



Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*

Adriana Sánchez, Patricia Escandón y Elizabeth Castañeda

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

Resumen

Diferentes características fenotípicas relacionadas con la virulencia del complejo *Cryptococcus neoformans* han revelado su importancia en la patogenidad. De acuerdo con estos antecedentes, se estudió fenotípicamente y genotípicamente la expresión de algunos factores de virulencia de aislamientos clínicos de las especies del complejo mencionado. Se evaluaron 35 aislamientos de *C. neoformans* y 19 de *Cryptococcus gattii*. Se estudió el crecimiento a 37 °C, la morfología macroscópica y microscópica, la frecuencia del fenómeno *switching*, la actividad de 23 enzimas extracelulares, la variabilidad de las colonias en medio con floxina B, la determinación del gen de la fosfolipasa B, el tipo de locus sexual mediante PCR y el patrón molecular del gen *URA5* mediante RFLP. Todos los aislamientos crecieron a 37 °C. El tamaño capsular fue mayor para *C. gattii* (1,87 $\mu\text{m} \pm 1,47 \mu\text{m}$) que para *C. neoformans* (0,83 $\mu\text{m} \pm 0,15 \mu\text{m}$). El fenotipo *switching* se encontró principalmente en aislamientos de *C. gattii*. Todos los aislamientos expresaron la enzima ureasa y tenían una actividad media (Pz=0,54) en proteasas, pero *C. gattii* presentó una mayor actividad de la enzima fosfolipasa (Pz=0,43) y fenoloxidasa (Pz=0,003); el perfil enzimático con el API ZYM reveló una actividad baja en el 89% de los aislamientos para las dos especies. Se observaron diferencias morfológicas en medio con floxina B en el 13% de los aislamientos, de los cuales cinco eran *C. neoformans* y dos *C. gattii*. El gen de la fosfolipasa se amplificó en todos los casos. El 93% de los aislamientos de *C. neoformans* tenían el locus α y el 47,5% de *C. gattii* el locus *a*. Predominaron los patrones moleculares VNI (82,9%) y VGII (52,6%). Se observaron diferencias en la expresión in vitro de los factores de virulencia estudiados, lo cual podría verse reflejado en estudios futuros en un modelo in vivo.

Palabras clave

Cryptococcus neoformans, Factores de virulencia, Fenotipo, In vitro

In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates

Summary

Different phenotypic characteristics associated with virulence of the *Cryptococcus neoformans* species complex have shown an important role in their pathogenicity. In this study we have determined the role of phenotypically and genotypically factors of some virulence factors from clinical isolates in the two species of the complex; 35 *C. neoformans* and 19 *Cryptococcus gattii*. Growth at 37 °C, macroscopic and microscopic morphology, switching phenomenon, activity of 23 extracellular enzymes, variability of the colonies in agar with phloxin B; phospholipase B gene, and the mating type were determined by PCR; the molecular pattern was determined by *URA5* RFLP. All isolates grew at 37 °C, the capsular size was greater in *C. gattii* (1.87 $\mu\text{m} \pm 1.47 \mu\text{m}$) than in *C. neoformans* (0.83 $\mu\text{m} \pm 0.15 \mu\text{m}$). Switching was observed mainly in isolates of *C. gattii*. All isolates expressed the enzyme urease, a lower activity of the proteases (Pz= 0.54), but a higher activity of the phospholipase (Pz=0.43) and phenoloxidase (Pz=0.003) was determined for *C. gattii*.

Dirección para correspondencia

Dra. Patricia Escandón
Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud
Bogotá, Colombia
Tel.: +57 220 7700 ext 445/446
Fax: +57 220 7700 ext 445
E-mail: pescandon@ins.gov.co

Aceptado para publicación el 11 de febrero de 2008

The enzymatic profile with API ZYM showed a low activity for 89% of the isolates of both species. Variability of the strains was observed in 13% of the isolates in agar with phloxin B, five of which were *C. neoformans* and two *C. gattii*. Phospholipase B gene was amplified in all isolates; 93% of the *C. neoformans* had the α locus and 47.5% of *C. gattii* the α one. Molecular patterns VNI (82.9%) and VGII (52.6%) prevailed among the isolates studied. They were found different in vitro expressions of the virulence factors studied depending on the species, and this fact could be shown in future in vivo studies.

