

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DE BIOIMAGEM PARA A ANÁLISE
EX VIVO DA INFECÇÃO CAUSADA POR *CRYPTOCOCCUS
GATTII*.**

Dissertação de mestrado

Natalia Vidal Figueiredo

Porto Alegre, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DE BIOIMAGEM PARA A ANÁLISE
EX VIVO DA INFECÇÃO CAUSADA POR *CRYPTOCOCCUS
GATTII*.**

Dissertação de mestrado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Natalia Vidal Figueiredo

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva

Porto Alegre, 2013.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, possibilitaram a realização deste trabalho:

À Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein pela orientação e pela oportunidade.

À Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva pela orientação e pelos ensinamentos diários.

Ao Prof. Dr. Charley Christian Staats pelos ensinamentos diários e pela revisão da dissertação.

Ao Prof. Marcio Rodrigues pelos ensinamentos durante a atividade de Redação Científica.

Aos membros da Banca Examinadora da Avaliação da Dissertação.

A todos os professores e funcionários do Centro de Biotecnologia que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e para a realização desse trabalho.

À Vanessa Barcellos, grande amiga e companheira de desafios.

A todos os amigos e colegas dos laboratórios 220, 217 e 222.

Em especial, ao meu namorado, Marcel Friedrich Thomé, e aos meus pais, Maria Delfina Vidal Figueiredo e Cleber Vieira Figueiredo, pelo amor incondicional, paciência e apoio de sempre. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. <i>CRYPTOCOCCUS GATTII</i>	9
1.2. PRINCIPAIS DETERMINANTES DA VIRULÊNCIA	12
1.2.1. CÁPSULA POLISSACARÍDICA	12
1.2.2. MELANINA	13
1.2.3. HABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO À TEMPERATURA FISIOLÓGICA DE HOSPEDEIROS MAMÍFEROS	14
1.2.4. PARTICULARIDADES DE <i>CRYPTOCOCCUS GATTII</i>	15
1.3. CRIPTOCOCCOSE	17
1.3.1. A PATOGÊNESE DA CRIPTOCOCCOSE	17
1.3.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	19
1.3.3. PRINCIPAIS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO	20
1.4. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS: O MÉTODO TRADICIONAL PARA A AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA INFECÇÃO.	22
1.5. BIOIMAGEM E O MONITORAMENTO DA INFECÇÃO	24
1.5.1. IVIS LUMINA II E A CAPTAÇÃO DE IMAGEM	25
1.5.2. PROTEÍNA FLUORESCENTE mCHERRY COMO BIOMARCADOR	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MANUSCRITO: MONITORING <i>CRYPTOCOCCUS GATTII</i> INFECTION IN A MOUSE MODEL USING A FLUORESCENT TAG PROTEIN	33
4. DISCUSSÃO	54
5. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.

°C	graus Celsius
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxiribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
h	hora
HIV	vírus da imunodeficiência humana
mL	mililitro
ng	nanogramas
bp	pares de base
rpm	rotações por minuto
sp	espécie
UV	ultravioleta
var	variedade
µg	microgramas
µl	microlitros
UFC	unidades formadoras de colônia
AMB	anfotericina B
FLC	fluconazol
GXM	glucuronoxilomanana
DOPA	L-3-4-dihidroxifenialanina
IDSA	Sociedade das Doenças Infecciosas da América (<i>Infectious Disease Society of America</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doença (<i>Center of Disease Control and Prevention</i>)
YPD	Peptona-dextrose para levedura
U. S. FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (<i>United States Food and Drug Administration</i>)
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos (<i>United States Pharmacopeial</i>)
MM	murcicarmina de Meyer
GSM	Grocott metanamina de prata
PAS	ácido periódico-Schiff
GFP	proteína fluorescente verde

CCD	dispositivo acoplado a carga (<i>coupled charge device</i>)
O ₂	oxigênio
µm	micrômetros
seg	segundos
cm ²	centímetros quadrados
pH	potencial de hidrogênio iônico
nm	nanômetros

RESUMO

O fungo patogênico *Cryptococcus gattii* é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma doença fatal que envolve a formação de criptocomas nos pulmões e cérebro em hospedeiros imunocompetentes. O monitoramento da patogênese de *C. gattii* e sua colonização nos diferentes órgãos em modelos animais geralmente são analisados pelo método laborioso e impreciso de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Neste trabalho foi desenvolvido um modelo prático de monitoramento da infecção e da eficácia de tratamentos antifúngicos, através da construção de uma linhagem de *C. gattii* expressando constitutivamente o gene repórter mCherry e da avaliação por imagem baseada em fluorescência. Após a infecção intranasal de camundongos e do tratamento com anfotericina B (AMB) ou fluconazol (FLC) durante 4 a 7 dias, pulmões, rins, baço e o cérebro foram removidos e examinados em IVIS Lumina, e a infecção foi monitorada pelo método tradicional de contagem de UFC. As análises por imagem demonstraram a predileção de *C. gattii* pelo trato respiratório, com presença reduzida no sistema nervoso central. Estas observações foram consistentes com as obtidas pela determinação de UFC. As análises por imagem e a determinação por UFC corroboraram os resultados relativos aos efeitos do tratamento com FLC. Entretanto, os dados foram significativamente diferentes quando AMB foi utilizada. Os resultados obtidos sugerem esta técnica como um potencial método para a investigação da dinâmica da infecção e da sua resposta a tratamentos terapêuticos.

ABSTRACT

The pathogenic fungus *Cryptococcus gattii* is one of the etiological agents of human cryptococcosis, which may evolve to the formation of cryptococcomas in the lungs and brain of immunocompetent hosts. Monitoring the progression of pathogenesis and organ colonization in animal models is important in the study of infectious microorganisms. However, this monitoring usually involves laborious and imprecise methods, such as colony forming unit (CFU) determination. Here, we propose the use of a practical model to monitor *C. gattii* infections in mice and to evaluate antifungal treatment. Our approach involved the infection of mice with a *C. gattii* strain that constitutively expresses the mCherry reporter gene, followed by fluorescence-based imaging analysis of the colonized organs. Mice were infected intranasally with the fluorescent *C. gattii* strain and treated with amphotericin B (AMB) or fluconazole (FLC) for 4 or 7 days. The lungs, kidney, spleen, and brain were excised and examined in an IVIS Lumina instrument to determine fluorescence intensity and for CFU determination. Imaging analyses showed that *C. gattii* primarily colonizes the respiratory tract, with reduced dissemination to the central nervous system. This observation was consistent with the results of CFU determination. The evaluation of the effects of fluconazole treatment in infected mice revealed that both imaging and CFU methods produced similar results. However, the results of the two methods were considerably different when the effects of AMB were evaluated. Our results support the use of imaging-based techniques to monitor infections caused by *C. gattii* in mice, as well as the response of animal hosts to treatment with antifungals.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento das doenças infecciosas emergentes tem sido um desafio para a comunidade médico-científica ao longo das últimas décadas, visto que as elevações na incidência da grande maioria dessas patologias têm sido correlacionadas com o aumento da suscetibilidade dos hospedeiros. A criptococose, por sua vez, é uma doença fúngica invasiva causada majoritariamente pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e tem se destacado devido à sua capacidade de acometer tanto populações imunodeficientes como indivíduos hígidos (Byrnes *et al.*, 2011a). Em conjunto, essas espécies têm gerado a cada ano aproximadamente 1 milhão de casos da doença, no qual 620 mil resultam em morte (Park *et al.*, 2009). *C. gattii*, apesar de representar apenas 1% desses casos, tem sido alvo de diversas pesquisas devido ao recente surto da infecção em British Columbia, Canadá, e na costa do Pacífico dos Estados Unidos (Kidd *et al.* 2004; Byrnes *et al.*, 2011a). Em estudos recentes, esta espécie tem apresentado diferenças relevantes quanto à epidemiologia, patogenia, suscetibilidade a antimicrobianos, entre outros, os quais têm instigado o desenvolvimento de abordagens alternativas ao método robusto e laborioso de contagem de unidades formadoras de colônia, para melhor caracterização dessa levedura.

O progresso das tecnologias de bioimagem tem possibilitado grande avanço na compreensão de diversos sistemas biológicos, especialmente relacionados a aspectos patológicos. A utilização de marcadores fluorescentes para o monitoramento de processos infecciosos vem sendo fundamental para entendimento de diversos mecanismos referentes à interação patógeno-hospedeiro, como a distribuição do patógeno no hospedeiro, assim como a visualização *in vivo* da ação dos tratamentos terapêuticos sobre a infecção (Andreu *et al.* 2011).

