Kwon-Chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z.A., Janbon, G., Idnurm, A., and Bahn, Y.-S. (2014) *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**: a019760.
- Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I., and Popkin, T.J. (1982b) Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J Bacteriol* **150**: 1414–1421.
- Kwon-Chung, K.J., and Varma, A. (2006) Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* **6**: 574–587.
- Labs, M., Rühle, T., and Leister, D. (2016) The antimycin A-sensitive pathway of cyclic electron flow: from 1963 to 2015. *Photosynth Res* **129**: 231–238.
- Laity, J.H., Lee, B.M., and Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 39–46.

- Lee, H., Chang, Y.C., Nardone, G., and Kwon-Chung, K.J. (2007) *TUP1* disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. *Mol Microbiol* **64**: 591–601.
- Lee, H., Khanal Lamichhane, A., Garraffo, H.M., Kwon-Chung, K.J., and Chang, Y.C. (2012) Involvement of PDK1, PKC and TOR signalling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **84**: 130–146.
- Lee, H.H., Carmichael, D.J., Ribeiro, V., Parisi, D.N., Munzen, M.E., Charles-Niño, C.L., *et al.* (2023) Glucuronoxylomannan intranasal challenge prior to *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection enhances cerebral cryptococcosis in rodents. *PLoS Pathog* **19**: e1010941.
- Lee, S.-H., Chung, S.-C., Shin, J., and Oh, K.-B. (2014) *GST2* is Required for Nitrogen Starvation-Induced Filamentous Growth in *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* **24**: 1207–1215.
- Lengeler, K.B., Cox, G.M., and Heitman, J. (2001) Serotype AD Strains of *Cryptococcus neoformans* Are Diploid or Aneuploid and Are Heterozygous at the Mating-Type Locus. *Infect Immun* **69**: 115–122.
- Lev, S., Li, C., Desmarini, D., Liuwantara, D., Sorrell, T.C., Hawthorne, W.J., and Djordjevic, J.T. (2020) Monitoring Glycolysis and Respiration Highlights Metabolic Inflexibility of *Cryptococcus neoformans*. *Pathogens* **9**: 684.
- Li, X., Shi, Q., Xu, H., Xiong, Y., Wang, C., Le, L., *et al.* (2022) Ebselen Interferes with Alzheimer's Disease by Regulating Mitochondrial Function. *Antioxidants* **11**: 1350.
- Li, Y.-H., and Liu, T.-B. (2020) Zinc Finger Proteins in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *IJMS* **21**: 1361.
- Li, Z., and Nielsen, K. (2017) Morphology Changes in Human Fungal Pathogens upon Interaction with the Host. *J Fungi* **3**: 66.
- Littman, M.L. (1958) Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Trans N Y Acad Sci* **20**: 623–648.
- Liu, Y., He, Q., and Cheng, P. (2003) Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2131–2138.
- Love, G.L., Boyd, G.D., and Greer, D.L. (1985) Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol* **22**: 1068–1070.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Lu, Y.-K., Sun, K.-H., and Shen, W.-C. (2005) Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **56**: 480–491.
- Ma, H., Croudace, J.E., Lammas, D.A., and May, R.C. (2006) Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. *Curr Biol* **16**: 2156–2160.
- Ma, H., Croudace, J.E., Lammas, D.A., and May, R.C. (2007) Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunol* **8**: 15.

- Ma, H., Hagen, F., Stekel, D.J., Johnston, S.A., Sionov, E., Falk, R., *et al.* (2009) The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 12980–12985.
- Madu, U.L., Ogundeji, A.O., Mochochoko, B.M., Pohl, C.H., Albertyn, J., Swart, C.W., *et al.* (2015) Cryptococcal 3-Hydroxy Fatty Acids Protect Cells Against Amoebal Phagocytosis. *Front Microbiol* **6**: 1351.
- Magalhães, T.F.F., Costa, M.C., Holanda, R.A., Ferreira, G.F., Carvalho, V.S.D., Freitas, G.J.C., *et al.* (2020) N-acetylcysteine reduces amphotericin B deoxycholate nephrotoxicity and improves the outcome of murine cryptococcosis. *Med Mycol* **58**: 835–844.
- Mamouei, Z., Alqarihi, A., Singh, S., Xu, S., Mansour, M.K., Ibrahim, A.S., and Uppuluri, P. (2018) Alexidine Dihydrochloride Has Broad-Spectrum Activities against Diverse Fungal Pathogens. *mSphere* **3**: e00539-18.
- Maxson, M.E., Cook, E., Casadevall, A., and Zaragoza, O. (2007a) The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol* **44**: 180–186.
- Maxson, M.E., Dadachova, E., Casadevall, A., and Zaragoza, O. (2007b) Radial Mass Density, Charge, and Epitope Distribution in the *Cryptococcus neoformans* Capsule. *Eukaryot Cell* **6**: 95–109.
- May, R.C., Stone, N.R.H., Wiesner, D.L., Bicanic, T., and Nielsen, K. (2016) *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* **14**: 106–117.
- McClelland, E.E., Bernhardt, P., and Casadevall, A. (2006) Estimating the Relative Contributions of Virulence Factors for Pathogenic Microbes. *Infect Immun* **74**: 1500–1504.
- McCluskey, K., Wiest, A., and Plamann, M. (2010) The Fungal Genetics Stock Center: a repository for 50 years of fungal genetics research. *J Biosci* **35**: 119–126.
- McFadden, D.C., De Jesus, M., and Casadevall, A. (2006a) The Physical Properties of the Capsular Polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* Suggest Features for Capsule Construction. *J Biol Chem* **281**: 1868–1875.
- McFadden, D.C., Fries, B.C., Wang, F., and Casadevall, A. (2007) Capsule Structural Heterogeneity and Antigenic Variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **6**: 1464–1473.
- McFadden, D.C., Zaragoza, O., and Casadevall, A. (2006b) The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **14**: 497–505.
- McGill, S., Malik, R., Saul, N., Beetson, S., Secombe, C., Robertson, I., and Irwin, P. (2009) Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995–2006. *Med Mycol* **47**: 625–639.
- Merrifield, E.H., and Stephen, A.M. (1980) Structural investigations of two capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans*. *Carbohydr Res* **86**: 69–76.
- Meyer, W., Gilgado, F., Ngamskulrungraj, P., Trilles, L., Hagen, F., Castañeda, E., and Boekhout, T. (2010) Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. In *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. pp. 327–357.
- Min, K., Neiman, A.M., and Konopka, J.B. (2020) Fungal Pathogens: Shape-Shifting Invaders. *Trends Microbiol* **28**: 922–933.

- Molinos-Castro, S., Pesqueira-Fontán, P.M., Rodríguez-Fernández, S., Rodríguez-Framil, M., Barbeito-Castiñeiras, G., Gayol-Fernández, M.C., *et al.* (2020) Clinical factors associated with pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl ed)* **38**: 4–10.
- Mourad, A., and Perfect, J.R. (2018) The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **113**.
- Mukaremera, L., Lee, K.K., Wagener, J., Wiesner, D.L., Gow, N.A.R., and Nielsen, K. (2018) Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *Cell Surf* **1**: 15–24.
- Mukaremera, L., McDonald, T.R., Nielsen, J.N., Molenaar, C.J., Akampurira, A., Schutz, C., *et al.* (2019) The Mouse Inhalation Model of *Cryptococcus neoformans* Infection Recapitulates Strain Virulence in Humans and Shows that Closely Related Strains Can Possess Differential Virulence. *Infect Immun* **87**: e00046-19.
- Mukherjee, J., Casadevall, A., and Scharff, M.D. (1993) Molecular characterization of the humoral responses to *Cryptococcus neoformans* infection and glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate immunization. *J Exp Med* **177**: 1105–1116.
- Mylonakis, E., Ausubel, F.M., Perfect, J.R., Heitman, J., and Calderwood, S.B. (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15675–15680.
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J.B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S.B., *et al.* (2005) *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. *Infect Immun* **73**: 3842–3850.
- Nicola, A.M., Frases, S., and Casadevall, A. (2009) Lipophilic Dye Staining of *Cryptococcus neoformans* Extracellular Vesicles and Capsule. *Eukaryot Cell* **8**: 1373–1380.
- Nielsen, K., Cox, G.M., Wang, P., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2003) Sexual Cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and Virulence of Congenic α and α Isolates. *Infect Immun* **71**: 4831–4841.
- Nnadi, N.E., and Carter, D.A. (2021) Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathog* **17**: e1009503.
- Noguchi, N. (2016) Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Arch Biochem Biophys* **595**: 109–112.
- Nosanchuk, J.D., and Casadevall, A. (2006) Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3519–3528.
- Noverr, M.C., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Huffnagle, G.B. (2003) Role of *PLB1* in Pulmonary Inflammation and Cryptococcal Eicosanoid Production. *Infect Immun* **71**: 1538–1547.
- Noverr, M.C., Williamson, P.R., Fajardo, R.S., and Huffnagle, G.B. (2004) *CNLAC1* Is Required for Extrapulmonary Dissemination of *Cryptococcus neoformans* but Not Pulmonary Persistence. *Infect Immun* **72**: 1693–1699.
- Okagaki, L.H., and Nielsen, K. (2012) Titan Cells Confer Protection from Phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* Infections. *Eukaryot Cell* **11**: 820–826.

- Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.N., Charlier, C., Baltes, N.J., Chrétien, F., *et al.* (2010) Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathog* **6**: e1000953.
- Okagaki, L.H., Wang, Y., Ballou, E.R., O'Meara, T.R., Bahn, Y.-S., Alspaugh, J.A., *et al.* (2011) Cryptococcal Titan Cell Formation Is Regulated by G-Protein Signaling in Response to Multiple Stimuli. *Eukaryot Cell* **10**: 1306–1316.
- Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Rodrigues, M.L., and Nimrichter, L. (2010) Extracellular Vesicles from *Cryptococcus neoformans* Modulate Macrophage Functions. *Infect Immun* **78**: 1601–1609.
- Olszewski, M.A., Noverr, M.C., Chen, G.-H., Toews, G.B., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Huffnagle, G.B. (2004) Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am J Pathol* **164**: 1761–1771.
- O'Meara, T.R., and Alspaugh, J.A. (2012) The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. *Clin Microbiol Rev* **25**: 387–408.
- O'Meara, T.R., Holmer, S.M., Selvig, K., Dietrich, F., and Alspaugh, J.A. (2013) *Cryptococcus neoformans* Rim101 Is Associated with Cell Wall Remodeling and Evasion of the Host Immune Responses. *mBio* **4**: e00522-12.
- Ormerod, K.L., Morrow, C.A., Chow, E.W.L., Lee, I.R., Arras, S.D.M., Schirra, H.J., *et al.* (2013) Comparative Genomics of Serial Isolates of *Cryptococcus neoformans* Reveals Gene Associated With Carbon Utilization and Virulence. *G3 (Bethesda)* **3**: 675–686.
- Orner, E.P., Bhattacharya, S., Kalenja, K., Hayden, D., Del Poeta, M., and Fries, B.C. (2019) Cell Wall-Associated Virulence Factors Contribute to Increased Resilience of Old *Cryptococcus neoformans* Cells. *Front Microbiol* **10**: 2513.
- Ortiz, S.C., Huang, M., and Hull, C.M. (2019) Spore Germination as a Target for Antifungal Therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* **63**: e00994-19.
- Osterholzer, J.J., Surana, R., Milam, J.E., Montano, G.T., Chen, G.-H., Sonstein, J., *et al.* (2009) Cryptococcal Urease Promotes the Accumulation of Immature Dendritic Cells and a Non-Protective T2 Immune Response within the Lung. *Am J Pathol* **174**: 932–943.
- Papp, C., Kocsis, K., Tóth, R., Bodai, L., Willis, J.R., Ksiezopolska, E., *et al.* (2018) Echinocandin-Induced Microevolution of *Candida parapsilosis* Influences Virulence and Abiotic Stress Tolerance. *mSphere* **3**: e00547-18.
- Parent, S., Nielsen, J., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A., *et al.* (1994) Calcineurin-dependent growth of an FK506- and CsA-hypersensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **139**: 2973–2984.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., and Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* **14**: 417–419.
- Patterson, M.J., McKenzie, C.G., Smith, D.A., Da Silva Dantas, A., Sherston, S., Veal, E.A., *et al.* (2013) Ybp1 and Gpx3 Signaling in *Candida albicans* Govern Hydrogen Peroxide-Induced Oxidation of the Cap1 Transcription Factor and Macrophage Escape. *Antioxid Redox Signal* **19**: 2244–2260.
- Peng, C.A., Gaertner, A.A.E., Henriquez, S.A., Fang, D., Colon-Reyes, R.J., Brumaghim, J.L., and Kozubowski, L. (2018) Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage in vitro. *PLoS One* **13**: e0208471.

- Perfect, J.R., Dismukes, W.E., Dromer, F., Goldman, D.L., Graybill, J.R., Hamill, R.J., *et al.* (2010) Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **50**: 291–322.
- Perfect, J.R., Lang, S.D.R., and Durack, D.T. (1980) Chronic Cryptococcal Meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol* **101**: 177–194.
- Pierini, L.M., and Doering, T.L. (2001) Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **41**: 105–115.
- Pippi, B., Lopes, W., Reginatto, P., Silva, F.É.K., Joaquim, A.R., Alves, R.J., *et al.* (2019) New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm J* **27**: 41–48.
- Pippi, B., Machado, G.D.R.M., Bergamo, V.Z., Alves, R.J., Andrade, S.F., and Fuentefria, A.M. (2018) Clioquinol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of *Candida* infections linked to the use of intrauterine devices. *J Med Microbiol* **67**: 1655–1663.
- Pirofski, L., and Casadevall, A. (2015) What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? *BMC Immunol* **16**: 13.
- Pourbaix, A., Lafont Rapnouil, B., Guéry, R., Lanternier, F., Lortholary, O., and Cohen, J.F. (2020) Smoking as a Risk Factor of Invasive Fungal Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Infect Dis* **71**: 1106–1119.
- Prole, D.L., and Taylor, C.W. (2012) Identification and Analysis of Cation Channel Homologues in Human Pathogenic Fungi. *PLoS One* **7**: e42404.
- Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q.D., Kraus, P.R., Boily, M.-J., Davis, M.J., Giles, S.S., *et al.* (2005) Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. *Eukaryot Cell* **4**: 190–201.
- Rainey, M.M., Korostyshevsky, D., Lee, S., and Perlstein, E.O. (2010) The Antidepressant Sertraline Targets Intracellular Vesiculogenic Membranes in Yeast. *Genetics* **185**: 1221–1233.
- Rajasingham, R., Govender, N.P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D.W., *et al.* (2022) The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis* **22**: 1748–1755.
- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., *et al.* (2017) Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* **17**: 873–881.
- Raso, T.F., Werther, K., Miranda, E.T., and Mendes-Giannini, M.J.S. (2004) Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol* **42**: 355–362.
- Rayens, E., Norris, K.A., and Cordero, J.F. (2022) Mortality Trends in Risk Conditions and Invasive Mycotic Disease in the United States, 1999–2018. *Clin Infect Dis* **74**: 309–318.
- Raza, H. (2011) Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J* **278**: 4243–4251.
- Refai, M.K., El-Hariri, M., and Alarousy, R. (2017) Cryptococcosis in Animals and Birds: A Review. *Eur J Acad Essays* **4**: 202–223.
- Reis, F.C.G., Borges, B.S., Jozefowicz, L.J., Sena, B.A.G., Garcia, A.W.A., Medeiros, L.C., *et al.* (2019) A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the

Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere* **4**: e00080-19.