Key words *Cryptococcus neoformans*, Virulence factors, Phenotype, In vitro

El complejo *Cryptococcus neoformans* se clasifica actualmente en dos especies; *Cryptococcus neoformans*, con las variedades *neoformans* (serotipo D), *grubii* (serotipo A) y el híbrido AD, y *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C) [11,18]. Recientemente se han descrito también aislamientos híbridos entre los serotipos B y D [1]. Se han estudiado ciertas características fenotípicas que se asocian con la virulencia del complejo *C. neoformans* por su capacidad de ocasionar daño en el hospedero. Entre ellas están el polisacárido capsular [3,4], el crecimiento a temperaturas fisiológicas [3], las actividades enzimáticas ureasa, fosfolipasa, y la acumulación de melanina, inducida por la enzima fenoloxidasa, entre otras [6,7,31]. Las dos especies presentan diferencias en la afinidad por el hospedero: *C. neoformans* afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos [24] y *C. gattii* a inmunocompetentes [27]. Aunque los factores de virulencia mencionados se han estudiado en detalle, poco se sabe acerca de las diferencias existentes entre las dos especies, dada la compleja relación hospedero-patógeno. Adicionalmente, los procesos involucrados en la afinidad por un determinado hospedero no han sido establecidos. El objetivo de este trabajo fue determinar in vitro la expresión diferencial de los factores asociados con la virulencia en aislamientos clínicos colombianos de las dos especies del complejo *C. neoformans*.

Materiales y métodos

Aislamientos. Se estudiaron 54 aislamientos clínicos del complejo *C. neoformans* almacenados en el cepario del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de Bogotá, recuperados entre los años 2002 y 2005, de los cuales 31 correspondían a *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A (10 provenientes de pacientes VIH positivos), cuatro a la variedad *neoformans* serotipo D (dos de pacientes VIH positivos) y 19 a *C. gattii*, 16 de serotipo B (un aislamiento de un paciente VIH positivo) y tres de serotipo C (todos provenientes de pacientes VIH negativos). La identidad de todos los aislamientos fue confirmada mediante pruebas bioquímicas (ureasa, crecimiento en el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol y prueba de nitratos) [17] y serotipificados con el test comercial Crypto-Check (Iatron, Japón).

Factores de virulencia evaluados

Crecimiento a 37 °C. Se estudió la capacidad de crecer a 37 °C utilizando el protocolo descrito por Huérffano et al. [15], en agar glucosado de Sabouraud incubado durante 72 horas.

Morfología macroscópica. Se evaluó textura, aspecto y diámetro de las colonias cultivadas en agar glucosado de Sabouraud (Becton Dickinson, EE.UU.) durante siete

días a 30 °C [10]. El tamaño de las colonias se midió diariamente durante los siete días.

Morfología microscópica. Se determinó el tamaño celular y capsular según el protocolo descrito por Franzot [10], en caldo de Sabouraud, midiendo 20 células de cada aislamiento.

Determinación del fenotipo switching. Se evaluó la variación morfológica de cada aislamiento según el protocolo descrito por Fries et al. [12], en el medio agar glucosado de Sabouraud, con un crecimiento de 200-400 colonias por caja. Como cepa control se utilizó la NIH/87 proporcionada por June Kwon-Chung del NIAID/NIH, Bethesda, MD, EE.UU.

Ureasa. La actividad ureasa se midió en caldo de urea de acuerdo al protocolo descrito por Kwon-Chung et al. [17].