Neste contexto, a fim de melhor compreender a patogênese da criptococose causada pela espécie *C.gattii*, assim como os efeitos dos antimicrobianos na progressão da doença, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um novo modelo de monitoramento *in vivo* da infecção baseada na análise de imagem a partir da emissão de fluorescência.

1.1. *CRYPTOCOCCUS GATTII*

C. gattii é uma levedura basidiomicética encapsulada causadora da criptococose principalmente em indivíduos imunocompetentes. Este patógeno foi descrito pela primeira vez ao ser isolado de paciente com leucemia em 1970, ainda como uma variedade da espécie *C. neoformans* (Vanbreuseghem *et al.* 1970). A partir de diversos estudos, importantes diferenças no conteúdo nucleotídico do DNA ribossomal, significativa divergência genética e a presença em cluster monofilético separado foram evidenciados para *C. gattii* (Diaz *et al.* 2000; Kwon-Chung *et al.* 2002; Bovers *et al.* 2008). Além disso, a ausência de indícios quanto à recombinação gênica em esporos resultantes do cruzamento entre linhagens compatíveis considerando as duas variedades, e a distinção em sorotipos A, B, C e D a partir da caracterização de antígenos capsulares resultaram na separação em espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii*. (Kwon-Chung *et al.* 2002; Chaturvedi *et al.* 2011). Como consequência, estima-se que *C. gattii* tenha divergido de *C. neoformans* aproximadamente há 37.5 milhões de anos (Kwon-Chung *et al.* 2002; Byrnes *et al.* 2011a).

Atualmente, a espécie *C. gattii* é subdividida em quatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII e VGIV (Meyer *et al.* 2003; Springer *et al.* 2012). Cada uma delas tem sido relacionada com aspectos epidemiológicos e clínicos específicos, o que demonstra a importância de suas caracterizações. Os genótipos VGI e VGII atuam como patógenos

primários associados principalmente à infecção de indivíduos imunocompetentes. VGI é o tipo molecular mais prevalente em isolados de amostras ambientais e clínica tanto de animais quanto de humanos a nível mundial e é endêmico na Austrália, embora casos clínicos e veterinários também tenham sido registrados na Holanda, China, Alemanha, Portugal, França, entre outros (Sorrell *et al.* 2001; Chen *et al.* 2012; Springer *et al.* 2012). O genótipo VGII, por sua vez, representa 95% dos casos nos surtos no noroeste da costa do Pacífico dos EUA, e na ilha de Vancouver, Canadá, também registrados em regiões da Austrália, América Central e do Sul, bem como com a Coreia, Índia e China. (Galanis *et al.* 2010; Springer *et al.* 2012). Os tipos moleculares VGIII e VGIV apresentam comportamento similar a *C. neoformans* acometendo mais frequentemente indivíduos imunossuprimidos, incluindo os portadores do vírus HIV, como os casos na África e nos EUA (Sorrell *et al.* 2001; Litvintseva *et al.* 2005; Byrnes *et al.* 2011a; Byrnes *et al.* 2011b; Springer *et al.* 2012).

Recentemente, o genótipo VGII de *C. gattii* tem sido diferenciado em subtipos VGIIa, VGIIb e VGIIc a partir das análises de tipagem das sequência multilocus (MLST) e do número variável de sequências repetidas em tandem (VNTR). Os subtipos VGIIa e VGIIb foram identificados como representantes dos grupos mais e menos predominantes, respectivamente, isolados durante o surto no noroeste do Pacífico dos EUA (Springer *et al.* 2012). VGIIa tem sido considerado mais virulento que VGIIb (Chaturvedi *et al.* 2011; Springer *et al.* 2012). Corroborando esses dados, ensaios de hibridização em microarranjos de DNA realizados por Ngamskulrunroj e colaboradores (2011a) identificaram genes relacionados a fatores de virulência como a melanina (LAC1, LAC2 e ATX1), a cápsula polissacarídica (CAS3) e a capacidade de desenvolvimento a 37°C (MPK1). Porém, estudos utilizando linhagens mutantes para esses genes demonstraram que somente o LAC1 e o MPK1 influenciaram efetivamente

a virulência de *C. gattii* R265 genótipo VGIIa. Os autores ainda descrevem que muitos genes da linhagem R265 envolvidos no metabolismo celular, na divisão celular e receptores de feromônios apresentaram uma diminuição na expressão quando comparados a *C. gattii* R272 genótipo minoritário e hipovirulento VGIIb (Ngamskulrunroj et al. 2011b). Já o subtipo VGIIc foi identificado como um componente da expansão do surto no Oregon, também apresentando uma alta virulência, assim como VGIIa, em testes em modelo murino. No entanto, sua origem ainda é desconhecida (Springer et al. 2012).

Embora inicialmente relacionada a regiões tropicais e subtropicais, *C. gattii* tem apresentado uma distribuição a nível mundial, incluindo registros na Índia, Japão, África, Austrália, Europa, ao longo da América entre outros (Byrnes et al. 2011a; Cogliati et al. 2012; Chowdhary et al. 2012; Chen et al. 2012; Cogliati et al. 2013; Springer et al. 2012;). Na maioria dessas áreas, o nicho ecológico desta espécie tem sido associado preferencialmente a árvores em decomposição, especialmente eucaliptos (Figura 1). No entanto, esse fungo também tem sido encontrado em outras espécies de árvores como *Prunus dulcis*, *Cassia fistula*, *Pseudotsuga menziesii* na Colômbia, no Brasil e na ilha de Vancouver, respectivamente (Boekhout et al. 2001; Kidd et al. 2007), assim como em fezes de inseto (Kidd et al. 2003), e também no ar, na água e no solo durante o surto na ilha de Vancouver (Kidd et al. 2007).

No Brasil, *C. gattii* genótipo VGII atua predominantemente como patógeno primário, acometendo hospedeiros imunocompetentes, incluindo crianças e adultos jovens, sendo considerado endêmico no Norte e Nordeste deste País, apresentando significativa letalidade e morbidade (Martins et al. 2011).

1.2. PRINCIPAIS DETERMINANTES DA VIRULÊNCIA

C. gattii e *C. neoformans* apresentam diversas características que os tornam capazes de invadir e estabelecer infecção no organismo. Entre os principais atributos destacam-se a presença de cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a habilidade de desenvolvimento a 37°C e a capacidade de interação com macrófagos, entre outros. Porém, para a espécie *C. gattii*, existem ainda mecanismos moleculares que foram descritos recentemente, os quais se acredita serem únicos do genótipo hipervirulento de *C. gattii* proveniente das ilhas Vancouver. Esses fatores presentes nas espécies do complexo *Cryptococcus* e específicos de *C. gattii* estão descritos em detalhe abaixo.

1.2.1. CÁPSULA POLISSACARÍDICA

A cápsula polissacarídica é o principal fator associado à virulência para *C. neoformans* e *C. gattii* (McFadden *et al.* 2006; McFadden *et al.* 2007; Zaragoza *et al.* 2009). Este componente é constituído principalmente de glucuronoxilomanana (GXM - 90 a 95%), com uma pequena porção de galactoxilomanana (GalXM - 5%) e manoproteínas (1%), e envolve a parede celular do fungo formando uma barreira física e/ou simplesmente serem liberados no meio durante a infecção (Zaragoza *et al.* 2009). Sua composição e tamanho podem sofrer alterações dependendo de fatores ambientais específicos. Estudos recentes mostraram características distintas nas espécies *C. gattii* e *C. neoformans*, onde *C. gattii* apresenta menor diâmetro e maior reatividade sorológica (Fonseca *et al.* 2010). Durante a infecção, o tamanho da cápsula aumenta consideravelmente (Guimarães *et al.* 2010; Chrisman *et al.* 2011). Nos pulmões, a presença de baixas quantidades de ferro e altos níveis de CO₂ promovem ao aumento da cápsula polissacarídica, também verificado durando os períodos agudos da infecção

(Del Poeta *et al.* 2004). *In vitro* também pode ser induzida por altas concentrações de CO₂ (Granger *et al.* 1985), limitação de ferro (Vartivarian *et al.* 1993; Lian *et al.* 2005; Jung *et al.* 2006) e por soro de mamíferos em baixos níveis de CO₂ (Casadevall *et al.* 1998; Zaragoza *et al.* 2003).

