

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PROTEÍNAS BIOLUMINESCENTES: BIOMARCADORES PARA O
MONITORAMENTO *IN VIVO* DA INFECÇÃO POR
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii***

Dissertação de mestrado

Vanessa de Abreu Barcellos

Porto Alegre, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PROTEÍNAS BIOLUMINESCENTES:
BIOMARCADORES PARA O MONITORAMENTO *IN VIVO* DA
INFECÇÃO POR *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Vanessa de Abreu Barcellos

Orientadora: Prof^ª Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Dra. Lívia Kmetzsch

Porto Alegre, 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Marilene H. Vainstein pelo aprendizado, auxílio, incentivo e oportunidade da realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. Livia Kmetzsch pela dedicação, apoio, incentivo e aprendizado.

Ao Dr. Charley Staats pelo conhecimento científico e por sempre colaborar nos momentos de dúvidas e discussões.

Ao Dr. Augusto Shcrank pelo aprendizado e incentivo.

À Dra. Patricia Valente, Dra. Melissa Landel e Belize Leite pela contribuição no trabalho e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Natalia Vidal pela amizade, incentivo, apoio, ensinamentos, conselhos e ajuda nos experimentos.

Aos colegas Patricia, Francine, Claudia, Leticia, Moara, Glaci, Caroline Silveira, Amanda, Alicia, Rafael, Natully, Caroline Flack, Liliane, Dani, Julia Catarina, Julia Basso, Fernanda, Fernanda B., Sara, Rana, Angela, Éder, Franciele, Thiane, Vanessa, Nicolau, Aline, Josi pelo aprendizado diário, ajuda e amizade.

Às ex-colegas do laboratório 220 Luana Kammler, Elisa Simon, Karina Amaral, Lusiana Leal, Juli Crestani, Anameli, Adriana Correa e Juliana Correa pelo ensinamento, apoio e amizade.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia Milton, Terezinha, Rosaura, Silvia, Luciano, Grasiela e Alice pelo auxílio e colaboração.

Ao meu namorado Rafael por todo o amor, dedicação e apoio.

Aos meus pais Paulo e Otília pelo amor, dedicação, apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado. Vocês são meus maiores exemplos de força e determinação.

Sumário

SUMÁRIO	V
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp.: características gerais	16
1.2 Virulência.....	21
1.3 Mecanismos de disseminação.....	24
1.4 Meningoencefalite criptocócica (MC)	27
1.5 Metodologias utilizadas para avaliação da disseminação de microrganismos.....	29
1.5.1 Contagem de CFU de órgãos isolados.....	29
1.5.2 Métodos ópticos para detecção da imagem <i>in vivo</i>	30
1.5.2.1 Imagem fluorescente	31
1.5.2.2 Imagem bioluminescente.....	31
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. CAPÍTULO 1:	38
Expressão da luciferase Renilla nas linhagens H99 de <i>C. neoformans</i> e R265 de <i>C. gattii</i>	38
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.2.1 Linhagens fúngicas, plasmídeos e meios de cultivo.....	43
3.2.2 Clonagem da sequência codificadora de luciferase em vetor pJAF15.....	44
3.2.2.1 Transformação do vetor pCMV-JAF15 nas linhagens H99 de <i>C. neoformans</i> e R265 de <i>C. gattii</i>	45
3.2.2.2 Análise <i>in vitro</i> da expressão de luciferase	45
3.2.2.3 Preparação do RNA e síntese de cDNA	46

3.2.3 Fusão dos fragmentos por PCR	47
3.2.3.1 Co-transformação na linhagem R265 de <i>C. gattii</i>	48
3.2.3.2 Análise <i>in vitro</i> de expressão de luciferase	48
3.2.3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	49
3.3 RESULTADOS	51
3.3.1 Construção e inserção do vetor pCMV-JAF15 nas linhagens H99 de <i>C. neoformans</i> e R265 de <i>C. gattii</i>	51
3.3.1.1 Análise de emissão de bioluminescência por linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> recombinantes.	52
3.3.2 PCR de fusão e co-transformação	53
3.3.2.1 Análise da expressão de luciferase <i>in vitro</i> na linhagem recombinante de <i>C. gattii</i> . .	56
3.4 CONCLUSÃO	62
3.5 PERSPECTIVAS	63
4. CAPÍTULO 2:	64
Isolamento e caracterização de bactérias bioluminescentes do ambiente natural marinho de Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil.....	64
4.1 Bioluminescência.....	64
4.1.2 Sistema lux	67
4.1.3 Aplicações do sistema repórter lux bacteriano.....	69
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.2.1 Coleta de amostras.....	73
4.2.2 Meios de cultura e isolamento de bactérias bioluminescentes	73
4.2.3 Extração do DNA genômico.....	74
4.2.4 Determinação de polimorfismos de regiões de microssatélite	75
4.2.5 Amplificação do gene 16S rDNA.....	75
4.2.6 Sequenciamento do gene 16S rDNA	76
4.2.7 Análise filogenética	77
4.2.8 Caracterização dos isolados bioluminescentes.....	77
4.3 RESULTADOS	78
4.3.1 Bactérias bioluminescentes isoladas.....	78
4.3.2 Identificação dos isolados bioluminescentes.....	79
4.3.3 Caracterização das bactérias bioluminescentes	81

4.4 DISCUSSÃO	84
4.5 CONCLUSÃO	87
4.6 PERSPECTIVAS	88
4.7 REFERÊNCIAS.....	89

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
HIV	vírus da imunodeficiência humana
DNA	ácido Desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
cDNA	DNA complementar
mRNA	RNA mensageiro
PCR	reação em cadeia polimerase
var.	variedade
nm	nanômetro
Kb	kilobase
ml	mililitro
pb	pares de base
rpm	rotações por minuto
pmol	picomol
UV	ultravioleta
µg	micrograma
µl	microlitro
ORF	quadro aberto de leitura
CMV	citomegalovírus
ng	nanograma
rDNA	DNA ribossômico
TEDUT	Terminal Marítimo Almirante Soares Dutra
tRNA	RNA transportador
s	segundos
min	minutos
RT-MMLV	transcriptase reversa do vírus da leucemia Maloney de camundongos

16S rDNA	subunidade 16S do Ácido desoxirribonucleico ribossômico
Transpetro	Petrobrás transporte
°C	graus Celsius

Lista de tabelas

Tabela 1. Luciferases utilizadas como gene repórter	31
Tabela 2. Lista de <i>primers</i> utilizados para a construção do vetor para expressão de luciferase Renilla em <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	52
Tabela 3. Lista de <i>primers</i> utilizados para amplificação da região 16S rDNA	79

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo celular de <i>Cyptococcus neoformans</i>	21
Figura 2. Fatores de virulência em <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	22
Figura 3. Ciclo da infecção de <i>Cryptococcus</i>	26
Figura 4. Disseminação do fungo através da barreira hematoencefálica	27
Figura 5. Representação esquemática da aquisição de imagem bioluminescente para o monitoramento de células <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	34
Figura 6. Representação esquemática dos vetores pJAF15 e pRL-CMV	45
Figura 7. Representação esquemática da construção do vetor pCMV-JAF15 para expressão de luciferase Renilla nas leveduras H99 e R265	53
Figura 8. Confirmação da inserção do gene <i>luc</i> por PCR em transformantes de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	54
Figura 9. RT-PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão do gene <i>luc</i> nos transformantes de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	55
Figura 10. Representação esquemática da fusão dos fragmentos por PCR	56
Figura 11. PCR de fusão	57
Figura 12. Confirmação da inserção do cassete higromicina (marca de seleção) e do gene <i>luc</i> por PCR na linhagem R265 de <i>C. gattii</i> recombinante	58
Figura 13. RT-PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão do gene <i>luc</i> na linhagem transformante	59
Figura 14. Organização do operon <i>lux</i> em gêneros <i>Vibrio</i> e <i>Photobacterium</i>	69
Figura 15. Organização genética de operons <i>lux</i> de bactérias do gênero <i>Vibrio sp.</i> e <i>Photobacterium sp.</i>	70
Figura 16. Pontos de coleta de água marinha	80
Figura 17. Perfil genotípico das bactérias bioluminescentes	81

Figura 18. Árvore filogenética	83
Figura 19. Coloração de Gram dos isolados bioluminescentes	84
Figura 20. Visualização e quantificação da bioluminescência	85
Figura 21. Avaliação da termoestabilidade da luciferase de bactérias bioluminescentes	86

Resumo

A criptococose é uma doença fúngica invasiva causada majoritariamente pelas espécies patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Estudos epidemiológicos recentes sugerem que a infecção causada por *C. gattii* desenvolve mais frequentemente criptococomas pulmonares, enquanto que *C. neoformans* estabelece principalmente quadros de meningoencefalite. Embora ocorra essa associação, o mecanismo de disseminação dessas espécies não está completamente elucidado, instigando a utilização de diferentes abordagens na caracterização da infecção. O desenvolvimento de microrganismos bioluminescentes tem permitido o monitoramento em tempo real da infecção em modelos animais. No presente trabalho, diferentes estratégias foram utilizadas para a construção de linhagens de *C. neoformans* e de *C. gattii* expressando o gene repórter luciferase Renilla, sem sucesso. Paralelamente, em uma segunda abordagem, bactérias bioluminescentes (BL) foram isoladas de amostras de água marinha coletadas nas adjacências da zona estuarina do rio Tramandaí, com o objetivo de selecionar o cassete *lux* (*CDABE*) para a utilização como gene repórter. Todos os isolados apresentaram luminescência a 28°C, mas, quando incubados a 37°C, somente o isolado BL6 permaneceu com uma atividade luminescente consideravelmente reduzida. Portanto as bactérias bioluminescentes pertencentes aos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Enterovibrio* isoladas do rio Tramandaí não apresentaram níveis de emissão de luminescência adequados à temperatura fisiológica humana para a utilização do cassete *lux* como gene repórter para monitoramento de infecções *in vivo*.

Abstract

Cryptococcosis is an invasive fungal disease caused mainly by pathogenic species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Recent epidemiological studies have suggested that infection with *C. gattii* develops more frequently pulmonary cryptococcomas, while *C. neoformans* establishes mainly neurological damages. Although exists this association, the mechanism of dissemination of these species is not completely understood, instigating the use of different approaches for the characterization of the infections. Alternatively, the development of bioluminescent organisms has allowed the real-time monitoring of infection in animal models. In this study, different strategies were used to construct strains of *C. neoformans* and *C. gattii* expressing Renilla luciferase reporter gene without success. In a second approach, bioluminescent bacteria (BL) were isolated from seawater samples collected in the vicinity of the river Tramandaí estuarine zone, in order to select the *lux* cassette (*CDABE*) for use as a reporter gene. All isolates showed luminescence at 28°C, but when incubated at 37°C, only the isolate BL6 remained with a considerably reduced luminescent activity. Thus, bioluminescent bacteria belonging to the genera *Vibrio*, *Photobacterium* and *Enterovibrio* isolated from Tramandaí river estuary zone presented unsuitable luminescence emission levels at human physiological temperature, preventing the use of *lux* cassette as a reporter gene in experiments to monitoring cryptococcosis infection.

1. Introdução

Fungos infecciosos estão entre um amplo grupo de patógenos microbianos que emergem concomitantemente devido à pandemia da AIDS, bem como o aumento no número de pacientes imunocomprometidos (Byrnes *et al.*, 2011). A criptococose é uma infecção fúngica causada por *Cryptococcus neoformans* e por *Cryptococcus gattii* cuja manifestação mais comum é a meningite criptococócica (Park *et al.*, 2009). Aproximadamente um milhão de casos de criptococose ocorrem anualmente em todo o mundo, envolvendo principalmente pacientes infectados com HIV (Mora *et al.*, 2012). A incidência de pacientes imunocompetentes com meningite criptococócica também está aumentando no Noroeste da América na Costa do Pacífico, sendo *C. gattii* a espécie responsável por estes casos (Sabiiti & May, 2012). Para entender a patogênese da infecção invasiva causada por estas duas espécies é fundamental conhecer o processo de disseminação do patógeno em seu hospedeiro (Eisenman *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos recentes sugerem que em pacientes infectados com *C. gattii*, a doença ocorre principalmente no pulmão, enquanto aqueles infectados com *C. neoformans* desenvolvem meningoencefalite, porém as diferenças no mecanismo de disseminação entre estas duas espécies não estão totalmente elucidadas (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). Dentre as metodologias utilizadas para a determinação das vias de disseminação de microrganismos patogênicos em seus hospedeiros, destaca-se a imagem bioluminescente (BLI) (Brock, 2011).

Bioluminescência é um processo de emissão de luz visível como consequência de uma reação enzimática. Esta reação é catalisada por luciferases que são encontradas principalmente em organismos marinhos. Assim a expressão de luciferase em microrganismos patogênicos, associada a um substrato, permite localizar o patógeno no hospedeiro devido à emissão de fótons de luz (Hutchens & Luker, 2007). O presente trabalho tem como objetivo construir linhagens bioluminescentes de *C. neoformans* e *C. gattii* visando compreender os mecanismos de disseminação destas leveduras no hospedeiro.

1.1 *Cryptococcus* spp.: características gerais

Mais de 50 espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* estão distribuídas na natureza. *Cryptococcus* spp. podem ser isoladas de várias fontes ambientais como solo, ar, água, animais e excretas de pombos (Khawcharoenporn *et al.*, 2007). Dentre as espécies incluídas no gênero, poucas são consideradas patogênicas, e estas apresentam diferentes características que conferem virulência (Petter *et al.*, 2001). As espécies que causam doença em humanos e animais são *C. neoformans* e *C. gattii* (Casadevall & Perfect, 1998), embora a incidência de infecções causadas por outras espécies como *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* têm aumentado recentemente (Burnik *et al.*, 2007). *C. neoformans* foi isolado pela primeira vez em 1894 do suco de frutas pelo cientista italiano Francesco Sanfelice (Knoke *et al.*, 1994). O primeiro caso de criptococose humana foi descrito pelo cientista alemão Busse,

que em 1895 isolou uma levedura encapsulada de um paciente que apresentava uma micose desconhecida (Heitman *et al.*, 2010). In 1905, Von Hansemann reportou o primeiro caso de meningite criptococócica (Revisado por Negroni, 2012).

A criptococose é uma doença resultante da inalação de propágulos infecciosos do ambiente. O fungo pode estabelecer uma infecção pulmonar e se disseminar para o sistema nervoso central. A infecção no sistema nervoso central representa a forma mais grave da criptococose. A meningite criptococócica é considerada a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com AIDS. Atualmente, o aumento no número de casos de criptococose é paralelo à epidemia global de HIV/AIDS (Revisado por Sabiiti & May, 2012).

C. neoformans e *C. gattii* são leveduras encapsuladas classificadas em quatro sorotipos (A, B, C e D), de acordo com as características antigênicas da cápsula polissacarídica. Os sorotipos A e D correspondem a *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, respectivamente. Já os sorotipos B e C correspondem a *C. gattii* (anteriormente descrito como *C. neoformans* var. *gattii*) (Springer *et al.*, 2010; Franzot *et al.*, 1999). As variedades são divididas em tipos moleculares: VNI, VNII e VNB correspondem a *C. neoformans* var. *grubii*; VNIV corresponde a *C. neoformans* var. *neoformans*, VNIII (sorotipo híbrido AD); e VGI, VGII, VGIII e VGIV são correspondentes a *C. gattii* (Ngamskulrunroj *et al.*, 2009). O sorotipo A de *C. neoformans* var. *grubii* é distribuído mundialmente e é responsável por 95% dos casos de criptococose. O

sorotipo híbrido AD é geograficamente restrito ao sul da África (Litvintseva *et al.*, 2006).

Os sorotipos B e C de *C. gattii* são endêmicos de regiões tropicais e subtropicais, e responsáveis por 70% a 80% dos casos de criptococose em hospedeiros imunocompetentes na Austrália, Nova Guiné e América do Sul, no entanto em 1999 *C. gattii* causou um surto de criptococose na Ilha de Vancouver, Canadá, região de clima temperado (Casadevall & Perfect, 1998). Um estudo preliminar dos aspectos clínicos do surto de criptococose na ilha de Vancouver revelou 38 casos de pacientes com criptococose infectados por *C. gattii*, sendo o diagnóstico destes pacientes realizado entre janeiro de 1999 e dezembro de 2001 (Hoang *et al.*, 2004). Este número foi maior do que o número de casos de pacientes infectados por *C. gattii* na Austrália, onde *C. gattii* é endêmico. O surto na ilha de Vancouver enfatiza a importância de estudar o patógeno *C. gattii*, visto que a maioria das informações na literatura é restrita a *C. neoformans*. A linhagem R265 de *C. gattii* hipervirulenta foi isolada na ilha de Vancouver e atualmente é alvo de vários estudos (Kidd *et al.*, 2004).

Como saprófitos, isolados clínicos de *C. neoformans* estão presentes no ambiente, principalmente no solo e associados à excretas de pombos (Lin, 2009). Diferentemente, linhagens de *C. gattii* são comumente encontrados em eucaliptos ou em outras espécies de árvores (Lin, 2009).

Partículas no ar são responsáveis por disseminar diversas infecções respiratórias em humanos. Assim como outras infecções fúngicas, a criptococose

é iniciada principalmente pela deposição de esporos ou células nos alvéolos pulmonares (Casadevall & Perfect, 1998). *C. neoformans* é isolado tanto de pacientes quanto do ambiente na forma leveduriforme. No entanto esse microrganismo pode sofrer uma transição dimórfica estabelecendo o desenvolvimento de hifas por duas rotas de diferenciação distintas: *mating* e a frutificação monocariótica. O ciclo sexual de *C. neoformans* ocorre a partir da fusão de células haploides de *mating types* opostos, α e α (*MAT α* e *MAT α*) para a produção de filamentos dicarióticos (Idnurm *et al.*, 2005). Estes passam por meiose, levando a produção de basidiósporos. As duas variedades de *C. neoformans* possuem diferenças no *mating*. Estudos epidemiológicos das linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* mostraram que isolados clínicos são usualmente *mating* α (96%), sendo mais virulento quando comparadas as linhagens de *mating* α (Kwon-Chung *et al.*, 1992). Em *C. neoformans* var. *grubii*, a maioria dos isolados também apresentam *mating* α (Nielsen *et al.*, 2003). Linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* podem se diferenciar e apresentar frutificação monocariótica. Durante o processo de frutificação monocariótica células do mesmo *mating* α sofrem diploidização em resposta a limitação de nutrientes (Figura 1) (Lin *et al.*, 2005). Embora a frutificação e o *mating* possuam fatores morfológicos similares, as hifas que são produzidas durante a frutificação são monucleadas e não são conectadas, já as células produzidas durante o *mating* contém dois núcleos e são conectadas por uma ramificação curta (Wickes *et al.*, 1996).