Reuwsaat, J.C.V., Agostinho, D.P., Motta, H., Chang, A.L., Brown, H., Brent, M.R., *et al.* (2021) The Transcription Factor Pdr802 Regulates Titan Cell Formation and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *mBio* **12**: e03457-20.

Rivera, J., Feldmesser, M., Cammer, M., and Casadevall, A. (1998) Organ-Dependent Variation of Capsule Thickness in *Cryptococcus neoformans* during Experimental Murine Infection. *Infect Immun* **66**: 5027–5030.

Robert, V.A., and Casadevall, A. (2009) Vertebrate Endothermy Restricts Most Fungi as Potential Pathogens. *J Infect Dis* **200**: 1623–1626.

Rodrigues, C., Rodrigues, M., and Henriques, M. (2019) *Candida* sp. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *J Clin Med* **8**: 76.

Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A. (2008) Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 58–67.

Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., *et al.* (2007) Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. *Eukaryot Cell* **6**: 48–59.

Rosas, Á.L., and Casadevall, A. (2006) Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 265–272.

Rosas, Á.L., MacGill, R.S., Nosanchuk, J.D., Kozel, T.R., and Casadevall, A. (2002) Activation of the Alternative Complement Pathway by Fungal Melanins. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**: 144–148.

Rossi, M. (1983) Structural studies of metyrapone: a potent inhibitor of cytochrome P-450. *J Med Chem* **26**: 1246–1252.

Rossi, S.A., Oliveira, H.C. de, Agreda-Mellon, D., Lucio, J., Mendes-Giannini, M.J.S., García-Camero, J.P., and Zaragoza, O. (2020) Identification of Off-Patent Drugs That Show Synergism with Amphotericin B or That Present Antifungal Action against *Cryptococcus neoformans* and *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **64**: e01921-19.

Saha, D.C., Goldman, D.L., Shao, X., Casadevall, A., Husain, S., Limaye, A.P., *et al.* (2007) Serologic Evidence for Reactivation of Cryptococcosis in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin Vaccine Immunol* **14**: 1550–1554.

Saidykhan, L., Correia, J., Romanyuk, A., Peacock, A.F.A., Desanti, G.E., Taylor-Smith, L., *et al.* (2022) An in vitro method for inducing titan cells reveals novel features of yeast-to-titan switching in the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *PLoS Pathog* **18**: e1010321.

Salas, S.D., Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., and Williamson, P.R. (1996) Effect of the laccase gene *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* **184**: 377–386.

Sanfelice, F. (1894) Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann Igiene* **4**: 463–495.

Santiago-Tirado, F.H., Onken, M.D., Cooper, J.A., Klein, R.S., and Doering, T.L. (2017) Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen. *mBio* **8**: e02183-16.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682.
- Sebolai, O.M., Pohl, C.H., Botes, P.J., Strauss, C.J., Van Wyk, P.W.J., Botha, A., and Kock, J.L.F. (2007) 3-Hydroxy fatty acids found in capsules of *Cryptococcus neoformans*. *Can J Microbiol* **53**: 809–812.
- Sethi, K.K., and Randhawa, H.S. (1968) Survival of *Cryptococcus neoformans* in the Gastrointestinal Tract of Pigeons following Ingestion of the Organism. *J Infect Dis* **118**: 135–138.
- Shapiro, T.A., and Englund, P.T. (1990) Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 950–954.
- Shi, M., Li, S.S., Zheng, C., Jones, G.J., Kim, K.S., Zhou, H., *et al.* (2010) Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest* **120**: 1683–1693.
- Siles, S.A., Srinivasan, A., Pierce, C.G., Lopez-Ribot, J.L., and Ramasubramanian, A.K. (2013) High-Throughput Screening of a Collection of Known Pharmacologically Active Small Compounds for Identification of *Candida albicans* Biofilm Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3681–3687.
- Singh, A., Panting, R.J., Varma, A., Saijo, T., Waldron, K.J., Jong, A., *et al.* (2013) Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* **4**: e00220-13.
- Singh, N., Sharpley, A.L., Emir, U.E., Masaki, C., Herzallah, M.M., Gluck, M.A., *et al.* (2016) Effect of the Putative Lithium Mimetic Ebselen on Brain Myo-Inositol, Sleep, and Emotional Processing in Humans. *Neuropsychopharmacol* **41**: 1768–1778.
- Siscar-Lewin, S., Hube, B., and Brunke, S. (2022) Emergence and evolution of virulence in human pathogenic fungi. *Trends Microbiol* **30**: 693–704.
- Smith, D.F.Q., and Casadevall, A. (2023) Disaster mycology. *Biomedica* **43**: 267–277.
- Smith, L.M., Dixon, E.F., and May, R.C. (2015) The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cell Microbiol* **17**: 702–713.
- Sorrell, T.C., Chen, S.C.-A., Phillips, P., and Marr, K.A. (2010) Clinical Perspectives on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: Implications for Diagnosis and Management. In *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. pp. 595–606.
- Sorrell, T.C., Juillard, P.-G., Djordjevic, J.T., Kaufman-Francis, K., Dietmann, A., Milonig, A., *et al.* (2016) Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes Infect* **18**: 57–67.
- Spadari, C.D.C., Wirth, F., Lopes, L.B., and Ishida, K. (2020) New Approaches for Cryptococcosis Treatment. *Microorganisms* **8**: 613.
- Stano, P., Williams, V., Villani, M., Cymbalyuk, E.S., Qureshi, A., Huang, Y., *et al.* (2009) App1: An Antiphagocytic Protein That Binds to Complement Receptors 3 and 2. *J Immunol* **182**: 84–91.
- Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D., and Casadevall, A. (2003) *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* **71**: 4862–4872.

- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., and Casadevall, A. (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15245–15250.
- Stempinski, P.R., Gerbig, G.R., Greengo, S.D., and Casadevall, A. (2023) Last but not yeast—The many forms of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **19**: e1011048.
- Steverding, D., Evans, P., Msika, L., Riley, B., Wallington, J., and Schelenz, S. (2012) *In vitro* antifungal activity of DNA topoisomerase inhibitors. *Med Mycol* **50**: 333–336.
- Sullivan, D., Haynes, K., Moran, G., Shanley, D., and Coleman, D. (1996) Persistence, replacement, and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* **34**: 1739–1744.
- Thangamani, S., Eldesouky, H.E., Mohammad, H., Pascuzzi, P.E., Avramova, L., Hazbun, T.R., and Seleem, M.N. (2017) Ebselen exerts antifungal activity by regulating glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**: 3002–3010.
- Thangamani, S., Younis, W., and Seleem, M.N. (2015) Repurposing Clinical Molecule Ebselen to Combat Drug Resistant Pathogens. *PLoS One* **10**: e0133877.
- Toffaletti, D.L., Rude, T.H., Johnston, S.A., Durack, D.T., and Perfect, J.R. (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol* **175**: 1405–1411.
- Torres, N.S., Abercrombie, J.J., Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J.L., Ramasubramanian, A.K., and Leung, K.P. (2016) Screening a Commercial Library of Pharmacologically Active Small Molecules against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 5663–5672.
- Touret, F., Gilles, M., Barral, K., Nougairède, A., Van Helden, J., Decroly, E., *et al.* (2020) *In vitro* screening of a FDA approved chemical library reveals potential inhibitors of SARS-CoV-2 replication. *Sci Rep* **10**: 13093.
- Trevijano-Contador, N., Herrero-Fernández, I., García-Barbazán, I., Scorzoni, L., Rueda, C., Rossi, S.A., *et al.* (2015) *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence* **6**: 66–74.
- Trevijano-Contador, N., Oliveira, H.C. de, García-Rodas, R., Rossi, S.A., Llorente, I., Zaballos, Á., *et al.* (2018) *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells *in vitro* in response to multiple signals. *PLoS Pathog* **14**: e1007007.
- Trevijano-Contador, N., Rueda, C., and Zaragoza, O. (2016) Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. *Semin Cell Dev Biol* **57**: 100–109.
- Trevijano-Contador, N., and Zaragoza, O. (2018) Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *J Fungi* **5**: 3.
- Trivedi, S.R., Sykes, J.E., Cannon, M.S., Wisner, E.R., Meyer, W., Sturges, B.K., *et al.* (2011) Clinical features and epidemiology of cryptococcosis in cats and dogs in California: 93 cases (1988–2010). *J Am Vet Med Assoc* **239**: 357–369.
- Tucker, S.C., and Casadevall, A. (2002) Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3165–3170.

- Tugume, L., Ssebambulidde, K., Kasibante, J., Ellis, J., Wake, R.M., Gakuru, J., *et al.* (2023) Cryptococcal meningitis. *Nat Rev Dis Primers* **9**: 62.
- Turner, S.H., Cherniak, R., and Reiss, E. (1984) Fractionation and characterization of galactoxylomannan from *Cryptococcus neoformans*. *Carbohydr Res* **125**: 343–349.
- Vaishnav, V.V., Bacon, B.E., O'Neill, M., and Cherniak, R. (1998) Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydr Res* **306**: 315–330.
- Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., Cowart, R.E., Sprigg, H.A., Tingler, M.J., and Jacobson, E.S. (1993) Regulation of Cryptococcal Capsular Polysaccharide by Iron. *J Infect Dis* **167**: 186–190.
- Venn-Watson, S., Daniels, R., and Smith, C. (2012) Thirty year retrospective evaluation of pneumonia in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* population. *Dis Aquat Org* **99**: 237–242.
- Verma, S., and Idnurm, A. (2013) The Uve1 Endonuclease Is Regulated by the White Collar Complex to Protect *Cryptococcus neoformans* from UV Damage. *PLoS Genet* **9**: e1003769.
- Veses, V., Richards, A., and Gow, N.A. (2008) Vacuoles and fungal biology. *Curr Opin Microbiol* **11**: 503–510.
- Voelz, K., Lammas, D.A., and May, R.C. (2009) Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **77**: 3450–3457.
- Vu, K., Eigenheer, R.A., Phinney, B.S., and Gelli, A. (2013) *Cryptococcus neoformans* Promotes Its Transmigration into the Central Nervous System by Inducing Molecular and Cellular Changes in Brain Endothelial Cells. *Infect Immun* **81**: 3139–3147.
- Vuillemin, P. (1901) Les blastomycètes pathogènes. *Rev Gen Sci Pures Appl* **12**: 732–751.
- Wall, G., Chaturvedi, A.K., Wormley, F.L., Wiederhold, N.P., Patterson, H.P., Patterson, T.F., and Lopez-Ribot, J.L. (2018) Screening a Repurposing Library for Inhibitors of Multidrug-Resistant *Candida auris* Identifies Ebselen as a Repositionable Candidate for Antifungal Drug Development. *Antimicrob Agents Chemother* **62**: e01084-18.
- Wall, G., Chen, E., Hull, M.V., and Lopez-Ribot, J.L. (2020) Screening the CALIBR ReFRAME Library in Search for Inhibitors of *Candida auris* Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 597931.
- Wall, G., Herrera, N., and Lopez-Ribot, J.L. (2019) Repositionable Compounds with Antifungal Activity against Multidrug Resistant *Candida auris* Identified in the Medicines for Malaria Venture's Pathogen Box. *J Fungi* **5**: 92.
- Walton, F.J., Idnurm, A., and Heitman, J. (2005) Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **57**: 1381–1396.
- Wang, D.Y.-C., Kumar, S., and Hedges, S.B. (1999) Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc Biol Sci* **266**: 163–171.
- Wang, J., Wang, P., Dong, C., Zhao, Y., Zhou, J., Yuan, C., and Zou, L. (2020) Mechanisms of ebselen as a therapeutic and its pharmacology applications. *Future Med Chem* **12**: 2141–2160.
- Wang, Y., and Casadevall, A. (1994) Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3864–3866.

