

Crecimiento del complejo *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* en extractos de excretas de palomas *

Luz Dary Caicedo Bejarano

Profesora asociada Universidad Santiago de Cali, Cali - Colombia

luz.caicedo@correounivalle.edu.co

 <https://orcid.org/0000-0003-4637-6268>

María Inés Álvarez

Profesora titular Universidad del Valle, Cali - Colombia

maria.alvarez@correounivalle.edu.co

 <https://orcid.org/0000-0001-6033-166X>

RESUMEN

Cryptococcus neoformans/*Cryptococcus gattii* son agentes etiológicos de la criptococosis, el primero tiene distribución mundial y su hábitat principal son las excretas de palomas (*Columba livia*), mientras que el último se ha aislado de árboles y en pocas ocasiones de heces de aves. En este estudio se comparó en condiciones de laboratorio, el crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* en extractos de excretas de paloma. Se utilizaron dos extractos de heces de aves cautivas: uno de una muestra en la que se aisló *C. neoformans* (extracto positivo) y otro de una muestra negativa para este hongo (extracto negativo), los cuales fueron inoculados con *C. neoformans* y *C. gattii*. Los extractos permitieron el desarrollo de las dos especies y, mostraron un patrón de crecimiento uniforme en el extracto negativo, mientras que, en el positivo, el crecimiento de *C. neoformans* fue mayor comparado con el de *C. gattii* ($P = 0.0001$). El crecimiento de *C. gattii* fue menor a un pH superior a 7,5, mientras que el crecimiento de *C. neoformans* no mostró diferencias significativas en los dos extractos independiente de las variaciones del pH. Se necesitan más estudios para elucidar la interacción de estas dos especies en las excretas de palomas.

PALABRAS CLAVE

Cryptococcus gattii, *Cryptococcus neoformans*, crecimiento, excreta de paloma, *Columba livia*

Growth of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex in pigeon excreta

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans/*Cryptococcus gattii* are etiologic agents of cryptococcosis, the former has a worldwide distribution, and its habitat is associated with pigeon excreta (*Columba livia*), whereas the latter it has been mainly associated with trees and rarely from the feces of birds. In this study was to compare, under laboratory conditions, the growth of *C. neoformans* and *C. gattii* in extracts of pigeon excreta. Two extracts of captive bird feces were used: one prepared from a sample in which *C. neoformans* was isolated (positive extract) and one from which sample was negative for this fungus (negative extract). Under laboratory conditions, the extracts allowed the development of both species. Both showed a uniform pattern of growth in the negative extract, whereas in the positive, *C. neoformans*

Recibido: 07/05/2019 Aceptado: 15/12/2019

* Este es un artículo Open Access bajo la licencia BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)

Cómo citar este artículo: CAICEDO BEJARANO, Luz Dary y ÁLVAREZ, María Ines. Crecimiento del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* en extractos de excretas de palomas. En: Entramado. Enero - Junio, 2020 vol. 16, no. 1, p. 218-229 <http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.6087>



growth was significantly higher than that of *C. gattii* ($P = 0.0001$). The growth of the *C. gattii* was lower in positive extracts and it seems to decrease at pH greater than 7.5, whereas the growth of *C. neoformans* showed no significant differences regardless of pH variations. Further studies are need to elucidate the interaction between these two species in the excreta of pigeon.

KEYWORDS

Cryptococcus gattii, *Cryptococcus neoformans*, growth, pigeon excreta, *Columba livia*

Crecimiento do complexo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* em extratos de excrementos de pombos

RESUMO

Cryptococcus neoformans / *Cryptococcus gattii* são agentes etiológicos da criptococose, o primeiro tem distribuição mundial e seu habitat principal é a excreção de pombos (*Columba livia*), enquanto o último foi isolado de árvores e raramente de fezes de aves. Neste estudo, o crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii* nos extratos de excrementos de pombo foi comparado em condições de laboratório. Foram utilizados dois extratos de fezes de aves em cativeiro: um de uma amostra em que *C. neoformans* (extrato positivo) foi isolado e outro de uma amostra negativa para esse fungo (extrato negativo), que foi inoculado com *C. neoformans* e *C. gattii*. Os extratos permitiram o desenvolvimento das duas espécies e mostraram um padrão de crescimento uniforme no extrato negativo, enquanto no positivo o crescimento de *C. neoformans* foi maior em comparação ao de *C. gattii* ($P = 0,0001$). O crescimento de *C. gattii* foi menor a pH maior que 7,5, enquanto o crescimento de *C. neoformans* não mostrou diferenças significativas nos dois extratos, independentemente das variações de pH. Mais estudos são necessários para elucidar a interação dessas duas espécies nos excrementos de pombos.

PALAVRAS-CHAVE

Cryptococcus gattii, *Cryptococcus neoformans*, crescimento, excrementos de pombos, *Columba livia*

I. Introducción

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* es un complejo (Kwon-Chung *et al.*, 2017) con varias especies crípticas (Hagen *et al.*, 2015). *C. neoformans* incluye las especies *C. neoformans* y *C. deneoformans* con cinco tipos moleculares y *C. gattii* con cuatro tipos moleculares (Meyer *et al.*, 2009). A lo largo de este artículo se adopta la denominación más simple de *C. gattii* y *C. neoformans*. Las dos especies están asociadas con infecciones en humanos y animales (Rajasingham *et al.*, 2017), causan criptococosis, entidad que, a nivel mundial, se relaciona principalmente con pacientes VIH+/SIDA (O'Halloran, Powderl y Spec, 2017); difieren por sus características genéticas, bioquímicas (Chen *et al.*, 2017; Watkins, King y Johnston. 2017; Chang y Chen, 2015), ecológicas (May, Stone, Wiesner Bicanic, y Nielsen, 2015; Herkert *et al.*, 2017), distribución geográfica (Rhodes *et al.*, 2017, Cogliati *et al.*, 2017), manifestaciones clínicas, tipo de huésped afectado y su respuesta a los tratamientos antimicóticos (Maziarz y Perfect, 2016).

Las excretas de aves en especial las de paloma (*Columba livia*) son la fuente principal de *C. neoformans* (Huamán *et*

al., 2018; Menezes *et al.*, 2014; Canónico-González; Adame-Rodríguez, Mercado Hernández, y Aréchiga-Carvajal, 2013), mientras que *C. gattii* se asocia con madera, corteza, flores, hojas de eucaliptos, almendros y otras especies de árboles (Escandón, Sánchez, Firacative y Castañeda, 2010; Vélez y Escandón. 2017; Springer *et al.*, 2014). También, en ocasiones *C. gattii* se ha aislado en excretas de aves, en 2014, Kangogo, Boga, Wanyoike y Bill informaron un porcentaje bajo en heces de otra especie de paloma (*Geopelia striata*) y en 2016 Dongmo *et al.*, estudiaron heces de murciélagos y palomas, y encontraron *C. gattii* en las de palomas, pero no especificaron el género.

Los trabajos citados muestran que el aislamiento de *C. gattii* en excretas de palomas es muy bajo comparado con la alta prevalencia de *C. neoformans* en distintas regiones del mundo y sugieren que debe existir algún factor o factores que determinan estos resultados, pero hasta ahora no hay estudios en condiciones controladas que comparen el crecimiento de estas especies en excretas positivas y negativas para *C. neoformans* que ayuden a dilucidar este fenómeno; el objetivo del presente estudio fue comparar el crecimiento en el laboratorio de *C. neoformans* y *C. gattii* en extrac-

tos de excretas de palomas y describir los posibles factores que dificultan la proliferación de *C. gattii* en este sustrato.