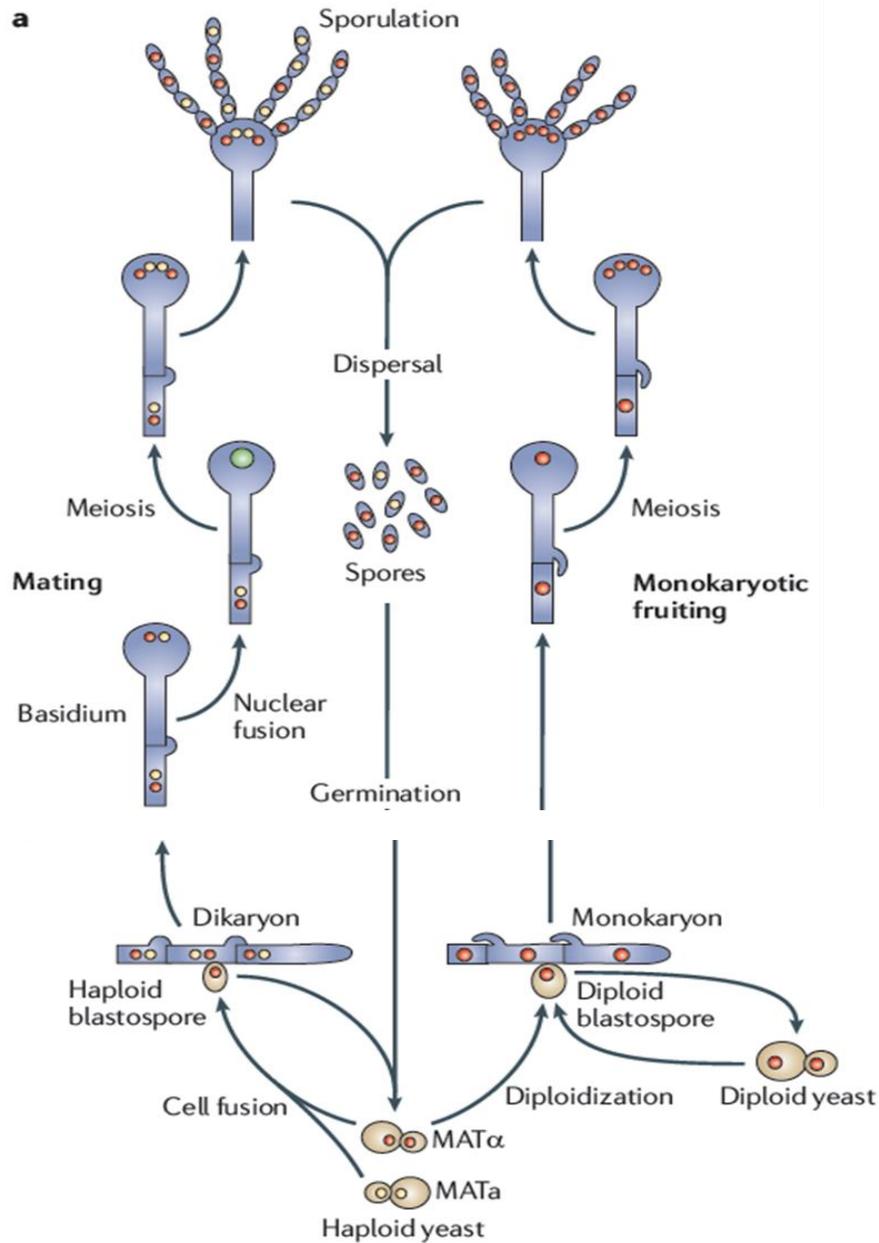


Figura 1. Ciclo celular de *Cyptococcus neoformans*. Esporos resultantes do *mating* entre as células de *mating* opostos (MAT a ou MAT α) e da formação dicariótica de células MAT α para estabelecer células monocarióticas. Em ambos os casos, o desenvolvimento sexual da filamentação monocariótica ou dicariótica resultam na meiose e na esporulação. Os esporos germinados se dividem por brotamento para produzir células haploides leveduriformes. Figura adaptada de Kronstad *et al.*, 2012.

1.2 Virulência

A adaptação de microrganismos a um determinado ambiente está associada a determinantes que possibilitem sua sobrevivência em nichos ecológicos específicos (Zaragoza *et al.*, 2009). Estes determinantes são os fatores de virulência que propiciam ao microrganismo transpor as defesas do hospedeiro infectado (Casadevall & Perfect, 1998). Os principais fatores de virulência em *C. neoformans*/*C. gattii* são a presença de uma cápsula polissacarídica, a síntese de melanina, a habilidade de desenvolvimento a 37°C e a presença de enzimas degradativas (Kozel *et al.*, 1995).

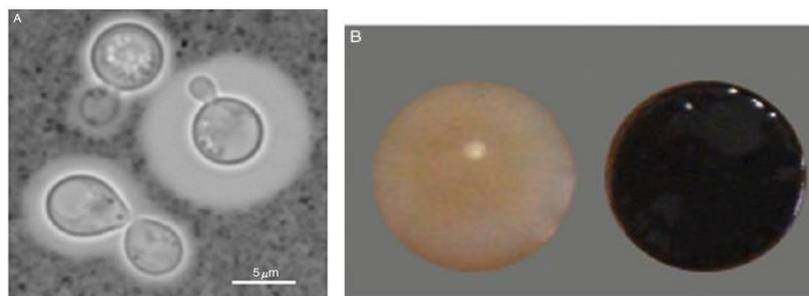


Figura 2. Fatores de virulência em *C. neoformans* e *C. gattii*. (A) Células de *C. neoformans* coradas com tinta da Índia evidenciando a presença da cápsula polissacarídica. (B) Colônia de *C. gattii* não melanizada e melanizada em meio contendo L-DOPA após 7 dias de incubação. Figura adaptada de Ma & May, 2009.

Cápsula polissacarídica

C. neoformans e *C. gattii* produzem uma complexa cápsula polissacarídica composta de glicuroxilomanana (GXM), galactoximanana (galXM) e manoproteínas (Zaragoza *et al.* 2009). A cápsula polissacarídica é o principal

fator de virulência de *C. neoformans* (Figura 2A) (McClelland *et al.*, 2006). Mutantes acapsulares de *C. neoformans* são avirulentos em modelos murinos de infecção experimental (Zaragoza *et al.*, 2009). A síntese da cápsula é induzida por soro, limitação de ferro e níveis fisiológicos de CO₂, podendo a cápsula ser visualizada através da coloração com tinta da China. No ambiente, a cápsula tem um importante papel de proteção do microrganismo contra condições de estresse, como a desidratação (Zaragoza *et al.*, 2009). *In vivo*, o tamanho da cápsula é influenciado pelo órgão e pelo período da infecção, sendo maior nos pulmões e na fase aguda da doença (Clancy *et al.*, 2006). A cápsula tem um papel importante na interação de *Cryptococcus* com o hospedeiro, pois com suas propriedades imunomodulatórias promove a evasão imune e sobrevivência do patógeno dentro do hospedeiro (Vecchiarelli, 2000).

Melanina

A melanina é um pigmento de coloração preta ou marrom, hidrofóbica com carga negativa e possui um alto peso molecular produzido pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Figura 2B) (Casadevall *et al.*, 2000). A síntese de melanina é catalisada pela enzima lacase e requer a presença de substrato exógeno. O tipo de pigmento sintetizado varia de acordo com a estrutura química do substrato adicionado ao meio (Casadevall *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que a lacase pode proteger o fungo da atividade oxidativa dos macrófagos alveolares, contribuindo para virulência independente de seu papel na catalisação da polimerização da melanina (Emery *et al.*, 1994). No ambiente a

melanização é um mecanismo de proteção contra amebas (Steenbergen *et al.*, 2001), altas temperaturas e contra a radiação ultravioleta (Casadevall & Perfect, 1998).

Desenvolvimento a 37 °C

A habilidade de desenvolvimento a temperatura fisiológica é essencial para que ocorra a proliferação e manutenção da infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*. Desenvolvimento a 37 °C está associado com a transição da forma micelial para leveduriforme, que ocorre em fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatidis* (Kraus *et al.*, 2004). Dentre o complexo de espécies *Cryptococcus*, somente *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de estabelecer desenvolvimento normal acima de 30 °C (Perfect *et al.*, 2006).

Enzimas degradativas

C. neoformans produz enzimas degradativas, como fosfolipases, proteinases e ureases. Estudos recentes demonstraram que estas enzimas degradam membranas comprometendo a integridade intracelular e intercelular do hospedeiro facilitando a disseminação do patógeno até o cérebro (Revisado por Sabiiti & May, 2012).

As proteinases produzidas por *C. neoformans* degradam as seguintes proteínas do hospedeiro: colágeno, elastina, fibrinogênio e imunoglobulinas (Chen *et al.*, 1996). Alguns estudos sugerem que as proteinases e fosfolipases são produzidas durante a replicação de *C. neoformans* no interior de macrófagos, provendo nutrientes ao patógeno e causando danos ao sistema de defesa do

hospedeiro (Chen *et al.*, 1996; Tucker & Casadevall, 2002). Assim como as proteinases, as fosfolipases atuam como enzimas degradativas, sendo capazes de hidrolisar um ou mais ésteres ligados a glicerofosfolipídeos (Wright *et al.*, 2004). A ação de fosfolipases pode resultar na desestabilização de membranas e lise celular promovendo a infecção no pulmão e a disseminação das leveduras no sangue (Ghannoum *et al.*, 2000; Santangelo *et al.*, 2004). A enzima urease catalisa a hidrólise de ureia a amônia e carbamato e é considerado um importante fator de virulência em *C. neoformans* (Steenbergen *et al.*, 2003).

1.3 Mecanismos de disseminação

A criptococose pode potencialmente ocorrer em qualquer parte do corpo humano como pele, fígado, baço, próstata, trato urinário, porém os órgãos mais afetados são os pulmões e o cérebro (Liu *et al.*, 2009). Os mecanismos de disseminação envolvem várias etapas. Acredita-se que o fungo estabelece a infecção no pulmão a partir da inalação de esporos ou leveduras dissecadas do ambiente. A colonização no hospedeiro pode resultar em nenhuma doença, onde o fungo é eliminado pela resposta imune do hospedeiro; uma infecção assintomática, na qual o fungo entra em estado de latência e só é reativado quando o sistema imune do hospedeiro torna-se comprometido; em doença pulmonar, caracterizada por nódulos pulmonares e inflamação dos pulmões (Wu *et al.*, 2009; Kisch *et al.*, 2006); ou ainda uma disseminação que pode ocorrer

potencialmente em todos os órgãos causando uma infecção sistêmica, e disseminação para o sistema nervoso central (Lin *et al.*, 2006).

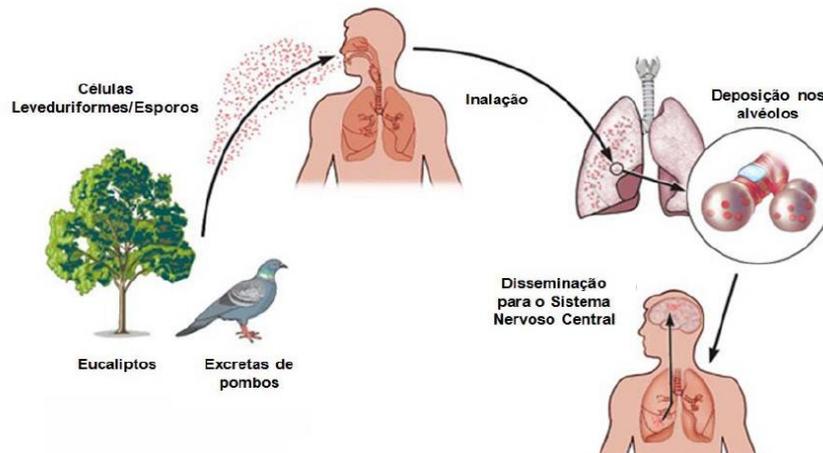


Figura 3. Ciclo da infecção de *Cryptococcus*. A infecção em humanos é estabelecida através da inalação de esporos ou leveduras dissecadas de fontes ambientais. Em hospedeiros imunocomprometidos, o fungo pode permanecer na forma dormente ou na forma latente e se disseminar para o sistema nervoso central. Adaptação da imagem disponível em <http://www.bmolchem.wisc.edu/research.html>.

C. neoformans tem a propensão de se disseminar para o sistema nervoso central, ultrapassando a barreira hematoencefálica (BHE), e causar o quadro mais grave da doença, a meningoencefalite (Chen *et al.*, 2003). A BHE é uma barreira entre a circulação sanguínea e o parênquima cerebral e é composta principalmente por células microvasculares endoteliais especializadas (Correale *et al.*, 2009). É responsável por manter a homeostase bioquímica do sistema nervoso central (SNC) (Rubin & Staddon, 1999). Recentes estudos têm sugerido diversos mecanismos utilizados por *Cryptococcus* para atravessar a BHE. *Cryptococcus* pode atravessar a BHE e entrar no SNC através da penetração

transcelular, entrada paracelular e transmigração por células imunes (modelo cavalo de troia) (Figura 4) (Revisado por Sabiit and May, 2012).

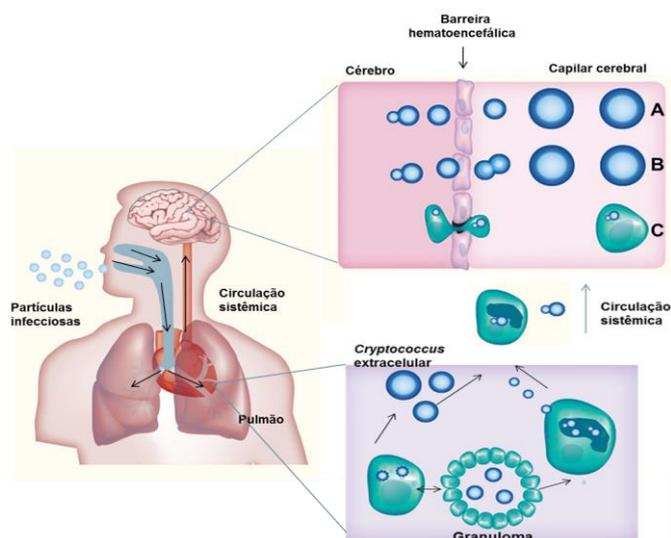


Figura 4. Modelo da disseminação de *Cryptococcus neoformans* do ambiente ao cérebro humano. Esporos ou leveduras dissecadas colonizam o espaço alveolar no pulmão a partir da inalação e podem permanecer na forma latente envolvido por granuloma ou se disseminar para o sistema nervoso central atravessando a BHE via paracelular (A), transcelular (B) ou por células fagocíticas (C). Figura adaptada de Sabiit and May, 2012.

A via transcelular permite o patógeno atravessar a BHE por transcitose, a partir de células endoteliais microvasculares do cérebro, aproveitando o processo celular endocítico sem a disrupção das junções (Charlier *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2011). No modelo paracelular a levedura ultrapassa a barreira por espaços intercelulares, denominado junções, causando danos na barreira hematoencefálica. Estudos sugerem que mudanças na estrutura e no tamanho da cápsula são responsáveis pelo dano no endotélio (Kim *et al.*, 2008). Chen *et al.*, 2003 demonstraram que *C. neoformans* se liga ao endotélio microvascular provocando alterações nas junções, ultrapassando a BHE.

Cryptococcus é um patógeno facultativo intracelular que pode sobreviver e se replicar dentro de macrófagos evitando o ambiente hostil do hospedeiro (Feldmesser *et al.*, 2000). No modelo cavalo de troia a disseminação é facilitada pela interação entre a levedura e a célula fagocítica (Kronstad *et al.*, 2011). *Cryptococcus* é engolfado por macrófagos no estágio inicial da infecção, e estas células levam o patógeno até o sistema nervoso central. O escape do patógeno pode ocorrer por lise ou expulsão mantendo a viabilidade das células. O processo de expulsão pode também resultar em movimento célula a célula, onde as células das leveduras passam entre macrófagos adjacentes (Shea *et al.*, 2006).

1.4 Meningoencefalite criptocócica (MC)

Meningite é a manifestação mais frequente e severa da criptococose. A infecção no espaço subaracnóideo é acompanhada pelo envolvimento do parênquima cerebral, assim o termo meningoencefalite pode ser o mais apropriado (Bicanic & Harrison, 2005). Meningoencefalite criptocócica (MC) tipicamente afeta grupos de alto risco como pacientes com HIV/AIDS (30 - 100% de mortalidade) ou recipientes de órgãos transplantados, mas também afeta indivíduos imunocompetentes (Park *et al.*, 2009). Os principais sintomas apresentados pela doença são dor de cabeça, febre, mal-estar, estado mental alterado e sintomas menos frequentes como déficit neurológico e níveis de consciência diminuída (Bicanic & Harrison, 2005). Patologicamente vítimas com

MC sem HIV apresentam mais inflamações no tecido do cérebro. Vítimas com MC associada a HIV analisadas após a morte apresentaram alto número de células de *C. neoformans* na área aracnoide e este número foi associado com o aumento da pressão intracraniana, o que sugere a acumulação de *C. neoformans* na obstrução aracnoide (Lee *et al.*, 1996).

C. neoformans é responsável por 99% dos casos de MC e é a principal causa de doença em pessoas imunocomprometidas, enquanto *C. gattii* é responsável por 1% dos casos infectando principalmente pessoas imunocompetentes. Embora as complicações subjacentes e a evolução clínica sejam diferentes, a forma e a gravidade da doença não variam entre os dois agentes etiológicos (Mora *et al.*, 2012; Steele *et al.*, 2010).

Orientações para o tratamento foram elaboradas de acordo com a gravidade da doença do paciente ou a presença de outras patologias subjacentes, tais como HIV ou recipiente de órgão transplantado. Por exemplo, para pacientes infectados com HIV é indicado anfotericina B desoxicolato (0,7-1,0 mg/kg) e flucitosina (100 mg/kg) durante 4 dias, seguido de 2 semanas de fluconazol de (6 mg/kg). O antifúngico corrente mais eficaz é a anfotericina, que é tóxico e requer sofisticados procedimentos de administração que não são facilmente acessíveis em locais com poucos recursos onde a MC é mais prevalente (Perfect *et al.*, 2010).

1.5 Metodologias utilizadas para avaliação da disseminação de microrganismos

1.5.1 Contagem de CFU de órgãos isolados

Técnicas de pesquisas microbiológicas muitas vezes dependem da precisão do resultado de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). Rotineiramente quando o ensaio tem o intuito de avaliar a disseminação do patógeno no hospedeiro, os órgãos são macerados separadamente, e diluições seriadas do macerado são plaqueadas em triplicata. Após a incubação apropriada para o microrganismo de escolha, o número de CFU é determinado (Brugger *et al.*, 2012). Embora esta técnica permita avaliar a progressão da doença em modelos experimentais, ela também possui algumas limitações, como uma análise da infecção somente em tempos específicos e em órgãos específicos. É impossível distinguir os acontecimentos entre dois intervalos de tempos determinados ou se a infecção progrediu para algum órgão não analisado. Outra limitação é a dinâmica da infecção que não pode ser seguida no mesmo grupo de animais, pois os dados de cada tempo são obtidos utilizando animais diferentes (Andreu *et al.*, 2010).

1.5.2 Métodos ópticos para detecção da imagem *in vivo*

No campo da imagem óptica, a imagem biofotônica é uma técnica altamente sensível, não tóxica e não invasiva. É baseada na detecção da luz visível que surge a partir da excitação de uma proteína fluorescente ou da reação de oxidação catalisada por uma enzima luciferase (fenômeno chamado bioluminescência). Embora a luz emitida seja fraca, ela é detectada externamente por detectores de fótons sensíveis que são câmeras dispositivas de carga acoplada. Conforme a luz passa através de vários tipos de tecidos (incluindo pele, músculo e ossos) é possível observar e quantificar a distribuição espacial e temporal da produção de luz a partir de animais vivos (Zacharakis *et al.*, 2005; Hoffman & Yang, 2006).