- Wang, Y., and Casadevall, A. (1996) Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 541–545.
- Wangsanut, T., and Pongpom, M. (2022) The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. *Int J Mol Sci* **23**: 10645.
- Warpeha, K.M., Park, Y.-D., and Williamson, P.R. (2013) Susceptibility of Intact Germinating *Arabidopsis thaliana* to Human Fungal Pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2979–2988.
- Warris, A., and Ballou, E.R. (2019) Oxidative responses and fungal infection biology. *Semin Cell Dev Biol* **89**: 34–46.
- Wear, M.P., Jacobs, E., Wang, S., McConnell, S.A., Bowen, A., Strother, C., *et al.* (2022) *Cryptococcus neoformans* capsule regrowth experiments reveal dynamics of enlargement and architecture. *J Biol Chem* **298**: 101769.
- Weth, F.R., Hoggarth, G.B., Weth, A.F., Paterson, E., White, M.P.J., Tan, S.T., *et al.* (2023) Unlocking hidden potential: advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. *Br J Cancer* .
- Wiederhold, N.P., Patterson, T.F., Srinivasan, A., Chaturvedi, A.K., Fothergill, A.W., Wormley, F.L., *et al.* (2017) Repurposing auranofin as an antifungal: *In vitro* activity against a variety of medically important fungi. *Virulence* **8**: 138–142.
- Wiesner, D.L., Specht, C.A., Lee, C.K., Smith, K.D., Mukaremera, L., Lee, S.T., *et al.* (2015) Chitin Recognition via Chitotriosidase Promotes Pathologic Type-2 Helper T Cell Responses to Cryptococcal Infection. *PLoS Pathog* **11**: e1004701.
- Williamson, J.D., Silverman, J.F., Mallak, C.T., and Christie, J.D. (1996) Atypical Cytomorphologic Appearance of *Cryptococcus neoformans*. *Acta Cytol* **40**: 363–370.
- Williamson, P.R., Jarvis, J.N., Panackal, A.A., Fisher, M.C., Molloy, S.F., Loyse, A., and Harrison, T.S. (2017) Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nat Rev Neurol* **13**: 13–24.
- Wilson, D.E., Bennett, J.E., and Bailey, J.W. (1968) Serologic Grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med* **127**: 820–823.
- Woods, J.P. (2001) Dimorphism in human pathogens. In *Fungal Pathogenesis*. CRC Press, pp. 117–132.
- World Health Organization (2022) *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. World Health Organization, Geneva. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>.
- Xu, X.-L., Lee, R.T.H., Fang, H.-M., Wang, Y.-M., Li, R., Zou, H., *et al.* (2008) Bacterial Peptidoglycan Triggers *Candida albicans* Hyphal Growth by Directly Activating the Adenylyl Cyclase Cyr1p. *Cell Host Microbe* **4**: 28–39.
- Xue, C., Tada, Y., Dong, X., and Heitman, J. (2007) The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus* Can Complete Its Sexual Cycle during a Pathogenic Association with Plants. *Cell Host Microbe* **1**: 263–273.
- Yan, C., Wang, S., Wang, J., Li, H., Huang, Z., Sun, J., *et al.* (2018) Clotrimazole induces G2/M cell cycle arrest through the up-regulation of TDH3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Res* **214**: 1–7.

- Yeh, Y., Lin, Y., Su, B., and Shen, W. (2009) A screening for suppressor mutants reveals components involved in the blue light-inhibited sexual filamentation in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* **46**: 42–54.
- You, Z., Ran, X., Dai, Y., and Ran, Y. (2018) Clioquinol, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe. *J Mycol Med* **28**: 492–501.
- You, Z., Zhang, C., and Ran, Y. (2020) The effects of clioquinol in morphogenesis, cell membrane and ion homeostasis in *Candida albicans*. *BMC Microbiol* **20**: 165.
- Zaragoza, O. (2011) Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol* **2**: 181.
- Zaragoza, O. (2019) Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence* **10**: 490–501.
- Zaragoza, O., and Casadevall, A. (2004) Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* **6**: 10–15.
- Zaragoza, O., Chrisman, C.J., Castelli, M.V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A. (2008) Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* **10**: 2043–2057.
- Zaragoza, O., Fries, B.C., and Casadevall, A. (2003) Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂. *Infect Immun* **71**: 6155–6164.
- Zaragoza, O., García-Rodas, R., Nosanchuk, J.D., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A. (2010) Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathog* **6**: e1000945.
- Zaragoza, O., Mihu, C., Casadevall, A., and Nosanchuk, J.D. (2005) Effect of Amphotericin B on Capsule and Cell Size in *Cryptococcus neoformans* during Murine Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4358–4361.
- Zaragoza, O., and Nielsen, K. (2013) Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol* **16**: 409–413.
- Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2009) The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* **68**: 133–216.
- Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R.A., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2006) The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* **59**: 67–83.
- Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., et al. (2016) Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol Rev* **40**: 182–207.
- Zhai, B., Wu, C., Wang, L., Sachs, M.S., and Lin, X. (2012) The Antidepressant Sertraline Provides a Promising Therapeutic Option for Neurotropic Cryptococcal Infections. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 3758–3766.
- Zhang, M., Sun, D., and Shi, M. (2015) Dancing cheek to cheek: *Cryptococcus neoformans* and phagocytes. *Springerplus* **4**: 410.
- Zhou, X., and Ballou, E.R. (2018) The *Cryptococcus neoformans* Titan Cell: From In Vivo Phenomenon to In Vitro Model. *Curr Clin Micro Rpt* **5**: 252–260.

Zhou, X., Desanti, G.E., May, R.C., Dambuza, I.M., and Ballou, E.R. (2021) Host-derived Reactive Nitrogen Species mediate the *Cryptococcus neoformans* yeast-to-titan switch via fungal-derived superoxide. *BioRxiv* 2021–03.

Zhu, P., and Idnurm, A. (2018) The contribution of the White Collar complex to *Cryptococcus neoformans* virulence is independent of its light-sensing capabilities. *Fungal Genet Biol* **121**: 56–64.

Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., and Williamson, P.R. (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. *Infect Immun* **69**: 5589–5596.

10. Material Suplementario

Tabla S1. Análisis de los genomas de las 10 variantes H99. Se especifican las mutaciones encontradas en cada gen y su localización. Las mutaciones encontradas son las siguientes: *Missense* (Mis), *Premature Termination Codon* (PTC), *FrameShift* (FS), *Splicing* (SpliceReg, SpliceDon), *Insertions* (In).

Gen CNAG	H99-1	H99-2	H99-3	H99-YSB	H99-JK	H99-RM	H99-HM	H99-JL	H99-MP	H99-PG
01594							Mis p64 T/I	Mis p64 T/I		
02201									Mis p151 G/A	Mis p151 G/A
02435 BWC2			PTC p179 V/* Mis p149 S/L FS p149 S/L							
03995										Mis p12 N/H
04078								Mis p3 S/F	Mis p3 S/F	Mis p3 S/F
04139							Splice Don g.- NC_ 026753.1_ 108747_C/ G			
04684				Mis p665 A/T						
04756		FS p5-9 ASLPS/ X								
05325	Splice Reg g.- NC_ 026748.1_ 1059881_ C/G			Splice Reg g.- NC_ 026748.1_ 1059881_ C/G	Splice Reg g.- NC_ 026748.1_ 1059881_ C/G	Splice Reg g.- NC_ 026748.1_ 1059881_ C/G				Splice Reg g.- NC_ 026748.1_ 1059881_ C/G
05395	Mis p128 I/V Mis p122 D/V Mis p122 D/V p117 K/R Mis p112 N/D	Mis p128 I/V Mis p122 D/V Mis p122 D/V p117 K/R			Mis p128 I/V Mis p122 D/V Mis p117 K/R Mis p112 N/D	Mis p128 I/V Mis p122 D/V Mis p122 D/V p117 K/R				Mis p128 I/V Mis p122 D/V Mis p117 K/R Mis p112 N/D
06456							Mis p298 Q/E	Mis p298 Q/E	Mis p298 Q/E	
06765									FS p142- 143 -/LAX	
07634							Ins p1054- 1055 -/E	Ins p1054- 1055 -/E	Ins p1054- 1055 -/E	

Explicación de las mutaciones (y ejemplos):

Mis|p.3|S/F: mutación con cambio de sentido (mutación en la cual se produce un cambio en un único nucleótido) en la posición 3 de la proteína, cambiando S por F.

PTC|p.179|V/*: codon de terminación prematuro en la posición 179 de la proteína, donde V se convierte en un codon de terminación.

FS|p.5-9|ASLPS/X: mutación por desplazamiento del marco de lectura de la posición 5 a la 9 de la proteína, donde se produce un cambio en el marco de lectura por delección ASLPS.

ins|p.1054-1055|-/E: inserción en el marco de lectura, donde la proteína gana un aa E en la posición 1055.

spliceDon|g.-|NC_026753.1_108747_C/G: mutación en los nucleótidos relacionados con *splicing*. La localización indica el cromosoma y las coordenadas genómicas.

spliceReg|g.-|NC_026748.1_1059881_C/G: mutación en una región de *splicing*.

Figura S1. Comprobación de la expresión del gen *BWC2* en las cepas analizadas por RNA-seq. Se hicieron librerías de RNA-seq con las cepas parentales H99-YSB y KN99 y sus mutantes *bwc2*, y los ficheros .bam obtenidos se analizaron en el programa SeqMonk (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/) para la comprobación de la correcta interrupción de los mutantes *bwc2*, que mostraron ausencia de lecturas del gen *BWC2* (*CNAG_02435*). En la parte superior de la figura se muestra la región cromosómica total, el ARNm y la región codificante. El color indica que el gen se encuentra en la cadena Watson (directa o *forward*, en rojo) o Crick (reversa, en azul) del cromosoma. Rep, réplica.

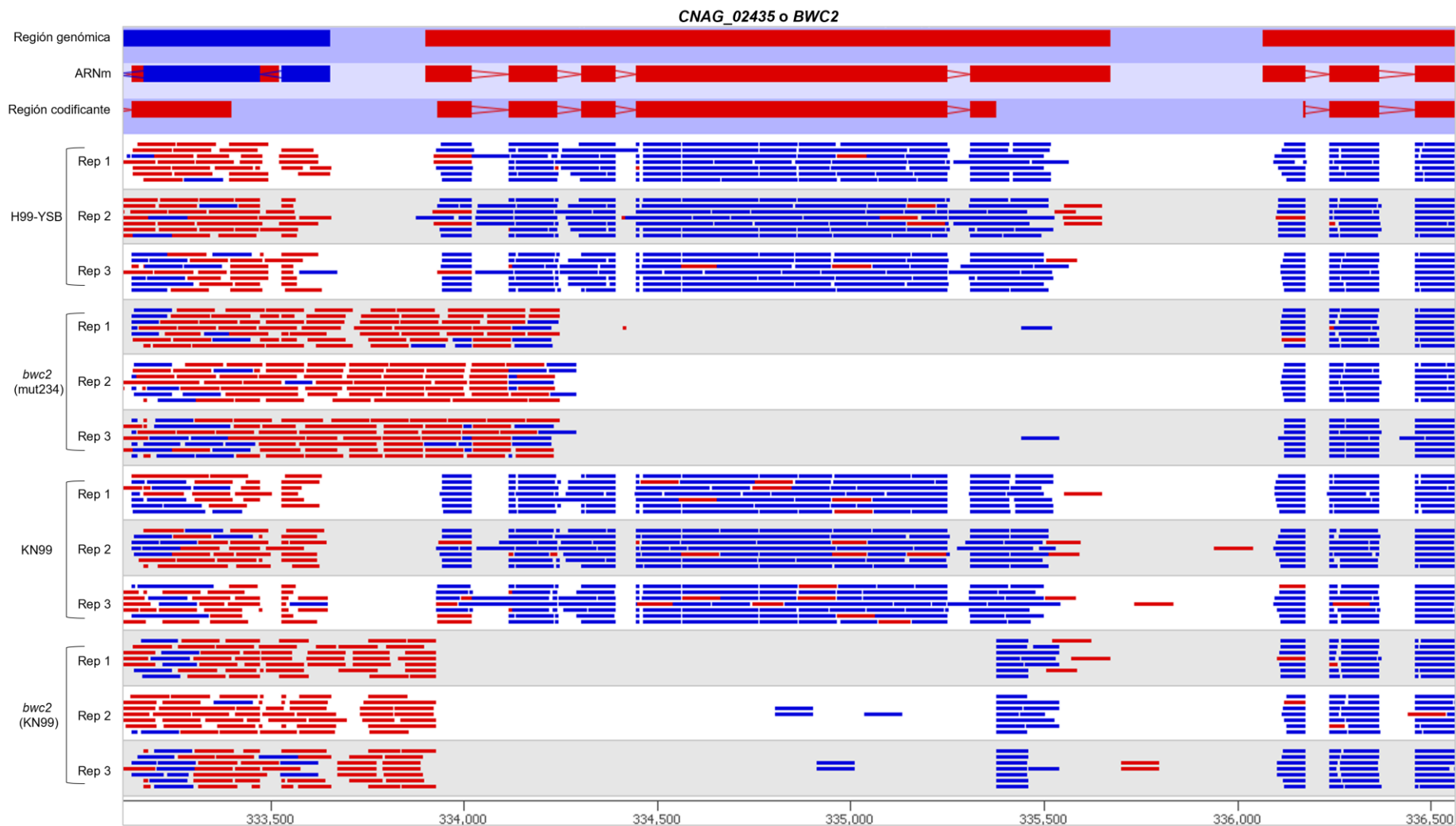
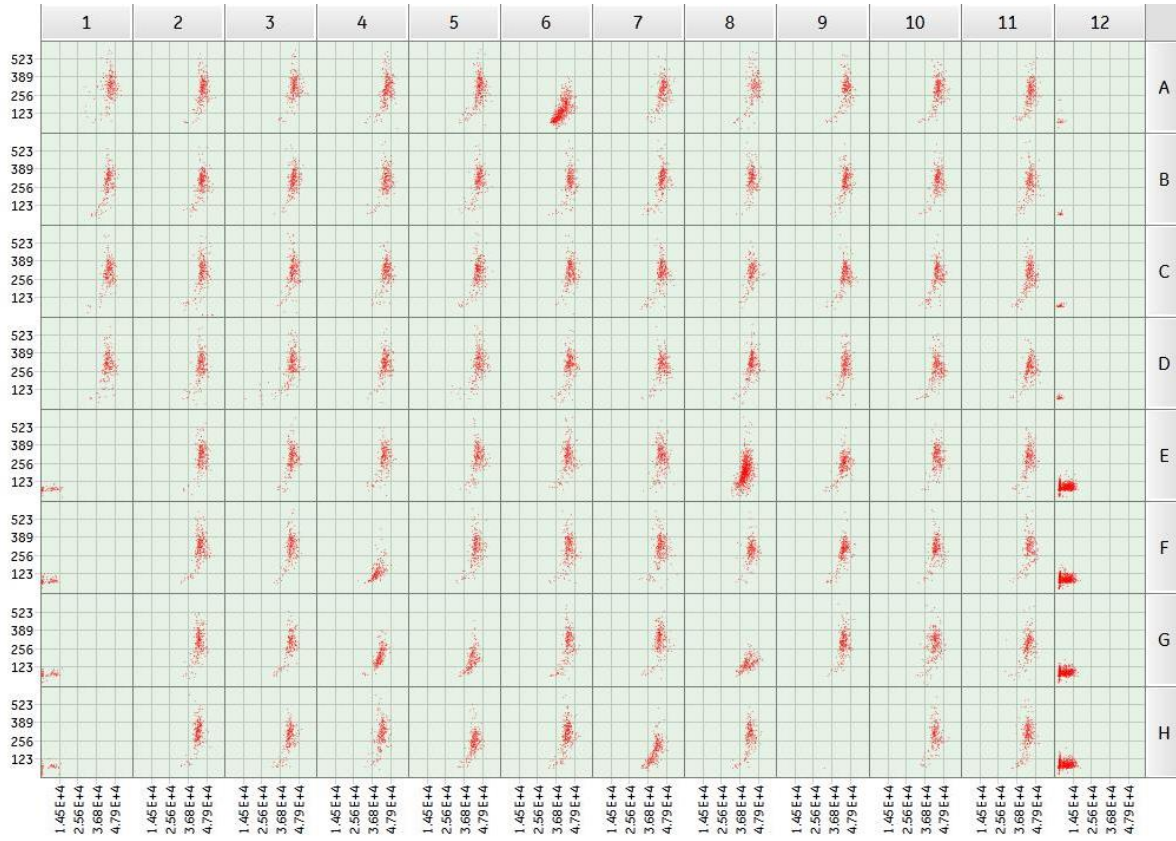
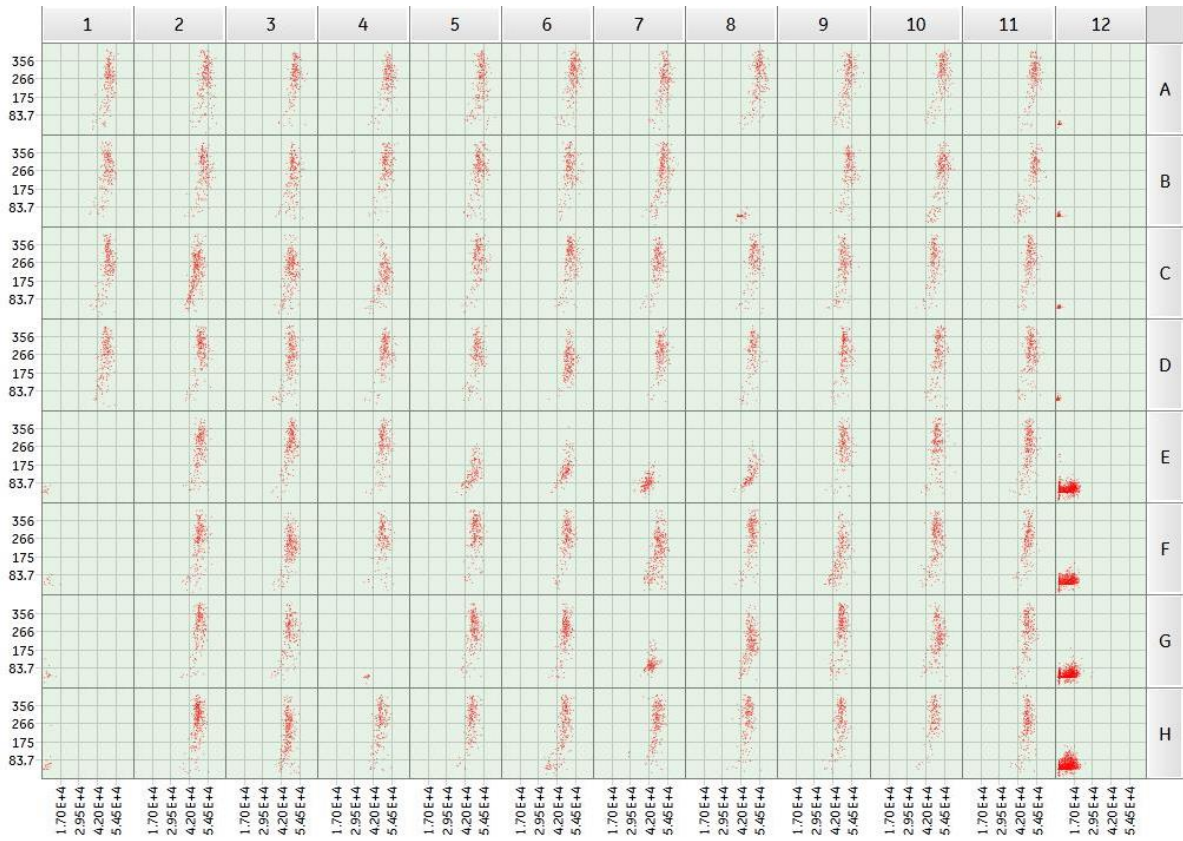