2. Marco teórico

2.1. Criptococosis

La criptococosis es una micosis sistémica, oportunista del hombre y los animales, de curso subagudo a crónico, que afecta tanto a individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Herkert *et al.*, 2017). La forma primaria es casi siempre pulmonar pero no necesariamente sintomática. Se adquiere por inhalación, aunque se han informado algunos casos con antecedentes de implantación. En su forma diseminada tiene marcado tropismo por el sistema nervioso central y más del 50% de los casos registrados tienen afección de tal sistema, sin embargo, pueden ocurrir lesiones a nivel de otros órganos (Williamson *et al.*, 2017). La meningitis criptocócica es la micosis más frecuentemente asociada con pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con una morbilidad y mortalidad significativa, y con menos frecuencia esta entidad se presenta en pacientes con leucemia, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hodgkin, o que reciben terapia inmunosupresora. Sin embargo, se reconoce cada vez más que la enfermedad puede ocurrir en pacientes con sistemas inmunitarios aparentemente normales “inmunocompetentes” (Messina, Maziarz, Spec, Kontoyiannis, Perfect, 2017; George, Spec, Powderly, Santos, 2017).

La meningitis criptocócica es una infección cerebral que produce un estimado de 600.000 muertes y una carga global de casi 1 millón de casos por año (Lin, Shiau y Fang, 2014). La incidencia de casos de criptococosis en América Latina es de 5300 por año y Colombia es uno de los países con mayor incidencia, entre 1.001 a 2.500 casos (Rajasingham *et al.*, 2017), con una media en la población general estimada en 2,4 casos por 10^6 habitantes, mientras que en los pacientes con SIDA se eleva a 3 casos por 10^3 (Lizarazo *et al.*, 2007).

2.2 Agente etiológico

El complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* agente etiológico de criptococosis son levaduras encapsuladas, que se reproducen por gemación casi siempre simple, rara vez múltiple. La célula es redonda, ovalada, usualmente de 4 a 6 micrómetros de diámetro (Kwon-Chung, *et al.*, 2014). Crece tanto a 37°C como a temperatura ambiente, hidroliza la urea, no fermenta azúcares, asimila glucosa, galactosa, dulcitol, inositol, maltosa y sucrosa, pero no lactosa, ni nitratos, y utiliza la creatinina como única

fente de nitrógeno (Torres-Rodríguez, Alvarado-Ramírez, Gutiérrez-Gallego, 2008).

Este complejo fue considerado inicialmente una sola especie (*C. neoformans*), con dos variedades *neoformans* y *gattii*, las cuales se distinguieron por su diversidad antigénica en los serotipos A y D para la variedad *neoformans* y, los serotipos B y C para la var. *gattii* (Kwon-Chung, *et al.*, 2014). El descubrimiento de dos teleomorfos diferentes (Kwon-Chung, 1976) condujo al reconocimiento de dos especies, *C. neoformans* y *C. gattii* que luego se verificó mediante datos de secuencia de todo el genoma (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

En la actualidad, se conoce que la especie *neoformans* presenta dos variedades *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) con los tipos moleculares VNI (AFLP1), VNII (AFLPIA/IB) y *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) VNIII (AFLP3), y la especie *gattii* presentan los tipos moleculares VGI (AFLP4), VGII (AFLP6), VGIII (AFLP5) y VGIV (AFLP6). (D'Souza *et al.*, 2011).

Las dos especies difieren en su morfología, hábitat, distribución geográfica, epidemiología, estructura inmunológica de la cápsula, afinidad por ciertos ácidos tricarbónicos, asimilación del triptófano, inhibición de la ureasa por el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), contenido de guanina-citosina, secuencia de ADN y en el metabolismo de los compuestos nitrogenados como la creatinina y la urea (Chen *et al.*, 2017; Watkins *et al.*, 2017; Chang y Chen, 2015; May *et al.*, 2015; Herkert *et al.*, 2017; Rhodes *et al.*, 2017; Cogliati *et al.*, 2017; Maziarz y Perfect, 2016).

El aislamiento del complejo *C. neoformans/C. gattii* a partir de muestras contaminadas, como excretas de aves, se hace en medios selectivos especiales como agar semilla de girasol (*Helianthus annuus*) (Pal y Baxter 1985). En este medio *C. neoformans* sintetiza la enzima fenoloxidasa que cataliza la oxidación de sustratos difenólicos en productos similares a la melanina, observándose colonias de color café que permiten diferenciarlas de otras levaduras como *Candida* u otras especies de *Cryptococcus*.

Para diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii* se utiliza, entre otros el medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), dicha prueba se fundamenta en la particularidad que presenta *C. gattii* de ser resistente a la L-canavanina (aminoácido natural estructuralmente similar a la L-arginina), el cual es degradado por las cepas de esta variedad, liberando amonio como compuesto final. El amonio en el medio eleva el pH del mismo, que pasa de 5,8 a 7 o más, virando el color del medio de amarillo verdoso a un azul de cobalto, por la presencia del indicador azul de bromotimol (Pérez *et al.*, 2003).

2.3 Hábitat de los agentes etiológicos

Cryptococcus neoformans var. *grubii* es un hongo ubicuo, se aísla con frecuencia de materiales contaminados con excretas de palomas y en menor proporción a partir del suelo, del aire, de los árboles, frutas, vegetales y excretas de otras aves. Las excretas de palomas suministran al hongo sustancias nitrogenadas de bajo peso molecular, como las purinas, xantinas, creatinina, ácido úrico y urea que explica su predilección por este sustrato. *C. neoformans* var. *neoformans* es encontrado principalmente en Europa y rara vez causa enfermedad (Spina-Tensini *et al.*, 2017; Kamari, Sepahvand y Mohammadi, 2017), ambas variedades afectan con mayor frecuencia a pacientes inmunocomprometidos.

Cryptococcus gattii, tiene una distribución geográfica y un hábitat más restringido, se aísla usualmente de diferentes especies de árboles nativos de regiones tropicales y subtropicales como eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*), almendros, abetos otras especies de árboles (Escandón *et al.*, 2010; Vélez y Escandón, 2017, Springer *et al.*, 2014) y en pocas ocasiones, de excretas de aves Abegg *et al.*, (2006), en un estudio realizado con excrementos de Psitaciformes lo encontraron en el 13% de las muestras examinadas, Kangogo *et al.*, (2014) lo hallaron en el 3.8% de heces de *Geopelia striata* (palomas).

3. Materiales y Métodos

Se recolectaron muestras de excretas de palomas (*C. livia*) en el perímetro urbano de Cali, Colombia (3°27'N, 76°32'O) por el método recomendado por Mira *et al.* 1968. Además, en cada uno de los sitios de muestreo se determinó el tipo de alimento que se les daba a las palomas. Luego las excretas se procesaron de acuerdo con las recomendaciones de Pal y Baxter (1985) y Shields y Ajello (1966), se tomaron 10 g de la muestra que se colocaron en un matraz, se añadió 90 mL de solución salina estéril al 0,85% (dilución 1:10) y se agitó durante 5 minutos. La suspensión se dejó sedimentar durante 10 minutos y se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo con 9 mL (dilución 1:100). Posteriormente cada dilución se sembró por duplicado en cajas de Petri que contenían agar semilla de girasol (Pal y Baxter 1985). Las cajas se incubaron durante 10 días a 25°C y se examinaron diariamente para visualizar el crecimiento de levaduras de color café, presuntivas de *C. neoformans*; luego, éstas se subcultivaron en tubos con agar Sabouraud dextrosa y se identificó con API 20C Aux (BioMérieux; Marcy-l'Etoile, Francia). Se confirmó que las cepas correspondían a *C. neoformans* con el medio de cultivo CGB (Pérez *et al.*, 2003). Se seleccionó una muestra que fuera positiva para *C. neoformans* y otra negativa y con ellas se prepararon dos extractos: uno a partir de heces positivas para

C. neoformans y otro de heces negativas. La muestra de excreta positiva fue de palomas cautivas, alimentadas exclusivamente con maíz, mientras que la negativa se obtuvo de un criadero de palomas mensajeras, éstas recibían alimento concentrado, diferentes granos, cereales y sales minerales.