Tecnologias de imagem molecular têm muitas aplicações, como o estudo de doenças infecciosas, oncologia, toxicologia e expressão gênica (Zhang *et al.*, 2001). Combinando sistemas repórteres com câmeras de carga acoplada (CCD) que detectam a luz transmitida através do tecido animal é possível monitorar diversos processos biológicos *in vivo* (Contag & Bachmann, 2002). Duas classes de repórteres ópticos são amplamente utilizadas, os bioluminescentes e fluorescentes (Mason, 1999).

1.5.2.1 Imagem fluorescente

Repórteres fluorescentes não requerem a presença de um substrato, mas necessitam de uma excitação de luz externa. Incluem proteínas como a proteína fluorescente verde (GFP), DsRed, mCherry, proteína fluorescente amarela (YFP), dentre outras (Blader, 2001). Muitas proteínas fluorescentes têm aplicações nas metodologias de citometria, microscopia, e também no monitoramento da distribuição de drogas, moléculas ou anticorpos (Rice *et al.*, 2001). Os sinais de fluorescência são mais brilhantes do que os sinais bioluminescentes, porém a taxa de *background* é mais forte na fluorescência devido os altos níveis de autofluorescência dos tecidos. A sensibilidade da detecção de proteínas fluorescentes é menor, com isso é necessário um maior número de células para uma análise por imagem (Troy *et al.*, 2004).

1.5.2.2 Imagem bioluminescente

Imagem bioluminescente (BLI) é uma técnica não invasiva que pode ser utilizada para monitorar microrganismos em animais vivos. A bioluminescência é a emissão de luz fria e visível por organismos vivos, é um fenômeno natural que ocorre em muitas espécies, mas não em mamíferos (Rice *et al.*, 2001). A enzima que catalisa a oxidação do substrato luciferina emitindo luz é a luciferase (Greer & Szalay, 2002). Luciferina e luciferase são denominações genéricas, pois existem cinco sistemas luciferase - luciferina caracterizados (Andreu *et al.*, 2011).

A aquisição de imagens bioluminescentes requerem células ou tecidos que expressem um cassete contendo um gene repórter bioluminescente regulado por um promotor constitutivo selecionado. Para conferir um fenótipo bioluminescente no microrganismo é necessário que os genes repórteres sejam expressos de forma estável e suficiente. Quando estas células são injetadas no camundongo a disseminação pode ser visualizada pela intensidade da luz emitida. Para indução da produção da luz é necessário à presença de um substrato (Sato *et al.*, 2004). A observação e a quantificação da produção de luz revelam a distribuição espacial e temporal de processos biológicos em animais vivos (Figura 5) (Contag & Bachmann, 2002).

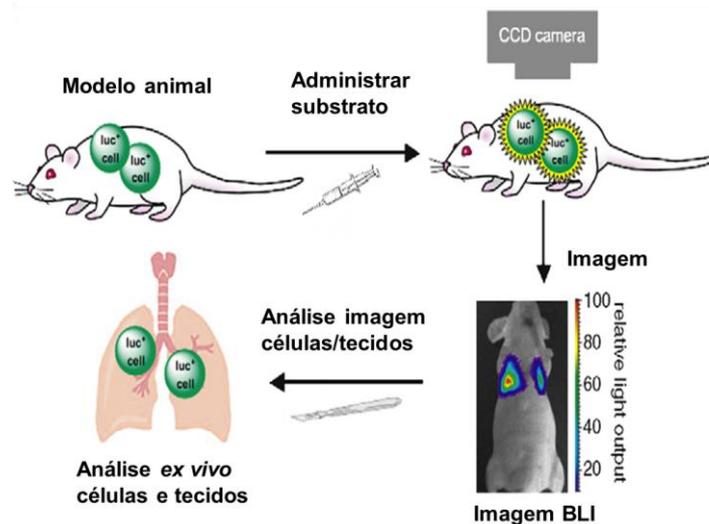
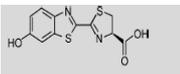
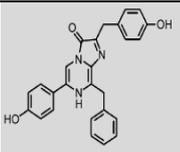


Figura 5. Representação esquemática da aquisição de imagem bioluminescente para o monitoramento de células *in vivo* e *ex vivo*. Após a injeção do substrato é produzida a luz de células marcadas com a luciferase e esta luz é detectada na câmera de carga acoplada. Os fótons captados geram a imagem. Figura adaptada de Prescher & Contag, 2010.

Esta técnica pode reduzir o número de animais requerido para o experimento, porque múltiplos ensaios podem ser realizados com o mesmo animal, diminuindo também os efeitos da variação biológica. Outra vantagem da utilização de luciferases como indicadores ópticos em células de mamíferos e tecidos é o baixo *background*, devido à ausência de luz endógena das células mamíferas (Contag *et al.*, 1998).

A sensibilidade da detecção de fontes de luz interna depende de vários fatores, incluindo o nível de expressão da luciferase, a profundidade que as células marcadas estão localizadas e a sensibilidade do sistema de detecção (Hollingshead *et al.*, 2004). Avanços importantes na tecnologia do detector têm colaborado para uma melhor qualidade da imagem e uma maior sensibilidade. Fótons são detectados pelo dispositivo especializado de carga acoplado (CCD) que converte fótons em elétrons gerando a imagem BLI (Oshiro, 1998). Vários sistemas bioluminescentes são identificados na natureza (Tabela 1), cada um requer um substrato específico para uma determinada enzima. As luciferases mais utilizadas como gene repórter são Firefly (*Photinus pyralis*; FLuc), Renilla (*sea pansy*; RLuc), Click beetle (*Pyrophorus plagiophthalmus*) e de várias espécies bacterianas (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*) (Hastings *et al.*, 1996).

Tabela 1. Luciferases utilizadas como gene repórter. Adaptada de Prescher & Contag, 2010.

Luciferase	Substrato	Pico emissão nm	Tamanho aproximado KDa	Comentários
<i>Firefly (Fluc) Norte Americano</i>	 D- luciferina	612	61	Requer ATP
<i>Besouro vermelho</i>		611	61	Requer ATP
<i>Besouro verde</i>		544	61	Requer ATP
<i>Renilla reniformis (Rluc nativo)</i>	 Coelenterazina	480	36	Pode ser usada em ambientes extracelulares
<i>Renilla reniformis (Rluc8.6-535)</i>		535	36	Enzima mutante com emissão de luz vermelha
<i>Gaussea princeps (Gluc)</i>	Coelenterazina	480	20	Enzima naturalmente secretada
<i>Lux AB</i>	FMNH2 + longa cadeia de aldeído	490	A: 42 B: 37	Operon <i>lux</i> (CDABE) bacteriano codifica todos componentes necessários para paraemissão de luz

A luciferase Firefly foi purificada e caracterizada em 1978 (Wilson *et al.*, 1998). Três anos depois foi utilizada como gene repórter em células de mamíferos, e tornou-se uma ótima ferramenta para estudo da regulação gênica *in vivo*. Luciferase Firefly produz fótons de luz numa reação que requer ATP, magnésio e o substrato luciferina. A emissão de luz da reação catalisada pela luciferase Firefly tem o comprimento que abrange uma faixa de 550 nm a 572 nm (DeLuca *et al.*, 1978). Em *P. pyralis* a luciferase Firefly está localizada nos peroxissomos de células especializadas chamada fotócitos na parte posterior do abdômen (Revisado por Brock *et al.*, 2011).

A luciferase Firefly é amplamente utilizada como repórter genético em vários tipos celulares. Mwakingwe *et al.*, 2009 construíram linhagens do parasita

Plasmodium yoelii expressando a luciferase Firefly para o monitoramento de estágios do parasita no fígado de camundongos. Recentemente construíram linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* expressando a luciferase Firefly com o objetivo de monitorar a eficácia do tratamento da tuberculose com antibiótico em camundongos (Andreu et al., 2013).

A Luciferase Renilla é uma enzima que catalisa a reação química que é responsável pela bioluminescência verde da *Renilla reniformis*, um coral mole também conhecido como *sea pansy* e membro da classe antazoa. *In vitro*, a enzima catalisa a reação de descarboxilação oxidativa do substrato coelenterazina na presença de O₂ resultando na emissão de luz azul (com máxima emissão de 480nm) e a formação de oxiluciferina e CO₂, como produtos da reação (Revisado por Bhaumik *et al.*, 2002). A bioluminescência *in vivo* resulta da transferência de energia oxiluciferina para proteína fluorescente verde que então emite luz verde com uma emissão máxima de 509 nm (Ward *et al.*, 1979). A enzima é uma cadeia de polipeptídios de 35 KDa na forma ativa (Matthews *et al.*, 1977) e é imediatamente ativa após a tradução sem o requerimento de modificações pós traducionais. Leoning *et al.*, 2007 realizaram estudos cristalográficos da luciferase Renilla com uma resolução de 1.4 Å e reportaram que a enzima demonstra uma clássica B-hidrolase enovelada. O cDNA da enzima luciferase Renilla foi clonado pela primeira vez por Lorenz *et al.*, 1991 que determinaram que a proteína contém 311 resíduos de aminoácidos. Subsequentemente, o mesmo grupo demonstrou a expressão da enzima em células de mamíferos

transfectadas e sugeriu seu potencial uso como marcador para expressão de genes em mamíferos (Lorenz *et al.*, 1996). A luciferase Renilla recombinante expressa em células de mamíferos mostrou ser idêntica à proteína nativa em termos de massa molecular e reatividade imunológica (Lorenz *et al.*, 1996). A enzima foi subsequentemente desenvolvida para ser utilizada como gene repórter em sistemas de cultura de células de mamíferos (Sherf *et al.*, 1996). Luciferase Renilla foi utilizada como repórter bioluminescente em *Candida albicans* (Srikantha *et al.*, 1996). A enzima luciferase Renilla não requer cofatores gerados pela célula hospedeira como ATP, requer somente a presença de O₂. A maior limitação encontrada na aplicação da luciferase Renilla é o substrato utilizado por esta enzima, a coelenterazina. Este substrato tem dificuldades de penetrar na célula eficientemente, dificultando a visualização da imagem intracelular *in vivo* (Pichler *et al.*, 2004).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Construir linhagens bioluminescentes de *C. neoformans* e *C. gattii* visando compreender os mecanismos de disseminação destas leveduras no hospedeiro murino.

2.2 Objetivos específicos

- Construir linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* expressando a ORF que codifica para luciferase Renilla.
- Avaliar a atividade bioluminescente das linhagens *C. neoformans* e *C. gattii* recombinantes para utilização no monitoramento *in vivo* da criptococose em modelo experimental.
- Isolar e identificar bactérias bioluminescentes de ambientes marinhos na região Sul do Brasil.
- Quantificar a emissão de luminescência dos isolados e avaliar a estabilidade da luminescência em diferentes temperaturas.
- Selecionar bactérias luminescentes marinhas que possuam luciferases com potencial para serem utilizadas como gene repórter.

A apresentação desta dissertação foi organizada em dois capítulos:

Capítulo 1:

Expressão da luciferase Renilla nas linhagens H99
de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*.

Capítulo 2:

Isolamento e caracterização de bactérias bioluminescentes
do ambiente natural marinho de Tramandaí,
Rio Grande do Sul, Brasil.

3. Capítulo 1:

Expressão da luciferase Renilla nas linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*.

O estudo de processos patogênicos é frequentemente limitado a ensaios *ex-vivos* correlacionados com culturas celulares (Fradin *et al.*, 2003). O

monitoramento em tempo real de infecções microbianas tornou-se parte integrante do estudo de interações entre patógeno e hospedeiro. Recentemente essa abordagem foi aplicada no monitoramento de infecções fúngicas (Gow *et al.*, 2012). A primeira tentativa de clonagem do gene repórter luciferase em leveduras foi realizada em 1988. Tatsumi *et al.*, 1988 construíram um cassete utilizando a luciferase Firefly e inseriram na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O cDNA nativo foi clonado sob controle do promotor álcool desidrogenase sendo o rendimento máximo obtido de luciferase na cultura de 10ng/ml. Essa quantidade foi considerada baixa para ser utilizada como repórter *in vivo* (Vieites *et al.*, 1994).

A maior limitação do ensaio *in vivo* é a distribuição do substrato nas células. A luciferase Firefly possui um domínio C-terminal com 12 aminoácidos, e um peptídeo sinal que direciona a proteína ao peroxissomos. A localização da luciferase nos peroxissomos poderia impedir o contato do substrato com a enzima, gerando a baixa emissão de luz. Assim, a remoção do peptídeo sinal foi realizada e a emissão de luz aumentou significativamente (McNabb *et al.*, 2005; Valimaa *et al.*, 2008).

Similar ao ocorrido em *S. cerevisiae*, a primeira clonagem da luciferase Firefly em *Candida albicans* não teve sucesso (Srikantha *et al.*, 1995). Com a expressão da Firefly regulada pelo promotor WH11, a bioluminescência não foi detectada. Este resultado negativo foi atribuído à presença de vários resíduos de leucinas codificadas pelo códon CUG, que é traduzido em serina em *C. albicans*

gerando uma proteína não funcional (Srikantha *et al.*, 1996; Soll *et al.*, 1998). Com o intuito de gerar um sistema repórter bioluminescente adequado para estudar a expressão gênica em *C. albicans*, a luciferase Renilla foi utilizada (Srikantha *et al.*, 1996).

Doyle *et al.*, 2006 utilizaram a luciferase Firefly regulada pelo promotor ENOI de *C. albicans* para o monitoramento de infecções fúngicas. O fator limitante foi a pouca permeabilidade do substrato nas hifas, sendo considerada uma desvantagem na utilização desse sistema repórter em *C. albicans*, pois a formação de pseudohifas contribui para a virulência de *C. albicans* (Biswas *et al.*, 2007). Devido as limitações de estudar a infecção fúngica sistêmica de *C. albicans* utilizando a luciferase Firefly, Enjalbert *et al.*, 2009 investigaram as possibilidades de utilizar a luciferase *Gaussia princeps* (Gluc) para o monitoramento da infecção de *C. albicans*, pois Gluc é naturalmente secretada. Para evitar a distribuição sistêmica de Gluc, a ORF que codifica para luciferase *Gaussia* foi fusionada na sequência codificadora da proteína PGA59, uma proteína requerida para integridade da parede celular, resultando no ancoramento desta proteína à parede celular. A expressão da luciferase correspondente a fusão PGA59gLUC foi localizada na superfície celular de *C. albicans*, permitindo a detecção da luciferase em células intactas. Células de *C. albicans* que produziram Gluc ancorada à parede celular foram comparadas a células de *C. albicans* expressando a luciferase Renilla (Rluc). A intensidade da luminescência foi mais alta no sistema Gluc. Este sistema foi útil para estudar a progressão da doença

cutânea, subcutânea e a infecção vaginal. Na infecção cutânea o substrato foi adicionado diretamente na pele infectada e na infecção vaginal o substrato foi adicionado no lúmen vaginal. Utilizando este método, a coelenterazina alcançou o local da infecção em quantidades suficientes, podendo ser realizada a correlação da luminosidade com a carga fúngica. Quando o sistema Gluc ancorado à parede celular foi utilizado para estudar a progressão de infecções sistêmicas, nenhum resultado satisfatório foi obtido. Vários fatores são apontados por impedir o monitoramento de infecções sistêmicas. O maior problema discutido pelos autores é a distribuição limitada de coelenterazina após a injeção intraperitoneal (Claes *et al.*, 2009).

Linhagens bioluminescentes de *Aspergillus fumigatus* foram construídas a partir da expressão do gene luciferase Firefly regulada pelo promotor constitutivo GPDA de *A. fumigatus* (Brock *et al.*, 2008). Com estas linhagens foi possível realizar o monitoramento da eficácia de diferentes antifúngicos *in vitro*. Além disso, foi possível visualizar a imagem no estágio inicial da infecção pulmonar utilizando o substrato luciferina, sendo injetado por via intraperitoneal, porém durante os estágios posteriores da infecção, o sinal de luz obtido diminuiu. Várias explicações foram discutidas para essa diminuição da luminescência nos estágios finais da aspergilose invasiva, como a diminuição do substrato luciferina nos pulmões infectados devido a pouca disponibilidade de oxigênio necessária para atividade da luciferase Firefly. Esta falta de oxigênio é resultante do estresse clínico gerado pela injeção do substrato. É necessário ainda encontrar uma

luciferase repórter adequada a fim de permitir a imagem de infecções fúngicas invasivas (Christophe *et al.*, 2010).

Portanto, neste trabalho objetivamos expressar a luciferase Renilla nas linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii* visando compreender os mecanismos de disseminação destas leveduras no hospedeiro murino.

3.2.2 Clonagem da sequência codificadora de luciferase em vetor pJAF15.

Para expressão da luciferase Renilla nas linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, o fragmento correspondente à sequência codificadora da luciferase Renilla e a região promotora CMV foi amplificado por PCR, utilizando-se como molde o vetor pRL-CMV (Lorenz *et al.*, 1991). O fragmento amplificado foi tratado com Klenow e fosforilado com a enzima T4 PNK, de acordo com instruções do fabricante. O vetor pJAF15, o qual contém a marca de resistência a higromicina, foi linearizado com a endonuclease de restrição EcoRV e defosforilado com a enzima SAP. Aproximadamente 100 ng do vetor e 25 ng do fragmento foram submetidos a uma reação de ligação contendo a enzima T4 DNA ligase. O produto foi transformado por eletroporação em células da linhagem TG2 de *E. coli*. A identificação dos clones recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando os *primers* PRLCMVF E PRLCMVR, os quais amplificam a região promotora CMV e a ORF que codifica para luciferase Renilla. A extração do DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russell, 2001) e novamente confirmada por PCR. O plasmídeo gerado foi denominado pCMV-JAF15.

3.2.2.1 Transformação do vetor pCMV-JAF15 nas linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*.

Aproximadamente 10 ug do vetor pCMV-JAF15 foi transformado nas linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii* por biobalística (Toffaletti *et al.*, 1993). Os transformantes foram selecionados em presença de higromicina, a qual foi utilizada como marca de seleção. Para confirmar a inserção do plasmídeo nas linhagens recombinantes de *C. neoformans* e *C. gattii*, DNA genômico foi extraído e amplificado por PCR utilizando os *primers* PRLCMVF e PRLCMVR.

3.2.2.2 Análise *in vitro* da expressão de luciferase

As linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii* recombinantes foram cultivadas em YPD por 24 horas a 30°C com agitação de 200 rpm. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão LA (0,5 M NaCl, 0,1 M K₂HPO₄, 1 mM EDTA, 0,6 mM azida sódica, 1 mM PMSF). Uma alíquota de 100 µl das células e 1,25 µM do substrato coelenterazina foram incubados em microplacas pretas para visualizar a bioluminescência dos transformantes no sistema IVIS Lumina.

Este mesmo ensaio foi repetido utilizando o extrato proteico total das linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii* recombinantes. Para obtenção do extrato proteico total, as linhagens recombinantes e selvagens H99 e R265 foram inoculadas em 50 ml de meio YPD e incubadas a 30 °C em shaker

com agitação de 200 rpm a 30 °C. Após liofilização, a lise celular foi realizada por maceração em nitrogênio líquido, 5 ml de PBS foram adicionados e procedeu-se agitação por 1 minuto em vórtex intercalada por incubação em gelo por 1 minuto. Esta etapa de agitação e incubação foi repetida 5 vezes e as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas determinada.