Proteasas y fosfolipasas. Se evaluó la producción de proteasas y fosfolipasas según Leone et al. [19] y Price et al. [25], en medios con base de carbono de levadura (Becton Dickinson) y agar glucosado de Sabouraud suplementado con yema de huevo (Becton Dickinson), respectivamente. Las pruebas se realizaron por triplicado. La lectura se realizó determinando los índices Pz (diámetro de la colonia dividido por el diámetro de la colonia más la zona de hidrólisis) [2,19,25,26]. Se determinaron los siguientes rangos de actividad enzimática de acuerdo con los valores Pz: Pz = 1, actividad negativa; Pz = 0,7-0,99, baja actividad enzimática; Pz = 0,5-0,69, actividad enzimática media, y Pz < 0,5, actividad enzimática alta [28].

Fenol oxidasa. Se estudió cualitativamente la actividad de esta enzima en el medio L-DOPA según el procedimiento descrito por Franzot et al. [10], clasificándose la actividad enzimática en los siguientes rangos, según la intensidad de pigmentación de las colonias: 0, negativa; 0,5-1, baja; 2, media, y 3-4, alta [28]. También se evaluó cuantitativamente su actividad por espectrofotometría [14], en el medio L-DOPA, ajustando las células a una concentración de 3×10^8 cel/ml. La concentración de melanina en las células fue determinada mediante una curva de calibración con diluciones seriadas de concentraciones conocidas de melanina (Sigma-Aldrich, USA) teniendo en cuenta la lectura por espectrofotometría a 475 nm. Cada una de estas pruebas se realizó por triplicado.

Evaluación de la actividad de 19 enzimas extracelulares. Se empleó la prueba comercial API ZYM (bioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la lectura e interpretación de los resultados. Se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como control. Los intervalos de actividad enzimática que se establecieron fueron los siguientes: 0, negativa; 1-2, baja;

3-4, media y 5, alta, para 19 enzimas, entre las que se encontraban la lipasa, la esterasa y la fosfatasa ácida [28].

Morfotipificación en medio con floxina B. Se estudió según el método de Kucsera et al. [16] la existencia de diferentes morfotipos entre los aislamientos en un medio con floxina B (Sigma-Aldrich), y se midió la cantidad de floxina B acumulada por las células mediante espectrofotometría, según la capacidad de cada aislamiento de acumular colorante en su interior.

Detección del gen de la fosfolipasa B mediante PCR. Se utilizaron iniciadores específicos (PBL1 y PLB2) para amplificar el gen de la fosfolipasa B, según Latouche et al. [20].

Determinación del locus sexual por PCR. Se realizó de acuerdo con las condiciones descritas por Halliday et al. [13] con iniciadores específicos para el locus sexual α y el α . Se utilizaron las cepas control de *C. neoformans*, CBS 6998 (α) y CBS 5757 (α), proporcionadas por Dee Carter, de la Universidad de Sydney, Australia.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen URA5. Se establecieron los patrones moleculares de los aislamientos según el protocolo descrito por Meyer et al. [22]. Como controles se utilizaron las cepas WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNIII), WM 629 (VNIV), WM179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 161 (VGIII), WM 779 (VGIV), del laboratorio de Investigación en Micología Molecular de la Universidad de Sydney, Australia.

Análisis estadístico. Para determinar si existían diferencias significativas entre las variables estudiadas se empleó un análisis de varianza, previa aplicación de la prueba de homogeneidad de varianzas (estadística de Levene). Para las variables fenoloxidasa, cuantificación de melanina, proteasas, API ZYM y cuantificación de floxina B, que cumplieron con los requisitos de homogeneidad, se aplicó el análisis de varianza. Para las variables que no cumplieron con dichos requisitos se utilizó la prueba estadística de Brown-Forsythe. Adicionalmente, para las variables cualitativas, se aplicó la prueba ji-cuadrado o el estadístico de Fisher de acuerdo con los resultados.