Para cada uno de los extractos, se suspendieron 100 gramos de la muestra (positiva y negativa) en 900 ml de agua destilada y se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 3 veces consecutivas. A continuación, el sobrenadante se pasó a través de filtros Millipore de 0,45 µm. Cada extracto obtenido (solución madre) se dividió en alícuotas de 500 mL y se congelaron a -5°C. En el momento del ensayo se descongelaron las soluciones madre (positiva y negativa); luego se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 30 minutos con el fin de eliminar precipitados que hubiesen podido formarse, después se les añadió penicilina G (40 U/mL) y gentamicina (1,6 µg/mL), se ajustó el pH a 6,5 y cada una de las soluciones se dividieron en dos. A una se añadió HEPES bicarbonato a una concentración de 10 mM, mientras que la otra no recibió solución amortiguadora. Así, se obtuvieron extractos positivos y negativos con y sin solución amortiguadora. Posteriormente, cada uno de estos extractos, con el fin de esterilizarlos se pasó a través de un filtro Millipore de 0,22 µm. El control de la esterilidad se llevó a cabo en un caldo tioglicolato y 10 mL de cada extracto se envasaron en frascos estériles de 50 mL y se taparon con algodón, gasa y papel de parafina.

Para la inoculación de los extractos se utilizó *C. neoformans* aislado de excretas recolectadas en la ciudad de Cali y *C. gattii* serotipo C (191C) obtenida del Instituto Nacional de Salud de Colombia, Bogotá DC, Colombia. Los ensayos se llevaron a cabo en cuatro fases como se indica en la Figura 1. En la primera y segunda se inocularon extractos positivos con y sin solución amortiguadora y en la tercera y cuarta fase, se inocularon extractos negativos con y sin solución amortiguadora.

En cada fase se utilizaron 96 frascos que contenían 10 ml del extracto, 48 de los cuales se inocularon con 1×10^5 células de *C. neoformans* y los restantes 48 con 1×10^5 células de *C. gattii*. Una vez inoculados, los frascos se incubaron en un agitador a 150 r.p.m., a 30°C durante 31 días. En los días 0, 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 19, 24 y 31, se elegían al azar cuatro frascos de *C. neoformans* y 4 de *C. gattii*, se determinaba el pH de los extractos, las unidades formadoras de colonias (UFC) y la concentración de proteínas, ácido úrico y creatinina.

El pH se midió con un potenciómetro (LEEDS & NORTHROP) calibrado con amortiguadores a pH 4, 7 y 10. El recuento de UFC/mL se determinó mediante la técnica de dilución en caja, de cada una de las diluciones se depositó por duplicado 0,1 mL en cajas de Petri con agar Sabouraud

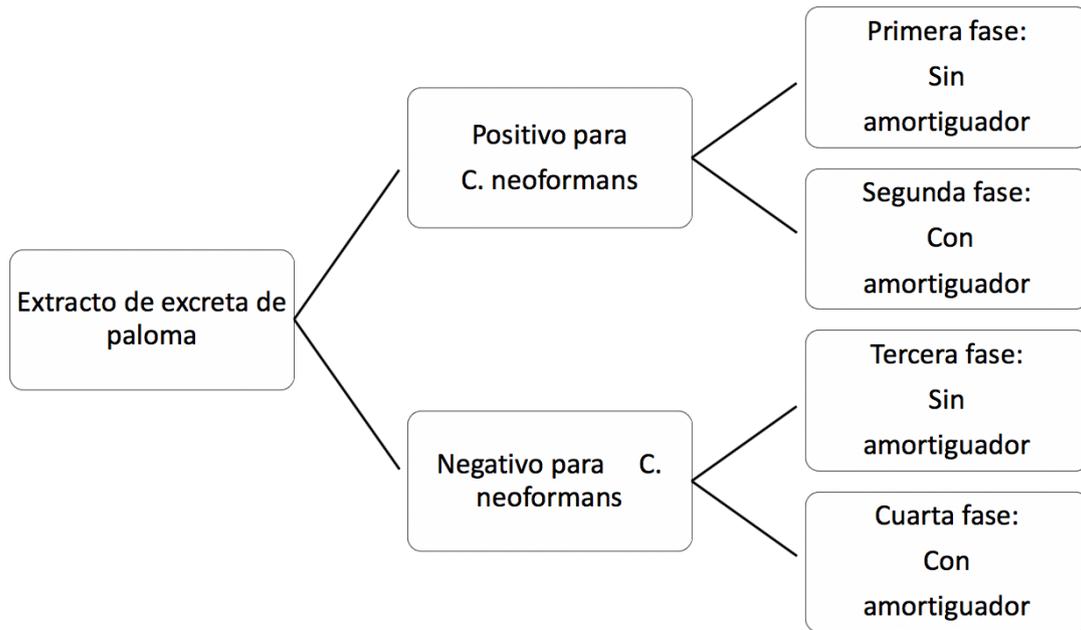


Figura 1. Diagrama de las fases de ensayo con los diferentes extractos de excretas de palomas.
Fuente: Los autores

dextrosa, que se incubaron a temperatura ambiente durante 2-4 días, después se contaron las UFC/mL. Se utilizó la prueba de Biuret para determinar la concentración de proteínas; el método picrato alcalino, sin desproteinización para medir la concentración de creatinina y el método colorimétrico de ácido túngstico para la determinación del ácido úrico.

El análisis estadístico se realizó bajo la norma de distribución de tratamientos de un diseño de bloques completamente al azar (DBA) con arreglo factorial 4x2x11; donde el factor A correspondió a cuatro diferentes extractos de excretas de paloma; el B a los tratamientos con *C. neoformans* y *C. gattii* y el C lo constituyeron 11 tiempos de incubación (0, 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 19, 24 y 31). Cada tratamiento se realizó con cuatro repeticiones. Los datos obtenidos se analizaron en SAS 9.1.3 versión 2007 y fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y prueba de significancia de Tukey para comparar variaciones estadísticamente significativas (P<0,05).

4. Resultados

Primera fase: extracto positivo sin solución amortiguadora

La Figura 2 muestra los valores de pH y el crecimiento (UFC/mL) de las dos especies; el pH estuvo entre 7,1-8,5, con un promedio de 7,96 y una desviación estándar

(DE) de 0,8. El mayor valor de pH se obtuvo el día 2 y no presentaron diferencias estadísticas significativas entre las dos especies.

El desarrollo de las dos especies fue similar en los dos primeros días, el punto máximo de crecimiento de *C. gattii* fue $55,6 \times 10^6$ UFC/mL, luego disminuyó en forma significativa, el crecimiento promedio de esta especie fue $9,8 \times 10^6$ UFC/mL, mientras que las UFC/mL de *C. neoformans* permanecieron casi constantes, con un promedio de $49,0 \times 10^6$ UFC/mL. En este medio de cultivo, el crecimiento de las dos especies presentó diferencias estadísticas significativas (P<0,001).