Figura S2. Resultados de la inhibición de la titanización en presencia de los compuestos de la colección de Prestwick generados por el equipo Cytell. Tras la inducción de las células titanes en presencia de los distintos compuestos de la colección de Prestwick se llevó a cabo un análisis automatizado de los tamaños de las levaduras con el equipo Cytell. Se muestran los resultados de cada una de las 19 placas de la colección generados por dicho equipo. Eje X, intensidad de las levaduras; eje Y, área de las levaduras.

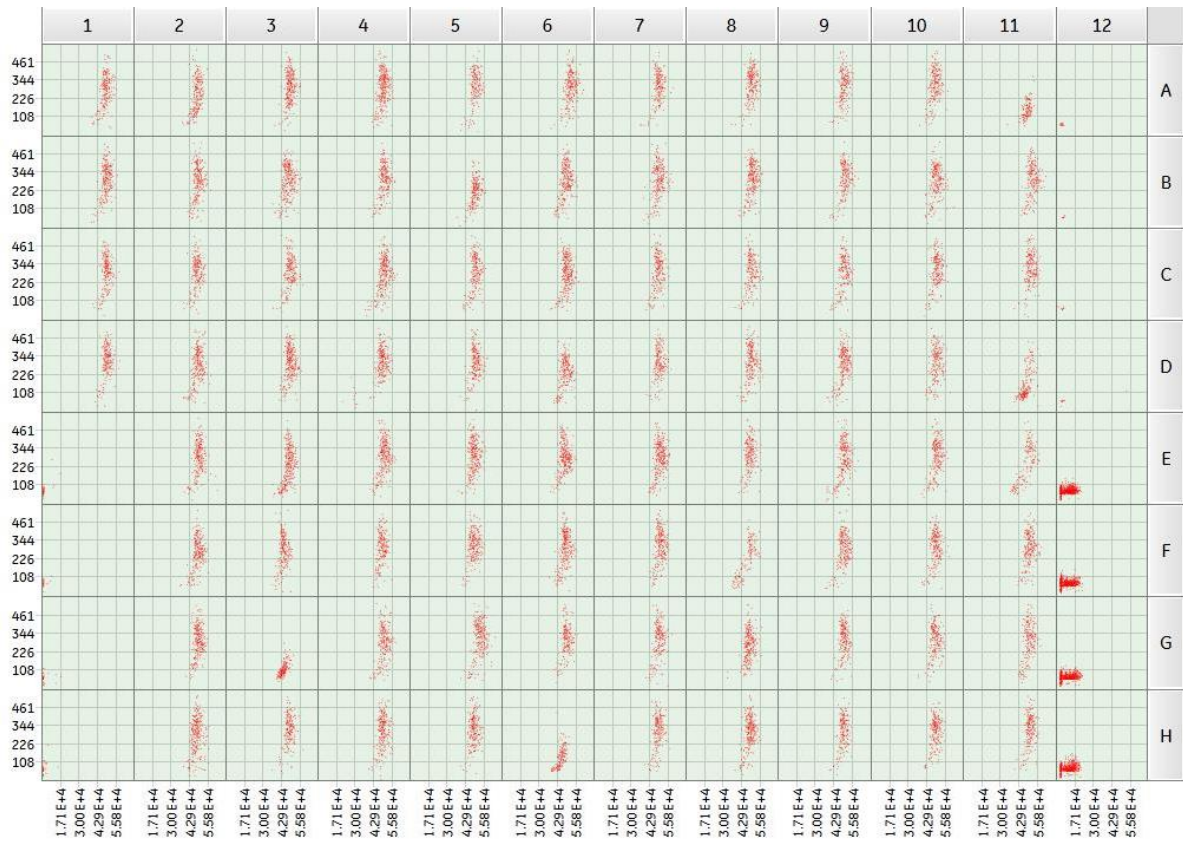
Placa 1



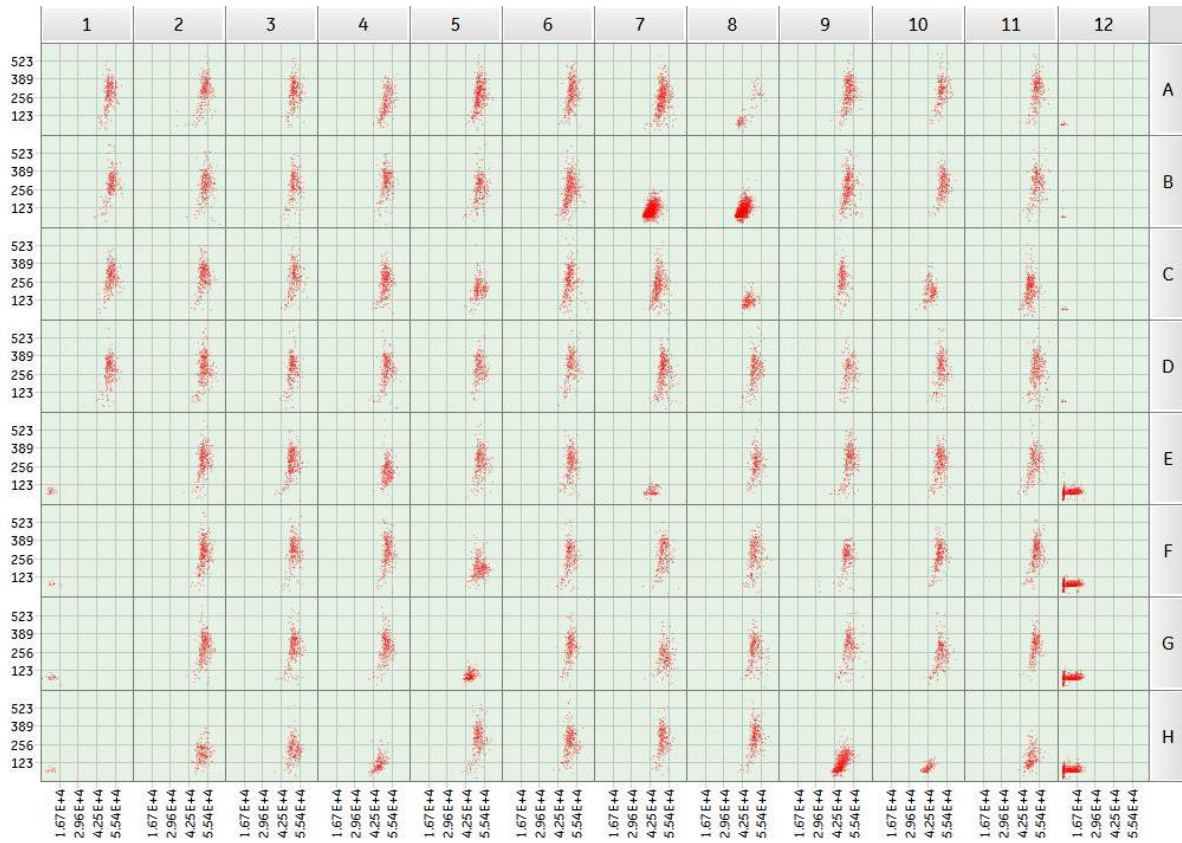
Placa 2



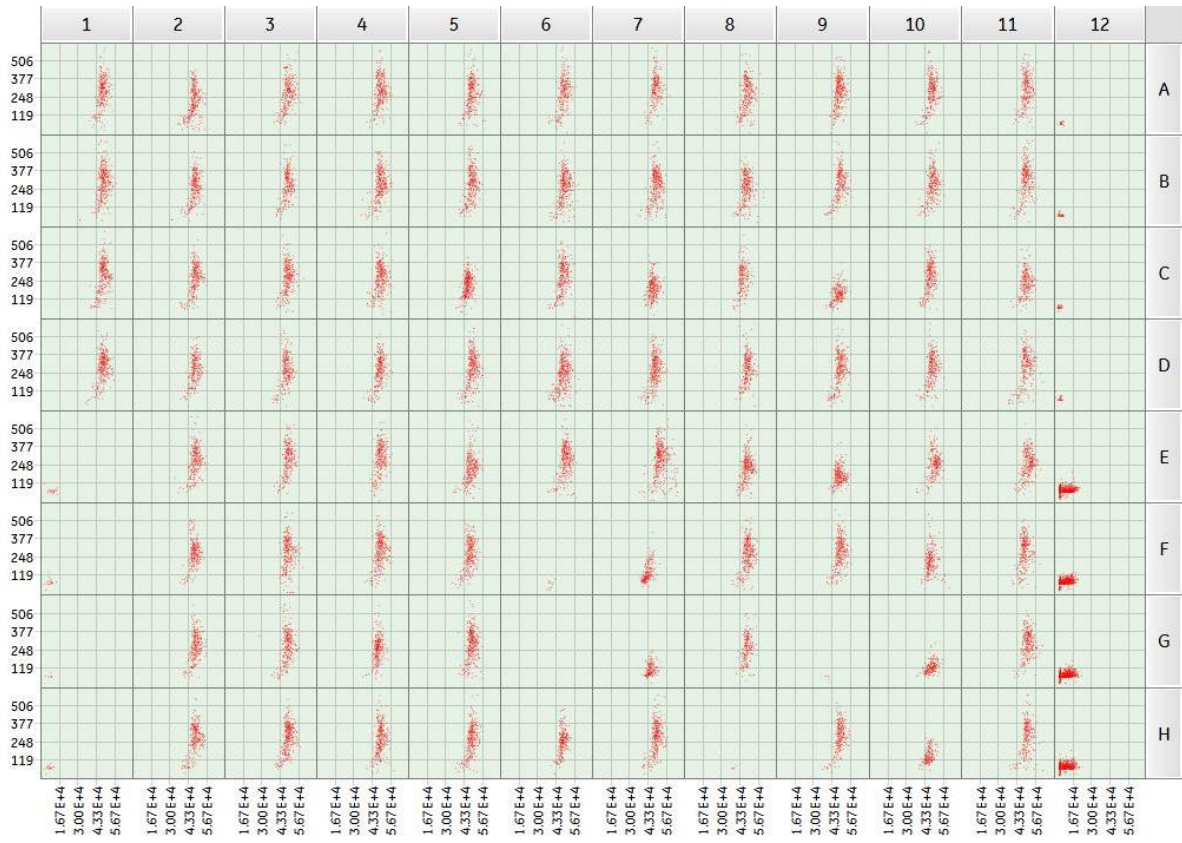
Placa 3



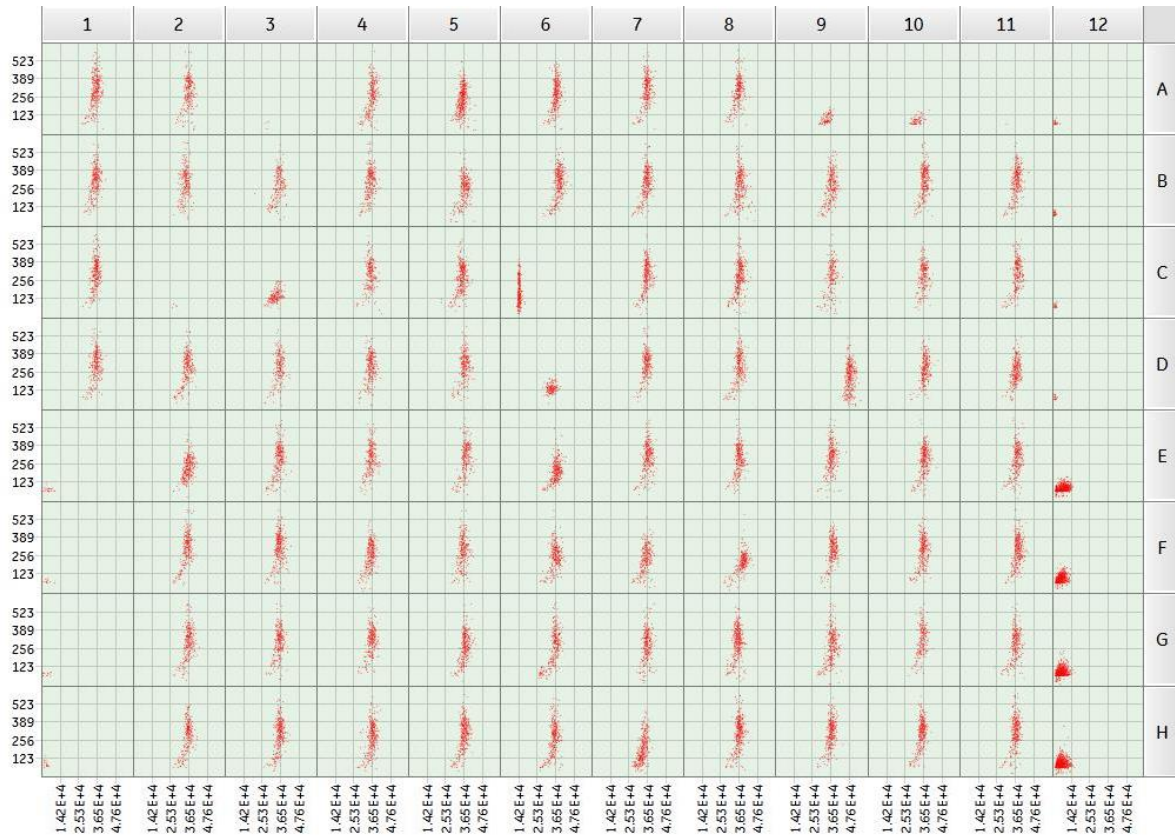
Placa 4



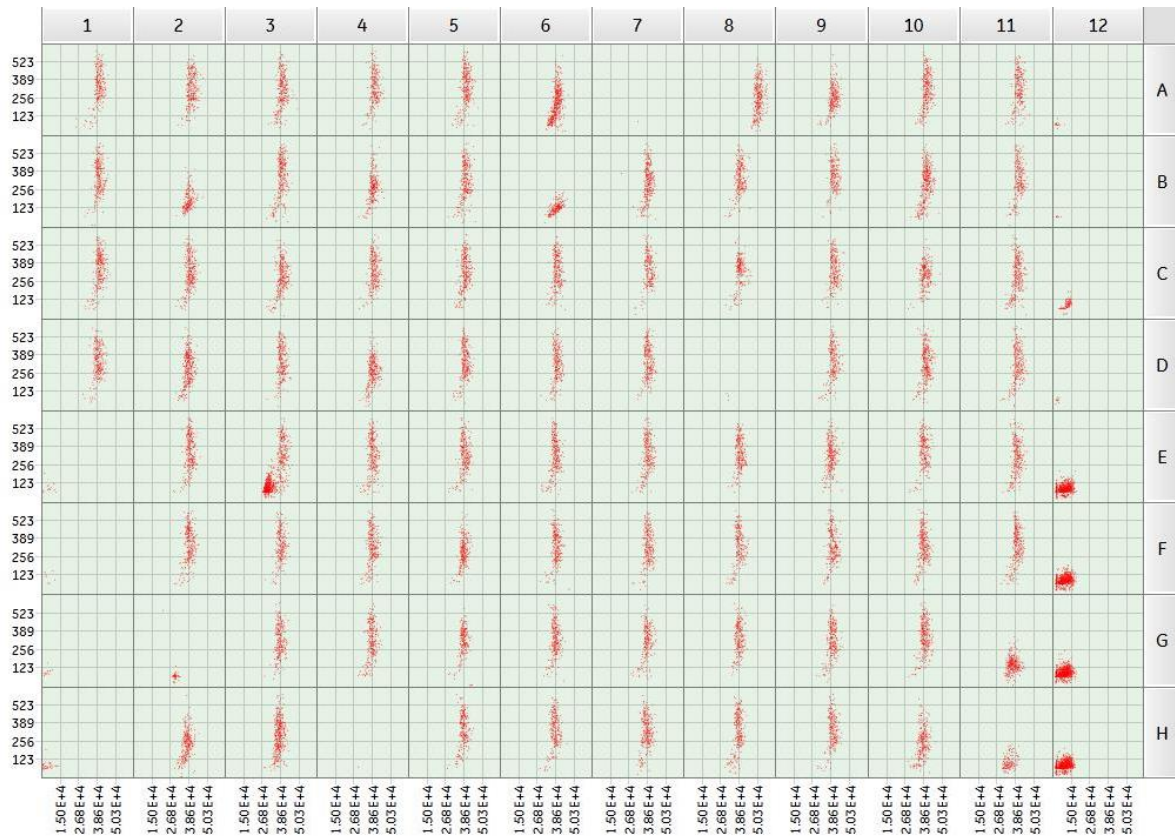
Placa 5



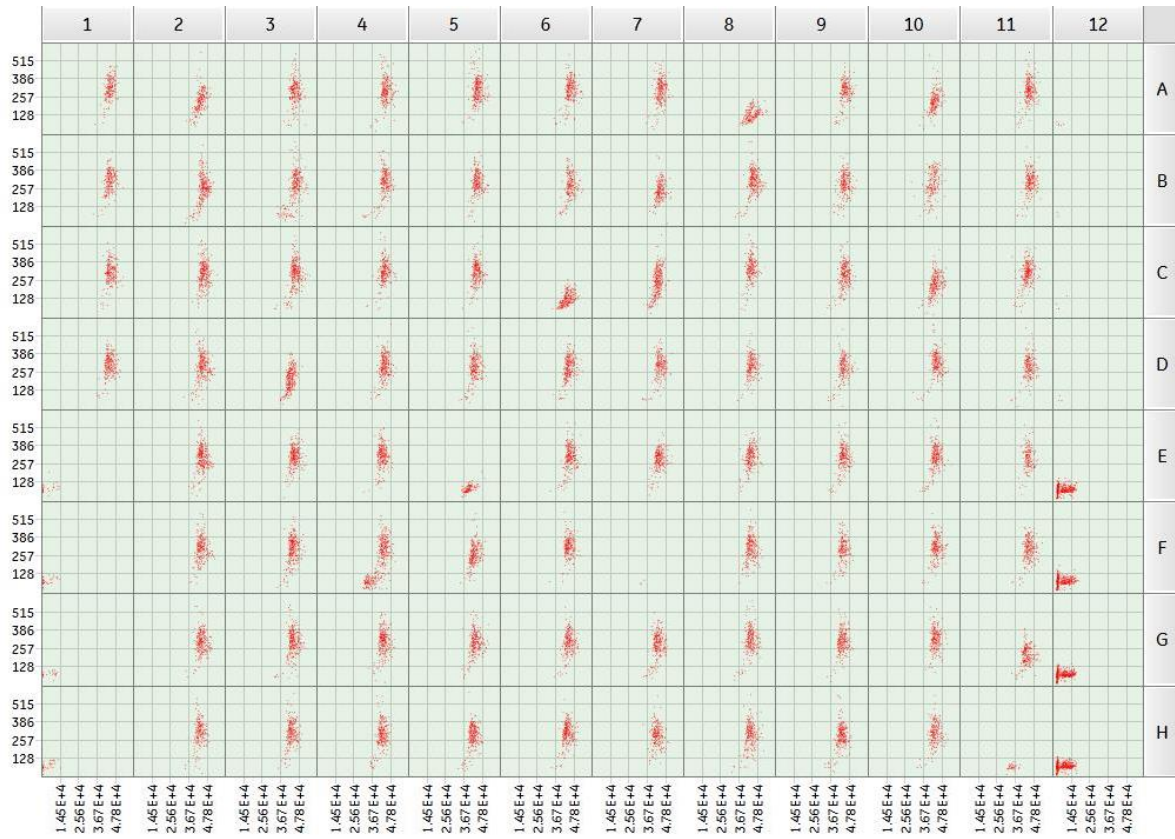
Placa 6



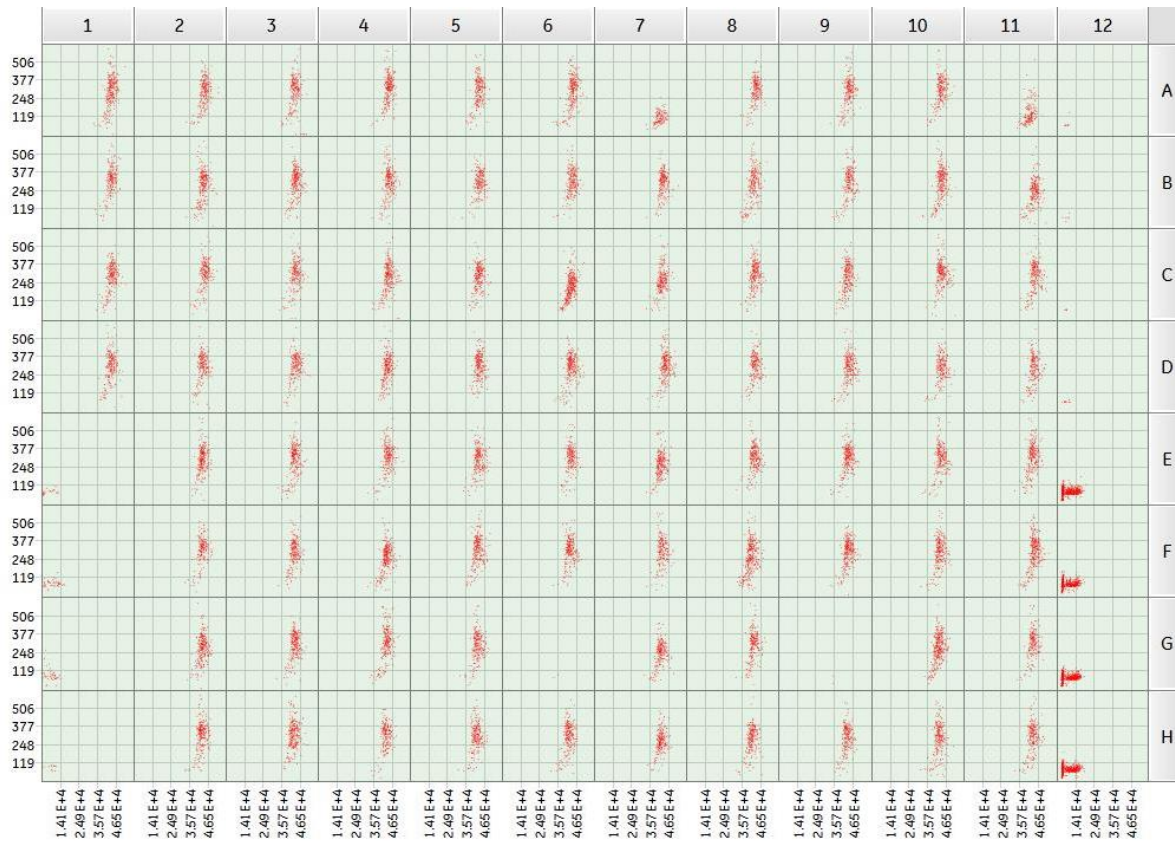
Placa 7



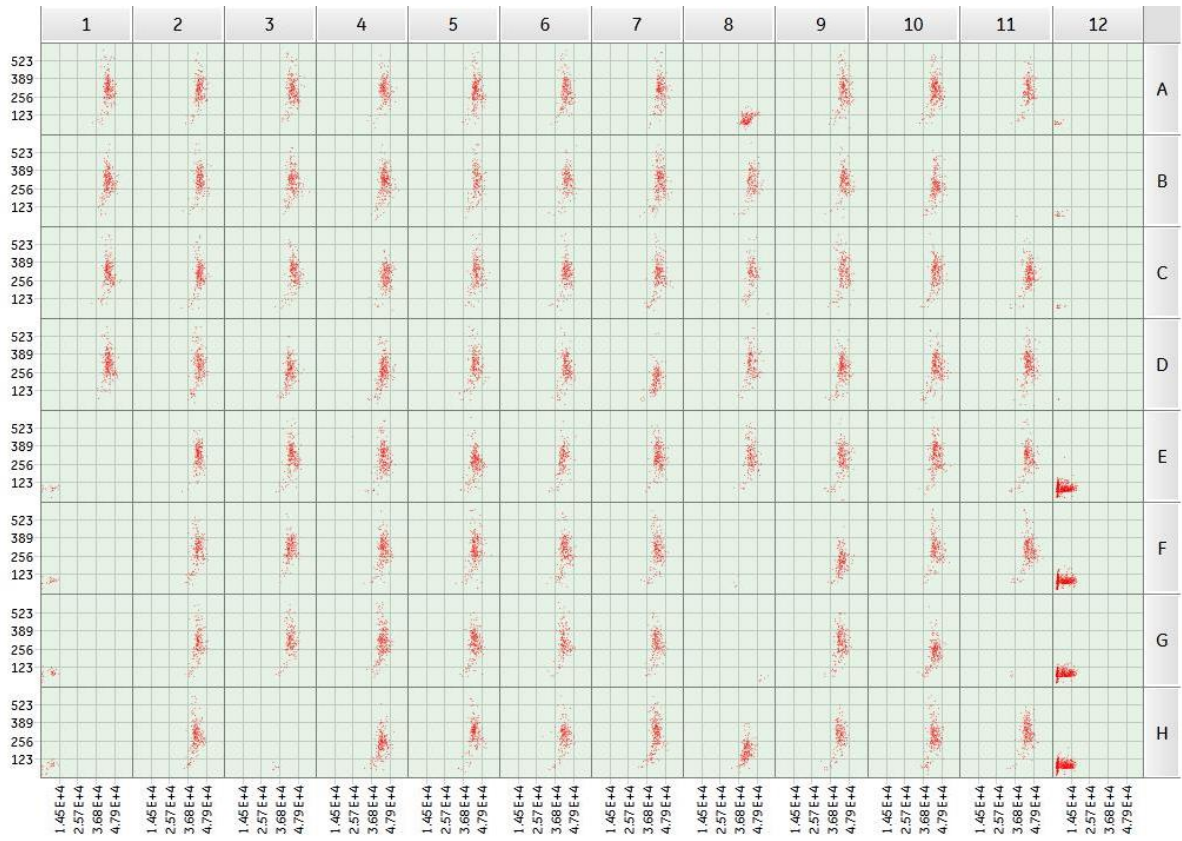
Placa 8



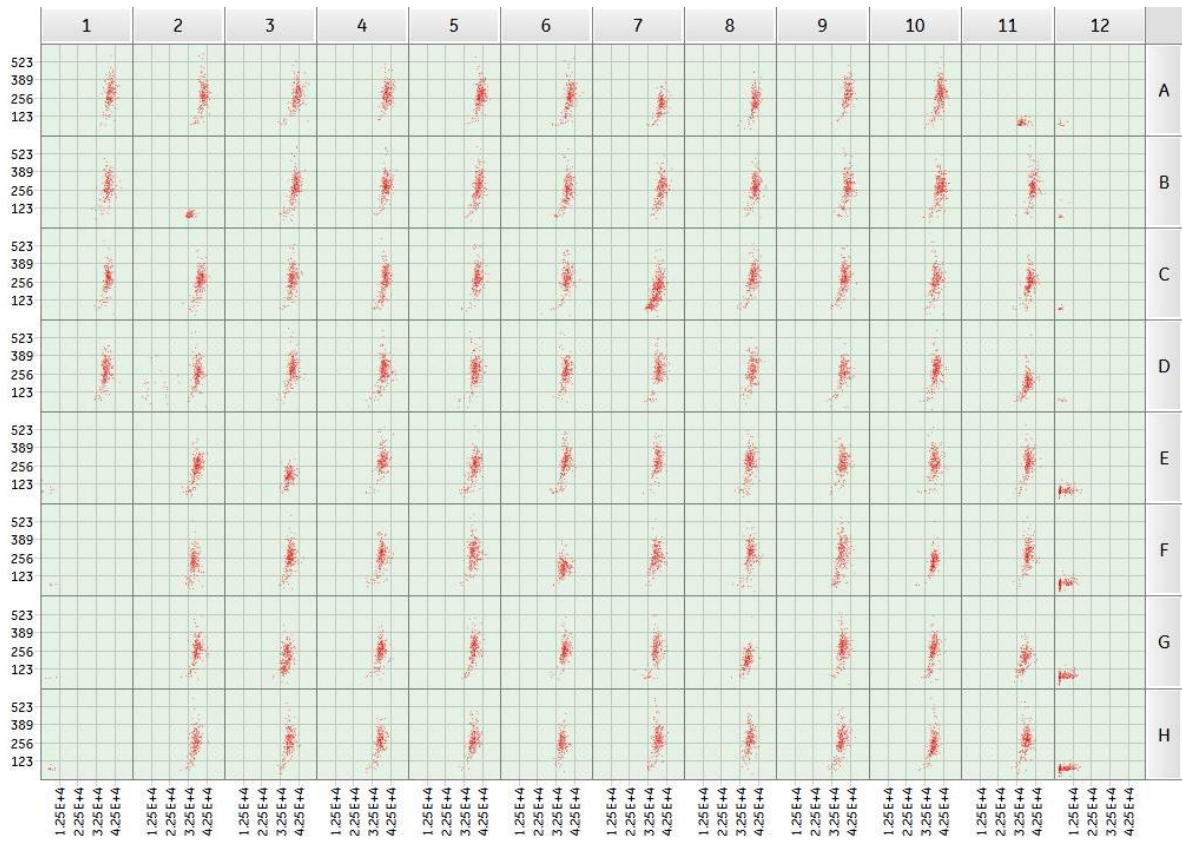
Placa 9



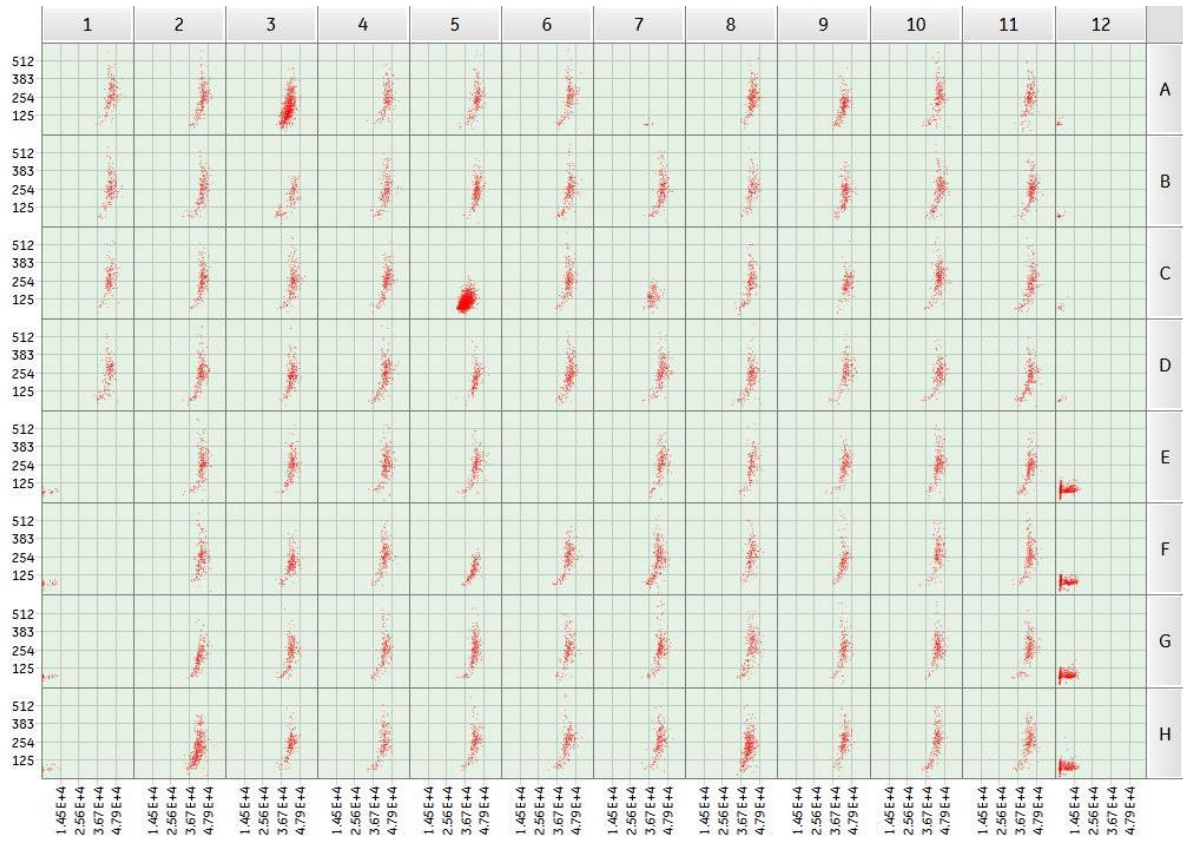
Placa 10



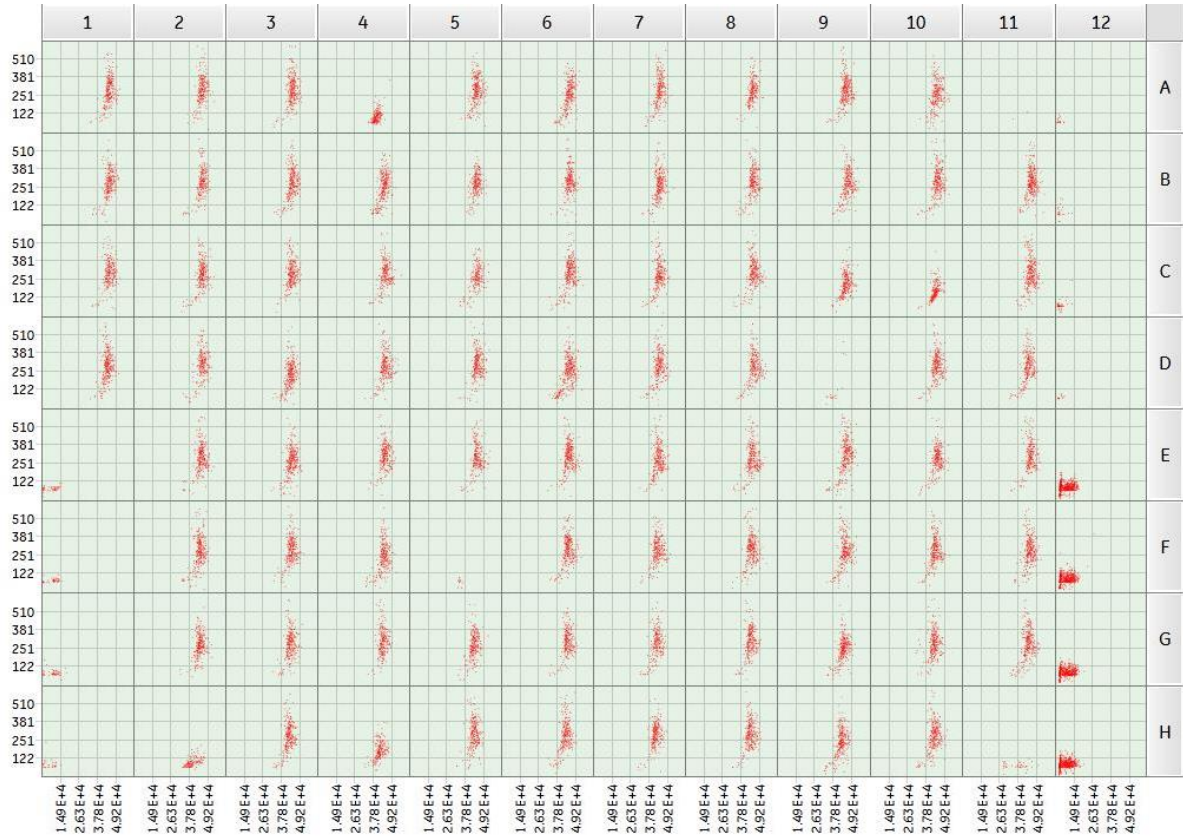
Placa 11



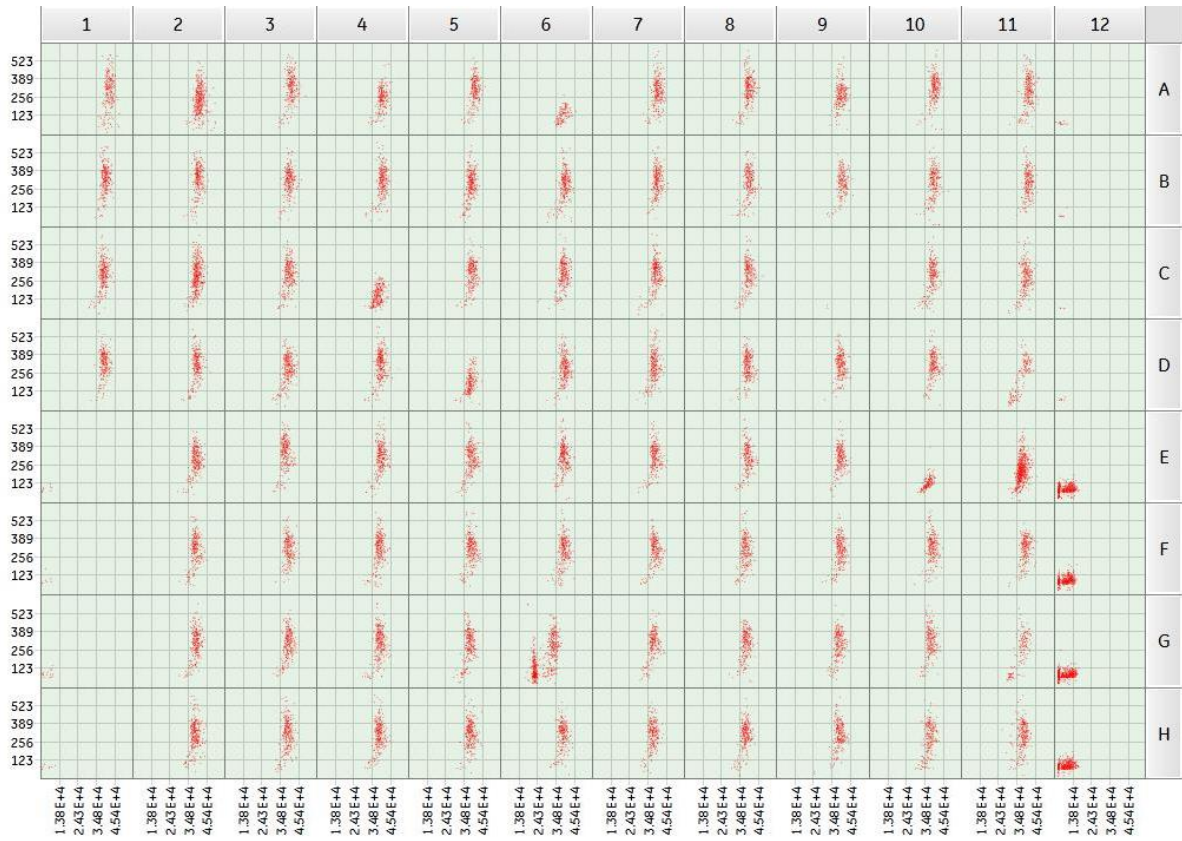
Placa 12



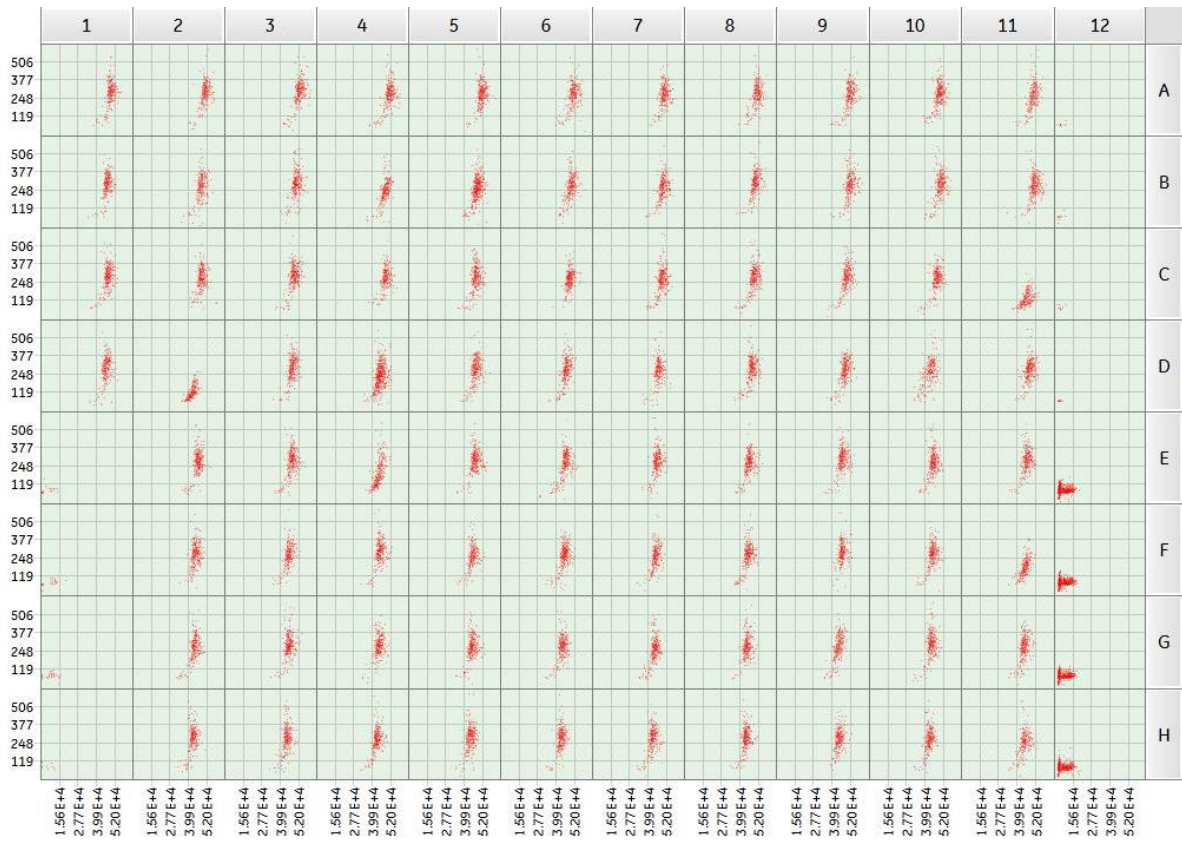
Placa 13



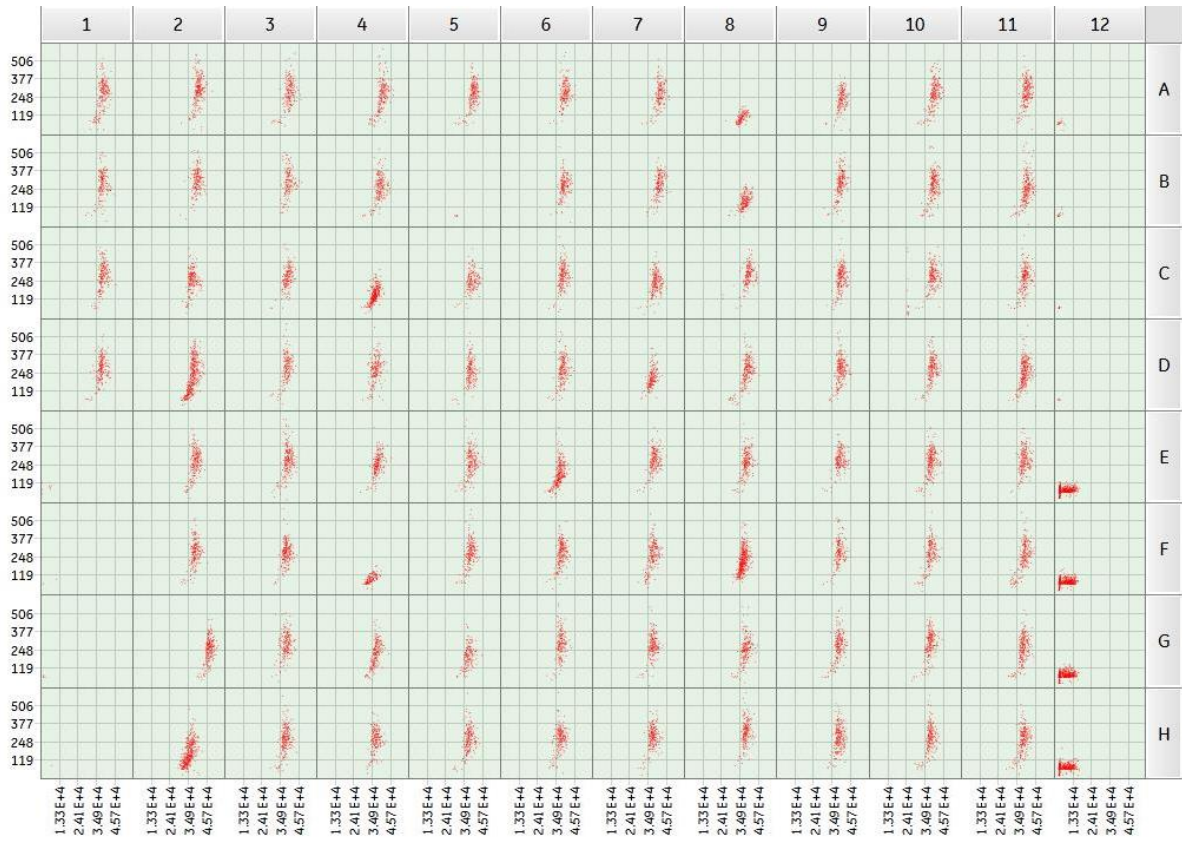
Placa 14



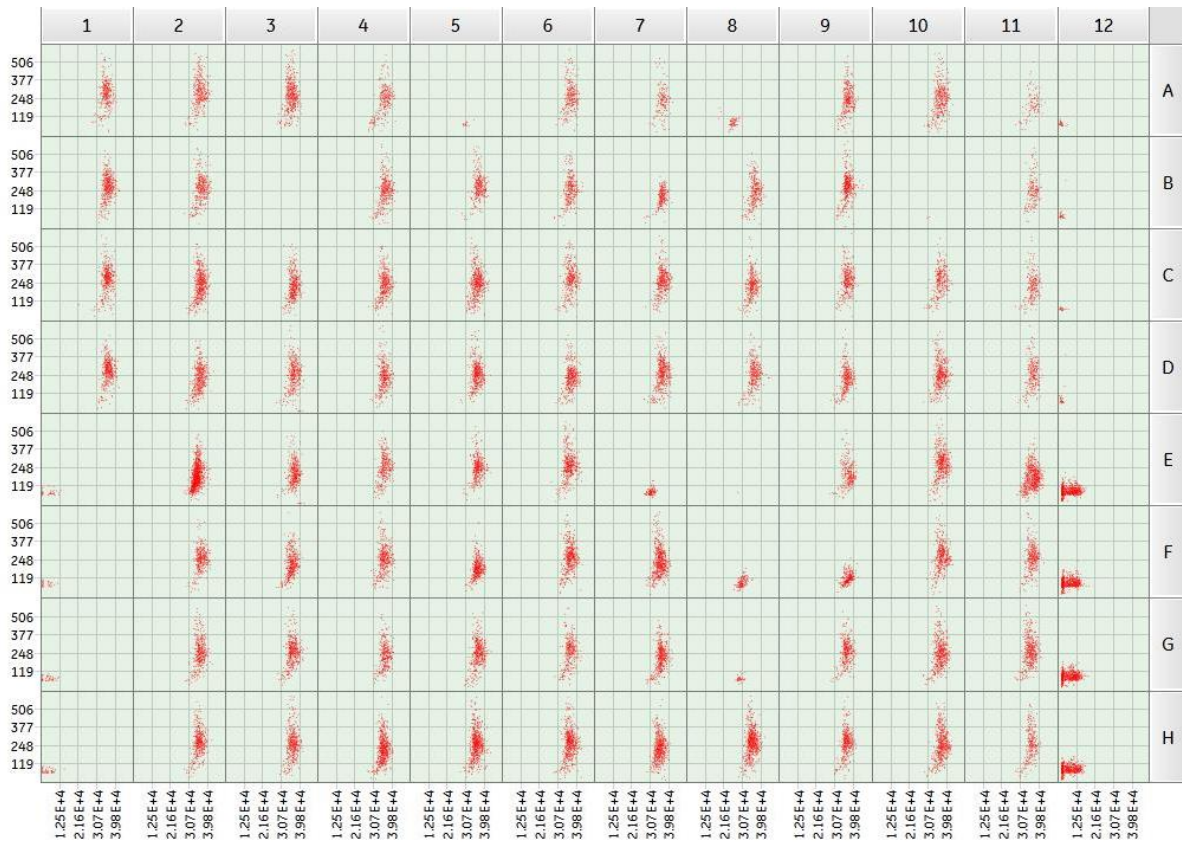
Placa 15



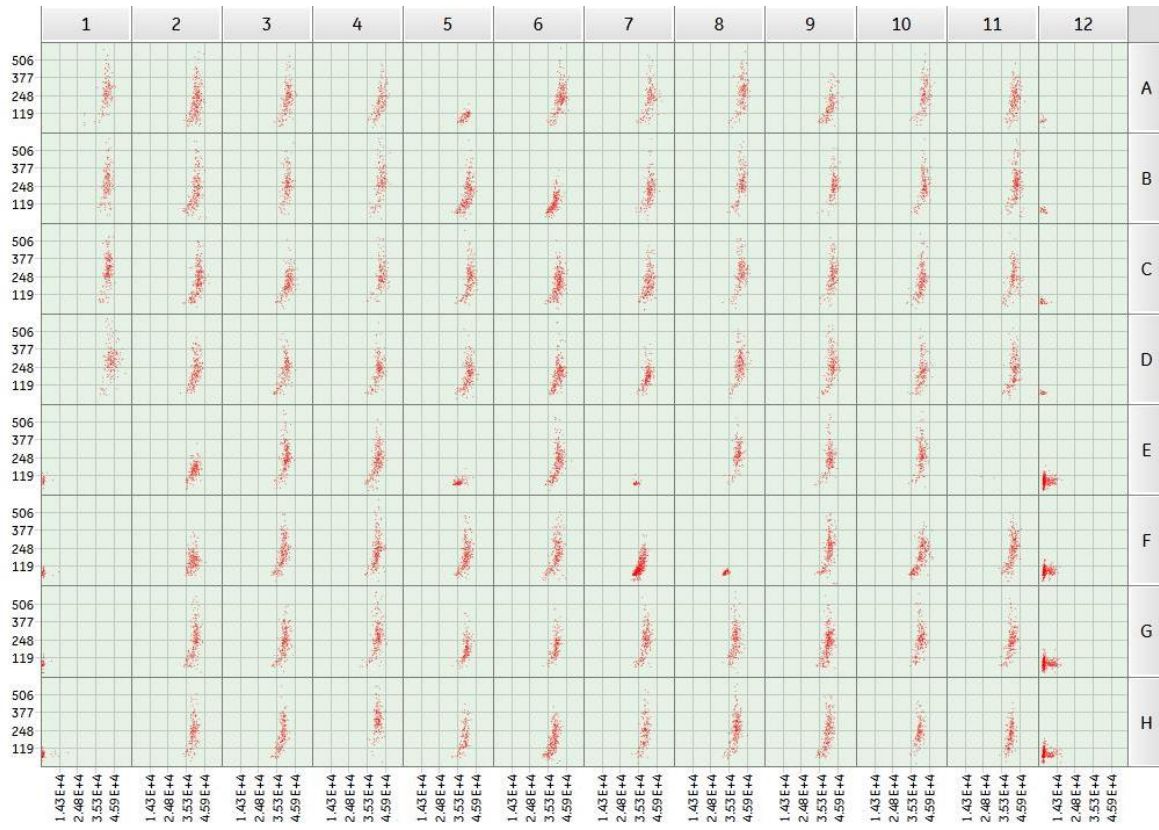
Placa 16



Placa 17



Placa 18



Placa 19

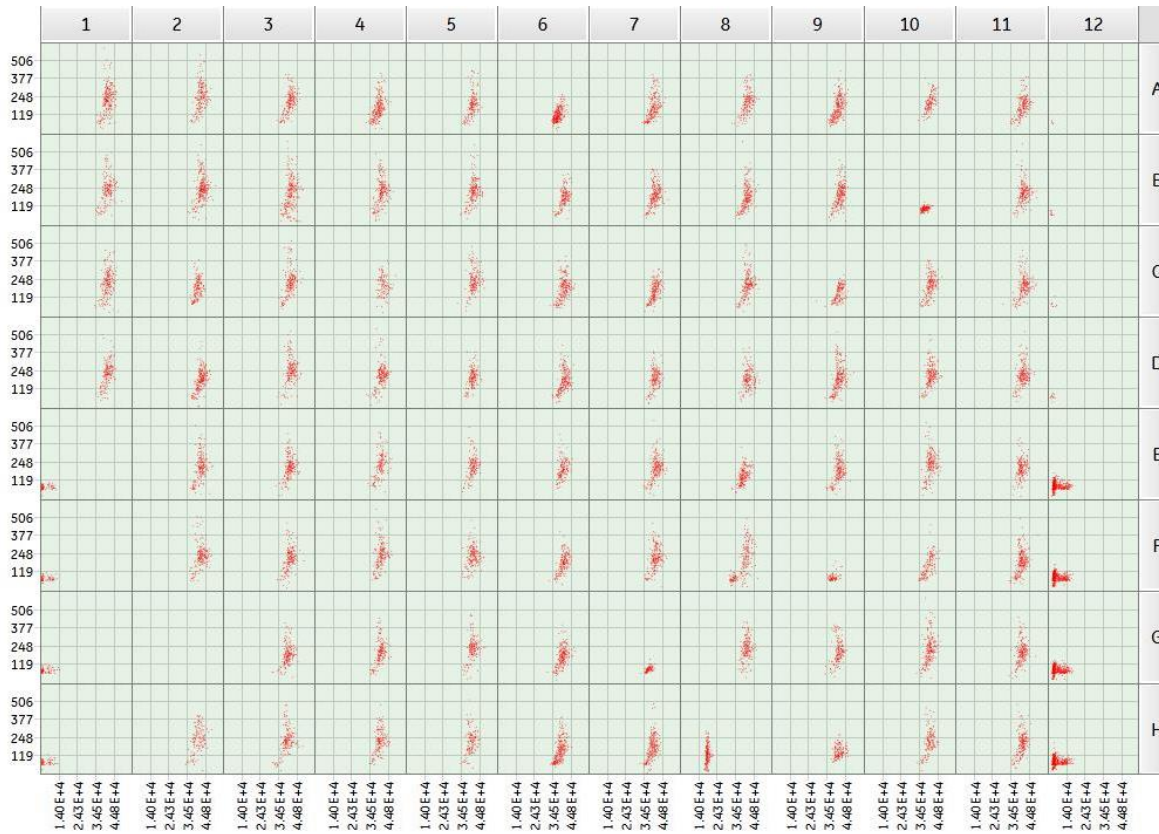


Tabla S2. Listado de compuestos que inhiben la formación de células titanes. Compuestos que han mostrado tener actividad inhibitoria de la titanización tras el cribado de los compuestos de la colección de Prestwick. Se indica el diámetro medio de las levaduras que se obtuvo tras su incubación en TCM en presencia de cada compuesto y el porcentaje de células titanes obtenido. Se especifican los compuestos que generaron levaduras con un diámetro medio por debajo de 15 μm .

Muestras control	Diámetro (μm)	Células Titanes (%)
Control TCM	21,5	93