Resultados

Crecimiento a 37 °C. Todos los aislamientos crecieron a 37 °C después de 72 horas de incubación.

Morfología macroscópica. El 26% de los aislamientos de *C. neoformans* presentaron textura mucoide, en contraste con el 63% de los aislamientos de *C. gattii*. El 83% y el 74% de los aislamientos presentaron colonias de superficie y borde liso para *C. neoformans* y *C. gattii*, respectivamente. El diámetro de las colonias fue mayor para *C. gattii* ($7,7 \mu\text{m} \pm 1,3 \mu\text{m}$) en comparación con *C. neoformans* ($6,41 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,02$ Kruskal-Wallis). Sin embargo, en cuatro aislamientos, uno de *C. neoformans* serotipo A y tres de *C. gattii* serotipo B, fueron observadas diferencias morfológicas al observar textura mucoide y no mucoide en un mismo aislamiento, al igual que colonias de borde y superficie rugosa.

Morfología microscópica. No se encontraron diferencias significativas entre el tamaño celular de *C. neoformans* ($4,30 \mu\text{m} \pm 0,51 \mu\text{m}$) y *C. gattii* ($3,90 \mu\text{m} \pm 1,26 \mu\text{m}$). En contraste, el tamaño capsular mostró diferencias significativas ($p = 0,01$ Brown Forsythe) para las dos especies, siendo mayor en *C. gattii* ($1,87 \mu\text{m} \pm 1,47 \mu\text{m}$) que en

C. neoformans ($0,83 \mu\text{m} \pm 0,15 \mu\text{m}$). Además, se encontraron dos aislamientos, uno en cada grupo, que presentaron mayor tamaño capsular ($6,1 \mu\text{m}$) con respecto al de los restantes aislamientos.

Fenotipo switching. Se observó cambio en la morfología macroscópica en el 36,8% de los aislamientos de *C. gattii* y en el 2,9% de los de *C. neoformans*, con diferencias significativas entre las dos especies ($p = 0,002$; estadístico de Fisher).

Actividad enzimática

La actividad de la enzima ureasa y los rangos de actividad de las enzimas proteasa, fosfolipasa y fenoloxidasa se observan en la Tabla.

La evaluación por espectrofotometría de la actividad fenoloxidasa reveló diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies ($p = 0,003$; estadístico de Fisher), encontrando mayores unidades de esta enzima en los aislamientos de *C. gattii* (47,5 unidades de lacasa), que en *C. neoformans* (35,7 unidades de lacasa) ($p = 0,029$). Sin embargo, un aislamiento del serotipo A presentó 2,6 veces más unidades de lacasa (94,2 unidades de lacasa) que el promedio calculado para el grupo.

Evaluación de la actividad de 19 enzimas extracelulares. Se encontró actividad para *C. neoformans* en las 19 enzimas y para *C. gattii* en siete enzimas, con un rango variable desde 0 (sin actividad enzimática) a 5 (actividad alta). Todas las cepas mostraron actividad de la enzima esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida y fosfoamidasa.

Morfotipificación en medio con floxina B. Un 13% de los aislamientos presentaron colonias heterogéneas (con diferente grado de pigmentación), de las cuales cinco (71,5%) correspondían a *C. neoformans* y dos (29%) a *C. gattii*; no se encontraron diferencias significativas entre las especies del complejo ($p = 0,526$; estadístico de Fisher). No se observó relación alguna entre las características estudiadas y el tipo de coloración de las colonias (rojas o rosadas) aisladas en ninguno de los siete aislamientos (datos no presentados).

Detección del gen de la fosfolipasa B. En todos los aislamientos se amplificó un fragmento de 674 pb correspondiente al gen de la fosfolipasa B, con un papel importante en la virulencia del hongo.

Determinación del locus sexual. Un 94,3% de los aislamientos de *C. neoformans* tenían el locus sexual α

Tabla. Rangos de actividad de proteasas, fosfolipasas y fenoloxidasas en los aislamientos del complejo *C. neoformans*.