3.2.2.3 Preparação do RNA e síntese de cDNA

Linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* recombinantes e selvagens foram inoculadas em 50 ml de meio YPD e incubados com agitação de 200 rpm a 30°C por 24 horas. RNA total foi extraído após liofilização das células utilizando o reagente trizol (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. As linhagens recombinantes foram incubadas por 24 horas a 200 rpm em meio YPD completo e em meio YPD sem glicose com sorbitol (1 M).

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa RT-MMLV (Invitrogen) utilizando-se 2 µg de RNA total. Os *primers* LUCF e LUCR foram utilizados para amplificação de transcritos referentes ao gene que codifica para luciferase. Como controle, níveis de transcritos do gene que codifica para actina foram determinados por RT-PCR.

3.2.3 Fusão dos fragmentos por PCR

O fragmento correspondente a sequência codificadora luciferase Renilla do vetor pRL-CMV (Promega) foi amplificado por PCR com os *primers* LUCF e LUCR. Os fragmentos correspondentes à região promotora de histona H3, a região terminadora de histona H3, e a sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína lacase foram amplificados por PCR com os *primers* PH3F e PH3R; TH3F e TH3R; PSF e PSR, respectivamente, do DNA genômico de *C. neoformans*. Os *primers* são específicos para cada sequência alvo e possuem 15 pb adicionais de extensão complementar nas extremidades, para possibilitar a fusão dos fragmentos. Os amplicons foram purificados com o kit PureLink® PCR *Purification* (Invitrogen).

Em uma primeira etapa, os fragmentos são fusionados por PCR sem a presença de *primers* (Figura 10). Em uma segunda etapa, o produto de fusão obtido foi amplificado utilizando os *primers* PH3F e TH3R e analisado por eletroforese em gel de agarose (0,8%). A confirmação da fusão foi realizada por clivagem com as enzimas de restrição EcoRV, PvuII, AvaII, SpeI. Paralelamente, o fragmento correspondente a marca de seleção a higromicina, foi amplificado por PCR utilizando os *primers* ECLACHIGF e ECLACHIGR e purificado com o kit PureLink® PCR *Purification* (Invitrogen). O vetor pJAF15 (Fraser *et al.*, 2003) foi utilizado como molde nesta reação.

3.2.3.1 Co–transformação na linhagem R265 de *C. gattii*

Aproximadamente 10 µg do produto da fusão e 10 µg do cassete de resistência higromicina foram combinados, precipitados e preparados para co-transformação em *C. gattii* utilizando a técnica de biobalística (Toffaletti *et al.*, 1993). Os transformantes foram plaqueados em meio YPD com 200 µg/ml de higromicina. O DNA genômico foi extraído dos transformantes que permaneceram estáveis em meio com antibiótico e o *screening* foi realizado por PCR. A sequência que codifica para a luciferase Renilla foi amplificada utilizando os *primers* LUCF e LUCR e para amplificar a sequência da marca de seleção, os *primers* utilizados foram ECLACHIGF e ECLACHIGR.

3.2.3.2 Análise *in vitro* de expressão de luciferase

Para as análises *in vitro* de expressão de luciferase, as linhagens selvagem e recombinante de *C. gattii* foram cultivadas em YPD por 24 horas a 30°C com agitação (200 rpm). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão LA (0,5 M NaCl, 0,1 M K₂HPO₄, 1 mM EDTA, 0,6 mM azida sódica, 1 mM PMSF). Uma alíquota de 100 µl das células de cada cultivo e 1,25 µM do substrato coelenterazina foi adicionada em microplacas pretas para visualizar a emissão de bioluminescência dos transformantes no sistema IVIS Lumina. Este mesmo ensaio foi repetido utilizando o extrato proteico total da linhagem R265 de *C. gattii* recombinante e selvagem, conforme descrito anteriormente.

3.2.3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

As linhagens R265 de *C. gattii* selvagem e recombinante foram inoculadas em 50 ml de meio YPD e incubadas com agitação de 200 rpm a 30°C por 24 horas. RNA total foi extraído após liofilização das células utilizando o reagente trizol (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa RT-MMLV (Invitrogen) utilizando-se 2 µg de RNA total. Os *primers* LUCF e LUCR foram utilizados para amplificação de transcritos referentes ao gene que codifica para luciferase. Como controle, níveis de transcritos do gene que codifica para actina foram determinados por RT-PCR.

Tabela 2. Lista de *primers* utilizados para a construção do vetor para expressão de luciferase Renilla em *C. gattii* e *C. neoformans*.

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')
PRLCMVF	AAAAAAAAAGGATCCCAATATTGGCATTAGCCATATT
PRCMVR	AAAAAAAAAGCTTTTATCGATTTTACCACATTTGTAG
LUCF	CCATGGATGACTTGGAAAGTTTAT
LUCR	CCATGGATTGTTTCATTTTGAGAAC
AMpH3PF	GCGAATTCTGCAGATCGGCAGATACGATATGTTGGCGC
AMpH3PPS	TGTAGTCGAGTACATGGTGATAGATGTGTTGTGG
AMpPSF	AACACATCTATCACCATGTACTCGACTACAGCT
AMpPSR	AACACATCTATCACCATGTACTCGACTACAGCT
AMpLucPSF	CACGAACGTCGTGTGATGACTTCGAAAGTTTATGAT
AMpLucR	GCTAATAAAAGCTGCTTATTGTTTCATTTTGGAGAACTCGC
AMpH3TF	AAAAATGAACAATAAGCAGCTTTTATTAGCTTGGCTTTTGTAGACT
AMpH3TR	GCCAGTGTGATGGATTTGTACGCTTGATTGTTT

3.3 Resultados

3.3.1 Construção e inserção do vetor pCMV-JAF15 nas linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*

A representação esquemática da estratégia de construção do vetor pCMV-JAF15 está evidenciada na figura 7A. A sequência codificadora de luciferase Renilla e a região promotora CMV foram eficientemente amplificadas por PCR para posterior clonagem no vetor pJAF15. A clonagem no vetor pJAF15 resultou em 3 colônias recombinantes do total de 12 colônias transformantes, confirmadas por PCR após a extração de DNA plasmidial. Os plasmídeos recombinantes apresentaram amplificação de um fragmento de 1800 pb, correspondente ao tamanho do fragmento inserido (Figura 7B).

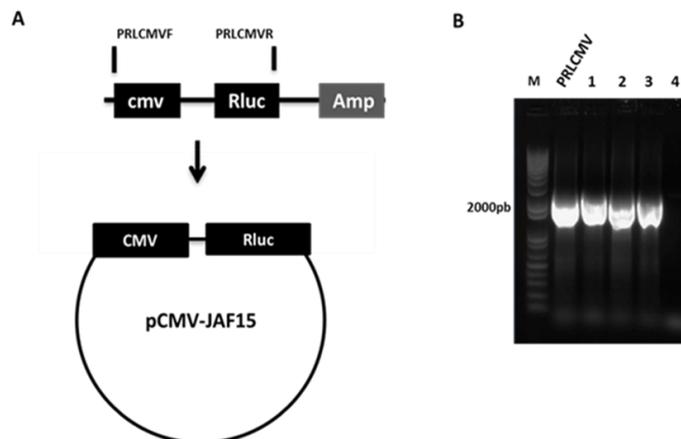


Figura 7. (A) Representação esquemática da construção do vetor pCMV-JAF15 para expressão de luciferase Renilla nas leveduras H99 e R265. (B) Confirmação da construção do vetor pCMV-JAF15 por amplificação do promotor CMV e do gene *luc* por PCR. M: marcador molecular 1 Kb, CP (controle positivo) PRLCMV, Colônias: 1, 2, 3 e CN(controle negativo):

O plasmídeo obtido foi transformado nas linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*. A transformação das linhagens R265 de *C. gattii* e H99 de *C. neoformans* resultou em 8 colônias transformantes para *C. neoformans* e 4 colônias transformantes para *C. gattii*. A confirmação da inserção foi realizada por PCR após a extração de DNA genômico dos transformantes. O produto de amplificação de 1800 pb observado após eletroforese corresponde ao tamanho do fragmento inserido (Figura 8).

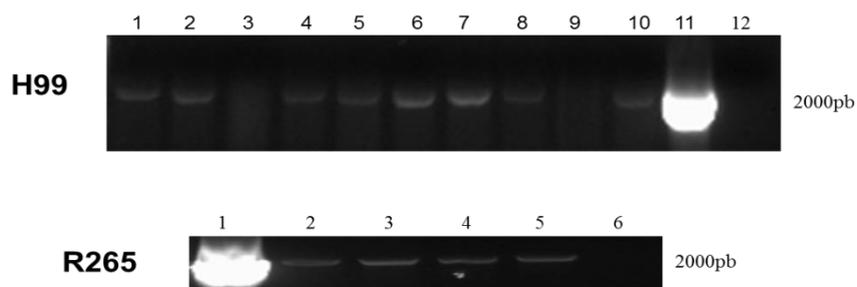


Figura 8. Confirmação da inserção do gene *luc* por PCR em transformantes de *C. neoformans* (painel superior) colônias: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, CP(controla positivo): 11 e CN(controla negativo): 12, e *C. gattii* (painel inferior) CP(controla positivo): 1, colônias: 2, 3, 4, 5 e CN: 6.

3.3.1.1 Análise de emissão de bioluminescência por linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* recombinantes.

As linhagens recombinantes de *C. neoformans* e *C. gattii* foram incubadas com o substrato coelenterazina e visualizadas no sistema IVIS Lumina. A bioluminescência nestas linhagens não foi detectada. A emissão de

bioluminescência também foi avaliada em extratos proteicos de células transformantes, entretanto não obtivemos resultados positivos de emissão.

Com o intuito de verificar a expressão de luciferase nas linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* transformantes, os níveis de transcritos do gene que codifica para luciferase foram determinados por RT-PCR semi-quantitativo. No entanto, não foi detectada expressão de luciferase nestas linhagens na condição de cultivo avaliada (Figura 9). O promotor CMV na levedura *S. cerevisiae* tem expressão constitutiva quando as células são expostas ao estresse osmótico, com isso as linhagens recombinantes foram incubadas em condições de estresse osmótico e a expressão também não foi observada, não sendo funcionais para o nosso estudo.

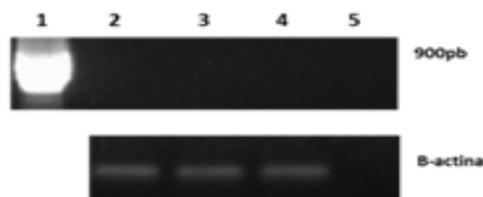


Figura 9. RT-PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão do gene *luc* nos transformantes de *C. neoformans* e *C. gattii*. Painel superior: transformantes 2, 3, 4, CP (controle positivo): 1 e CN (controle negativo): 5. Painel inferior: A expressão de B-actina foi utilizada como controle.

3.3.2 PCR de fusão e co-transformação

Em virtude dos resultados anteriormente descritos, utilizamos como estratégia alternativa a utilização de um promotor endógeno de *C. neoformans*

para controle da expressão de luciferase. O promotor escolhido foi o de histona H3, o qual é considerado forte e constitutivo, e tem sido amplamente utilizado em *C. neoformans* (Jung *et al.*, 2013). Desta forma, a região promotora de histona H3, um peptídeo sinal para endereçamento a membrana celular, o gene *luc*, e a região terminadora de histona H3 foram fusionadas por PCR, conforme a representação esquemática evidenciada na Figura 10.

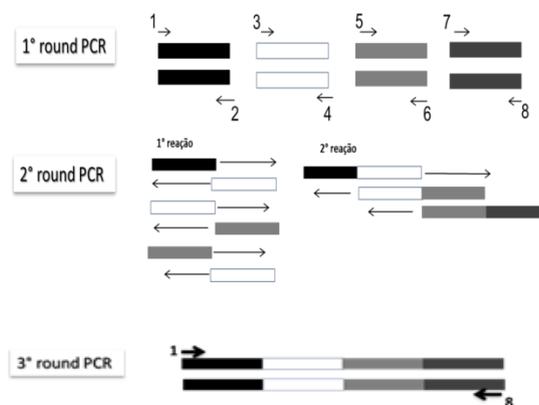


Figura 10. Representação esquemática da fusão dos fragmentos por PCR. No primeiro *round* é realizada a amplificação dos fragmentos utilizando *primers* específicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 com 15pb de extensão complementares entre as extremidades dos fragmentos. No segundo *round* a reação de PCR é realizada sem *primers* específicos. No terceiro *round* a amplificação do produto final é realizada utilizando os *primers* externos (1 e 8).

Os fragmentos correspondentes à sequência codificadora luciferase Renilla, a região promotora histona H3, o peptídeo sinal, e a região terminadora histona H3 foram eficientemente amplificados por PCR (Figura 11A) e fusionados por PCR. O produto da fusão apresentou tamanho predito de 2000 pb, confirmado por eletroforese (Figura 11C). A digestão da região promotora histona H3, do

peptídeo sinal, da luciferase, e da região terminadora histona h3, com as endonucleases de restrição EcoRV, PvuII, AvaII e SpeI respectivamente, confirmam a sequência correta do produto obtido a partir da fusão (Figura 12D e 12E). Optamos por uma estratégia de co-transformação do produto oriundo da fusão e da marca de seleção a higromicina em células de *C. gattii*.

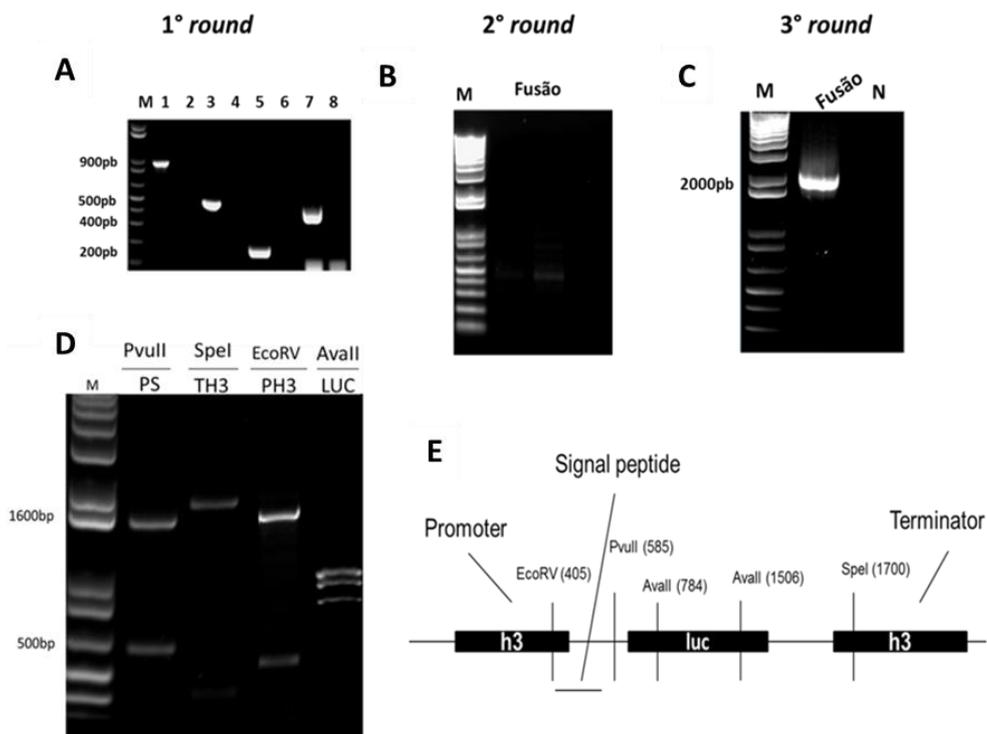


Figura 11. PCR de fusão (A) O gene Rluc (1) foi amplificado por PCR a partir do vetor comercial pRL-CMV (Promega). O peptídeo sinal (5), região promotora histona H3 (3) e terminador histona H3 (7) foram amplificados por PCR utilizando-se como molde DNA genômico da linhagem H99 de *C. neoformans* (2, 4, 6, 8 são controles negativos do PCR). (B) Os fragmentos foram fusionados por PCR. (C) O tamanho do produto PCR fusão foi confirmado por eletroforese. (D) Digestão da região promotora histona H3 (PH3), do peptídeo sinal (PS), da luciferase (LUC), e da região terminadora histona h3 (TH3), com as endonucleases de restrição EcoRV, PvuII, AvaII e SpeI respectivamente, confirmam a sequência correta do produto obtido a partir da fusão. (E) Representação esquemática dos fragmentos fusionados por PCR. O marcador molecular está indicado em pb.

Após a transformação, os transformantes foram cultivados em meio YPD com higromicina. De sete colônias transformantes, três permaneceram estáveis no meio com antibiótico. O *screening* para confirmação da inserção da marca de seleção e do produto de fusão foi realizado por PCR após a extração de DNA genômico. Apenas em um transformante a marca de seleção e a sequência correspondente à luciferase Renilla foram amplificadas (Figura 12).

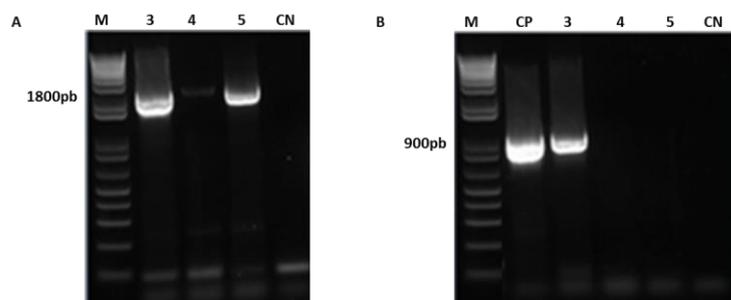


Figura 12. Confirmação da inserção do cassete higromicina (marca de seleção) e do gene *luc* por PCR na linhagem R265 de *C. gattii* recombinante. (A) Amplificação da marca de seleção: colônias 3, 4, 5 e CN: controle negativo. (B) Amplificação do gene *luc*: colônias 3, 4, 5; CP (controle positivo): *luc*; CN, e M: marcador molecular 1 Kb.

3.3.2.1 Análise da expressão de luciferase *in vitro* na linhagem recombinante de *C. gattii*.

A linhagem recombinante de *C. gattii* selecionada foi incubada com o substrato coelenterazina e visualizada no sistema IVIS LUMINA. A emissão de bioluminescência não foi detectada. Da mesma forma, a emissão de

bioluminescência em extrato proteico de células na presença do substrato coelenterazina também não foi detectada.

Adicionalmente, a expressão de luciferase Renilla na linhagem recombinante de *C. gattii* não foi detectada por RT-PCR semi-quantitativo (Figura 13), impossibilitando a utilização desta linhagem para o monitoramento *in vivo* da infecção em modelo experimental de criptococose.