A cápsula polissacarídica é uma estrutura que envolve a parede celular do fungo, sendo responsável por conferir proteção contra a desidratação durante o seu desenvolvimento no meio ambiente (Zaragoza *et al.* 2009). No decorrer da infecção é fundamental no processo de interação patógeno–hospedeiro para a adaptação da levedura no ambiente do hospedeiro. Através da sua propriedade antifagocítica, a cápsula inibe a ação de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, bem como a internalização do fungo pelas células endoteliais (Del Poeta *et al.* 2004). Estudos de infecção experimental de camundongos demonstraram uma composição antigênica capsular *in vivo* distinta em diferentes órgãos infectados, sugerindo uma evolução da estrutura capsular durante a infecção (Charlier *et al.* 2009). Mutantes acapsulados são avirulentos sendo facilmente fagocitados por macrófagos e neutrófilos (Kwon-Chung & Rhodes, 1986). O material capsular também interfere na secreção de citocinas pró-inflamatórias, inibe a proliferação de células T do sistema imune, induz a apoptose de macrófagos através do ligante Fas e atrasa a maturação e ativação das células dendríticas humanas (Ma & May 2009).

1.2.2. MELANINA

A melanina é um pigmento hidrofóbico, negativamente carregado, formado a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Ma & May 2009). No complexo *Cryptococcus* a síntese deste composto é catalisada pela enzima lacase a

partir de fontes exógenas de 3-4 dihidroxifenil alanina (DOPA), norepinefrina, epinefrina e dopamina (Ngamskulrunroj *et al.* 2009b). Como consequência, a disponibilidade desses compostos como neurotransmissores proporcionam o neurotropismo do complexo *Cryptococcus*. Regiões do cérebro ricas em catecolaminas, como o núcleo basal, são as mais afetadas (Ngamskulrunroj *et al.* 2009b). Além disso, a atividade da enzima lacase também tem sido relacionada com imuno-modulação do crescimento de *C. neoformans* nos pulmões e sua disseminação para o sistema nervoso central (Qiu *et al.* 2012). No meio ambiente, a melanina protege a levedura das radiações UV, raios-X e gama, e das altas e baixas temperaturas (Eisenman *et al.* 2012). Durante a infecção, esse composto reduz a ação fagocítica e a morte provocada por agentes oxidantes derivados do nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos, além de limitar as respostas inflamatórias mediadas por células T (Ma & May 2009).

A produção de melanina também apresenta variações intraespecíficas importantes para a caracterização da infecção. Ngamskulrunroj e colaboradores (2009b) demonstraram que *C. gattii* VGIIa apresenta maior produção de melanina que *C. gattii* VGIIb a 37°C. Essa evidência foi confirmada em estudo subsequentes, que demonstraram maior expressão de genes envolvidos na síntese de melanina (*LAC1* e *LAC2*) por *C. gattii* VGIIa quando comparado com *C. gattii* VGIIb (Ngamskulrunroj *et al.* 2011b), evidenciando a maior virulência de VGIIa em comparação a VGIIb.

1.2.3. HABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO À TEMPERATURA FISIOLÓGICA DO HOSPEDEIRO MAMÍFERO.

O desenvolvimento a temperatura fisiológica é essencial para a virulência de *C. gattii*, visto que as demais espécies do complexo *Cryptococcus sp.* são incapazes de desenvolver infecção, e raramente possuem a habilidade de crescimento a 37°C *in vitro*

(Perfect *et al.* 2005; Ma & May 2009). Essa característica está diretamente relacionada com a ação de uma variedade de produtos gênicos. Em *C. neoformans*, os mutantes do gene *CNA1*, que codifica para calcineurina A, são inviáveis a temperatura fisiológica e consequentemente avilrentos em modelo de meningite criptocócica em coelhos (Ma & May 2009). Análises do perfil transcricional de *C. neoformans* a temperatura fisiológica demonstraram indução da expressão de 49 genes (Kraus *et al.* 2004). Rosa e Silva e colaboradores (2008) identificaram 29 genes diferencialmente expressos a 37 °C, envolvidos em estresse, sinalização, montagem da parede celular, integridade da membrana e metabolismo básico. Adicionalmente, Ngamskulrunroj e colaboradores (2011b) demonstraram que isolados de *C. gattii* VGIIa possuem maior expressão de genes envolvidos na habilidade de crescimento a temperaturas fisiológicas humanas que isolados VGIIb, evidenciando que tolerância aumentada a altas temperaturas é uma propriedade fundamental para o aumento da virulência.

1.2.4. PARTICULARIDADES DE *CRYPTOCOCCUS GATTII*

C. gattii apresenta importantes particularidades referentes aos fatores de virulência que o diferem de *C. neoformans*. Um dos principais atributos é a reduzida capacidade de infiltração de neutrófilos e produção de citocinas inflamatórias nos pulmões durante a infecção. Conjuntamente, metabólitos liberados por *C. gattii*, especialmente acetoína e dihidroxiacetona, contribuem para a redução na resposta pró-inflamatória, o que poderia explicar a sua capacidade de promover infecção em indivíduos hígidos (Dong *et al.* 1995, Cheng *et al.* 2009). Outro atributo a ser considerado é a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD1p). Esta proteína em *C. gattii* atua na proteção da integridade funcional de diversos fatores de virulência, além de ser fundamental no desenvolvimento da infecção e na proteção contra a ação

dos fagócitos, sendo algumas dessas funções bastante diferentes das desempenhadas em *C. neoformans* (Narasipura *et al.* 2003, Cox *et al.* 2003). A trealose é outro importante antioxidante que desempenha função fundamental na tolerância ao estresse e virulência em leveduras. Em *C. gattii* e *C. neoformans*, os genes envolvidos na síntese de trealose, *TPS1* (trealose-6-fosfato [T6P] sintase) e *TPS2* (T6P fosfatase), são essenciais para a termotolerância. No entanto, somente em *C. gattii* esses genes demonstraram serem essenciais na produção de fatores de virulência como a cápsula polissacarídica e melanina (Ngamskulrunroj *et al.* 2009a). Outra característica interessante envolve a divergência de funções em *C. gattii* e *C. neoformans* desempenhadas pela proteína quinase A dependente de AMP cíclico, especialmente em relação às subunidades catalíticas Pka1p e Pka2p. Enquanto em *C. neoformans* Pka1p regula o *mating*, a produção de cápsula e melanina, e virulência, em *C. gattii* essa subunidade catalítica perdeu sua ação sobre a produção de melanina, influenciando a formação de cápsula polissacarídica e *mating*. Já Pka2p controla o *mating*, e a produção de cápsula e melanina em *C. gattii*, sem função aparente em *C. neoformans*, ilustrando uma reconfiguração evolucionária na cascata de sinalização de *C. gattii* (Hicks *et al.* 2007). Além disso, é importante considerar que o genoma mitocondrial das espécies do complexo *Cryptococcus* difere drasticamente de tamanho. *C. gattii* possui um genoma mitocondrial maior que *C. neoformans* var. *neoformans* e var. *grubii*, possivelmente exercendo função importante na patogênese (Springer *et al.* 2012). Outra importante característica de *C. gattii* é a produção de fibrilas extracelulares na superfície de plantas. Springer e colaboradores (2010) demonstraram que células de *C. gattii* contendo fibrilas extracelulares, que aparentemente apresentam formação e organização relacionadas com a cápsula polissacarídica, apresentaram-se mais virulentas e mais resistentes a ação de neutrófilos *in vitro*, sugerindo que esse componente poderia atuar uma estrutura

adaptativa durante interações célula-célula, célula-substrato e/ou célula a comunicações fagocíticas. Adicionalmente, a linhagem *C. gattii* encontrada durante o surto em Vancouver apresenta particularidades que envolvem o aumento do parasitismo intracelular a partir de uma regulação mitocondrial, caracterizando o fenótipo hipervirulento (Ma *et al.* 2009). E finalmente, o fator de transcrição Ste12a também se demonstrou cruciais para a virulência de *C. gattii* ao atuar como regulador do processo de *mating*, melanina e virulência (Ren *et al.* 2006).

1.3. CRIPTOCOCCOSE

1.3.1. A PATOGÊNESE DA CRIPTOCOCCOSE

A criptococose é uma doença grave que pode levar a óbito diversas populações, incluindo homem, animais domésticos, selvagens, agrários e marinhos (Figura 1) (Byrnes *et al.* 2011a). A via natural de infecção geralmente envolve a inalação de células dessecadas ou basidiósporos com tamanhos aproximados de 1-3µm, pequenos o suficiente para se estabelecerem nos alvéolos pulmonares (Kronstad *et al.* 2011). Durante esse período inicial, o fungo pode residir em um estado dormente no pulmão, através de um complexo de linfonodo pulmonar primário, ou se disseminar pela via hematogênica e atingir diferentes órgãos como pele, olhos, ossos, até alcançar o sistema nervoso central, ocasionando o quadro mais grave da doença: a meningoencefalite (Ma & May 2009).