Enzimas y rango de actividad	Especie		P
	<i>C. neoformans</i> (n=35)	<i>C. gattii</i> (n=19)	
	n (%)		
Proteasas			
Alta	13 (37,1)	4 (21)	0,579
Media	17 (48,6)	9 (47)	0,879
Baja	5 (14,3)	6 (32)	0,035
Fosfolipasas			
Alta	11 (31,4)	3 (16,8)	0,142
Media	24 (68,6)	16 (84,2)	0,386
Fenoloxidasa			
Alta	0 (0)	2 (10,5)	-
Media	8 (22,9)	9 (47,4)	0,765
Baja	27 (77,1)	8 (42,1)	0,005

mientras que este porcentaje fue del 47,4% en el grupo de los aislamientos de *C. gattii* ($p < 0,01$).

RFLP del gen URA5. El patrón molecular VNI fue observado en el 82,9% de los aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A). Para *C. gattii*, serotipo B, se observó el patrón VGII en el 52,6% de los aislamientos.

Discusión

Los diferentes estudios realizados no han logrado establecer con claridad si la afinidad de *C. neoformans* y *C. gattii* por el hospedero está en relación con la expresión diferencial de los factores de virulencia de las dos especies del complejo [3].

Se determinó en ambas especies el crecimiento a temperatura fisiológica (37 °C). La morfología no mucóide y de superficie lisa de las colonias es una característica que se relaciona con cepas menos virulentas que aquellas mucóides y rugosas [12], encontradas en este estudio principalmente en *C. gattii*.

La presencia de la cápsula es otro factor de virulencia de gran importancia para la defensa del hongo ante la respuesta inmune del hospedero [4]; sin embargo, se han encontrado variaciones en su tamaño de acuerdo con el hospedero, por lo que sería de gran importancia realizar mediciones que permitan establecer su comportamiento in vivo. La cápsula se observó en todos los aislamientos estudiados, si bien su tamaño fue mayor en *C. gattii*, en concordancia con trabajos previos [3]. El fenotipo *switching*, que le permite evadir el sistema inmune del hospedero, se presentó principalmente en *C. gattii*, demostrando así su habilidad para generar nuevas variantes para escapar a la respuesta inmune del hospedero. Sería de gran importancia estudiar estos aislamientos, ya que este fenómeno había sido descrito principalmente en *C. neoformans* [8,12].

Se ha descrito la importancia de diferentes enzimas extracelulares, como la ureasa, proteasa, fosfolipasa y fenoloxidasas, entre otras, que le permiten a la levadura alterar el pH en el fagolisosoma, degradar proteínas de importancia para la respuesta inmune del hospedero, favorecer la invasión mediante el daño de membranas celulares, o evitar procesos oxidativos, protegiéndose así de la fagocitosis [3,6,7,19,30]. Ruma et al. [26] encontraron una actividad proteolítica menor en aislamientos de *C. gattii* que en *C. neoformans*, contrario a lo obtenido en el presente estudio, donde se observó una actividad media para los aislamientos de las dos especies sin diferencias significativas. Estas diferencias pueden deberse al tipo y cantidad de proteinasas producidas por cada aislamiento, lo cual puede a su vez influenciar el desarrollo de la enfermedad. Estudios in vitro de enzimas como las fosfolipasas han demostrado similar actividad en las dos especies [23,28] lo que ratifica los resultados obtenidos en este estudio. Estudios de disrupción genética han revelado la importancia del gen de la fosfolipasa B en la virulencia del hongo en modelos animales, observándose una disminución en la actividad de esta enzima cuando el gen está alterado [5]. La presencia del gen de la fosfolipasa B se observó en todos los aislamientos, al igual que todos presentaron actividad de esta enzima in vitro. Se ha descrito que el gen de la fosfolipasa B tiene un papel importante en la virulencia de *C. neoformans* al estar involucrado en la rotura de fosfolípidos, ocasionando daños en el tejido del hospedero [20].