Control Sab	8	0,5

Compuesto	Diámetro (μm)	Células Titanes (%)	Posición (placa y pocillo)	Clase terapéutica	Efecto terapéutico	Diana
Mitoxantrona dihidrocloruro	5,8	0	05G06	Oncología	Antineoplásico	Topoisomerasa II, ADN y ARN
Alexidina dihidrocloruro	6,7	0	10F08	Infectología	Antibacteriano	
Ebselen	6,7	0	17B03	Metabolismo SNC	Antiinflamatorio Antioxidante Antidiabético Estimulante SNC	Epóxido hidrolasa 2 bifuncional, Acetilcolinesterasa
Lactato de Etacridina	6,7	0	17E08	Infectología Endocrinología	Antifúngico Abortivo	Ciclooxigenasa-1
Tiomersal	6,8	0	17B10	Infectología	Antiséptico Antifúngico	Receptores de inositol trifosfato
Cinacalcet hidrocloreuro	6,8	0	19G02	Endocrinología	Antitiroideo	Receptor extracelular de calcio
Cloruro de Benzetonio	7,1	0	09G06	Infectología	Antibacteriano	
Merbromina	7,2	0	10G08	Infectología	Antibacteriano	
Yoduro de Propidio	7,2	0	10H03	Infectología	Antibacteriano	
Isetionato de Pentamidina	7,3	0	07H04	Infectología	Antifúngico Antiparasitario Antiprotozoario	
Cloruro de Tolonio	7,5	0	18E11	Cardiovascular Diagnóstico	Hemostático Diagnostico	ADN o ARN
Pamoato de Pirvinio	7,7	0,7	13H11	Metabolismo		
Dihidrocloruro de Flupentixol cis-(Z)	8	0	17A05	SNC	Estimulante SNC Antipsicótico	Receptor Dopamina (D1)
Nitroxolin	8,1	0	17G08	Infectología	Antibacteriano	Ciclooxigenasa-2, Catepsina B, Aminopeptidasa de metionina 2
Sertralina	8,2	1,3	13F05	SNC	Antidepresivo Estimulante SNC	Transportador de Serotonina
Clioquinol	8,6	0	12A07	Metabolismo	Amebicida Antifúngico Antiséptico	
Broxyquinolina	9	0,4	17E07	Metabolismo	Antidiarreico Antiprotozoario	Unión a proteína Acil-CoA
Azul de metileno	9,2	0	17A08	Dermatología Hematología	Antiséptico Antídoto Antimalárico	Citocromo-b5 reductasa, Óxido nítrico sintasa
Cloroquinaldol	9,7	0	18E07	Infectología	Antibacteriano Antiséptico Antifúngico	Crecimiento bacteriano
Hemisulfato de Proflavina	10	1,8	17F08	Infectología Diagnóstico	Antiséptico Antibacteriano Contraste	ADN y ARN bacteriano