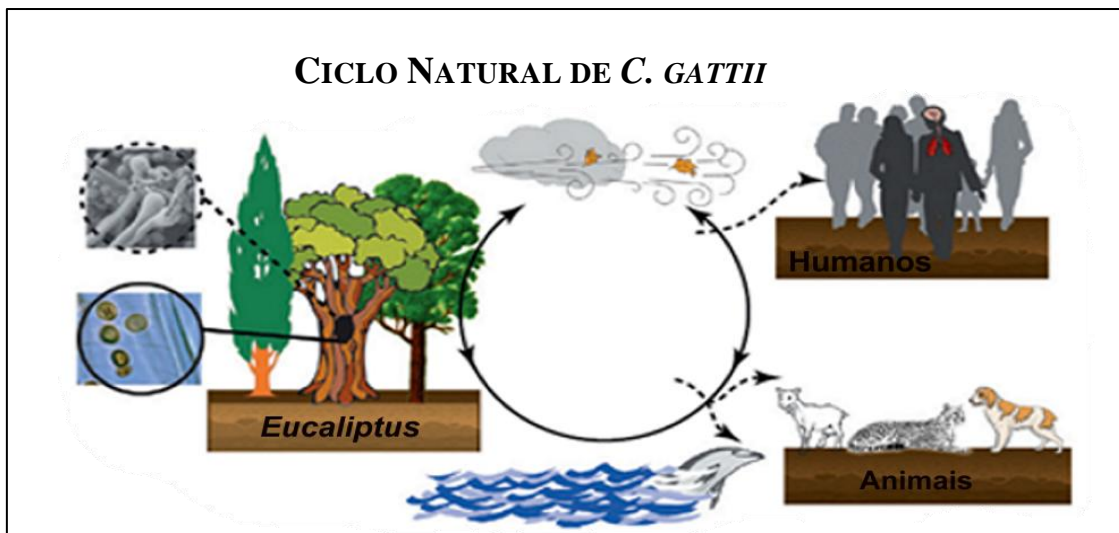


Figura 1. Ciclo natural sugerido para *Cryptococcus gattii*. Observações recentes indicam que *C. gattii* apresenta a capacidade de circular por plantas, pelo solo, pelo ar e pela água, sem a necessidade de um hospedeiro intermediário (flecha contínua). Estudos atuais, no entanto, têm revelado a habilidade desse fungo em colonizar diferentes populações incluindo o homem, animais selvagens, domésticos e marinhos provocando a patologia conhecida como criptococose (flechas descontínuas) (Adaptado de Chaturvedi *et al.* 2011).

No trato respiratório, as células criptocócias proliferam extra e intracelularmente. A levedura pode assumir o formato de células gigantes, atingindo diâmetro de 25-100 μm , as quais são refratárias à fagocitose (Zaragoza *et al.* 2010; Okagaki *et al.* 2010); ou pode ser reconhecida e internalizada por macrófagos alveolares e outras células fagocíticas, onde rapidamente é capaz de se desenvolver e proliferar (Feldmesser *et al.* 2000). Essa interação com as células fagocíticas também envolve a sua habilidade de residir, ser expulso de maneira não destrutiva ou ser transferido de uma célula para outra, os quais facilitam o transporte desse patógeno para diferentes órgãos, teorizando uma importante via de disseminação da infecção conhecida como “Cavalo de Tróia” (Kronstad *et al.* 2011). Essa capacidade de residir e escapar dos macrófagos são considerados um fator contribuinte para o crescimento das infecções

por *C. gattii* na América do Norte, visto que foi observada uma interação/correlação entre altas taxas de proliferação intracelular e a virulência (Ma *et al.* 2009).

“Cavalo de Tróia” também é considerado um possível mecanismo de travessia da barreira hemato-encefálica, pelo qual o fungo ultrapassa o endotélio no interior do monócito (Charlier *et al.* 2009; Kronstad *et al.* 2011). Acredita-se, porém, que outro processo conhecido como transcitose também permita a entrada do patógeno no sistema nervoso central (Shi *et al.* 2010; Shi *et al.* 2012). Esse sistema envolve a captação direta das células fúngicas pelas células endoteliais, e a transmigração do fungo pelo citoplasma até atingir o cérebro. Durante essa passagem, é proposta uma mudança morfológica, na qual a célula fúngica, inicialmente esférica, assume um formato ovoide, possibilitando sua interação com as células endoteliais (Shi *et al.* 2010; Shi *et al.* 2012).

1.3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A criptococose apresenta um complexo curso clínico, atingindo principalmente pulmões e o sistema nervoso central, com lesões menos frequentes na pele, olhos, ossos, trato urinário, entre outros (Byrnes *et al.* 2011a). Quando causada por *C. gattii*, a doença é caracterizada pela concentração do patógeno em regiões pontuais formando criptococomas principalmente nos pulmões, no cérebro ou lesões combinadas. Esses aglomerados de fungo estão associados com graves complicações tanto no sistema nervoso, através de casos de hidrocefalia, paralisia de nervos craniais e convulsões; como no sistema pulmonar, com lesões inflamatórias agravadas, as quais exigem terapias prolongadas (Ma & May 2009; Chen *et al.* 2012).

Interessantemente, o perfil da manifestação clínica tem sido diretamente relacionado com as condições imunológicas do hospedeiro (Chen *et al.* 2000). Como

principal alvo de *C. gattii*, indivíduos imunocompetentes desenvolvem prevalentemente criptococose pulmonar, enquanto que hospedeiros imunocomprometidos, infectados principalmente por *C. neoformans*, apresentam mais frequentemente meningoencefalite (Chen *et al.* 2000). Recentemente, tem sido proposto a correlação ente o aspecto clínico e tipos moleculares da espécie *C. gattii*. Os genótipos VGI e VGII atuam como patógeno primário, causando doença principalmente em hospedeiros imunocompetentes. Enquanto *C. gattii* VGI foi recentemente descrito ser endêmico na Austrália, causando principalmente lesões neurológicas (Chen *et al.* 2012); *C. gattii* VGII demonstrou-se predominante nos surtos em Vancouver, Canadá, e no noroeste do EUA, causando majoritariamente danos pulmonares (Sorrell *et al.* 2001; Galanis *et al.* 2010). Já os tipos moleculares VGIII e VGIV identificados nas regiões do sul da África e EUA, apresentam comportamento similar a *C. neoformans*, acometendo principalmente hospedeiros imunossuprimidos, incluindo indivíduos portadores do vírus HIV (Sorrell *et al.* 2001; Litvintseva *et al.* 2005; Byrnes *et al.* 2011a).

1.3.3. PRINCIPAIS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO

A doença causada por *C. gattii* envolve aspectos clínicos fundamentalmente diferentes daqueles apresentados nas infecções por *C. neoformans*. No entanto, a atual diretriz da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA, *Infectious Diseases Society of America*), utilizada na clínica, estabelece estratégias similares para o tratamento da criptococose causada por ambas, devido à insuficiência de estudos definitivos que comparem os efeitos da terapêutica para cada uma das espécies (Byrnes *et al.* 2011a). Alguma atenção, porém, tem sido exigida quanto à presença de criptococomas e as condições imunológicas do paciente. O Centro de Controle e Prevenção da Doença (CDC) recomenda que anfotericina B (AMB) ou seus

produtos lipídicos devam ser sempre utilizados como terapia de indução, seguida do tratamento de manutenção com fluconazol (FLC) para *C. gattii*, incluindo as linhagens do surto no noroeste da costa do pacífico dos EUA (Byrnes *et al.* 2011a). A AMB é um polieno inicialmente introduzido durante os anos 50 como a primeira terapia efetiva. Esse fármaco se liga ao ergosterol presente na membrana plasmática do fungo causando um aumento na permeabilidade a prótons e cátions (Baginski *et al.* 2009). Além disso, também foi observado seu potencial estimulante da produção de citocina pró-inflamatória a partir de células imunes inatas (Ma & May 2009). Embora esse composto tenha se mostrado bastante efetivo no tratamento da criptococose, a sua nefrotoxicidade e hepatotoxicidade limitam o seu uso (Baginski *et al.* 2009). Já FLC é um composto do grupo dos triazóis que inibe a síntese de ergosterol pela célula fúngica. Esse fármaco apresenta uma excelente absorção pelos tecidos, incluindo sistema nervoso central (Ma & May 2009). No entanto, essa droga apresenta uma resposta lenta ao tratamento, o qual a torna ideal para a manutenção de terapias de longa duração (Jarvis *et al.* 2007). Outro composto bastante utilizado no tratamento da criptococose é a 5-fluocitocina. Esse fármaco é capaz de inibir a síntese de RNA e DNA no fungo, e sua associação com AMB tem-se demonstrado mais eficiente que o tratamento apenas com AMB (Jarvis *et al.* 2007). Como um fator preocupante, recentemente tem-se descrito um grande número de casos de desenvolvimento de resistência fúngica a diferentes drogas incluindo FLC, comprometendo a terapia (Ma & May 2009; Varma *et al.* 2010). Além disso, Trilles e colaboradores (2004) demonstraram que *C. gattii* apresenta menor suscetibilidade a sete compostos antifúngicos quando comparado com *C. neoformans*, embora os níveis permanecessem os mesmos em relação a AMB e flucitocina (Ma & May 2009).