La fenoloxidasas, al actuar sobre compuestos fenólicos en la producción de la melanina, juega un importante papel en la protección de esta levadura tanto en el ambiente como en el hospedero [30]. A diferencia de lo descrito por Huérfano et al., donde los aislamientos de *C. neoformans*

tuvieron mayor actividad, nuestros datos revelaron mayor actividad para *C. gattii*, lo que a su vez podría reflejar una mayor virulencia de estos últimos, debido a una mayor acumulación de melanina en la célula [15].

En un estudio realizado por Vidotto et al. se destaca la actividad de la enzima fosfatasa ácida, calificándola como un importante factor de virulencia por su alta actividad en la mayoría de los aislamientos estudiados [29]. De igual forma, nuestros datos muestran que todos los aislamientos presentaron actividad alta de esta enzima, ratificando su importancia como un factor de virulencia a considerar para futuros estudios.

La coloración de las colonias en medio con floxina B se relaciona con membranas normales o disfuncionales que permiten la entrada del pigmento [16]. Este hecho podría relacionarse con la susceptibilidad a agentes antifúngicos que traspasen la membrana, sugiriendo una nueva alternativa para futuros estudios en cuanto a la relación entre susceptibilidad a antifúngicos y el tipo de coloración de la colonia.

Estudios previos han demostrado la prevalencia del tipo sexual α en aislamientos clínicos, asociándose con una mayor virulencia, lo que ha sido demostrado en modelos animales [13,32]. En nuestro estudio, el 78% de los aislamientos presentaron dicho tipo sexual.

Los patrones moleculares VNI y VGII predominaron en los aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii*, respectivamente, lo que concuerda con lo descrito para aislamientos procedentes de Colombia e Iberoamérica [9,22].

Las especies del complejo *C. neoformans* afectan tanto a hospederos inmunosuprimidos como inmunocompetentes, por lo que podrían clasificarse como patógenos de clase II, según McClelland et al. [21]. Sin embargo, la capacidad que tiene esta levadura para afectar a individuos inmunocompetentes viene determinada por la expresión de factores que promueven la habilidad de evadir la respuesta inmune en un individuo normal [21]. Esto se ve reflejado en los aislamientos de *C. gattii* estudiados, que presentaron mayor actividad en factores de virulencia importantes. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las especies del complejo muestran una expresión diferencial en los factores estudiados que le permite a *C. gattii* comportarse como un patógeno primario y a *C. neoformans*, con menor actividad en las características fenotípicas estudiadas, afectar a pacientes inmunocomprometidos; sin embargo, es necesario realizar estudios en modelos animales que permitan corroborar la afinidad de cada especie por un hospedero determinado. Los resultados muestran aislamientos que presentan características diferentes con respecto a las establecidas para otros de la misma especie, características relacionadas principalmente con mayor virulencia.

Actualmente, en nuestro laboratorio, se están realizando estudios para conocer el comportamiento biológico de *C. neoformans* en un modelo experimental en ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos para, posteriormente, determinar si los factores implicados en la virulencia varían de acuerdo con el ambiente en el cual se desarrollan.

Los autores agradecen al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas –Colciencias– la financiación del proyecto (2104-05-14656). Agradecen también a Elizabeth López y Consuelo Pinilla, del Grupo de Sociedad y Salud del Instituto Nacional de Salud (INS), la asesoría en el análisis estadístico, y al doctor Luis Alberto Gómez, del Grupo de Fisiología Molecular del INS, su dirección en la cuantificación de la enzima fenoloxidasas.