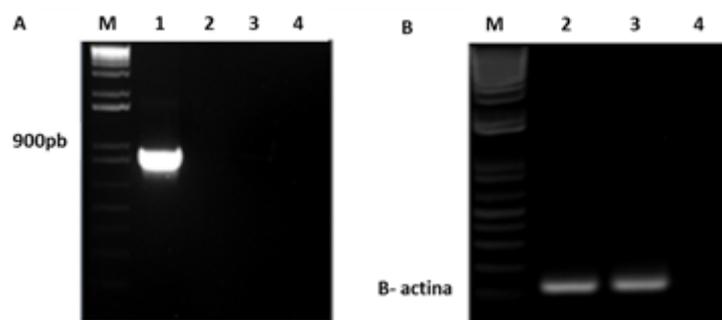


Figura 13. RT-PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão do gene *luc* na linhagem recombinante. (A) M: marcador molecular 1kb, 3: R265 recombinante, 2: R265 selvagem, CP (controle positivo): 1 e CN (controle negativo): 4. (B) A expressão de B- actina foi utilizada como controle, 2: R265 recombinante R265, 3: R265 selvagem, 4:CN, M: marcador molecular 1 kb.

Os sistemas repórteres bioluminescentes são amplamente utilizados para análise da interação entre patógenos e seus hospedeiros. Permitem o monitoramento da infecção microbiana em tempo real, destacando também a grande vantagem de não ser uma metodologia invasiva (Rice *et al.*, 2001). Devido à técnica ainda possuir algumas limitações e a construção de vetores de expressão ser difícil e laboriosa, vários fatores devem ser considerados para a

geração de linhagens bioluminescentes, como a escolha do gene repórter bioluminescente utilizado (Andreu *et al.*, 2010).

Inicialmente, para geração de linhagens bioluminescentes de *Cryptococcus* construímos o vetor pCMV-JAF15. A inserção do vetor pCMV-JAF15 foi confirmada nas linhagens de *Cryptococcus*, porém a emissão de bioluminescência das linhagens recombinantes não foi detectada. A acessibilidade ao substrato pode interferir na atividade da luciferase Renilla. Para que a enzima luciferase Renilla possa catalisar a reação de emissão de luz é necessário à adição do substrato coelenterazina, porém a localização da Rluc na célula pode dificultar o acesso da enzima ao substrato, impedindo a emissão e detecção de bioluminescência (Saville *et al.*, 2003). Com isso, as células das linhagens recombinantes foram lisadas e o extrato proteico bruto foi incubado diretamente com o substrato. A detecção da bioluminescência foi avaliada, porém novamente foi ausente.

No vetor pCMV-JAF15 a expressão do gene luciferase Renilla é regulada pelo promotor CMV (Citomegalovírus). O promotor CMV é amplamente utilizado em células eucarióticas e tem expressão constitutiva (Santacreu *et al.*, 2010), porém não há evidências na literatura da utilização deste promotor em *Cryptococcus*. Santacreu *et al.*, 2010 reportaram que o promotor CMV na levedura *S. cerevisiae* tem expressão constitutiva quando as células são expostas ao estresse osmótico. A avaliação da expressão da luciferase foi realizada após a incubação das linhagens em condição de estresse, porém não foi detectada. A

hipótese mais aceita para a ausência de bioluminescência das linhagens recombinantes foi a utilização do promotor CMV, porque os níveis de transcritos da ORF que codifica a luciferase Renilla não foram detectados quando avaliados por RT-PCR.

Como alternativa para expressar a luciferase Renilla na linhagem de *C. gattii* o promotor histona H3 de *C. neoformans* foi utilizado. Este promotor tem sido amplamente utilizado em *C. neoformans* (Jung *et al.*, 2013). Também incluímos na estratégia de clonagem um peptídeo sinal com domínio transmembrana para possibilitar o endereçamento da luciferase Renilla à membrana celular. A principal vantagem de utilizar uma proteína repórter secretada ancorada na membrana, em comparação com uma proteína repórter intracelular, é facilitar a acessibilidade da enzima ao substrato (Donat *et al.*, 2012). O gene Rluc foi bem estudado como gene repórter em *C. albicans*. Enjalbert *et al.*, 2009 testaram se a luz pode ser detectada a partir de células intactas de *C. albicans* expressando o gene Rluc intracelular, e compararam com extrato de células lisadas da mesma cultura. Extratos celulares apresentaram 50x mais atividade bioluminescente do que as células intactas. Estes dados sugerem que o substrato coelenterazina não penetra nas células de *C. albicans* eficientemente.

Uma metodologia assistida por PCR foi utilizada para fundir os fragmentos correspondentes à região promotora de histona H3 e terminadora de histona H3, o peptídeo sinal e a luciferase Renilla. O produto da fusão dos

fragmentos de DNA foi obtido e confirmado por diferentes metodologias. Em mais de uma estratégia de clonagem utilizada não foi possível clonar a ORF que codifica para luciferase Renilla regulada pelo promotor de histona H3 nos plasmídeos pJAF15 ou pAI4, e por isto utilizamos alternativamente a estratégia de co-transformação. Um clone recombinante foi obtido, porém não detectamos emissão de bioluminescência na linhagem recombinante de *C. gattii*.

A utilização de um sistema repórter bioluminescente para *C. neoformans* e *C. gattii* é de extrema importância científica, visto que na literatura a disseminação de *C. neoformans* e *C. gattii* não foi avaliada ainda por imagem. A primeira abordagem referente à construção de linhagens bioluminescentes de *C. neoformans* foi recentemente descrita. Ding *et al.*, construíram plasmídeos responsivos a cobre, na qual a expressão da luciferase é regulada pelo promotor CTR4 em condições limitantes de cobre e pelo promotor CMT1 em resposta a elevados níveis de cobre. Este plasmídeo foi transformado em *C. neoformans* e a atividade da luciferase foi avaliada nos estágios iniciais da infecção de *C. neoformans* em camundongos. A emissão de luminescência não foi observada nos pulmões quando o substrato luciferina foi injetado via intraperitoneal. Somente com administração via intranasal foi possível detectar emissão de luminescência (Ding *et al.*, 2013).

Investigações utilizando o sistema de imagem bioluminescente para o monitoramento de infecções fúngicas *in vivo* são basicamente limitadas a *C. albicans* e *A. fumigatus* (Brock, 2011). Em ambos os trabalhos foi possível à

visualização da infecção superficial *in vivo* destes patógenos, contribuindo para o entendimento dos mecanismos da patogenicidade e a resposta do hospedeiro a doença (Doyle *et al.*, 2004). Contudo é necessário ainda encontrar uma luciferase repórter adequada a fim de permitir a imagem de infecções fúngicas invasivas. O ambiente de infecções invasivas não é ótimo para a atividade da luciferase ou para disponibilidade de substrato, porém em infecções superficiais já é possível realizar o monitoramento da infecção de linhagens fúngicas (Brock, 2011).

3.4 Conclusão

Após a utilização de diferentes estratégias não foi possível gerar um sistema repórter adequado para expressão de luciferase Renilla em *C. neoformans* e *C. gattii*.

3.5 Perspectivas

- Construir linhagens bioluminescentes de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando outro gene que codifica para luciferase como repórter.
- Avaliar a possibilidade de utilizar o cassete *lux* bacteriano completo para construir linhagens bioluminescentes de *C. neoformans* e *C. gattii*.

4. Capítulo 2:

Isolamento e caracterização de bactérias bioluminescentes do ambiente natural marinho de Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil.

4.1 Bioluminescência

A bioluminescência pode ser conceituada como um processo de emissão de luz visível por um organismo vivo resultante de uma reação química natural (Haddock *et al.*, 2010). A grande maioria dos organismos bioluminescentes reside no oceano. O fundo do mar é iluminado por uma variedade de organismos marinhos como crustáceos, cefalópodes, cnidários, equinodermas, anelídeos, dinoflagelados e bactérias (Widder *et al.*, 2010). Dentro da biosfera mais de 700 gêneros são conhecidos por conter espécies luminosas, 80% destes são encontrados no ecossistema marinho. Ocupam variados habitats, dos polos aos trópicos, da superfície das águas ao fundo do mar (Haddock *et al.*, 2010). A luminescência é quase ausente em água doce, com exceção de algumas larvas. Na terra o vagalume é o exemplo mais evidente, mas existem também besouros, moscas, fungos, lacraias e minhocas bioluminescentes (Meighen, 1991). A biologia e a regulação da bioluminescência diferem entre os grupos. Enquanto as bactérias e alguns sistemas emitem luz continuamente, outros sistemas emitem somente flashes que duram de 0,1 a 1 segundo. Estes requerem que a reação

enzimática seja rápida (Wilson *et al.*, 1998). A bioluminescência é utilizada pelos organismos para vários fins como a camuflagem, iluminação e comunicação com os membros da mesma espécie. (Haddock *et al.*, 2011). O valor adaptativo da emissão de luz é evidente em bactérias luminosas que são simbioses de peixes: as bactérias fornecem luz ao hospedeiro que utiliza essa luz para atrair presas, fugir de predadores e atrair parceiros para o acasalamento, enquanto o hospedeiro fornece um ambiente ideal para o desenvolvimento das bactérias (Dunlap *et al.*, 2009).

As bactérias marinhas bioluminescentes são pertencentes à família *Vibrionaceae*. Os sete principais gêneros que estão incluídos nesta família são *Vibrio*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Enterovibrio*, *Aliivibrio*, *Grimontia*, e *Salinivibrio*. As espécies luminescentes mais estudadas são as bactérias *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* e *Photobacterium leiognathi* (Meighen *et al.*, 1991).

As bactérias do gênero *Vibrio* são abundantes no ambiente aquático incluindo estuários, águas costeiras marinhas e sedimentos marinhos. Várias espécies têm papéis ecológicos, pois suas estratégias de vida incluem associações mutualísticas com organismos marinhos. Algumas espécies como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são patógenos de humanos e de outros organismos eucariotos. Alguns destes patógenos são conhecidos por colonizar a superfície de animais marinhos sem causar doença. *V. harveyi* é responsável por causar doença em alguns animais marinhos, produzindo alta taxa de mortalidade

em camarões, e também faz associações mutualísticas com o hidrozoário *Aglaophenia octodonta* e alguns peixes com órgãos luminosos. As bactérias pertencentes à família *Vibrionaceae* geralmente são gram negativas, móveis e mesófilas (Thompson *et al.*, 2004).

P. leiognathi e *P. phosphoreum* fazem associações simbióticas com peixes. Estas bactérias colonizam os órgãos luminosos do hospedeiro e tem um papel na comunicação, atraindo presas e evitando predadores (Meighen, 1991).

Novas espécies de bactérias marinhas bioluminescentes foram descritas recentemente, como *Photobacterium kishitanii*, isolada da pele e de órgãos luminosos de peixes do Japão, Havaí, África do Sul, e Flórida (Ast *et al.*, 2007); *Vibrio azureus*, *Photobacterium aquimaris*, *Vibrio sagamiensis*, *Alivibrio sifiae*, isolados da água do mar do Japão (Yoshizawa *et al.*, 2010) e *Alivibrio finisterrensis* encontrado em mariscos (Beaz-hidalgo *et al.*, 2009).

Embora enzimas luciferases já tenham sido isoladas de organismos marinhos como a luciferase Renilla (Rluc) (cnidário *Renilla reniformis*) e Gaussia (Gluc) (copépode *Gaussia princeps*) para aplicações biotecnológicas, o ambiente marinho continua sendo um recurso rico inexplorado para o isolamento e caracterização de sistemas luciferases com potencial para a utilização em diversas aplicações na biologia molecular (Gahan *et al.*, 2012). A luciferase bacteriana é distinta das luciferases Fluc, Rluc e Gluc. Embora as espécies mais estudadas que contém o operon *lux* são as bactérias marinhas do gênero *Vibrio*, a emissão de bioluminescência é presente em diversos filos bacterianos, e em todos

os exemplos já documentados o método básico da produção da luminescência é o mesmo (Close *et al.*, 2009).

4.1.2 Sistema lux

O sistema *lux* bacteriano é basicamente codificado pelo operon *luxCDABE* (Figura 14A). A luciferase bacteriana (*luxAB*) catalisa a oxidação de uma longa cadeia de aldeído na presença de FMNH₂ (monucleotídeo flavina redutase) e O₂ emitindo luz aproximadamente de 480 nm (Figura 14B) (Waidmann *et al.*, 2011).

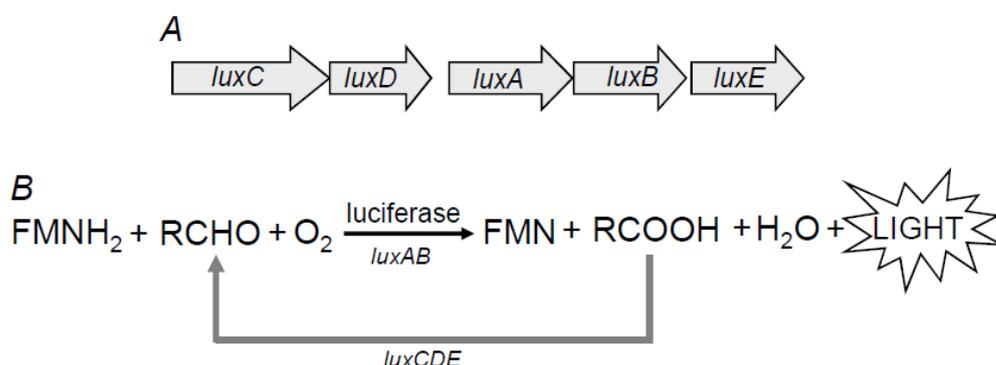


Figura 14. Organização do operon *lux* em espécies *Vibrio* e *Photobacterium* (A). Reação química da geração de luz produzida pela bactéria bioluminescente. Os genes *luxAB* codificam a enzima luciferase. Os genes *lux CDE* codificam o complexo ácido graxo redutase que regenera a longa cadeia de aldeído, o substrato (B). Figura adaptada de Gahan *et al.*, 2012.

Os genes *luxAB* codificam as subunidades α - and β - da luciferase heterodimérica, enquanto os genes flanqueadores *luxCDE* codificam um

complexo redutase ácido graxo, responsável pela regeneração da longa cadeia de aldeído graxo, que é utilizada como luciferina. Assim, a adição exógena de substrato não é necessária (Meighen, 1991). O gene *luxF* é adicional e está localizado entre o *luxB* e *luxE* em muitas espécies de *Photobacterium*, mas é ausente em *Vibrio* sp. e *P. luminescente* (Figura 15)(Soly *et al.*, 1988). Este gene codifica uma flavoproteína homóloga as subunidades da luciferase, mas aparentemente não está relacionado com a luminescência. Adjacente a *luxE*, todas as espécies bioluminescentes marinhas possuem *luxG*, o qual codifica uma flavina redutase (Figura 15) (Lee *et al.*, 1991). Em *V. harveyi*, o gene *luxH* foi identificado como parte do operon *lux*. O produto do gene *luxH* pode estar envolvido na biossíntese de riboflavina, gerando FMN (Swartzman *et al.*, 1990).

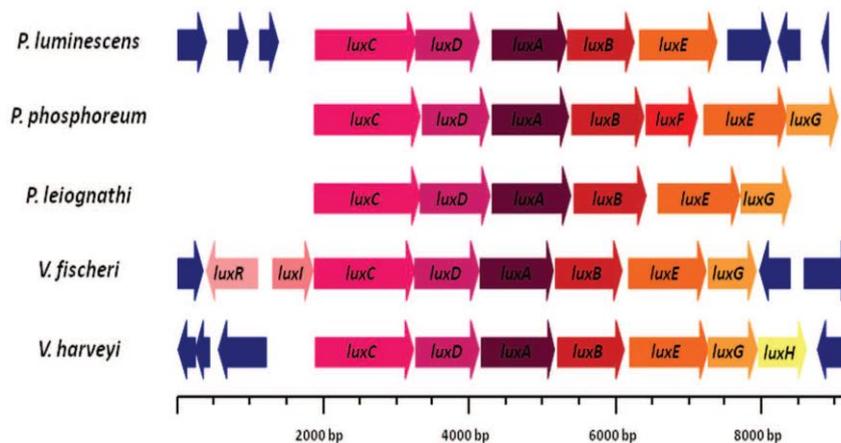


Figura 15. Organização genética de operons *lux* de *V. harveyi* ATCC BAA-1116, *V. fischeri* ES114, *P. leiognathi* ATCC 25521, *P. phosphoreum* ATCC 11040 and *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01. Genes do operon *lux* e genes *lux* acessórios são demonstrado em diferentes cores. Figura adaptada de Waidmann *et al.*, 2011.

A geração de luz das bactérias marinhas é influenciada por vários fatores e é regulada por autoindução ou quorum sensing (QS) (Dunlap *et al.*, 1991). Quorum sensing é um sistema de comunicação intercelular que vincula a expressão gênica à densidade celular bacteriana, envolvendo a produção autônoma de um feromônio que é chamado de auto-indutor (Zhang *et al.*, 1993). O sinal bioluminescente só é produzido quando há uma densidade populacional alta (Swartzman *et al.*, 1992). Este mecanismo permite que a produção da luz seja regulada e expressa quando é benéfico para o organismo, não consumindo energia metabólica desnecessária. Em algumas espécies luminescentes o autoindutor (I) é produzido pelo gene *luxI* e o ativador transcricional (R) é produzido pelo gene *luxR*. Quando os dois componentes interagem, há um aumento da expressão dos genes *luxCDABE* (Close *et al.*, 2012).

4.1.3 Aplicações do sistema repórter lux bacteriano

Os mecanismos responsáveis pela bioluminescência foram bem explorados e o sistema *lux* ganhou destaque sendo referido como potencial repórter devido a fácil detecção e quantificação da luz visível produzida pela proteína Lux (Gahan, 2012).

As aplicações moleculares da bioluminescência foram iniciadas a partir do desenvolvimento de sistemas *lux* repórteres para análise do crescimento e viabilidade de bactérias *in vitro* (Stewart *et al.*, 1992). Os estudos iniciais da utilização do sistema *lux* como repórter ocorreram em 1982, quando Belas *et al.*, demonstraram a construção de linhagens de *E. coli* bioluminescentes contendo os

genes *luxA* e *luxB* de *V. harveyi* com adição de substrato exógeno (Belas *et al.*, 1982). Após foi realizada a inserção do cassete *lux* completo (*luxCDABE*) em *E. coli*. Esta foi a primeira construção de *E. coli* recombinante capaz de emitir luz sem a adição de substrato exógeno (Engebrecht *et al.*, 1983). A luciferase da bactéria marinha *Vibrio* sp. foi amplamente utilizada em sistemas modelo que necessitam de baixa temperatura para o crescimento, como plantas (*Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*) e organismos não mamíferos como Zebra fish (*Dario rerio*) (Greer & Szalay, 2002).

Um das principais aplicações do sistema repórter bioluminescente é investigar interações de bactérias com seus hospedeiros. Infecções do patógeno bacteriano podem ser visualizadas em pequenos animais, como camundongos (Waidmann *et al.*, 2011). *Salmonella thiphimurium* foi o primeiro patógeno visualizado por imagem *in vivo*. O sistema repórter utilizado foi o operon *luxCDABE* de *P. luminescens*. O trabalho demonstrou a localização do patógeno em animais vivos e a avaliação da eficácia do tratamento com antibiótico em animais infectados (Contag *et al.*, 1995). O operon *luxCDABE* também foi otimizado para expressão em bactérias gram positivas, permitindo o monitoramento do tratamento de amoxicilina contra infecções de *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos (Francis *et al.*, 2001).