Butenafina hidrocloreuro	10,3	1,2	08E05	Infectología Metabolismo	Antifúngico	
Lomitapida	10,3	3,6	19F09	Metabolismo	Hipocolesterolémico	Proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, Receptor de neuroquinina 1 (NK1)

Material Suplementario

Ebastina	10,7	0,7	18E05	Alergología	Antihistamínico	Receptor de Histamina (H1)
Nitrato de Sulconazol	10,8	1,3	11A11	Metabolismo	Antifúngico	
Nitrato de Econazol	11,1	6,5	04G05	Infectología	Antifúngico	
Halofantrina hidrocloreuro	11,2	7,0	13H02	Metabolismo	Antimalárico	
Fenoxipropazina dihidrocloreuro	11,2	0,8	19G07	SNC	Antidepresivo	Monoamino oxidasa
Nitrato de Butoconazol	11,3	14,4	06A09	Infectología Metabolismo	Antibacteriano Antifúngico	
Isotretinoína	11,4	11,0	04B07	Queratolítico		
Ácido retinoico	11,4	10,1	04B08	Queratolítico		
Metirapona	11,6	9,9	12C05	Endocrinología		
Enilconazol	11,9	8,1	13A04	Metabolismo	Antifúngico	
Liranaftato	12,1	18,2	10A08	Infectología Metabolismo	Antifúngico	
Albendazol	12,2	25,3	04A08	Infectología	Antihelmíntico Antiparasitario	
Amorolfina hidrocloreuro	12,2	13,8	16A08	Infectología Dermatología	Antifúngico	
GBR 12909 dihidrocloreuro	12,5	20,7	05G07	SNC	Antidepresivo	
Antimicina A	12,7	17,3	03G03	Infectología	Antibacteriano Antifúngico	
Nitrato de Oxiconazol	12,7	22,0	09A07	Infectología Metabolismo	Antifúngico	
Lactato de Prenilamina	12,9	26,4	07H11	Cardiovascular SNC	Antianginoso Ansiolítico Vasodilatador	
Tacrólimus	12,9	5,3	19B10	Inmunología	Inmunosupresor	Unión a proteína inmunofilin FKBP-12, FK506
Flubendazol	13	44,0	12B03	Metabolismo		
5-Fluorouracilo	13	24,3	15D02	Oncología	Antineoplásico	Timidilato sintasa
Tinoridina hidrocloreuro	13	23,8	18F07	Reumatología	Antiinflamatorio Analgésico Antipirético	Oxidación lipídica
Quinacrina hidrato de dihidrocloreuro	13,2	28,9	04H09	Infectología	Antiparasitario (helmintos, leishmania, malaria, protozoos, tricomonas)	
Zanamivir	13,2	24,9	19A06	Infectología	Antiviral	Neuraminidasa
Clotrimazol	13,5	25,9	04C08	Infectología	Antibacteriano Antifúngico	