Segunda fase: extracto positivo con solución amortiguadora

La Figura 3 muestra que los valores de pH variaron entre 7,0-7,6 con un promedio de 7,47 y una DE de 0,05, no hubo diferencias significativas.

El crecimiento de las dos especies fue similar en los dos primeros días, *C. gattii* alcanzó un recuento de $34,4 \times 10^6$ UFC/mL que correspondió al punto máximo de crecimiento, se redujo notoriamente el día 3 y siguió disminuyendo hasta llegar a un recuento de $4,9 \times 10^6$ UFC/mL, con un promedio de $9,5 \times 10^6$ UFC/mL, mientras que *C. neoformans* mantuvo un crecimiento uniforme con un promedio de $47,6 \times 10^6$ UFC/mL. En este medio de cultivo el crecimiento de las dos especies presentó diferencias estadísticas significativas (P<0,001).

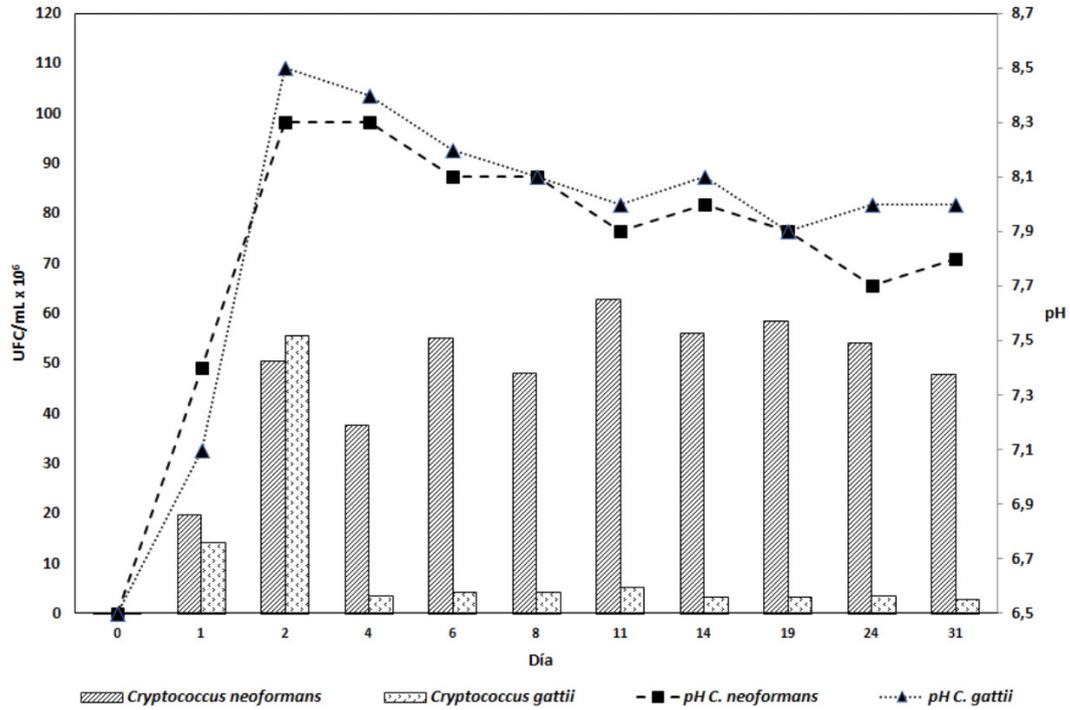


Figura 2. Crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* y cambios de pH en el extracto de heces de palomas positivos sin solución amortiguadora.
Fuente: Los autores

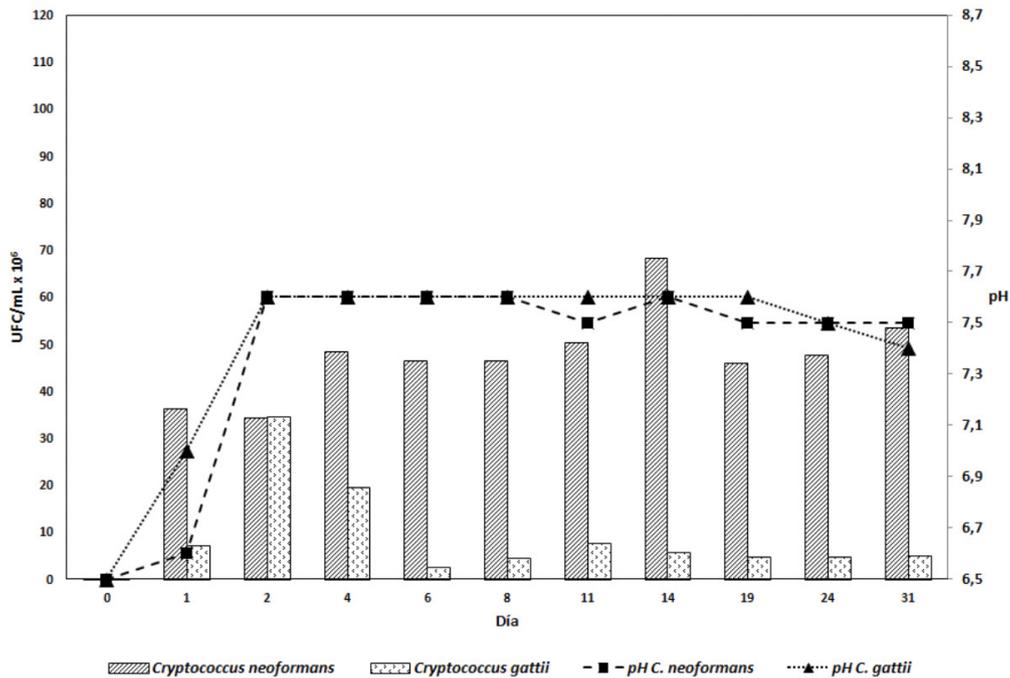


Figura 3. Crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* y cambios de pH en el extracto de heces de palomas positivos con solución amortiguadora.
Fuente: Los autores

Tercera fase: extracto negativo sin solución amortiguadora

La Figura 4 muestra que el pH de este extracto se mantuvo estable con las dos especies y no presentó diferencias significativas. Los valores de pH estuvieron entre 7,1-7,5, con un promedio de 7,4 y una DE de 0,13.

Cryptococcus gattii alcanzó un crecimiento promedio de $28,0 \times 10^6$ UFC/mL y *C. neoformans* de $56,8 \times 10^6$ UFC/mL. No se presentaron diferencias significativas $P = (0,056)$

Cuarta fase: extracto negativo con solución amortiguadora

La Figura 5 muestra que el máximo valor de pH alcanzado se registró el día 19, con un rango a lo largo del proceso entre 6,8-7,2 y una DE de 0,08. No se presentaron diferencias significativas. *Cryptococcus gattii*, alcanzó un crecimiento promedio de $61,0 \times 10^6$ y *C. neoformans* de $75,3 \times 10^6$ UFC/mL, sin presentar diferencias significativas $P = (0,14)$.

Los frascos que contenían los extractos negativos con y sin solución amortiguadora presentaron un precipitado muy notorio que al observarse al microscopio correspondió a cristales de trifosfato de amonio.

Con relación a los datos de creatinina, ácido úrico y proteínas se observó que el comportamiento de los tres com-

puestos fue similar en los dos extractos; en la Tabla I se presentan para el día inicial y final de los diferentes ensayos, los resultados de estos tres compuestos relacionados con e pH y el crecimiento (UFC/mL) de las dos especies de *Cryptococcus*. Con estos datos no se logró establecer diferencias significativas entre las concentraciones de estos compuestos, el pH y el crecimiento de estas dos especies en excretas de palomas.