A expressão do cassete *lux* em eucariotos foi realizada pela primeira vez na levedura *S. cerevisiae*. Os genes *lux A*, *B*, *C*, *D*, e *E* isolados de *Photobacterium luminescens* foram clonados e funcionalmente expressos na levedura *S.*

cerevisiae. Neste estudo foi utilizada uma estratégia alternativa para construção do vetor. Os genes *luxA* e *luxB* foram expressos independentemente via clonagem bidirecional no vetor de expressão pBEVY-U, porque anteriormente os genes *luxA* e *luxB* fusionados, utilizados como repórter, apresentaram um nível baixo de expressão em uma variedade de células eucarióticas. Células de *S. cerevisiae* recombinantes produziram altos níveis de bioluminescência, comparados aos sistemas procarióticos contendo o cassete *luxCDABE* (Gupta *et al.*, 2003).

O cassete *lux* de *P. luminescens* foi também utilizado para monitorar compostos estrogênicos no ambiente utilizando *S. cerevisiae* como linhagem repórter (Sanseverino *et al.*, 2005). Recentemente imagem bioluminescente (BLI) foi utilizada para o monitoramento de infecções do *M. tuberculosis* e *B. anthracis* em camundongos (Andreu *et al.*, 2010; Sans *et al.*, 2008).

Close *et al.*, 2010 otimizaram o cassete *lux* para expressão em linhagens celulares mamíferas. Para expressão do cassete *luxCDABE* em células humanas os genes foram separados por elementos IRES e divididos em dois plasmídeos que foram simultaneamente expressos no hospedeiro. As linhagens celulares de mamíferos apresentaram um sistema de luminescência autônoma permitindo o monitoramento dessas células *in vivo* sem adição de substrato exógeno.

Portanto, neste trabalho objetivamos isolar bactérias bioluminescentes de amostras de água marinha coletadas nas adjacências da zona estuarina do rio

Tramandaí, com o intuito de selecionar o cassete *lux* (*CDABE*) para a utilização como gene repórter nas linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Coleta de amostras

A coleta de amostras de água para o isolamento de bactérias bioluminescentes foi realizada no dia 19 de abril de 2011. As amostras foram obtidas nas adjacências da zona de estuário da Bacia do Rio Tramandaí, Litoral norte do Rio Grande do Sul.

Amostras de água superficial do estuário e do mar foram coletadas em três pontos de Tramandaí: zona estuário, de pós-arrebentação, e nas monobóias do TEDUT, da Transpetro, com uma distância de cerca de duas milhas da costa. Recipientes de vidro estéreis foram lançados superficialmente na lâmina d'água para coleta das amostras. Os recipientes foram mantidos em isopor com gelo e transportados ao laboratório em Imbé (Ceclimar).

4.2.2 Meios de cultura e isolamento de bactérias bioluminescentes

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram ágar marinho sólido (0,5% de peptona, 0,1% de extrato de levedura, 0,00812% de cloreto férrico, 0,1% de citrato de sódio, 1,5% de cloreto de sódio e 2% de ágar), e LB (Luria Bertani).

Alíquotas de 0,1 e 1 ml de cada amostra de água foram inoculadas em placas de petri contendo ágar marinho. As culturas foram incubadas a 28°C por 24 horas. O monitoramento foi realizado numa sala escura diariamente por até

cinco dias, para verificação da atividade bioluminescente das bactérias. As colônias bioluminescentes foram selecionadas em ágar marinho. Os isolados que permaneceram bioluminescentes foram inoculados em 3 ml de ágar marinho, incubados a 28 °C com agitação de 200 rpm por 18 horas. Uma alíquota de 900 µl da cultura resultante foi adicionada a 900 µl de glicerol 40% e estocada a -80 °C.

4.2.3 Extração do DNA genômico

Uma colônia de cada isolado foi inoculada em 3 ml de LB líquido e incubados overnight a 28 °C com agitação de 200 rpm por 18 horas. As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e para lise enzimática o sedimento foi suspenso em 2 ml de solução lisozima (5 mg/ml lisozima, 50 mM de Tris-HCl pH 8). Para lise química foi adicionado 2 ml da solução de SDS (100 mM EDTA pH8, 50 mM Tris-HCl pH 8, 20% de SDS), seguido de agitação vigorosa por 5 minutos. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 60°C e posteriormente por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 2700 x g a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Para precipitação, 0,7 volumes de isopropanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M foram adicionados. As amostras foram incubadas *overnight* a -20 °C. Após, foram centrifugadas por 10 minutos a 2700 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em água Milli-Q.

4.2.4 Determinação de polimorfismos de regiões de microssatélite

A utilização da análise de polimorfismos é baseada na amplificação de regiões repetitivas que se organizam em tandem no DNA. O iniciador utilizado foi a sequência microssatélite (GTG)₅. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 1 µl de DNA genômico (50 ng/µl), 2,5 µl de dNTP (1 mM), 1 µl de iniciador (GTG)₅ (10 pmol/ µl), 2,5 µl de tampão 10X (10 mM tris-HCl pH8, 50 mM KCl) 1 µl MgCl₂ (50 mM), 1,5 µl Mg(CH₃COO)₂, 1 µl de Taq DNA polimerase (1 U/µl) (Invitrogen). O programa utilizado para amplificação possui as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) e 72°C de extensão final por 6 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,3% em eletroforese a 50 V por 75 minutos. O gel foi corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídeo e visualizado com luz UV. Os *primers* estão listados na Tabela 3.

4.2.5 Amplificação do gene 16S rDNA

O fragmento correspondente à região 16S do DNA ribossomal foi amplificado por PCR com os iniciadores externos F27 e R1492. A reação de PCR foi realizada com os seguintes componentes: DNA genômico (50 ng/µl), 2,5 µl de dNTP (1 mM), 1 µl de iniciador (F27 e R1492; 10 pmol/µl), 2,5 µl de tampão 10X (10 mM tris-HCl pH8, 50 mM KCl) 1 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl de Taq DNA polimerase (1 U/µl) (Invitrogen). O volume final da reação foi de 25

μl. O programa utilizado para amplificação possui as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (94 °C por 1 min, 54 °C por 30 s, 72 °C por 2 minutos) e 72 °C de extensão final por 6 min. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 0,8%. Os amplicons obtidos foram purificados por precipitação com RNA transportador (tRNA). Para a reação de precipitação utilizamos 20 μl do produto de PCR, 2 μl de tRNA (1 ug/ul), 60 μl de etanol absoluto gelado. A reação foi incubada *overnight* a -20 °C. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 200 μl de etanol 70% e ressuspenso em 20 μl de água Milli-Q. A quantificação foi realizada com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen).

4.2.6 Sequenciamento do gene 16S rDNA

Aproximadamente 200 ng de DNA genômico amplificado com os *primers* F27 e R1493 foram utilizados para a reação de sequenciamento na plataforma MEGABACE 1000. A reação de sequenciamento foi realizada com os *primers* internos F357, R518, F945, R1087. O volume final para cada reação foi de 10 μl, contendo 1 μl de DNA, 4 μl de água Milli-Q, e 5 μl do MIX composto por 4 μl do Kit DYEnamic ET DYE Terminator Cycle sequencing (Mega BACE) e 1 μl de *primer* (5 pmol/μl). O programa utilizado possui as seguintes condições: 35 ciclos (desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 20 s e extensão a 60 °C por 90 s).

4.2.7 Análise filogenética

As sequências foram analisadas no programa STADEN PACKAGE (Bonfield, 2000) e comparadas no banco de dados do NCBI utilizando o algoritmo Blastn para uma identificação inicial dos isolados bacterianos. A árvore filogenética foi construída utilizando o método de análise máxima de verossimilhança no programa MEGA 5. Para construção da árvore filogenética foram adicionados membros da família *Vibrionaceae* já caracterizados e os isolados bioluminescentes.

4.2.8 Caracterização dos isolados bioluminescentes

A morfologia das bactérias bioluminescentes foi avaliada em microscópio óptico após coloração pelo método de gram.

A detecção e a quantificação da emissão de luz dos isolados bioluminescentes foi avaliada no software Living Image 3.1 do sistema IVIS Lumina, Caliper Life Sciences. Os parâmetros utilizados pelo software foram F/stop 8, binning médio e 1 s de tempo de exposição para detecção das células. Para a quantificação da emissão de luminescência, três inóculos independentes de cada isolado foram cultivados a 28 °C por 18 horas a 200 rpm. Alíquotas de 200 ul de cada cultivo foram transferidas para microplacas pretas e a emissão de luz foi avaliada no sistema IVIS Lumina. Para a avaliação da termoestabilidade, os isolados foram cultivados a 28 °C e a 37 °C por 18 horas em ágar marinho líquido. A termoestabilidade da luciferase dos isolados também foi avaliada em

placas de petri com ágar marinho sólido. Os isolados foram estriados em ágar marinho sólido e incubados a 28 °C e a 37 °C por 24 horas.

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação da sequência 16S rDNA das bactérias.

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')
F27	AGAGTTTGATCMFGGCTCAG
R1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
F357	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
R518	ATTACCGCGGCTGCTGG
F945	GGGCCCGCACAAAGCGGGTGG
R1087	CTCGTTGCGGACTTTAACCC

4.3 Resultados

4.3.1 Bactérias bioluminescentes isoladas

Em dois pontos de coleta da água do mar foram isoladas bactérias bioluminescentes. Seis bactérias foram isoladas no ponto 1 (estuário) e duas no ponto 3 (monobóias) (Figura 16). As bactérias isoladas foram identificadas como

bactérias luminescentes e denominadas BL1, BL2, BL3, BL4, BL5, BL6, BL7, e BL8.

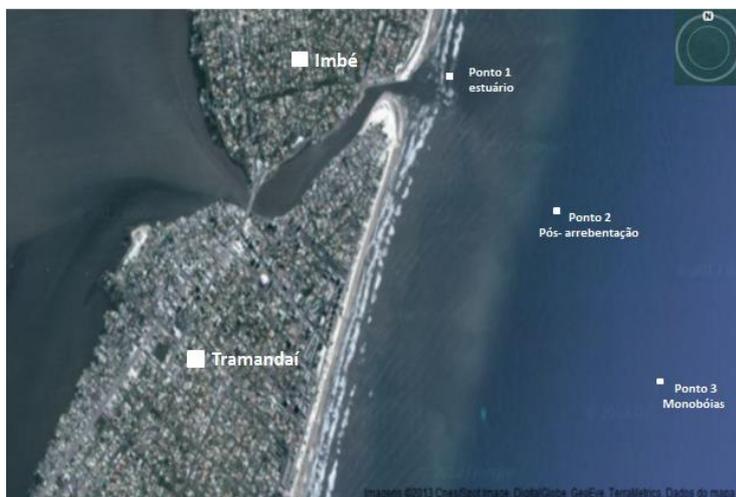


Figura 16. Pontos de coleta de água marinha. Ponto 1 estuário esta localizado em Imbé. Ponto 2 esta localizado em Tramandaí na zona pós arrebentação e o ponto 3 também em tramandaí, próximo as monobóias da empresa Transpetro, a cerca de 2 milhas da costa. Imagem adaptada de Google earth 2013.

4.3.2 Identificação dos isolados bioluminescentes

Os isolados foram agrupados pela técnica DNA fingerprinting Microsatélite – Primed (MSP-PCR). O perfil genotípico de 8 bactérias bioluminescentes foi avaliado. Comparando os padrões de bandas dos fragmentos amplificados, podemos observar três perfis genotípicos. Os isolados BL2, BL4, BL6, BL7 e BL8 apresentam perfil genotípico similar. BL1 e BL3 também apresentaram um perfil similar quando comparados, e o isolado BL5 apresenta um perfil genotípico que difere de todos os isolados (Figura 17).

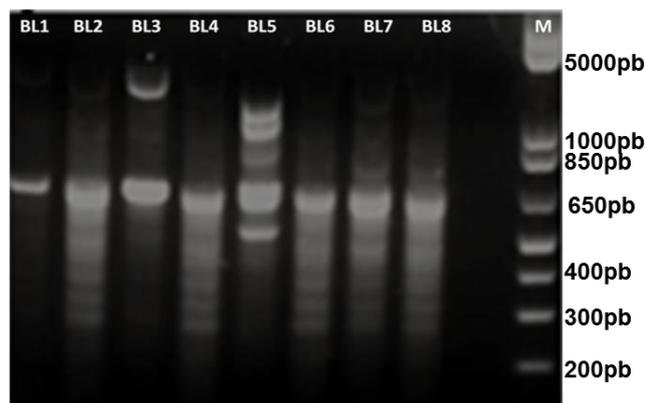


Figura 17. Perfil genotípico das bactérias bioluminescentes. O DNA das bactérias bioluminescentes foi amplificado por MSP-PCR utilizando o iniciador (GTG)₅. As bactérias luminescentes estão identificadas como BL1, BL2, BL3, BL4, BL5, BL6, BL7, BL8. M: marcador de tamanho molecular 1Kb plus (Invitrogen).

A sequência 16S do rDNA dos isolados BL1, BL2, BL3, BL6, BL7 e BL8 foi completamente sequenciada. Nos isolados BL4 e BL5 a sequência 16S rDNA foi sequenciada parcialmente (900pb). Com a análise filogenética foi possível confirmar que todas as bactérias bioluminescentes pertencem à família *Vibrionaceae* da classe gammaproteobactéria.

A Figura 18 demonstra a análise filogenética das bactérias bioluminescentes isoladas entre as espécies da família *Vibrionaceae* já caracterizadas. Os isolados BL2, BL4, BL6, BL7 e BL8 apresentam alta similaridade de 98% - 99% com as espécies *V. harveyi*, e outras espécies de *Vibrio*, incluindo *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. proteolyticus*. BL1 e BL3 tem baixo grau de similaridade com as espécies do gênero *Vibrio* (90% - 95% similaridade), e formam um cluster com o gênero *Enterovibrio*. BL5 forma um cluster com o gênero *Photobacterium*, sendo identificada como espécie *P. leiognathi* (99% de

similaridade). As análises do perfil genotípico foram confirmadas com os dados do sequenciamento, e os isolados identificados pertencem aos gêneros *Photobacterium*, *Vibrio* e *Enterovibrio*.

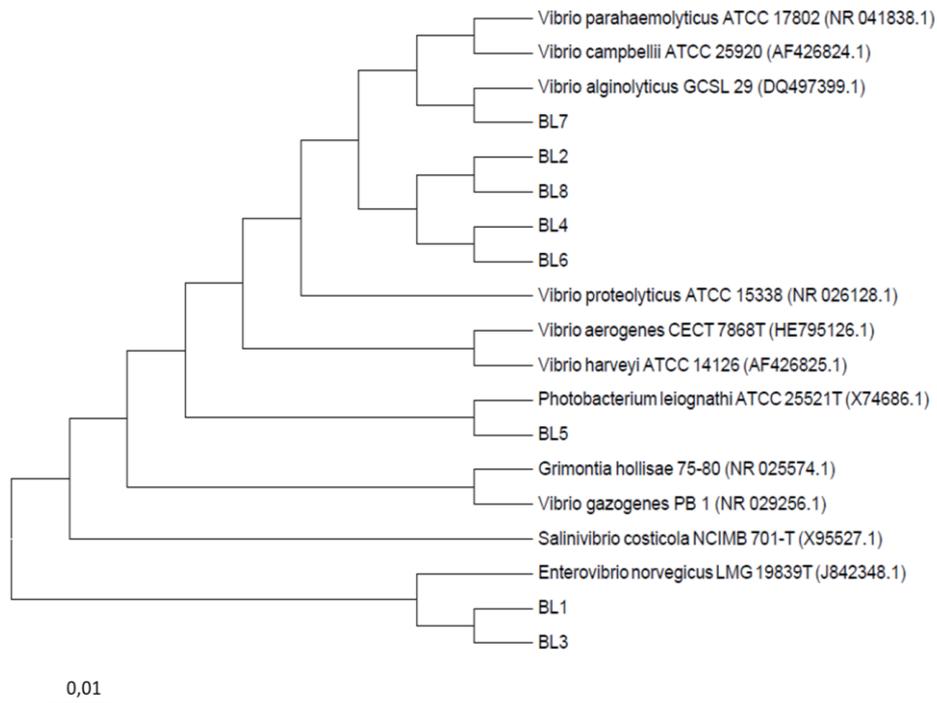


Figura 18. Árvore filogenética não enraizada derivada do método de análise máxima verossimilhança da sequência do gene 16S rDNA de bactérias luminescentes isoladas e de outros membros da classe gammaproteobacteria. As análises filogenéticas foram realizadas no programa Mega 5.

4.3.3 Caracterização das bactérias bioluminescentes

O método de coloração de Gram permitiu a visualização de bacilos gram negativos. Todos os isolados apresentaram morfologia semelhante (Figura 19).

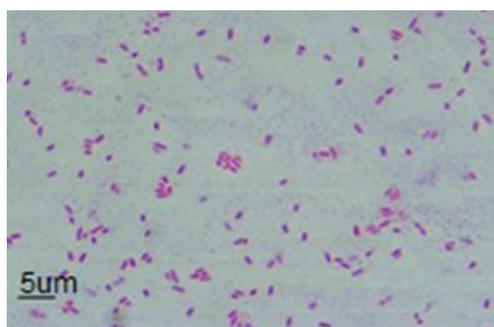


Figura 19. Coloração de Gram dos isolados bioluminescentes. Os oito isolados apresentaram coloração gram negativa.

foram realizadas com o software 3.1 Living Image no sistema IVIS Lumina. De acordo com a quantificação da emissão de luz, os isolados BL3 ($3,25E+08$ fótons/segundo) e BL6 ($4,50E+08$ fótons/segundo) emitem a luminescência mais intensa (Figuras 20A e 20B).

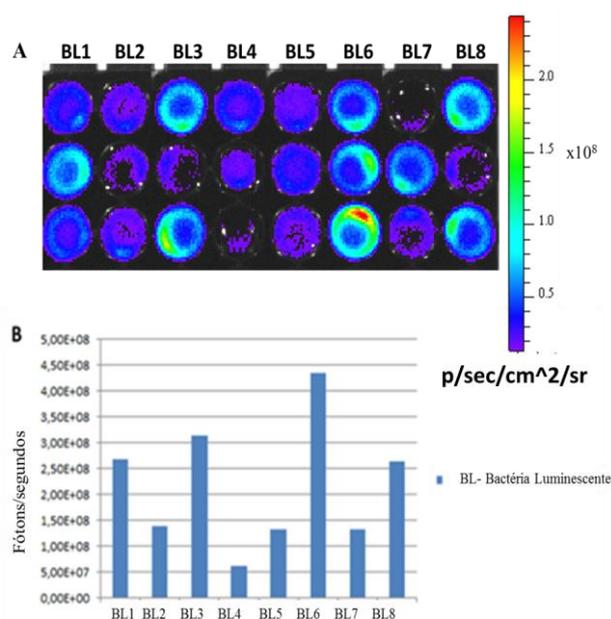


Figura 20. Visualização e quantificação da bioluminescência. Determinação da emissão de luz das bactérias marinhas identificadas como BL1, BL2, BL3, BL4, BL5, BL6, BL7 e BL8 utilizando o sistema IVIS Lumina. Três inóculos de cada isolado foram cultivados a 28°C por 18 horas a 200rpm. Uma alíquota de 200μl de cada cultivo foi transferida para microplacas pretas em triplicata representado por A, B, C (A). Quantificação da emissão de luz demonstrada no painel A utilizando o software Living Image, 3.1 (B).