1.4. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS: O MÉTODO TRADICIONAL PARA A AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA INFECÇÃO.

C. gattii apresenta características essencialmente distintas de *C. neoformans* quanto à epidemiologia, ecologia, manifestações clínicas, suscetibilidade a fármacos, entre outros. A compreensão das diferenças relativas à patologia causada por *C. gattii* e a sua resposta a tratamentos antifúngicos são comumente analisadas através do método experimental de contagem de unidades formadoras de colônia complementada por análises histopatológicas (Goldman *et al.* 1994; Calvo *et al.* 2010; Ngamskulrunroj *et al.* 2012).

A contagem de unidades formadoras de colônia é o método que permite a estimativa da viabilidade de células bacterianas ou fúngicas a partir de uma determinada amostra, com base na sua capacidade de gerar colônias sob condições específicas (Sutton *et al.* 2006; Goldman *et al.* 2009; Brugger *et al.* 2012). Em estudos experimentais de doenças infecciosas, essa técnica permite avaliar a distribuição do patógeno no hospedeiro, possibilitando a identificação dos órgãos colonizados por este fungo durante a infecção. Estudos comparativos também têm utilizado tal método para avaliar o efeito de diferentes antifúngicos na contenção da doença (Calvo *et al.* 2010; Ngamskulrunroj *et al.* 2012). De acordo com modelos recentes de infecção por *Cryptococcus sp*, essas análises são realizadas a partir da retirada dos órgãos do animal previamente infectado, sendo posteriormente macerados após determinação da massa de cada órgão. O conteúdo líquido resultante do homogeneizado é recolhido e utilizado para as diluições, que, por fim, são plaqueadas em triplicata em meio YPD (Goldman *et al.* 1994; Ngamskulrunroj *et al.* 2012). A faixa de contagem de UFC aceitável para fungos, e especificamente para a espécie *Cryptococcus*, no entanto, ainda não está claramente estabelecida. De acordo com o órgão americano Administração de

Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (U. S. FDA, United States *Food and Drug Administration*), um número aceitável para a contagem de colônias, em amostras contendo principalmente leveduras é de aproximadamente 150 colônias (U. S. FDA, 2001). Já para o órgão americano de padronização conhecido como Farmacopéia dos Estados Unidos (USP, *United States Pharmacopeia*), a faixa de contagem aceitável de 30-300 UFC/placa para a maioria das bactérias e para *Candida albicans*, previamente estabelecida pela indústria de alimentos durante análises de amostras de leite (USP, 2006). Goldman e colaboradores (2009) em “Manual Prático de Microbiologia” e Rosa e colaboradores (2006) em “Biodiversidade e Ecofisiologia de Leveduras” definem, de modo geral, faixas aproximadas de 30-300 ou 25-250 colônias por placa. Entre as principais limitações da técnica inclui-se esse estreito intervalo de contagem padrão, a variabilidade dos resultados obtidos devido ao desentendimento entre limite de identificação (1 UFC) e limite de quantificação (30 UFC), e a influência de inúmeros parâmetros referentes às propriedades físicas como o tamanho, a forma e a sobreposição de colônias (Sutton *et al.* 2006; Goldman *et al.* 2009; Clarke *et al.* 2010). Recentemente, foi desenvolvido e padronizado o método de contagem de colônia automatizada, diminuindo o erro em relação a parâmetros físicos (Brugger *et al.* 2012). No entanto, mesmo com a contagem automatizada, o experimento de determinação de UFC a partir de órgãos macerados permanece laboriosa, sujeito a erros e a imprecisão de resultados. Nesse sentido, a metodologia de UFC a partir de órgãos macerados requer muita atenção e consumo de tempo.

A histopatologia utilizada durante a pesquisa experimental apresenta-se como um método complementar para a confirmação da infecção. Por essa técnica é possível analisar a resposta inflamatória, determinar a disposição da infecção e até mesmo a formação de fibrose e necrose do tecido (Guarner *et al.* 2010). Durante a identificação

da criptococose, a coloração de hematoxilina e eosina possibilita a visualização de uma fina cápsula polissacarídica envolta por uma região mais clara, caracterizando a presença do fungo no tecido (Guarner *et al.* 2010). A cápsula também pode ser identificada pelos corantes azul Alcian, mucicarmina de Meyer (MM) e de Southgate, Grocott metenamina de prata (GMS) e ácido periódico-Schiff (PAS), como também por Fontana-Masson pela presença de melanina (Gazzoni *et al.* 2009; Guarner *et al.* 2010). A histopatologia também permite analisar a reação inflamatória pela detecção de granulomas bem definidos podendo apresentar um aspecto de necrose à fibrose, no qual o fungo está presente dentro dos macrófagos; ou pelo reconhecimento de células gigantes no ambiente extracelular apresentando mínima inflamação (Guarner, *et al.* 2010). Embora auxilie na confirmação da presença do fungo nos mais diversos tecidos, caracterizando também seu aspecto inflamatório, a histopatologia é um método laborioso, que pode apresentar algumas dificuldades na identificação de fungos com pouca produção de cápsula, além de trazer pouca informação a respeito do padrão de disseminação do fungo (Guarner *et al.* 2010).

1.5. BIOIMAGEM E O MONITORAMENTO DA INFECÇÃO

Recentemente, avanços na compreensão de vários sistemas biológicos foram adquiridos por métodos de análise por bioimagem. O monitoramento *in vivo* baseado na fluorescência tem possibilitado o acompanhamento em tempo real da evolução de diversas doenças, tais como os processos infecciosos (Kong *et al.* 2011; Andreu *et al.* 2011). Manicassamy e colaboradores (2010) utilizaram o gene repórter GFP para caracterizar *in vivo* a dinâmica da infecção causada pelo vírus influenza em camundongos e a ação de agentes antivirais para bloquear sua propagação. Da mesma

forma, estas novas tecnologias estão permitindo a investigação da função de proteínas específicas envolvidas na virulência de diversas patologias. Waterman e colaboradores (2012) utilizaram o sistema de análise óptica *in vivo* para caracterizar a função do transportador CTR4 dependente de cobre fusionado a proteína reporter mCherry em *C. neoformans*. Assim como a fluorescência, o sistema de análise por imagem baseado na bioluminescência também tem permitido avanços no conhecimento de diversos sistemas microbiológicos. Doyle e colaboradores (2006) visualizaram *in vivo* a infecção causada pelo fungo patogênico *Candida albicans*, expressando o gene repórter luciferase de vagalume. De forma similar, Brock e colaboradores (2008) desenvolveram uma nova ferramenta de monitoramento da infecção e da eficácia de diferentes drogas no tratamento da doença causada por *Aspergillus fumigatus*, a partir construção de uma linhagem do fungo patogênico expressando constitutivamente o gene repórter luciferase de vagalume, em um sistema de análise por bioluminescência. Nesse sentido, o sistema de análise por imagem tem contribuído para uma maior compreensão de diversos mecanismos referentes à interação patógeno-hospedeiro, a distribuição do patógeno no hospedeiro, assim como a visualização *in vivo* dos efeitos de tratamentos terapêuticos e vacinas sobre a infecção (Andreu *et al.* 2011).