5. Discusión

El hábitat más importante y frecuente de *C. neoformans* son las excretas de palomas en especial las de *C. livia*, (Huamán, *et al.*, 2018; Menezes *et al.*, 2014; Canónico-González; *et al.*; Aréchiga-Carvajal, 2013), llama la atención que *C. gattii* solo en pocas ocasiones se ha aislado de forma natural en heces de otras especies de aves (Dongmo *et al.*, 2016; Kangogo *et al.*, 2014 y Abegg *et al.*, 2006). En el presente estudio, los extractos de heces de paloma permitieron el desarrollo de las dos especies de *Cryptococcus*; no obstante, el crecimiento de *C. gattii* fue menor y su comportamiento fue diferente en los extractos positivos y negativos. En los extractos positivos las dos especies crecieron gradualmente y alcanzaron su máximo desarrollo entre los días 2 y 4, lo que coincidió con el aumento del pH. Luego, el crecimiento de *C. neoformans* se mantuvo constante a lo largo del estudio, mientras que el de *C. gattii* fue significativamente menor. Este patrón de crecimiento no se produjo en los extractos negativos, donde ambas especies crecieron bien y

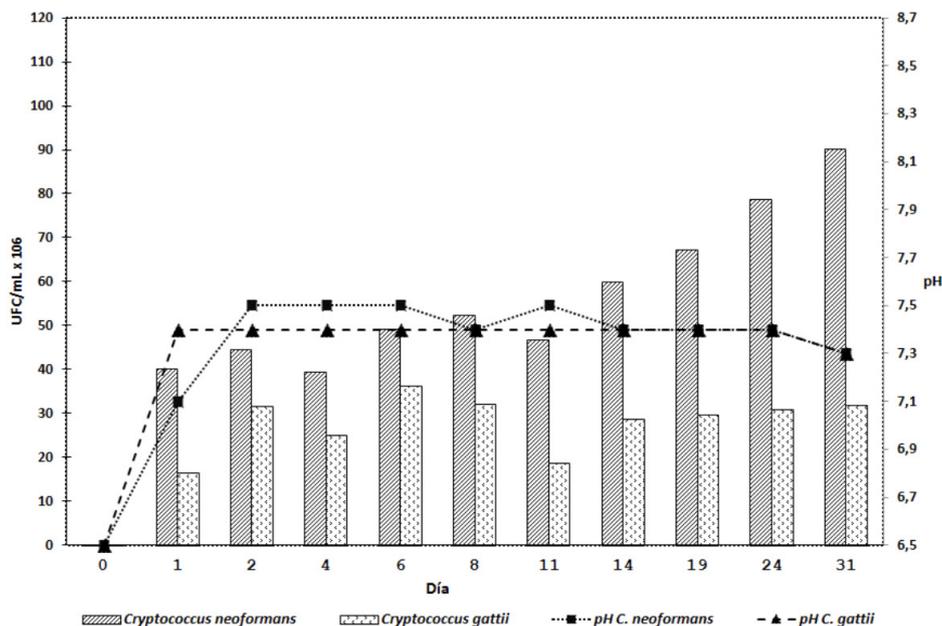


Figura 4. Crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* y cambios de pH en el extracto de heces de palomas negativos sin solución amortiguadora.

Fuente: Los autores

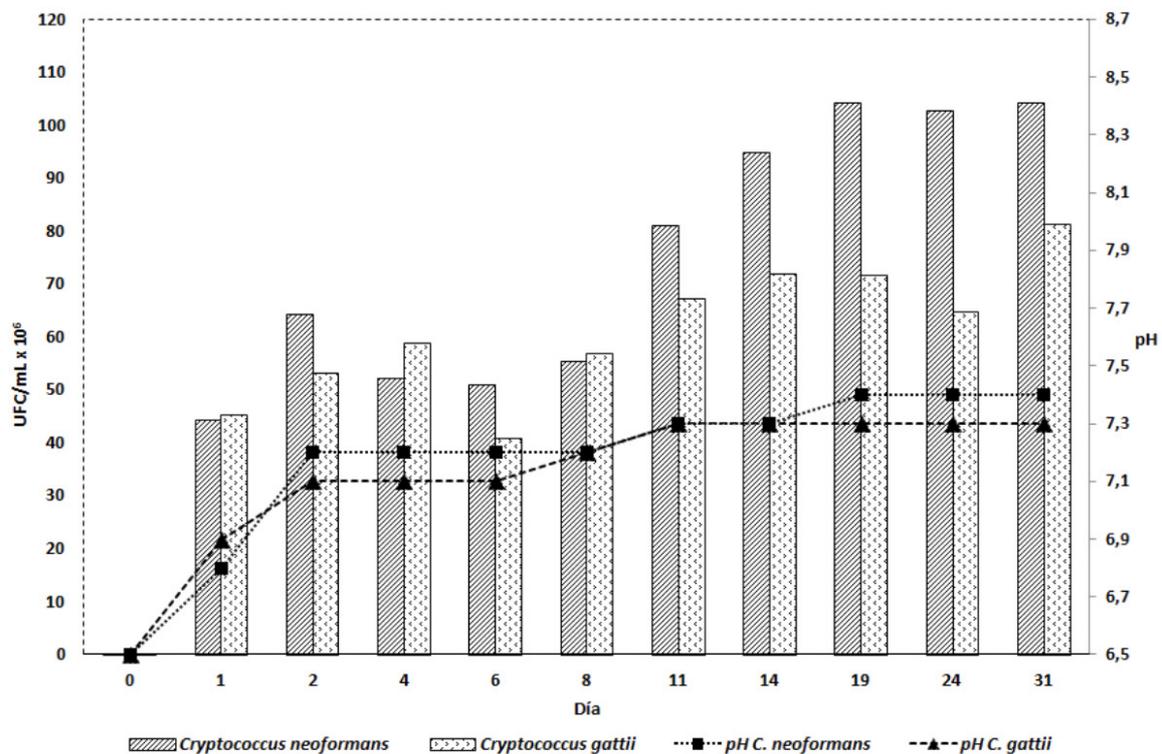


Figura 5. Crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* y cambios de pH en el extracto de heces de palomas negativas con solución amortiguadora.

Fuente: Los autores

tuvieron recuentos de UFC /mL más altos. Una posible explicación podría ser el contenido nutricional de las excretas; lyappan, Karthikeyan y Sekar, (2011) describieron que la composición de las excretas de aves cambia según la dieta y es importante destacar que los extractos positivos provenían de palomas alimentadas solo con maíz, mientras que las palomas de donde se obtuvieron los extractos negativos eran alimentadas con una variedad de granos. Nielsen, De Obaldia y Heitman, (2007) encontraron que *C. neoformans* crece mejor en el guano de paloma que en un medio de cultivo a base de levadura, lo que corrobora que la composición nutricional puede proporcionar un entorno favorable para el crecimiento de estos hongos.