A termoestabilidade da luciferase das bactérias luminescentes também foi verificada. As temperaturas avaliadas foram 28 °C e 37 °C. BL1, BL2, BL3, BL4, BL5, BL7 e BL8 não emitiram luminescência quando incubados a 37 °C (Figura 21A). O único isolado que emitiu luminescência quando incubado a 37 °C foi BL6, porém a emissão da luminescência diminuiu consideravelmente (Figura 21B).

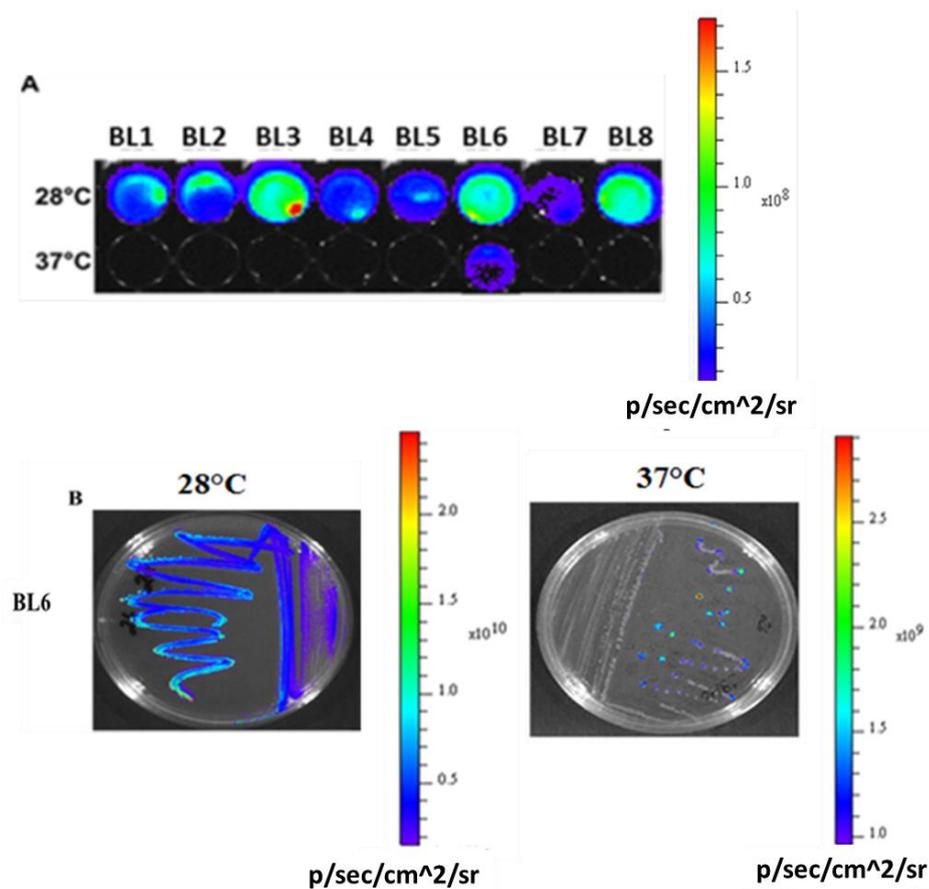


Figura 21. Avaliação da termoestabilidade da luciferase de bactérias bioluminescentes. As bactérias bioluminescentes foram incubadas a 28°C e a 37°C em ágar marinho com agitação de 200 rpm (A). A bactéria bioluminescente 6 emite luminescência quando incubada 37°C. A visualização foi realizada no software Living Image 3.1 do sistema IVIS Lumina (B).

4.4 Discussão

Neste trabalho foram isoladas oito bactérias bioluminescentes de amostras de águas coletadas em dois pontos nas adjacências da zona estuária do rio Tramandaí, litoral norte do Rio Grande do Sul. O objetivo principal do isolamento é encontrar uma bactéria que emita alto nível de luminescência e que esta luminescência permaneça estável a temperatura fisiológica humana (37 °C). Construções repórteres que utilizam o cassete *lux* bacteriano completo (*luxCDABE*) tem muitas vantagens, como a luminescência autônoma, ou seja não é necessário a adição de substrato, nem a excitação por uma fonte de luz externa (Revisado por Gahan, 2012). O principal obstáculo na utilização de luciferases bacterianas como repórter é a termoestabilidade. Algumas bactérias bioluminescentes já descritas na literatura como *V. harveyi* possui a enzima luciferase termoestável a 30 °C, porém quando é expressa em altas temperaturas a enzima não enovela corretamente, não emitindo luminescência (Tinikula *et al.*, 2012). O isolado BL6 identificado como pertencente ao gênero *Vibrio* foi o único isolado que emitiu luminescência quando incubado a 37 °C, mas a luminescência diminuiu consideravelmente (Figura 21A). Este fator deve ser considerado para seleção da luciferase bacteriana como potencial repórter. Estudos reportaram que a luciferase de espécies do gênero *Vibrio* é mais termoestável do que a luciferase de espécies do gênero *Photobacterium* (Suadee *et al.* 2007). A diferença da termoestabilidade de luciferases entre as espécies do gênero *Vibrio* também é

variável. Suadee *et al.*, avaliaram a termoestabilidade do operon *lux* produzido pela bactéria marinha *Vibrio Campbellii*. Embora a sequência da luciferase de *V. campebllii* tenha 98% de identidade com a sequência da luciferase de *V. harveyi*, a luciferase de *V. campebllii* é mais termoestável a 37 °C (Suadee *et al.*, 2007), possuindo um potencial para ser utilizada como gene repórter em eucariotos.

A identificação dos isolados bioluminescentes foi baseada em características genóticas com dados de análise filogenética. Através da metodologia MSP-PCR, observamos diferentes perfis genóticos entre as bactérias luminescentes. Essas diferenças também foram observadas quando sequenciamos a região 16S rDNA. O isolado BL5 apresentou um padrão de bandas distinto quando comparado com as outras bactérias luminescentes. Através da análise da sequência 16S rDNA, BL5 é identificado como *P. leionagnathi*. BL1 e BL3 apresentaram baixa similaridade com espécies do gênero *Vibrio* (90% - 95% similaridade), formando um cluster com o gênero *Enterovibrio*. A alta similaridade da sequência 16S rDNA das linhagens BL2, BL4, BL6, BL7 e BL8 com *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. proteolyticus* impediu uma identificação específica em nível de espécie, mas podemos inferir que estas bactérias pertencem ao gênero *Vibrio*. A análise da região 16S rDNA possui algumas limitações como a pouca diferenciação entre alguns gêneros, devido à alta similaridade entre as sequências (Stackerbrandt *et al.*, 1994). Para uma identificação mais precisa é necessário, muitas vezes, realizar outras metodologias adicionais ao sequenciamento como,

caracterização bioquímica, fisiológica e morfológica. Chiu *et al.*, realizaram o isolamento e a identificação de 27 bactérias bioluminescentes da costa de Taiwan. A identificação dos isolados foi realizada utilizando as seguintes metodologias: diferenças nas características fenotípicas, genotípicas e análise filogenética, possibilitando uma identificação completa dos isolados (Chiu *et al.*, 2007).

Portanto, as bactérias bioluminescentes dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Enterovibrio* isoladas do rio Tramandaí não apresentaram níveis de emissão de luminescência adequados à temperatura fisiológica humana para a utilização do cassete *lux* como gene repórter em experimentos para o monitoramento da criptococose *in vivo*.

4.5 Conclusão

- Oito bactérias bioluminescentes foram isoladas da água do mar em dois pontos nas adjacências da zona de estuário do rio Tramandaí. Estes isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Enterovibrio*.

- Os isolados BL1, BL2, BL3, BL4, BL5, BL6, BL7 e BL8 apresentaram níveis de emissão de luminescência quando incubados a 28 °C, porém quando incubados à temperatura fisiológica humana (37 °C), somente o isolado BL6 emitiu luminescência, e esta foi consideravelmente reduzida.

- As bactérias bioluminescentes isoladas do rio Tramandaí não apresentaram níveis de emissão de luminescência adequados à temperatura fisiológica humana para a utilização do cassete *lux* como gene repórter em experimentos para o monitoramento da criptococose *in vivo*.

4.6 Perspectivas

- Realizar uma metodologia adicional ao sequenciamento do 16S rDNA para identificação dos isolados em nível de espécie.

- Realizar novamente a coleta de água do mar e isolar novas bactérias bioluminescentes com o intuito de avaliar a diversidade destes micro-organismos no litoral norte do Rio Grande do Sul.

4.7 Referências

Andreu N.; Zelmer A.; Sampsonl S.; Ikeh M.; Bancroft G.; Schaible U. E.; Wiles S.; Robertson B. D.; **Rapid in vivo assessment of drug efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* using an improved firefly luciferase.** Journal of Infectious Diseases Volume 200, Issue 9Pp. 1470-1478, 2009.

Andreu, N.; Zelmer & Wiles. **Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease.** FEMS Microbiol Rev 35 360–394, 2011.

Andreu, N.; Zelmer, A.; Fletcher, T.; Elkington, P. T.; Ward, T. H.; Ripoll, J.; et al. **Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria.** PLoS One; 5:10777, 2010.

Casadevall, A.; Rosas A, L.; D Nosanchuk, J. **Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*.** Current Opinion in Microbiology, 3:354–358, 2000.

Ast, J.C., Cleenwerck, I.; Engelbeen, K.; Urbanczyk ,H.; Thompson, F.L.; De Vos P, Dunlap, P. V. **Photobacterium kishitanii sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes.** Int J Syst Evol Microbiol ;57 (Pt 9):2073-8, 2007.

Beaz-Hidalgo ,R.; Doce, A.; Balboa, S.; Barja, J. L.; Romalde, J. L. ***Aliivibrio finisterrensis* sp. nov., isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*.** Int J Syst Evol Microbiol. (Pt 1):223-8, 2010.

Beilhack, A.; Krappmann, S. **Surface display of *Gaussia princeps* luciferase allows sensitive fungal pathogen detection during cutaneous aspergillosis.** Virulence 3:1, 51–61;2012.

Belas, R.; Mileham, A.; Cohn, D.; Hilmen, M.; Simon, M.; Silverman, M. **Bacterial bioluminescence: Isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*.** Science, 218, 791–793, 1982.

Bicanic, T.; Harrison, T.S. **Cryptococcal meningitis.** Br. Med. Bull. 72, 99–118, 2005.

Biswas, S.; Dijck, V. P, Datta A. **Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans***. Microbiol Mol Biol Rev; 71:348-76, 2007.

Bhaumik. S. & Gambhir, S. S. **Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice**. PNAS, vol. 99, no. 1, 377–382, January 8, 2002.

Boekhout, T.; Van, Belkum, A.; Leenders, A. C. **Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects**. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(2), 432–442, 1997.

Boekhout, T.; Kwon-Chung, K. J.; Meyer, W. **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)**. Proc Natl Acad Sci U S A.7;101(49):17258-63, 2004.

Blader, W. **Living Colors DsRed**. CLONTECHniques. 16:2– 3, 2001.

Blodgett, R. J. **Mathematical treatment of plates with colony counts outside the acceptable range**. Food Microbiol 25: 92–98, 2008.

Brock, M. **Application of bioluminescence imaging for in vivo monitoring of fungal infections**. Int J Microbiol. Volume 2012, Article ID 956794, 2011.

Brock, M.; Jouvion, G.; Droin-Bergere, S.; Dussurget, O.; Nicola, M. A.; Ibrahim-Granet, O. **Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis**. Appl Environ Microbiol; 74:7023-35, 2009.

Brugger, S. D.; Baumberger, C.; Jost, M.; Jenni, W.; Brugger, U. et al. **Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates**. PLoS ONE 7(3):0033695, 2012.

Burnik, C.; Altintas, N.D.; Ozkaya, G.; Serter, T.; Selcuk, Z.T. **Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: case report and review of the literature**. Med Mycol 45: 469–73, 2007.

Byrnes, E.J.; Li, W.; Ren, P.; Lewit, Y.; Voelz, K.; et al. **A Diverse Population of *Cryptococcus gattii* Molecular Type VGIII in Southern Californian HIV/AIDS Patients.** PLoS Pathog 7(9): e1002205. doi:10.1371/journal.ppat.1002205, 2011.

Casadevall, A.; Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology Press, WA, USA, 1998.

Casadevall, A.; Rosas, A. L.; Nosanchuk, J. D.; **Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*.** *Curr. Opin. Microbiol.* 3(4), 354–358, 2000.

Contag, C.H.; Bachmann, M.H. **Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression.** *Annu Rev Biomed Eng* 4: 235–260, 2002.

Contag, C. H.; Contag, P. R.; Mullins, J. I.; Spilman, S. D.; Stevenson, D. K.; Benaron, D. A. **Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts.** *Mol Microbiol*; 18:593-603, 1995.

Contag, P.R.; Olomu, I. N.; Stevenson, D. K.; Contag, C. H. **Bioluminescent indicators in living mammals.** *Nat. Med.* 4:245– 47, 1998.

Correale, J.; Villa, A. **Cellular elements of the blood–brain barrier.** *Neurochem. Res.* 34(12), 2067–2077, 2009.

Chang, Y. C.; Wang, Z.; Flax, L. A et al. **Glycosaminoglycan binding facilitates entry of a bacterial pathogen into central nervous systems.** PLoS Pathog. 7(6), e1002082, 2011.

Chen, L. C.; Blank, E.S.; Casadevall, A. **Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*.** *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3(5), 570–574, 1996.

Chen, S. H.; Stins, M. F. Huang SH et al. ***Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells.** *J. Med. Microbiol.* 52, 961–970, 2003.

Chiu, H. H.; Chou, H. H.; Jean, W.; Shieh W. Y. **Isolation and characterization of marine luminous bacteria from shallow coastal waters of Taiwan.** *J microbial immunol infect* 40: 14-23 2007.

Claes, F.; S. Vodnala, K.; van Reet, N.; et al., **Bioluminescent imaging of Trypanosoma brucei shows preferential testis dissemination which may hamper drug efficacy in sleeping sickness.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 7, article e486, 2009.

Clancy CJ, Nguyen MH, Alandoerffer R, Cheng S, Iczkowski K, Richardson M, Graybill JR. **Cryptococcus neoformans var. grubii isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors.** *Microbiology* ;152(Pt 8):2247–55, 2006.

Close, D.M.; Patterson, S.S.; Ripp, S.; Baek, S.J.; Sanseverino, J.; Saylor, G.S. **Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line.** *PLoS One*, 5, e12441, 2010.

Close, D.; Xu, T.; Smartt, A.; , Rogers, R.; 2, Crossley, R.; , Price, s.; Ripp, S.; Saylor, G. **The Evolution of the Bacterial Luciferase Gene Cassette (*lux*) as a Real-Time Bioreporter.** *Sensors*, 12, 732-752; 2012.

DeLuca, M.; McElroy, W.D. **Purification and properties of firefly luciferase.** *Methods Enzymol*; 57:3-15, 1978.

Ding, C.; Festa, R. A.; Chen, Y. L.; Espart, A.; Palacios, o.; Espi'n, J .; Capdevila, M. S. A.; Heitman, J.; Thiele, D. J. **Cryptococcus neoformans Copper Detoxification Machinery Is Critical for Fungal Virulence.** *Cell Host & Microbe*, 265–276, March 13, 2013.

Doyle, T. C.; Burns, S. M.; Contag, C. H. **In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection.** *Cellular Microbiology*. vol. 6, no. 4, pp. 303–317, 2004.

Doyle, T. C; Nawotka K. A; Kawahara, C. B; Francis, K. P; Contag, P.R. **Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic**

Candida albicans strains transformed with the firefly luciferase gene. Microbial pathogenesis, 40:82-90; 2006.

Donat, S.; Hasenberg, M.; Schäfer, T.; Ohlsen, K.; Gunzer, M.; Einsele, H.; Löffler, J. Zhang, Z.; Moo-Young, M.; Chisti Y. **Plasmid stability in recombinant Saccharomyces cerevisiae.** Biotechnol Adv.;14(4):401-35, 1997.

D'Enfert, C.; Vecchiarelli, A.; Brown, A. J. P. **Bioluminescent fungi for real-time monitoring of fungal infections.** Virulence 1:3, 174-176; 2010.

Dunlap, P.V.; Kita-Tsukamoto, K. **Luminous bacteria.** Prokaryotes 2:863–92, 1996.

Dunlap, P. V. In Encyclopedia of Microbiology, M. Schaechter, Ed. (Elsevier, Oxford, pp. 45–61, 2009.

Eisenman, H.C.; Casadevall, A.; McClelland, E.E. **New insights on the pathogenesis of invasive Cryptococcus neoformans infection.** Curr Infect Dis Rep. Nov;9(6):457-64, 2007.

Emery, H. S.; Shelburne, C. P.; Bowman, J.P.; Fallon, P.G.; Schulz, C. A.; Jacobson, E. S. **Genetic study of oxygen resistance and melanization in Cryptococcus neoformans.** Infect. Immun. 62(12), 5694–5697, 1994.

Enjalbert, B.; Rachini, A.; Vedyappan, G.; Pietrella, D.; Spaccapelo, R.; Vecchiarelli, A.; et al. **A multifunctional, synthetic Gaussia princeps luciferase reporter for live imaging of Candida albicans infections.** Infect Immun; 77:4847-58, 2009.

Engbrecht, J.; Neilson, K.; Silverman, M. **Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri.** Cell, 32, 773–781, 1982.

Feldmesser, M.; Kress, Y.; Novikoff, P.; Casadevall, A. **Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection.** Infect Immun; 68:4225-37, 2000.

Ferreira, R. G.; Gorman, C.; Chavez, A. A.; Willie, S.; Nishiguchi, M. K.; **Characterization of the Bacterial Diversity in Indo-West Pacific Loliginid and Sepiolid Squid Light Organs.** *Microb Ecol*; 65(1): 214–226, 2013.

Fradin, C.; Kretschmar, .; Nichterlein, T.; Gaillardin, C.; d'Enfert , C.; Hube, B. **Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood.** *Mar*;47(6):1523-43, 2003

Franzot, S. P.; Salkin, I. F.; Casadevall A. ***Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates.** *J. Clin. Microbiol.* 37(3), 838–840, 1999.

Francis, K. P.; Yu, J.; Bellinger-Kawahara, C.; Joh, D.; Hawkinson, M. J.; Xiao, G.; et al. **Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel Gram-positive lux transposon.** *Infect Immun*; 69:3350-8, 2001.

Fraser, J. A.; Subaran, R. L.; Nichols, C. B.; Heitman J. **Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada.** *Eukaryot Cell.* Oct;2(5):1036-45, 2003.

Fromtling, R. A.; Shadomy, H. J.; Jacobson E. S. **Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*.** *Mycopathologia*; 79(1):23–9, 1982.

Gahan, C. G. **The bacterial lux reporter system: applications in bacterial localisation studies.** *Curr Gene Ther.* 1;12 (1):12-9, 2012.

Ghannoum, M. A. **Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis.** *Clin. Microbiol. Rev.* 13(1), 122–143, 2000.

Greer, L. F.; Szalay, A. A. **Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review** *Luminescence.* 17(1):43-74, 2002.