1.5.1. IVIS LUMINA II E A CAPTAÇÃO DE IMAGEM

Na ciência da imagem óptica, o sistema de imagem por biofotônica baseada em fluorescência surge como um método não invasivo e não tóxico, o qual detecta luz visível produzida a partir da excitação de proteínas fluorescentes. Essa tecnologia é a base do funcionamento do equipamento IVIS Lumina II (Caliper, 2012), um sistema amplo e sensível de imageamento *in vivo* tanto para fluorescência, como para luminescência. O equipamento IVIS Lumina II consiste em materiais de alta tecnologia

e acessórios práticos, contendo uma câmera de CCD (*charge coupled device*) altamente sensível acoplada a um compartimento isolado de luz, mais de 21 filtros, incluindo filtros de excitação e emissão, além de automação completa e capacidade de análise.

A obtenção da imagem pelo aparelho é possível através da técnica de imagem planar. Esse processo apresenta um sistema inicial de aquisição de uma imagem referência do objeto sob iluminação fraca, seguida pela passagem de um intenso feixe de luz por um filtro ajustado de acordo com o comprimento de onda de excitação do fluoróforo em questão, para então incidir sobre o objeto. A fonte de luz é uma lâmpada de tungstênio geralmente alocada no mesmo lado do detector, forma conhecida como epi-iluminação (Leblond *et al.* 2010). O sinal biofotônico resultante é então capturado no escuro, através dos filtros de emissão específicos para os comprimentos de onda de cada fluoróforo, e a intensidade da incidência de fótons é espacialmente codificada por câmeras CCD, resultando em uma imagem com escala de cor sobreposta (Leblond *et al.* 2010).

Entre os principais fatores que influenciam a sensibilidade da detecção incluem-se: as propriedades relacionadas à propagação da luz pelo tecido, o sinal de autofluorescência inerente ao tecido animal e a disponibilidade de oxigênio (Andreu *et al.* 2010). A propagação da luz pelo tecido está relacionada com as propriedades de espalhamento e absorção de luz. Em contato com o tecido, os fótons emitidos em um comprimento de onda visível e infravermelho sofrem um espalhamento intenso, resultando em um sinal com padrão difuso (Andreu *et al.* 2010). Além disso, Contag e colaboradores (1995) demonstraram que a cada centímetro de profundidade no tecido há uma diminuição de aproximadamente dez vezes o valor da intensidade de fótons. Essa perda é associada, sobretudo, à presença de cromóforos endógenos absorvedores tais como a hemoglobina e a melanina (Andreu *et al.* 2010; Leblond *et al.* 2010). Esses

componentes são capazes de absorver luz na faixa do verde e do azul do espectro visível, com reduzida atuação em comprimentos de onda acima de 600nm, permitindo dessa forma a passagem de luz vermelha ao do longo do tecido (Andreu *et al.* 2010). Além disso, a presença de fluoróforos endógenos, que são capazes de converter a luz absorvida em fluorescência, tais como a queratina, as porfirinas, o NAD(H)P, o colágeno e a elastina possuem faixas de emissão até próximo do infravermelho, caracterizando a autofluorescência emitida durante a aquisição das imagens. Geralmente a autofluorescência da maioria dos compostos, incluindo o tecido, é maior em comprimentos de ondas curtos, diminuindo na faixa do vermelho, dependendo também da intensidade e do comprimento de onda da fonte de excitação (Andreu *et al.* 2010). Como consequência, o Sistema de Imagem IVIS adota um método de subtração da autofluorescência através da utilização de filtros de *background*, que são filtros de excitação na faixa do azul com objetivo de excitar a autofluorescência do tecido sem excitar o fluoróforo em questão. Dessa forma, a imagem obtida pelos filtros de *background* é subtraída da imagem principal obtida pelo filtro de excitação do fluoróforo utilizando um fator de escala apropriado, de forma a reduzir a autofluorescência (Troy *et al.* 2004). Outro importante fator que interfere na sensibilidade da detecção envolve a disponibilidade de oxigênio, visto que esse componente é essencial para a maturação dos cromóforos fluorescentes, embora somente condições rigorosas de anóxia (concentrações de O₂ menores que 0,75 µM) poderiam prejudicar sua formação (Andreu *et al.* 2010).

O Sistema de Imagem IVIS é calibrado de acordo com o padrão de radiação rastreável determinado pelos Institutos Nacionais de Padrão e Tecnologia. A utilização desses padrões possibilita que as imagens medidas em unidades relativas de luz (contagem por câmera CCD) sejam convertidas em unidades físicas de radiação de

superfície (fótons/seg/cm²/steradiano) (Troy *et al.* 2004). Para imagens fluorescentes, no entanto, a medida de radiação de superfície é dependente da intensidade de iluminação. No Sistema de Imagem IVIS a iluminação corresponde à luz incidente sobre o objeto, que tem sua intensidade variável de acordo com o campo de visão; dessa forma, a intensidade de iluminação irá variar conjuntamente com as mudanças no campo de visão (Troy *et al.* 2004). Para reduzir os efeitos dessa variação de iluminação, as imagens fluorescentes são normalizadas a partir da razão entre a imagem fluorescente e uma imagem de iluminação referente. Logo, a imagem de referência é uma “imagem branco” obtida através da utilização filtro de excitação no local e filtro de emissão aberto, a qual é previamente armazenada no sistema, servindo de base para a aquisição das imagens. Portanto, as imagens fluorescentes normalizadas não possuem unidades, e são conhecidas como imagem de eficiência fluorescente ou eficiência de radiação (Troy *et al.* 2004).

1.5.2. PROTEÍNA FLUORESCENTE mCherry COMO BIOMARCADOR

A utilização de marcadores fluorescentes em estudos de bioimagem vem sendo fundamental para entendimento dos mecanismos de muitas doenças. No entanto, existem diversos desafios referentes às características do fluoróforo, os quais devem ser considerados para a obtenção de imagens e análises de alta qualidade. Primeiramente, a proteína fluorescente deve ser expressa de maneira eficiente e possuir brilho suficiente para fornecer sinal significativamente acima da autofluorescência para a análise adequada da imagem (Shaner *et al.* 2005). O brilho é determinado por uma variedade de fatores incluindo as características intrínsecas à proteína (velocidade e eficiência de maturação, coeficiente de extinção, rendimento quântico e fotoestabilidade), as

propriedades ópticas do sistema de aquisição de imagem (comprimento e intensidade da iluminação, o espectro de filtros), bem como os relacionados à sensibilidade da câmera e do olho humano ao espectro de emissão (Shaner *et al.* 2005). O marcador também deve possuir uma fotoestabilidade adequada de maneira a possibilitar a visualização até a finalização do experimento. Essa característica está relacionada diretamente com o foto-decaimento ou destruição irreversível da fluorescência devido à excessiva intensidade da luz de excitação (excitação estendida), de maneira que a foto estabilidade é determinada pelo tempo de decaimento de 50% de uma faixa de emissão inicial de 1000 fótons/s (Shaner *et al.* 2005). Ensaios de foto-decaimento demonstraram que as proteínas possuem uma grande variabilidade quanto a fotoestabilidade, sendo as proteínas mCherry e mKO as mais adequadas para experimentos de longa duração (Shaner *et al.* 2005). Além disto, a proteína fluorescente deve possuir a capacidade de se fundir com demais proteínas para evitar a sua oligomerização, e ser insensível aos efeitos ambientais tais como variação de pH ou temperatura, que de alguma maneira possam prejudicar a interpretação dos resultados experimentais (Shaner *et al.* 2005). Finalmente, os fluoróforos adequados devem possuir o mínimo de *crosstalk* entre as faixas de emissão e excitação durante análises com a utilização de múltiplas marcações, evitando assim a sobreposição dos espectros (Shaner *et al.* 2005).

A proteína fluorescente mCherry é derivada originalmente de *Discosoma sp.*, mais diretamente de uma proteína de segunda geração, mRFP1. A proteína vermelha mRFP1, e posteriormente mCherry, é resultado de diversas modificações pós-traducionais nos resíduos Gln66, Tyr67, e Gly68, para a formação de um heterociclo de imidazolidinona com os substituintes *p*-hidroxibenzilidene e acilimina (Shaner *et al.* 2004). Subsequentemente, diversas mutações adicionais promoveram o aperfeiçoamento desse cromóforo pela obtenção de uma maturação completa e elevação

de comprimentos de ondas de excitação e emissão no espectro do vermelho, além do aprimoramento da capacidade de fusão na porção N-terminal. Essas mutações resultaram na proteína fluorescente mCherry, conhecida como o melhor biomarcador dentre os monômeros vermelhos (Shaner *et al.* 2004). Esse fluoróforo possui comprimento de onda de excitação de 580nm e de emissão de 610nm, além de outras características fundamentais que permitem a obtenção de bioimagens de excelente qualidade como: fotoestabilidade elevada, rápido tempo de maturação, coeficiente de extinção elevado, tolerância para as fusões N-terminais e alta resistência a variação de pH (Tabela 1). Além disso, a presença de um brilho adequado e a eficiência de dobramento a 37°C a tornam um bom fluoróforo para análises de imagens em experimentos de longa duração (Shaner *et al.* 2004).