En este estudio, se observó que un pH superior a 7,5 afectaba el crecimiento de *C. gattii* pero no el de *C. neoformans*. El estiércol de paloma es rico en compuestos nitrogenados como la creatinina; en ambas especies, la creatinina induce la síntesis de la enzima creatinina desaminasa, pero los mecanismos de regulación son diferentes (Polacheck y Kwong-Chung 1980). La creatinina desaminasa de *C. neoformans* exhibe un mecanismo de regulación por producto, en este caso el ion amonio, que al alcanzar un cierto nivel, inhibe la síntesis de la enzima y detiene el catabolismo de

la creatinina, mientras que la creatinina desaminasa de *C. gattii* no tiene mecanismos de regulación por producto, su síntesis en presencia de creatinina es constante, lo que permite una acumulación del ion amonio y un aumento de los valores de pH y se conoce que los iones de amonio pueden ser tóxicos para las células (Franco, Smith y Berry, 1984; Vidotto, Benech, Maina, Bruatto 1993; Lloyd, Kristensen y Degn, 1983). En los extractos de excretas negativas, la mayor cantidad de nutrientes (azúcares) puede haber influido en los valores de pH más bajos. Los estudios realizados por Polacheck y Kwong-Chung (1980), muestran que la producción de iones de amonio se inhibe en presencia de ciertos azúcares y que éstos pueden reaccionar con los fosfatos, produciendo pH neutros. En este estudio los valores de pH de las excretas negativas se mantuvieron muy homogéneos posiblemente por la formación de cristales de trifosfato de amonio que actuaron como un tampón natural y mantuvieron el pH entre 7,2 y 7,4.

Los valores anteriores contrastaron con lo que sucedió con los extractos positivos, donde posiblemente la concentración de azúcares y fosfatos fue baja y se encontraron los pH más altos, Burton (1980) describe que la dieta puede influir en el pH de la orina del animal y también en el contenido

Tabla 1.

Relación de los compuestos nitrogenados con el crecimiento (UFC/mL) y pH encontrados en los extractos de excretas de paloma el día inicial y final de los ensayos.

Extracto de excretas de palomas	<i>Cryptococcus neoformans</i>					<i>Cryptococcus gattii</i>				
	pH	UFC/mL X10 ⁷	Creatinina mg/dL	Ac. Úrico mg/dL	Proteínas g/dL	pH	UFC/mL X10 ⁷	Creatinina mg/dL	Ac. Úrico mg/dL	Proteínas g/dL
POSITIVO (valor inicial)	6,5	0,01	1,49	56,36	0,52	6,5	0,01	1,49	56,36	0,52
PSA¹ (valor final)	7,8	4,78	1,54	3,27	0,58	8,0	0,26	1,39	10,00	0,52
PCA² (valor final)	7,5	5,33	1,49	3,81	0,52	7,4	0,49	1,42	11,77	0,51
NEGATIVO (valor inicial)	6,5	0,01	2,15	51,39	0,88	6,5	0,01	2,15	51,39	0,88
NSA³ (valor final)	7,3	9,02	1,79	6,67	0,62	7,3	3,17	1,47	9,36	0,54
NCA⁴ (valor final)	7,4	10,42	1,66	5,97	0,58	7,3	8,12	1,47	8,59	0,50

1PSA: Extracto positivo sin amortiguador; 2PCA: Extracto positivo con amortiguador; 3NSA: Extracto negativo sin amortiguador; 4NCA: Extracto negativo con amortiguador.

Fuente: Los autores

de nitrato en las excretas de las palomas (Sales y Janssens 2003a, 2003b). El menor crecimiento de *C. gattii* en excretas de palomas, podría indicar al igual que lo planteado por Nielsen, De Obaldia y Heitman (2007), que este sustrato es su nicho fundamental, mientras que para *C. neoformans* que creció muy bien, indicaría que este organismo está mejor adaptado y que es su nicho realizado.

Aunque el extracto positivo permitió el crecimiento de *C. gattii*, lo hizo de una manera muy restringida, mientras que en el extracto negativo el crecimiento de las dos cepas no mostró diferencias significativas. Este comportamiento similar en los extractos negativos podría explicarse por los valores de pH menores a 7,5 encontrados en este sustrato.

Los resultados del presente estudio muestran diferencias en el crecimiento de las dos especies en excretas de palomas, pero se necesitan estudios posteriores con ambas especies en estos extractos para poder analizar las interacciones entre ellas, así como determinar la influencia del pH en la presencia de diferentes concentraciones de compuestos nitrogenados y azúcares. Además, se debe establecer el efecto del ion amonio, dada su importancia en la regulación de los diferentes compuestos nitrogenados (Lee, Chow,

Morrow, Djordjevic y Fraser, 2011; Baumgardner, 2009). También, se deben buscar posibles metabolitos liberados por *C. neoformans* que pueden ayudar a limitar el crecimiento de *C. gattii*.

6. Conclusiones

Cryptococcus gattii crece en extractos de excretas de palomas (*Columba livia*), sin embargo, su crecimiento (UFC/mL) se ve notoriamente disminuido cuando se compara con el desarrollo de *C. neoformans*, en los diferentes extractos empleados.

Los pH mayores de 7.5 y los extractos de excretas positivas para *C. neoformans* limitan el crecimiento de manera significativa el crecimiento de *C. gattii*, pero no en los extractos de excretas negativos.

El presente estudio aporta nueva información sobre el desarrollo de *C. neoformans* y *C. gattii*, sin embargo es necesario realizar más investigaciones para aclarar las interacciones de estas especies en los extractos de excretas de palomas (*Columba livia*).

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al área de Micología del Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, por la financiación del proyecto.

Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. In: *Mycopathologia* 2006, 161, 83–91. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11046-005-0186-z>
2. BAUMGARDNER Dennis J. Microecology of *Blastomyces dermatitidis*: the ammonia hypothesis. In: *Med Mycol.* 2009. Vol. 47, no. 7, p. 745–752. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888807>
3. BURTON R. Acid and base excretion: Assessment and relationships to diet and urine composition. In: *Comparative biochemistry and physiology Part A. Physiology* 1980. Vol. 66, no. 3, p. 371–375. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(80\)90182-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90182-6). Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300962980901826>
4. CANÓNICO-GONZÁLEZ, Yolanda; ADAME-RODRÍGUEZ, Juan Manuel; MERCADO HERNÁNDEZ, Roberto; ARÉCHIGA-CARVAJAL, Elva Teresa. *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. In: *SpringerPlus*. 2013. Vol. 2. 632. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-632>. Available in: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3862861/pdf/40064_2013_Article_692.pdf
5. CHANG CC.; CHEN, SC. Colliding epidemics and the rise of cryptococcosis. In: *Journal of Fungi*. 2015. Vol. 2, no. 1, p. 1–11 <https://doi.org/10.3390/jof2010001>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29376920>
6. CHEN, Yuan; FARRER, Rhys A., GIAMBERARDINO, Charles; SAKTHIKUMAR, Sharadha; JONES, Alexander; YANG, Timothy; TENOR, Jennifer L.; WAGIH, Omar; WYK, Marelize Van; GOVENDER Nelesh P.; MITCHELL, Thomas G.; LITVINTSEVA, Anastasia P.; CUOMO, Christina; PERFECT John R. Microevolution of serial clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. In: *MBio*. 2017 vol. 8 p. e00166–e17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00166-17>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897067>
7. COGLIATI, Massimo; PUCCIANI, Erika; MONTAGNA, Maria T.; DE DONNO, Antonella.; SUSEVER, Serdar; ERGIN, Cagri; VELEGRAKI, Aristeia; ELLABIB, Mohamed S.; NARDONI, Simona; MACCI, Cristina; TROVATO, Laura; DIPINETO, Ludovico; RICKERTS, Volker; AKCAGLAR, Sevim; MLINARIC-MISSONI, Emilija; BERTOUT, Sebastien; VENCÀ, Ana C.F.; SAMPAIO, Ana C.; CRISEO, Giuseppe; RANQUE, Stéphane; ÇERIKÇIOĞLU, Nilgün; MARCHESE, Anna; VEZZULLI, Luigi; ILKIT, Macit; DESNOS-OLLIVIER, Marie; PASQUALE, Vincenzo; POLACHECK, Itzhack; SCOPA, Antonio; MEYER, Wieland; FERREIRA-PAIM Kennio; HAGEN, Ferry; BOEKHOUT, Teun; DROMER, Françoise; VARMA, Ashok; KWON-CHUNG, Kyung J.; INÁCIO, João; COLOM, Maria F. Fundamental niche prediction of the pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Europe. In: *Environ Microbiol.* 2017. Vol. 19, no. 10, p. 4318–4325. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13915>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28892309>.
8. DONGMO, W.; KECHIA, F.; TCHUENGUEM, R.; NANGWAT C.; YVES I.; KUIATE JR.; DZOYEM JP. In Vitro antifungal susceptibility of environmental isolates of *Cryptococcus* spp. from the West region of Cameroon. In: *Ethiop J Health Sci.* 2016. Vol. 26, no. 6, p. 555–560. doi: <https://doi.org/10.4314/ejhs.v26i6.8>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28450771>
9. D'SOUZA, CA.; KRONSTAD, JW.; TAYLOR, G.; WARREN, R.; YUEN, M.; HU, G.; JUNG, WH.; SHAM, A.; KIDD, SE.; TANGEN, K.; LEE, N.; EILMAKER, T.; SAWKINS, J.; MCVICKER, G.; SHAH, S.; GNERRE, S.; GRIGGS, A.; ZENG, Q.; BARTLETT, K.; LI, W.; WANG, X.; HEITMAN, J.; STAJICH, JE.; FRASER, JA.; MEYER, W.; CARTER, D.; SCHEIN, J.; KRZYWINSKI, M.; KWON-CHUNG, KJ.; VARMA, A.; WANG, J.; BRUNHAM, R.; FYFE, M.; OUELLETTE, BF.; SIDDIQUI, A.; MARRA, M.; JONES, S.; HOLT, R.; BIRREN, BW.; GALAGAN, JE.; CUOMO, CA. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. In: *mBio*. 2011. Vol. 2, p. e00342–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00342-10>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304167>
10. ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ, A., FIRACATIVE, C. and CASTAÑEDA E. Isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII, from *Corymbia ficifolia* detritus in Colombia. In: *Med Mycol.* 2010. Vol. 48, no. 4, p. 675–678. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465517>
11. FRANCO C.; SMITH, J.E.; BERRY, D. Effect of nitrogen and phosphate on the levels of intermediates in bakers' yeast grown in continuous culture. In: *J. Gen Microbiol.* 1984. Vol. 130, no. 10, p. 2465–2472. Available in: <https://doi.org/10.1099/00221287-130-10-2465>
12. GEORGE, IA.; SPEC, A.; POWDERLY, WG.; SANTOS, CAQ. Comparative epidemiology and outcomes of HIV, non-HIV non-transplant and organ transplant associated cryptococcosis: a population-based study. In: *Clin Infect Dis.* 2017. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/cix867>. Available in: <https://academic.oup.com/cid/article/66/4/608/4344940>
13. HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHECK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, HT.; BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. In: *Fungal Genet Biol.* 2015. Vol. 78, p. 16–48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988>
14. HERKERT Patricia.; HAGEN, Ferry; PINHEIRO, Rosangela; MURO, Marisol; MEIS, Jacques; QUEIROZ-TELLES, Flávio. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in developing countries. In: *J Fungi*. 2017. Vol. 3, no. 4, p. 62. <https://doi.org/10.3390/jof3040062>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753164/>
15. HUAMÁN, Ana; BÉJAR, Vilma; SÁEZ, Gloria; GUEVARA, José; SEVILLA, Raúl; TAPIA, Mario; CASTILLO, Edith; VALENCIA, Esther; MAROCHO, Luis; PAREJA, Elizabeth; ROMERO, Giuliana; ABANTO, Patricia. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en Lima metropolitana. En: *Rev Med Hered.* 2018. Vol. 29, p. 85–89. <https://doi.org/10.20453/rmh.v29i2.3347>. Available in: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Abstracts/Phyto78_1075.htm
16. IYAPPAN, P.; KARTHIKEYAN, S.; SEKAR, S. 2011. Changes in the composition of poultry farm excreta (PFE) by the cumulative influence of the age of birds, feed and climatic conditions and a simple mean for minimizing the environmental hazard. In: *Int. J. Environ. Sci.* 2011. Vol. 1, no. 5, p. 847–859. Available in: https://www.researchgate.net/publication/215627893_Changes_in_the_composition_of_poultry_farm_excreta_PFE_by_the_cumulative_influence_of_the_age_of_birds_feed_and_climatic_conditions_and_a_simple_mean_for_minimizing_the_environmental_hazard