(S)(-) Cicloserina	13,5	28,3	14E10	Infectología Metabolismo	Antibacteriano	
Verteporfin	13,5	41,1	14G06	Oftalmología		
Carbazocromo	13,6	25,3	18A05	Hematología Dermatología	Hemostático Antihemorroidal	Receptor α -adrenérgico
Climbazol	13,7	25,7	17F09	Dermatología	Antifúngico	Citocromo P450
Terconazol	13,8	32,1	07B06	Infectología Metabolismo	Antifúngico	
Exifona	13,8	39,7	18B06	SNC	Estimulante SNC	Anti-radicales
Tiostreptona	13,9	34,7	07E03	Infectología	Antibacteriano	
Bromuro de Pinaverio	14,1	33,5	09A11	Neuromuscular	Antiespasmódico	
Clofazimina	14,2	36,5	05F07	Infectología	Antibacteriano	
Isoconazol	14,3	42,5	02E08	Infectología Metabolismo	Antibacteriano Antifúngico	
Cinepazida maleato	14,5	49,0	19H06	Cardiovascular	Vasodilatador	Canales de calcio voltaje-dependientes
Fenelzina sulfato	14,8	51,4	03A11	Antidepresivo	Enzima	
Naftifina hidrocloreuro	14,8	49,6	14C04	Infectología Metabolismo	Antifúngico	
1,8-Dihidroxi-antraquinona	14,9	49,6	16C04	Gastroenterología	Laxante Antiemético	
Cisatracurio	14,9	47,1	16H02	Neuromuscular	Relajante muscular	

PUBLICACIONES

ORCID 0000-0003-4372-9646

García-Barbazán I, Torres-Cano A, García-Rodas R, Sachse M, Luque D, Megías D, Zaragoza Ó. Accumulation of endogenous free radicals is required to induce titan-like cells formation in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 2024 Jan 16;15(1):e0254923.

Rossi SA, **García-Barbazán I**, Chamorro-Herrero I, Taborda CP, Zaragoza Ó, Zambrano A. Use of 2D minilungs from human embryonic stem cells to study the interaction of *Cryptococcus neoformans* with the respiratory tract. *Microbes Infect*. 2023 Nov 18:105260.

Lara-Aguilar V, Rueda C, **García-Barbazán I**, Varona S, Monzón S, Jiménez P, Cuesta I, Zaballos Á, Zaragoza Ó. Adaptation of the emerging pathogenic yeast *Candida auris* to high caspofungin concentrations correlates with cell wall changes. *Virulence*. 2021 Dec; 12(1):1400-1417.