Tabela 1. Principais características da proteína fluorescente mCherry. Em forma de monômero, a proteína mCherry destaca-se pela sua alta foto estabilidade, pela faixa de comprimento de onda de excitação/emissão mais elevadas e o brilho em níveis regulares (Adaptado de Shaner *et al.* 2005).

Classe	Proteína	Laboratório	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Brilho	Foto estabilidade	pKa	Oligomerização
Far-vermelho	mPlum	Tsien	590	649	4.1	53	< 4.5	Monômero
Vermelho	mCherry	Tsien	587	610	16	96	< 4.5	Monômero
	tdTomato	Tsien	554	581	95	98	4.7	Dímero em tandem
	mStrawberry	Tsien	574	596	26	15	< 4.5	Monômero
	J-Red	Evrogen	584	610	8.8	13	5.0	Dímero
	DsRed-monômero	Clontech	556	586	3.5	16	4.5	Monômero
Laranja	mOrange	Tsien	548	562	49	9.0	6.5	Monômero
	mKO	MBL Intl.	548	559	31	122	5.0	Monômero
Amarelo-	mCitrine	Tsien	516	529	59	49	5.7	Monômero
Verde	Venus	Myauwaki	515	528	53	15	6.0	Dímero fraco
	YPet	Daugherty	517	530	80	49	5.6	Dímero fraco
	EYFP	Invitrogen	514	527	51	60	6.9	Dímero fraco
Verde	Emerald	Invitrogen	487	509	39	0.69	6.0	Dímero fraco
	EGFP	Clontech	488	507	34	174	6.0	Dímero fraco
Cyan	CyPet	Daugherty	435	477	18	59	5.0	Dímero fraco
	mCFPm	Tsien	433	475	13	64	4.7	Monômero
	Cerulean	Piston	433	475	27	36	4.7	Dímero fraco
Verde excitável por UV	T-Sapphire	Griesbeck	399	511	26	25	4.9	Dímero fraco

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo de monitoramento por bioimagem da infecção causada por *Cryptococcus gattii* e avaliar a sua resposta a tratamentos com os antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLC).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir linhagem de *C. gattii* expressando o marcador de fluorescência mCherry.
- Avaliar os principais fatores de virulência incluindo cápsula polissacarídica, melanina e desenvolvimento a 37°C, e a emissão de fluorescência das linhagens selvagem e fluorescente de *C. gattii* nessas condições.
- Analisar *in vitro* a sensibilidade da linhagem fluorescente de *C. gattii* à AMB e FLC.
- Determinar o limite de detecção de fluorescência da linhagem fluorescente de *C. gattii* no sistema IVIS Lumina.
- Monitorar *ex vivo* a infecção causada pela linhagem fluorescente de *C. gattii* em camundongos.
- Avaliar por bioimagem a infecção causada pela linhagem fluorescente de *C. gattii* em camundongos em resposta a tratamentos com os antifúngicos AMB e FLC.
- Comparar os resultados obtidos pelas imagens *ex vivo* com resultados obtidos pelo método de determinação UFC.

Monitoring *Cryptococcus gattii* infection in a mouse model using a fluorescent tag protein

*Natalia Vidal Figueiredo*¹, *Vanessa de Abreu Barcellos*¹, *Charley Christian Staats*¹,
*Augusto Schrank*¹, *Marcio L. Rodrigues*^{2,3}, *Lívia Kmetzsch*^{1Ψ}, *Marilene Henning*
Vainstein^{1Ψ*}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro;

³ Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author: Marilene Henning Vainstein, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa postal 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 (51) 3308-6060.

E-mail: mhv@cbiot.ufrgs.br

Ψ LK and MHV share senior authorship on this article.

Abstract

The pathogenic fungus *Cryptococcus gattii* is one of the etiological agents of human cryptococcosis, which may evolve to the formation of cryptococcomas in the lungs and brain of immunocompetent hosts. Monitoring the progression of pathogenesis and organ colonization in animal models is important in the study of infectious microorganisms. However, this monitoring usually involves laborious and imprecise methods, such as colony forming unit (CFU) determination. Here, we propose the use of a practical model to monitor *C. gattii* infections in mice and to evaluate antifungal treatment. Our approach involved the infection of mice with a *C. gattii* strain that constitutively expresses the mCherry reporter gene, followed by fluorescence-based imaging analysis of the colonized organs. Mice were infected intranasally with the fluorescent *C. gattii* strain and treated with amphotericin B (AMB) or fluconazole (FLC) for 4 or 7 days. The lungs, kidney, spleen, and brain were excised and examined in an IVIS Lumina instrument to determine fluorescence intensity and for CFU determination. Imaging analyses showed that *C. gattii* primarily colonizes the respiratory tract, with reduced dissemination to the central nervous system. This observation was consistent with the results of CFU determination. The evaluation of the effects of fluconazole treatment in infected mice revealed that both imaging and CFU methods produced similar results. However, the results of the two methods were considerably different when the effects of AMB were evaluated. Our results support the use of imaging-based techniques to monitor infections caused by *C. gattii* in mice, as well as the response of animal hosts to treatment with antifungals.

Introduction

The human pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the etiological agents of cryptococcosis, a life-threatening disease that affects the lungs and brain of humans and animal hosts [1, 2]. It has been estimated that human cryptococcosis affects approximately 1 million individuals each year, causing 650,000 deaths [3]. Although *C. gattii* is responsible for less than 1% of these cases, different outbreaks involving immunocompetent individuals have been recently described in Vancouver Island (Canada), the US Pacific Northwest and in some tropical and subtropical areas [2, 4, 5, 6]. *C. gattii* can damage the lungs of immunocompetent individuals by inducing strong inflammatory reactions and cryptococcomas [2, 7, 8, 9]. *C. gattii* is supposedly more resistant to antifungal drugs than is *C. neoformans*, which is likely associated with prolonged exposure to antifungals [2, 10, 11, 12]. Experimental models of infection progression and *in vivo* antifungal susceptibility are crucial for the development of efficient therapeutic protocols.

In cryptococcosis, pathogen dissemination and the efficacy of different therapeutic agents have been widely investigated using the traditional method of counting colony forming units (CFUs) in macerated organs [11,13]. Although organ CFU counting has proven useful for *in vivo* drug tests, the technique is laborious and is regularly affected by fluctuations in fungal recovery and colony counting. Recently, *in vivo* methods of bioimaging have emerged as powerful alternatives for monitoring organ colonization by pathogens in animal models [14]. In fact, fluorescence-based *in vivo* monitoring has been proven to allow the real-time tracking of microbial dissemination [14]. In an influenza model, Manicassamy et al. [15] utilized a GFP reporter gene to characterize the *in vivo* dynamics of the progression of infection in mice and the efficacy of antiviral agents to block viral spreading. In *C. neoformans*,

reporter gene-based systems have successfully been used for the *ex vivo* characterization of the function of CTR4, a cooper transporter [16]. Similar investigations of fungal infection were performed for *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infection, albeit with bioluminescence imaging systems [17, 18].

Although the mechanisms of pathogenicity in the *C. neoformans* model have been studied in detail, knowledge about how *C. gattii* causes damage to its host remains limited. More recently *C. gattii* mechanisms are under study and it is suggested that there are important differences from *C. neoformans* in terms of how cryptococcal disease develops in the mammalian host, which may impact therapeutic protocols. In the present work, we propose a model of monitoring *C. gattii* infection and its response to two antifungal drugs using fluorescence-based bioimaging analysis. We constructed a recombinant *C. gattii* strain carrying the mCherry reporter gene and used it to track the dynamics of *C. gattii* pathogenesis and the effects of amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC) administration, comparing the results of the fluorescence-based method with those of conventional organ CFU determination.

Materials and Methods

Ethics statement

The use of animals in this work were performed with approval of The Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethics Committee for Use of Animals (CEUA - protocol number 18801). Mice were housed in groups of four and kept in filtered top ventilated cages, maintained on 12 h dark/light cycle, with food and water ad libitum. The animals were cared according to the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines. All efforts to minimize animal suffering were made. Before infection with

C. gattii strains, mice were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg Ketamine and 16 mg/kg Xylazine. Mice were analyzed twice daily for any signals of suffering, defined by weight loss, weakness or inability to obtain feed or water. In the first signals of suffering, mice were humanely sacrificed.