17. KAMARI A.; SEPAHVAND, A.; MOHAMMADI, R. Isolation and molecular characterization of *Cryptococcus* species isolated from pigeon nests and Eucalyptus trees. In: *Curr Med Mycol*. 2017. Vol. 3, no. 2, p.20-25. <https://doi.org/10.29252/cmm.3.2.20>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29354777>
18. KANGOGO, M.; BOGA, H.; WANYOIKE, W.; Bii, C. Isolation and characterisation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources in Nairobi, Kenya. In: *African Medical Journal*. 2014. Vol 91, no. 8, p. 281-285. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862653>
19. KWON-CHUNG K.J.; BENNETT, J.E.; WICKES, BL.; MEYER, W.; CUOMO, CA.; WOLLENBURG, KR.; BICANIC, TA.; CASTAÑEDA, E.; CHANG, YC.; CHEN, J.; COGLIATI, M.; DROMER, F.; ELLIS, D.; FILLER, SG.; FISHER, MC.; HARRISON, TS.; HOLLAND, SM.; KOHNO, S.; KRONSTAD, JW.; LAZERA, M.; LEVITZ, SM.; LIONAKIS, MS.; MAY, RC.; NGAMSKULRONGROJ, P.; PAPPAS, PG.; PERFECT JR.; RICKERTS, V.; SORRELL, TC.; WALSH, TJ.; WILLIAMSON, PR.; XU, J.; ZELAZNY, AM.; CASADEVALL, A. The case for adopting the species complex nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. In: *mSphere*. 2017. Vol 2, no 1:e00357-416. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29354777>
20. KWON-CHUNG, KJ.; FRASER, JA.; DOERING, TL.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, YS. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. In: *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014. Vol. 4, no. 7, a019760. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132>
21. KWON-CHUNG, KJ. A New Species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. In: *Mycologia*. 1976. Vol. 68; p.943-946. <https://doi.org/10.2307/3758813>. Available in: https://www.jstor.org/stable/3758813?seq=1#metadata_info_tab_contents
22. LEE, IR.; CHOW, EW.; MORROW, CA.; DJORDJEVIC, JT.; FRASER, JA. Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Genetics*. 2011. Vol. 188 no. 2, p. 309-323. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128538>.
23. LIN, Y.; SHIAU, S.; FANG CT. Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case control study. In: *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10 no. 3, p 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119090>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4352003/pdf/pone.0119090.pdf>
24. LIZARAZO, J.; LINARES, M.; DE BEDOUT, C.; RESTREPO, Á.; AGUDELO, CI.; CASTAÑEDA, E. Estudio clínico y epidemiológico de la cryptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. En: *Biomédica*. 2007. Vol. 27 no. 1, p. 94-109. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000100009&lng=en&tln=es
25. LLOYD, D.; KRISTENSEN, B.; DEGN, H. Glycolysis and respiration in yeasts: the effect of ammonium ions studied by mass spectrometry. In: *Microbiology*. 1983. Vol 129 no. 7, p. 2125-2127. Available in: https://www.researchgate.net/publication/247608860_Glycolysis_and_Respiration_in_Yeasts_the_Effect_of_Ammonium_Ions_Studied_by_Mass_Spectrometry
26. MAY, RC.; STONE, NR.; WIESNER, DL.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. In: *Nature Reviews Microbiology*. 2016. Vol. 14 no. 2, p106-117. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6> Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685750>
27. MAZIARZ E.K.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. In: *Infect Dis Clin North Am*. 2016. Vol 30, no. 1, p.179-206. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897067>
28. MENEZES, Thaianna; SCAIN, Gustavo; QUADROS, Rosiléia Marinho; MILETTI, Luiz Claudio; SOUZA, Alexandre Lemos; DE LIMA Miguel Rafael; MARQUES, Sandra Márcia Tietz. *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (Columba Livia) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina. In: *Science and Animal Health*. 2014. Vol.2, no. 2, p. 102-114. Available in: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/4109>
29. MESSINA, JA.; MAZIARZ EK.; SPEC, A.; KONTOYIANNIS; DP; PERFECT JR. Disseminated cryptococcosis with brain involvement in patients with chronic lymphoid malignancies on ibrutinib. In: *Open Forum Infect Dis*. 2017. Vol. 4, no. 1, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw261>. Available in: <https://academic.oup.com/ofid/article/4/1/ofw261/2740624>
30. MEYER, W.; AANENSEN, DM.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, MR.; ESPOSTO, MC.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; KAOCHAROEN, S.; LITVINTSEVA, AP; MITCHELL, TG.; SIMWAMI, SP; TRILLES, L.; VIVIANI, MA.; KWON-CHUNG, J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: *Med Mycol*. 2009. Vol. 47, no. 6, p 561-570. doi: <https://doi.org/10.1080/13693780902953886>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19462334>
31. MIRA, C.A.; ANZOLA, R.; MARTÍNEZ, A.; LLINÁS, R.; VALENCIA, C.; RESTREPO, A. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de materiales contaminados con excretas de palomas en Medellín, Colombia. En: *Antioquia Med*. 1968. Vol. 18, p. 33-41.
32. NIELSEN, K.; DE OBALDIA, A.L.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. In: *Eukaryot Cell*. 2007. Vol.6, no. 6, p. 949-959. <https://doi.org/10.1128/EC.00097-08>. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449657>
33. O'HALLORAN, J.A., POWDERL, W.G.; SPEC, A. *Cryptococcus* today: It is not all about HIV infection. In: *Curr Clin Microbiol Rep*. 2017. Vol. 4 no. 2, p. 88-95. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0064-8>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29130027>
34. PAL M.; BAXTER L. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from the environment using a simplified sunflower seed medium. In: *Proc NZ Microbiol Soc*. 1985. Vol. 29, p. 155-158.
35. PÉREZ C.; HERNÁNDEZY.; COLELLA MT.; ROSELLÓA.; HARTUNG-DE CAPRILES C.; OLAIZOLA C.; MAGALDI S.; MATA ESSAYAG S. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* mediante el uso del medio canavanina glicina-azul de bromotimol (CGB). En: *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; Vol.23 no. 2, p 158-162. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262596662_Identificacion_de_Cryptococcus_neoformans_var_gattii_mediante_el_uso_del_medio_canavanina-glicina-azul_de_bromotimol_CGB
36. POLACHEK I.; KWON-CHUNG. K.J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. In: *J Bacteriol*. 1980. Vol. 142 no. 1, p. 15-20. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC293892/>
37. RAJASINGHAM, R.; SMITH, RM.; PARK, BJ.; JARVIS, JN.; GOVENDER, NP.; CHILLER, TM.; DENNING, DW.; LOYSE, A. and BOULWARE, DR. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. In: *Lancet Infect Dis*. 2017. Vol. 17, no. 8, p. 873-881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28483415>
38. RHODES, J.; DESJARDINS, CA.; SYKES, SM.; BEALE, MA.; VANHOVE, M.; SAKTHIKUMAR, S.; CHEN, Y.; GUJJA, S.; SAIF, S.; CHOWDHARY, A.; LAWSON, DJ.; PONZIO, V.; COLOMBO, AL.; MEYER, W;

- ENGELTHALER, DM.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, MT.; ALANIO, A.; VREULINK, JM.; HEITMAN, J.; PERFECT, JR.; LITVINTSEVA, AP.; BICANIC, T.; HARRISON, TS.; FISHER, MC.; CUOMO CA. Tracing genetic exchange and biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the global population level. In: *Genetics*. 2017. Vol. 207 no. 1, p. 327-346. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.203836>.
39. SALES, J.; JANSSENS, G.P.J. Methods to determine metabolizable energy and digestibility of feed ingredients in the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). In: *Poult Sci*. 2003A. vol. 82, no. 9, p. 1457–1461. <https://doi.org/10.1093/ps/82.9.1457>.
40. SALES, J.; JANSSENS, G.P.J. Nutrition of the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). *World's Poultry Science Journal*. 2003B. Vol. 59 no. 2, p. 221–232. <https://doi.org/10.1079/WVPS20030014>. Available in: https://www.researchgate.net/publication/248626757_Nutrition_of_the_domestic_pigeon_Columba_livia_domestica
41. SCHMEDING, K. A.; JONG, SC.; HUGH, R. Biochemical variation of *Cryptococcus neoformans*. In: *Mycopathologia*. 1984. Vol. 84 p.121-131. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371540>
42. SPINA-TENSINI, T.; MURO, MD.; QUEIROZ-TELLES, F.; STROZZI, I.; MORAES, ST.; PETTERLE, RR.; VETTORELLO, M.; STAUDACHER, C.; MIGUEZ, LA.; DE ALMEIDA SM. Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. In: *Mycoses*. 2017. Vol. 60, no. 1, p. 51-58. <https://doi.org/10.1111/myc.12550>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27561904>
43. SPRINGER, DJ.; BILLMYRE, RB.; FILLER, EE.; VOELZ, K.; PURSALL, R.; MIECZKOWSKI, PA.; LARSEN, RA.; DIETRICH, FS.; MAY, RC.; FILLER SG.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. In: *PLoS Pathog*. 2014. Vol. 10, no. 8, p. e1004285. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004285>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144534>
44. TORRES-RODRIGUEZ, J. ALVARADO-RAMIREZ, E.; GUTIERREZ-GALLEGO, E. Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. En: *Rev Iberoam Micol*. 2008. Vol. 25, p.27-31. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70007-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70007-X). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S113014060870007X>
45. VÉLEZ, N.; ESCANDÓN, P. Report on novel environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia: *Tabebuia guayacan* and *Roystonea regia*. In: *Med Mycol*. 2017. Vol. 55 no. 7, p. 794-797. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw138>.
46. VIDOTTO, V.; BENECH, S.; MAINA, A.; BRUATTO, M. Influence of different levels of ammonium concentrations on cell growth, RNA and protein production by *Candida albicans*. In: *Mycopathologia*. 1993. Vol. 123, no. 1, p.19-25. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01103484>
47. WATKINS, R.; KING, J.; JOHNSTON, S. Nutritional requirements and their importance for virulence of pathogenic *Cryptococcus* species. In: *Microorganisms*. 2017. Vol. 5, no. 4, p.65. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms5040065>.
48. WILLIAMSON, PR.; JARVIS, JN.; PANACKAL AA.; FISHER, MC.; MOLLOY, SF.; LOYSE, A.; HARRISON, TS. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. In: *Nat Rev Neurol*. 2017. Vol. 13, no. 1, p13-24. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.167>. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886201>