de Oliveira HC, Rossi SA, **García-Barbazán I**, Zaragoza Ó, Trevijano-Contador N. Cell wall integrity pathway involved in morphogenesis, virulence and antifungal susceptibility in *Cryptococcus neoformans*. *J Fungi*. 2021 Oct 5; 7(10): 831.

García-Barbazán I and Zaragoza Ó. Polyenes and Amphotericin B. In: *Encyclopedia of Mycology*. Zaragoza Ó and Casadevall A ,editors. Elsevier, Oxford. 2021. p. 421–426.

OTRAS PUBLICACIONES

Carucci M, Duez J, Tarning J, **García-Barbazán I**, Fricot-Monsinjon A, Sissoko A, Dumas L, Gamallo P, Beher B, Amireault P, Dussiot M, Dao M, Hull MV, McNamara CW, Roussel C, Ndour PA, Sanz LM, Gamo FJ, Buffet P. Safe drugs with high potential to block malaria transmission revealed by a spleen-mimetic screening. *Nat Commun*. 2023 Apr 7; 14(1):1951.

Eagon S, Hammill JT, Sigal M, Ahn KJ, Tryhorn JE, Koch G, Belanger B, Chaplan CA, Loop L, Kashtanova AS, Yniguez K, Lazaro H, Wilkinson SP, Rice AL, FaladeMO, Takahashi R, Kim K, Cheung A, DiBernardo C, Kimball JJ, Winzeler EA, Eribez K, Mittal N, Gamo FJ, Crespo B, Churchyard A, **García-Barbazán I**, Baum J, Anderson MO, Laleu B, Kiplin Guy R. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Dual-Stage Antimalarial Pyrazolo[3,4-b]pyridines. *J Med Chem*. 2020 Oct 22; 63 (20), 11902–11919.

Duez J, Carucci M, **García-Barbazán I**, Corral M, Pérez Ó, Presa JL, Henry B, Roussel C, Ndour PA, Bahamontes-Rosa N, Sanz L, Gamo FJ, Buffet P. High-throughput microfiltration to assess red blood cell deformability and screen for malaria transmission-blocking drugs. *Nat Prot*. 2018 Jun; 13 (6), 1362–1376.

García-Barbazán I, Trevijano-Contador N, Rueda C, de Andrés B, Pérez-Tavárez R, Herrero-Fernández I, Gaspar ML, Zaragoza Ó. The formation of titan cells in *Cryptococcus neoformans* depends on the mouse strain and correlates with induction of Th2-type responses. *Cell Microbiol*. 2016 Jan; 18(1):111–24.

Trevijano-Contador N, Herrero-Fernández I, **García-Barbazán I**, Scorzoni L, Rueda C, Rossi SA, García-Rodas R, Zaragoza Ó. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015; 6(1):66–74.