Bibliografía

1. Bovers M, Hagen F, Kuramae E, Diaz M, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld L, Boekhout T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. FEMS Yeast Res 2006; 6: 599-607.
2. Bruske C. Proteolytic activity of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1986; 23: 631-633.
3. Casadevall A, Perfect J. *Cryptococcus neoformans*. Washington, D.C., American Society for Microbiology Press, 1998.
4. Chang Y, Kwon-Chung J. Complementation of a capsule deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. Mol Cell Biol 1994; 14: 4912-4919.
5. Chen S, Pirofski L, Casadevall A. Extracellular proteins of *Cryptococcus neoformans* and host antibody responses. Infect Immun 1997; 65: 2599-2605.
6. Cox G, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect J. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infect Immun 2000; 68: 443-448.
7. Cox G, Mcdade H, Chen S, Gotfredson M, Wright L, Sorrell T, Leidich S, Casadevall A, Ghannoum M, Perfect J. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol 2001; 39: 166-175.
8. De Souza C, Heitman J. Infects me, infects me not: phenotypic switching in fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. J Clin Inv 2001; 108: 1577-1578.
9. Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res 2006; 6: 625-635.
10. Franzot S, Mukherjee J, Cherniak R, Chen L, Hamdan J, Casadevall A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. Infect Immun 1998; 66: 89-97.
11. Franzot S, Salkin I, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 838-840.
12. Fries B, Goldman D, Cherniak R, Ju R, Casadevall A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. Infect Immun 1999; 67: 6076-6083.
13. Halliday C, Bul T, Krockenberger M, Malik R, Ellis D, Carter D. Presence of α and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. J Clin Microbiol 1999; 37: 2920-2926.
14. Hicks J, Bahn Y, Heitman J. Pde1 phosphodiesterase modulates cyclic AMP levels through a protein kinase A mediated negative feedback loop in *Cryptococcus neoformans*. Eucaryot Cell 2005; 4: 1971-1981.
15. Huérfano S, Cepero MC, Castañeda E. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*. Biomédica 2003; 23: 328-340.
16. Kucsera J, Yarita K, Takeo K, Yoshida S, Gacser A, Hamari Z, Avasi Z, Kevei F. Intra-strain variability of *Cryptococcus neoformans* can be detected on phloxin B medium. J Basic Microbiol 2002; 42: 111-119.
17. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. En: Kwon-Chung KJ, Bennett JE (Eds.) Medical Mycology. Pennsylvania, USA Lea & Febiger Press; 1992: 397-446.
18. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell J, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). Taxon 2002; 51: 804-806.
19. Leone R, Cabeli P, Sinicco A, Ito Kuwa S, Vidotto V. Relationship between protease production and capsule size in *Cryptococcus neoformans*. J Mycol Med 1999; 9: 42-44.
20. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, Meyer W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 2080-2086.
21. McClelland E, Bernhardt P, Casadevall A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. Infect Immun 2006; 74: 1500-1504.
22. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E and the Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003; 9: 189-195.
23. Pienthaweechai K, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S, Vidotto V, Koga-Ito CY. Phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in Thailand and Italy. J Mycol Med 1999; 9: 45-48.
24. Powderly WG. Cryptococcal meningitis and AIDS. Clin Infect Dis 1993; 17: 837-842.
25. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982; 20: 7-14.
26. Ruma P, Browniee A, Sorrell T. A rapid method for detection of extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. J Med Microbiol 2000; 49: 733-737.
27. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol 2001; 39: 155-168.
28. Vidotto V, Yumi-Koga-Ito C, Sinicco A, Di Perri G, Aoki S, Nakamura K. Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strain isolates from AIDS patients and from environmental sources. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 14-19.
29. Vidotto V, Ito-Kuwa S, Nakamura K S, Nakamura K, Auki S, Melhem M, Fukushima K, Bollo E. Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* strain isolates from AIDS patients in different countries. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 216- 220.
30. Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol 1998; 180: 1570-1572.
31. Xudong Z, Meter RW. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res 2004; 5: 1-10.
32. Yan Z, Li X, Xu J. Geographic distribution of mating types alleles of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. J Clin Microbiol 2002; 40: 965-972.