Gow, N.A.; van de Veerdonk, F.L.; Brown, A. J.; Netea, M.G.; **Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization.** Nat Rev Microbiol; 10:112-22; 2012.

Gupta, R.; Sharma, P.; Vyas, V. V. **Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in Escherichia coli.** J. Biotechnol., v. 41, p. 29-37, 1995.

Gupta, R. K.; Patterson, S. S.; Ripp, S.; Simpson, M.; Sayler, G. S.; **Expression of the Photobacterium luminescens lux genes (luxA, B, C, D, and E) in Saccharomyces cerevisiae.** FEMS Yeast Research 4, 305-313, 2003.

Haddock, S. H. D.; Moline, M. A.; Case, J. F. **Bioluminescence in the Sea.** Annu. Rev. Mar. Sci. 2:443-93, 2010.

Hastings, J. W. **Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review.** Gene; 173:5-11, 1996.

Hastings, J. H.; Nealson, K. H. **Bacterial bioluminescence.** Annu. Rev. Microbiol. 31 549-595, 1977.

Hardy, J.; Francis, K. P.; DeBoer, M.; Chu, P.; Gibbs, K.; Contag, C. H. **Extracellular replication of Listeria monocytogenes in the murine gall bladder.** Science; 303:851-3, 2004.

Hoang, L. M.; Maguire, J. A.; Doyle, P.; Fyfe, M.; Roscoe, D. L. **Cryptococcus neoformans infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology** J Med Microbiol. Sep;53(Pt 9):935-40, 2004.

Hoffman, R. M.; Yang, M. **Whole-body imaging with fluorescent proteins.** Nat Protoc 1: 1429-1438, 2006.

Heitman, J.; Kozel, T. R.; Kwon-Chung, K. J.; Perfect, J. R.; Casadevall, A. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.** American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, 347-349, 2010.

Hollingshead, M. G., Bonomi C. A.; Borgel, S. D.; Carter, J. D.; Shoemaker, R.; Melillo, G.; Sausville, E. A. **A potential role for imaging technology in anticancer efficacy evaluations.** *Eur. J. Cancer* 40:890-898, 2004.

Huang, S. H. & Jong, A. Y. **Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier.** *Cell Microbiol* 3, 277–287, 2001.

Hutchens, M.; Luker G. D. **Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases.** *Cell Microbiol.* 10 :2315-22, 2007.

Idnurm, A.; Bahn, Y.S.; et al., **Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*.** *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 753–764, 2005.

Idnurm A.; Reedy J. L.; Nussbaum J. C.; Heitman J. ***Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis.** *Eukaryot. Cell* 3: 420-429, 2004.

Jung, K. W.; Kang, H. A.; Bahn, Y.S. **Essential roles of the Kar2/BiP molecular chaperone downstream of the UPR pathway in *Cryptococcus neoformans*.** *PLoS One*; 8(3): e58956, 2013.

Kim, K.S. **Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier.** *Nat. Rev. Microbiol.* 6(8), 625–634, 2008.

Kishi, K.; Homma, S.; Kurosaki, A.; Kohno, T.; Motoi, N.; Yoshimura, K. **Clinical features and high-resolution CT findings of pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients.** *Respir. Med.* 100(5), 807–812, 2006.

Kidd, S. E.; Hagen, F.; Tschärke, R. L.; Huynh, M.; Bartlett, K. H.; Fyfe, M.; Macdougall, L.; **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;101(49):17258-63, 2004.

Kozel, TR: **Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*.** *Trends Microbiol* 3: 295-299, 1995.

Khawcharoenporn, T.; Apisarnthanarak, A.; Mundy, L. M. **Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review.** *Infection*, 35: 51–8, 2007.

Knoke, M.; Schwesinger, G. **One hundred years of cryptococcosis. Medical mycology in the 19th century in Greifswald.** *Mycoses* 37(Suppl. 1), S28–S33, 1994.

Kraus, P. R.; Boily, M. J.; Giles, S. S.; Stajich, J.E.; Allen, A.; et al. **Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray.** *Eukaryot Cell* 3: 1249–1260, 2004.

Kronstad, J. W.; Attarian, R.; Cadieux, B.; Choi, J.; D'Souza, C. A.; Griffiths, E. J.; Geddes, J. M.; Hu, G.; Jung, W. H.; Kretschmer, M.; Saikia, S.; Wang J. **Review Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box.** *Nat Rev Microbiol.* 9(3):193-203, 2011.

Kwon-Chung, K. J.; Boekhout, T.; Fell, J. W.; Diaz, M. **Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae).** *Taxon* 51(4), 804–806, 2002.

Kwon-Chung, K. J.; Bennett, J. E. *Medical Mycology.* Lea & Febiger, Philadelphia, 1992.

Lee, S. C.; Dickson D.W.; Casadevall, A. **Pathology of cryptococcalmeningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications.** *Hum. Pathol.* 27(8), 839–847, 1996.

Lee, C.Y.; Szittner, R.B.; Meighen, E. A. **The lux genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. Nucleotide sequence, difference in gene organization and high expression in mutant *Escherichia coli*.** *Eur J Biochem*; 201:161-7, 1991.

Leskinen, P.; Virta, M.; Karp, M. **One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast.** *Yeast*, vol. 20, no. 13, pp. 1109–1113, 2003.

Lin, X.; Hull, C.M.; et al., **Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*.** *Nature* 434 (7036), 1017–1021, 2005.

Lin, X. ***Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution.** *Infect Genet Evol.* 9(4):401-16, 2009.

Lin, X.; Huang, J. C.; Mitchell, T. G.; Heitman J. **Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MATa allele enhances filamentation.** PLoS Genet. 2 (11), e187, 2006.

Litvintseva, A. P.; Thakur, R.; Vilgalys, R.; Mitchell, T. G. **Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana.** Genetics 172(4), 2223–2238, 2006.

Liu, P. Y.; Yang, Y.; Shi, Z. Y. **Cryptococcal liver abscess: a case report of successful treatment with amphotericin-B and literature review.** Jpn J. Infect. Dis. 62(1), 59–60, 2009.

Liu, t. B.; Perlin , D. S.; Xue, C. **Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis.** Virulence 3:2, 173–181; 2012.

Loening AM, Fenn TD, Gambhir SS. **Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*.** J Mol Biol; 374:1017–1028, 2007

Lorenz, W. W.; McCann, R.O.; Longiaru, M.; Cormier, M. J. **Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase.** Proc Natl Acad Sci USA; 88:4438–4442, 1991.

Lorenz WW, Cormier MJ, O'Kane DJ, Hua D, Escher AA, Szalay AA. **Expression of the *Renilla reniformis* luciferase gene in mammalian cells.** J Biolumin Chemilumin; 11:31–37, 1996.

Ma, H.; May R. C. **Virulence in *Cryptococcus* Species.** Advances in Applied Microbiology, Volume 67, 2009.

Mason, E. d. **Fluorescent and luminescent probes for biological activity.** London, UK: Academic Press, 1999.

Matthews, J. C.; Hori, K.; Cormier, M. J. **Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase.** Biochemistry;16 : 85–91, 1977.

Meacock, P. A.; Cohen, S. N. **Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance.** *Cell*, 20(2):529-42, 1980.

Meighen, E. A. **Molecular biology of bacterial bioluminescence.** *Microbiol Rev.* 55(1):123-42, 1991.

Molez, J. F. **The historical question of acquired immunodeficiency syndrome in the 1960s in the Congo River basin area in relation to cryptococcal meningitis.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(3), 273–276, 1998.

Mora, D.J.; da Cunha Colombo, E.R.; Ferreira- Paim, K.; Andrade-Silva, L.E.; Nascentes G.A.; Silva-Vergara M.L. **Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil.** *Mycopathologia* 173(5–6), 321–327, 2012.

McClelland, E. E.; Bernhardt P.; Arturo Casadevall, A. **Estimating the Relative Contributions of Virulence Factors for Pathogenic Microbes.** *INFECTION AND IMMUNITY*, Mar. p. 1500–1504 Vol. 74, No. 3, 2006.

McNabb, d. S.; Reed, R.; Marciniak, R. A. **Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*,** *Eukaryotic Cell*, vol. 4, no. 9, pp. 1539–1549, 2005.

Negrone, R. Cryptococcosis, *Clinics in Dermatology* 30, 599–609, 2012.

Nielsen, K.; Cox, G.M.; et al. **Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. grubii and virulence of congenic a and a isolates.** *Infect. Immun.* 71 (9), 4831–4841, 2003.

Ngamskulrungrroj, P.; Chang, Y.; Sionov, E.; Kwon-Chung, K.J. **The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model.** *mBio* 3(3), e00103-12, 2012.

Ngamskulrungrroj, P.; Gilgado, F.; Faganello, J. et al. **Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties.** PLoS One 4(6), e5862, 2009.

Oshiro, M. **Cooled CCD versus intensified cameras for low-light video-applications and relative advantages.** Methods Cell Biol; 56:45-62, 1998.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. **Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS.** AIDS 23(4), 525–530, 2009.

Perfect, J. R.; Dismukes, W. E.; Dromer, F. et al. **Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America.** Clin. Infect. Dis. 50(3), 291–322, 2010.

Perfect, J. R. ***Cryptococcus neoformans*: The yeast that likes it hot.** FEMS yeast Res 6: 463-468, 2006.

Petter, R.; Kang, BS.; Boekhout, T.; Davis B. J.; Kwon-Chung K. J. **A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59.** Microbiology, 147: 2029–36, 2001.

Pichler, a.; Prior, J. L.; Piwnicka-Worms, D.; **Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports coelenterazina.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, no. 6, pp. 1702–1707, 2004.

Prescher, J. A.; Contag, C. H.; **Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence.** Current Opinion in Chemical Biology, 14:80–89, 2010.

Primrose, S. B.; Ehrlich, S. D. **Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability.** Plasmid, 6, 193-201, 1981.

Rice, B. W.; Cable, M.D.; Nelson, M. B. **In vivo imaging of light emitting probes.** J Biomed Opt. 6:432– 440, 2001.

Riedel, C. U.; Monk, I. R.; Casey, P. G.; Waidmann, M. S.; Gahan, C. G.; Hill, C. **AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes***. *Mol Microbiol*; 71:1177-89, 2009.

Ripp, S.; Daumer, K. A.; McKnight, T.; Levine, L. H.; Garland, J. L.; et al.. **Bioluminescent bioreporter integrated circuit sensing of microbial volatile organic compounds**. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:636–42, 2003.

Rubin, L. L.; Staddon, J. M. **The cell biology of the blood-brain barrier**. *Annu Rev Neurosci* 22, 11–28, 1999.

Sabiiti, W.; & May, R.C. **Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans***. *Future Microbiol.*7(11), 1297–1313, 2012.

Sanz, P.; Teel, L. D.; Alem, F.; Carvalho, H. M.; Darnell, S. C.; O'Brien, A. D. **Detection of *Bacillus anthracis* spore germination in vivo by bioluminescence imaging**. *Infect Immun*; 76:1036-47, 2008.

Sanseverino, J.; Gupta, R. K.; Layton, A. C.; Patterson, S. S.; Ripp, S. A, Saidak, L.; et al. **Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds**. *Appl Environ Microbiol*; 71:4455-60, 2005.

Santangelo, R.; Zoellner, H.; Sorrell, T. et al. **Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model**. *Infect. Immun.* 72(4), 2229–2239, 2004.

Santacreu, R. L.; Orozco, H.; Garre ,E.; Alepuz, P. **The bidirectional cytomegalovirus immediate/early promoter is regulated by Hog1 and the stress transcription factors Sko1 and Hot1 in yeast**. *Mol Genet Genomics*;283 (5):511-8. 2010.

Sambrook and Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

Saville, S. P.; Lazzell, A. L.; Monteagudo, C.; Lopez, J. L. **Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection.** Eukaryot. Cell 2:1053–1060, 2003.

Sato, A.; Klaunberg, B.; Tolwani, R. **In Vivo Bioluminescence Imaging.** Comparative Medicine; Vol 54, No 6, 2004.

Soly, R. R.; Mancini, J.A.; Ferri, S.R.; Boylan, M.; Meighen, E. A. **A new lux gene in bioluminescent bacteria codes for a protein homologous to the bacterial luciferase subunits.** Biochem Biophys Res Commun; 155:351-8, 1988.

Shea, J. M.; Kechichian, T. B.; Luberto, C.; Del Poeta, M. **The cryptococcal enzyme inositol phosphosphingolipidphospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system.** Infect Immun 74:5977-88, 2006.

Sherf, B. A.; Navarro, S. L.; Hannah, R. R.; Wood, K. V. **Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and *Renilla* Luciferase Assays.** Promega Notes; 57:2–8, 1996.

Spesso, M. f.; Nuncira C. t.; Burstein V. L.; Masih, D. T.; Dib M. D.; Chiapello, s. L.; **Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 013-1839-32013.

Springer, D. J.; Chaturvedi, V. **Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*.** Emerg. Infect. Dis. 16(1), 14–20, 2010.

Srikantha, T.; Chandrasekhar, A.; Soll, D. R. **Functional analysis of the promoter of the phase-specific WH11 gene of *Candida albicans*.** Molecular and Cellular Biology, vol. 15, no. 3, pp. 1797–1805, 1995.

Srikantha, T.; Klapach, A.; Lorenz W. W.; et al. **The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*.** Journal of Bacteriology, vol. 178, no. 1, pp. 121–129, 1995.

Stackerbrandt, E.; Gobel, B. M. **Taxonomic note: a place for DNA- DNA reassociation and 16S rRNA sequence analyses in the present species definition in bacteriology.** *Int J Syst Bacteriol*; 44: 8469, 1994.

Steele, K.T.; Thakur, R.; Nthobatsang, R.; Steenhoff, A. P.; Bisson, G. P. **In-hospital mortality of HIV-infected cryptococcal meningitis patients with *C. gattii* and *C. neoformans* infection in Gaborone, Botswana.** *Med. Mycol.* 48(8), 1112–1115, 2010.

Stewart, G.S.; Williams P. **lux genes and the applications of bacterial bioluminescence.** *J Gen Microbiol*; 138(7): 1289-300, 1992.

Steenbergen, J. N.; Casadevall, A.; **The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*.** *Microbes Infect.* 5(7), 667–675, 2003.

Steenbergen, J. N.; Shuman, H. A.; Casadevall, A. ***Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(26): 15245–15250, 2001.

Swartzman, E.; Miyamoto, C.; Graham, A.; Meighen, E. **Delineation of the transcriptional boundaries of the lux operon of *Vibrio harveyi* demonstrates the presence of two new lux genes.** *J Biol Chem*; 265:3513-7, 1990.

Suadee, C.; Nijvipakul, N.; Svasti, J.; Entsch, B.; Ballou, D. P.; Chaiyen, P. **Luciferase from *Vibrio campbellii* is more thermostable and binds reduced FMN better than its homologues.** *J. Biochem.* 142, 539–552, 2007.

Swartzman, E.; Silverman, M.; Meighen, E.A. **The luxR gene product of *Vibrio harveyi* is a transcriptional activator of the lux promoter.** *J Bacteriol.* Nov;174(22):7490-3, 1992.

Szittner, R.; Meighen, E. **Nucleotide sequence, expression and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium.** *J Biol Chem*; 265:16581-7, 1990.

Tatsumi, H., Masuda, T.; Nakano, e. **Synthesis of enzymatically active firefly luciferase in yeast.** Agricultural and Biological Chemistry, vol. 52, no. 5, pp. 1123–1127, 1988.

Thompson, F. L.; Iida, T.; Swings, J. **Biodiversity of *Vibrios*.** Microbiology and Molecular biology reviews, p. 403–431 Vol. 68, No. 3, 2004.

Tinikula, R.; Thotsapornb, k.; Thaveekarna, W.; Jitrapakdeec, S.; Chaiyena, P. **The fusion *Vibrio campbellii* luciferase as a eukaryotic gene reporter.** Journal of Biotechnology 162,346– 353, 2012.

Troy, T.; McMullen, D. J.; Sambucetti L.; Rice, B. **Quantitative Comparison of the Sensitivity of Detection of Fluorescent and Bioluminescent Reporters in Animal Models Molecular Imaging .** Vol. 3, No. 1, pp. 9 – 23, 2004.

Vaishnav, V. V.; Bacon, B. E.; O’Neill, M.; and Cherniak, R. **Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67.** Carbohydr. Res. 306, 315–330, 1998.

Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. **Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.** Microbiol. Rev. 60, 407–438, 1996.

Vecchiarelli, A. **Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*.** Med Mycol; 38(6):407–17, 2000.

Vieites, J. M.; Navarro-Garcia, F.; Perez-Diaz, R.; Pla, J.; Nombela, C. **Expression and in vivo determination of firefly luciferase as gene reporter in *Saccharomyces cerevisiae*,** Yeast, vol. 10, no. 10, pp. 1321–1327, 1994.

Välimala, A. L.; Kivistö, A.; Virta, M.; Karp, M. **Real-time monitoring of non-specific toxicity using a *Saccharomyces cerevisiae* reporter system.** Sensors, vol. 8, no. 10, pp. 6433– 6447, 2008.

Vu, K.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P. O.; Gelli, A. **Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood–brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*.** Eukaryot. Cell 8(11), 1803–1807, 2009.

Waidmann, M. S.; Bleichrodt, F.S.; Laslo, T.; Riedel, C.U. **Bacterial luciferase reporters: the Swiss army knife of molecular biology**. *Bioeng Bus* 2(1):8-16, 2011.

Ward, W.W.; Cormier, M. J. **An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein**. *J Biol Chem*; 254:781–788, 1979.

Wickes, B. L.; Mayorga, M. E.; et al., **Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (14), 7327–7331, 1996.

Wilson, T. Hastings, j. W. **BIOLUMINESCENCE**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:197–230, 1998.

Wider, E. A. **Biological, Chemical, and Ecological Diversity**. *Science* 328, 704, 2010.

Wilson, T. Hastings, j. W. **BIOLUMINESCENCE**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:197–230, 1998.

Wright, L. C.; Payne, J.; Santangelo, R. T. et al. **Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii***. *Biochem. J.* 384, 377–384, 2004.

Wu, B.; Liu, H.; Huang, J.; Zhang, W.; Zhang, T. **Pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients**. *Clin. Invest. Med.* 32(1), E70–E77, 2009.

Yoshizawa, S.; Wada, M.; Kita-Tsukamoto, K.; Yokota, A.; Kogure K. **Photobacterium aquimaris sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater**. *Int J Syst Evol Microbiol*, (Pt 6):1438-42, 2009.

Zaragoza, O.; Rodrigues, M. L.; De Jesus, M.; Frases, S.; Dadachova, E.; Casadevall, A.; **The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans***. *Adv. Appl. Microbiol.* 68, 133–216, 2009.

Zacharakis, G.; Ripoll, J.; Weissleder, R.; Ntziachristos, V. **Fluorescent protein tomography scanner for small animal imaging.** IEEE Trans Med Imaging 24: 878–885, 2005.

Zhang, W.; Feng, Q. J.; Harris, S. E.; Contag, P. R.; Stevenson, D. K.; Contag, C.H. **Rapid in vivo functional analysis of transgenes in mice using whole body imaging of luciferase expression.** Transgenic Res. 10:423– 434, 2001.

Zhang, L.; Murphy, P.J.; Kerr, A.; Tate, M.E. **Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones.** Nature. Apr 1;362(6419):446-8, 1993.