Strains and media

The wild-type *C. gattii* strain R265 (molecular type VGII; R265WT) and a recombinant strain containing a constitutively expressed mCherry fluorescent gene (*C. gattii*::mCherry) were cultivated overnight in YPD medium (2% dextrose, 2% peptone and 1% yeast extract) at 30°C with shaking (200 rpm) for most of the procedures used in this study.

The construction of a *C. gattii* strain expressing the red fluorescent protein mCherry

A 400 bp fragment corresponding to the histone H3 promoter region of *C. neoformans* was amplified by PCR using the following primers: 5'-AAAAAAAAGATCTGGCAGATACGATATGTTGGC -3' and 5'-AAAAAAACTAGTGGTGATAGATGTGTTGTGGTG -3' (*Bgl*II and *Spe*I sites underscored). The PCR product was analyzed in an agarose gel (0.8%) and purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). The resulting material was digested with the restriction enzymes *Bgl*II and *Spe*I. The plasmid pLKB25 [19], which contains the mCherry coding sequence, was cleaved by *Bgl*II and *Xba*I. Approximately 100 ng of the vector and 25 ng of the fragment were ligated in a reaction containing the T4 DNA ligase (Invitrogen), and the product was transformed into *E. coli* OmniMAX 2-T1 cells. The construct was confirmed by PCR and by cleavage with *Eco*RV, *Nco*I, and *Xho*I. Approximately 10 µg of the resulting vector was used to perform biolistic transformation [20]. Transformants were selected

on YPD agar medium supplemented with 200 µg/ml of the antibiotic G418 to select cells containing the neomycin resistance marker.

Southern blot

Fragment insertion into the genomic DNA was confirmed by Southern blot. Approximately 10 µg of yeast genomic DNA was digested with the restriction enzyme EcoRI. The fragments were separated on a 0.8% agarose gel, and the DNA was transferred to a nylon membrane. The plasmid was cleaved with the restriction enzymes HincII and XbaI, and the cassette encoding mCherry was used as a probe (GE Healthcare).

Fluorescence emission analysis

Cells were visualized by confocal microscopy in an Olympus FluoView 1000 microscope. Fluorescence levels were determined with Living Image and IVIS Lumina (Xenogen) software.

Fluorescence detection in transformed cells

The fluorescence levels in recombinant cells were determined in the IVIS Lumina, and sensitivity was determined using serial dilutions of initial suspensions of 10^8 cells yeast cells in 100 µl PBS. The IVIS Lumina system settings used included an f/stop of 4, a binning of 4 and a 2 second exposure for cell detection.

Analysis of virulence determinants

The *C. gattii*::mCherry strains were evaluated for the key virulence determinants in the *Cryptococcus* model: pigmentation, capsule formation and ability to grow at 37°C [21]. To evaluate melanin production, the strains were grown on agar Niger medium at 30°C, and pigment production was analyzed visually after 48 h and 72 h of incubation, with mCherry-derived fluorescence emission analyzed in parallel. For the analysis of capsule formation, the strains were initially cultivated in YPD for 18 h. From this

culture, 10 μ l aliquots were taken and transferred to the wells of a 24-well plate containing 600 μ l of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Fungal suspensions were incubated for 24 hours in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C [22]. India Ink was used to prepare the samples for microscopic visualization of the capsule. Capsule sizes were defined as the ratio between the capsule thickness and cell diameter. Image J software was utilized for capsule measurement in 100 cells of each strain.

The relative ability of the transformed strain to grow at 37°C was analyzed by inoculating both WT and mCherry-containing strains onto YPD solid medium and allowing them to grow for 48 h. Fluorescence emission was also monitored under this condition, as described earlier in this section.

Interaction with macrophages

RAW 264.7 macrophages (10^5) were suspended in 100 μ l of DMEM medium supplemented with BFS and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin; GIBCO) and placed into the wells of a 96-well plate. The cells were incubated overnight at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The medium was then replaced with a similar, fresh suspension supplemented with 10^6 yeast cells and further incubated for 18 h under similar conditions. The wells were washed 3 times with PBS, and the macrophages were lysed with sterile ice-cold distilled H₂O. The remaining fungal cells were suspended in sterile PBS and plated on YPD solid medium for CFU counting after 48 h of incubation at 30°C. Triplicate sets were prepared for each experiment.

Mortality curves

Groups of 4- to 6-week-old female BALB/c mice (n=5) were intranasally inoculated with 50 μ l of PBS containing 10^7 *C. gattii* cells (WT or recombinant). Survival was then monitored daily. The results were analyzed with the Kaplan-Meier

test in GraphPad Prism 5.0 software. All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

***In vivo* drug administration**

Intranasal infection was performed as previously described [23]. For drug treatment, 4- to 6-week-old female BALB/c mice were arranged in groups of ten animals. The control groups were infected with WT *C. gattii* or the recombinant strain. Drug-treated animals were first infected with *C. gattii* and after 24 h, animals were treated with intraperitoneal injections of amphotericin B (1.5 mg/kg/day) [11], or fluconazole (10 mg/kg/day) [24] or not treated for periods of 4 and 7 days. Lungs, brains, spleens and kidneys were excised, and their fluorescence levels were analyzed in the IVIS Lumina system. Fluorescence measurements are expressed as radiance efficiency values, which corresponds to surface radiance normalized to the illumination intensity incident on the object [25]. After fluorescence determination, the organs were macerated and prepared for CFU determination as described [11, 13]. The radiance efficiency and CFU values were compared using the T-test in GraphPad Prism 5.0 software. All *P* values were two-tailed, and values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Construction of a *C. gattii* strain that constitutively expresses the mCherry reporter gene.

A vector with the histone H3 promoter from *C. neoformans* positioned upstream of the mCherry CDS in the pLKB25 plasmid for cloning was constructed and subsequently transformed into *C. gattii* strain R265 (Figure 1A). Southern blotting

analysis confirmed the presence of H3::mCherry in the yeast genome of the transformants (Figure 1B). The fluorescent phenotype was confirmed by confocal microscopy (Figure 1C). Analysis of the *C. gattii*::mCherry using the IVIS Lumina system revealed that the sensitivity of the method required a minimum of 10^6 transformed cells (Figure 1D).

The fluorescent *C. gattii* recombinants retain the ability to express virulence determinants

Before validating the *in vivo* model using the *C. gattii* fluorescent strain, we verified that the mCherry insertion did not interrupt any of the cryptococcal genes required for virulence. Both *C. gattii*::mCherry and the WT strains presented the same pattern of melanization (Figure 2A). Similar results were observed when we tested the ability of both *C. gattii* strains to grow at 37°C (Figure 2B). Finally, we tested the ability of the fungal strains used in this study to form polysaccharide capsules. No alterations in capsular dimensions were observed in the *C. gattii*::mCherry strain ($P = 0.2485$) (Figure 2C). The results described in Figure 2A-C likely reflect the facts that the *C. gattii*::mCherry and WT strains exhibited similar levels of survival after interaction with macrophages ($P = 0.8413$) (Figure 2D) and produced similar levels of mortality in mice ($P = 0.5391$) (Figure 2E). Taken together, these results demonstrate that the *C. gattii*::mCherry strain has preserved the virulence patterns of the original strain, supporting its establishment for use in *in vivo* models for monitoring disease progression and treatment.

Comparative analysis of imaging and CFU counting methods.

Mice were infected with WT or *C. gattii*::mCherry strains and monitored for organ colonization by CFU counting and fluorescence measurement. After 5 days of infection, *ex vivo* analyses demonstrated colonization of the respiratory tract (Figure

3A). Fluorescence determination revealed an average value of radiance efficiency corresponding to $7.2 \times 10^{-6} \pm 2.3 \times 10^{-6}$ for *C. gattii::mCherry* cells, with fluorescence emission concentrated at specific foci within the lungs. CFU counting gave an average value of $8.7 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^6$ viable cells per gram of organ weight for the same samples (Fig. 3A). After 8 days of infection, the pathogen burden remained restricted to the pulmonary environment (Figure 3A) and presented a radiance efficiency corresponding to $1.7 \times 10^{-5} \pm 2.5 \times 10^{-6}$ for the *C. gattii::mCherry* strain, with CFU values of $7.7 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^6$ viable *C. gattii::mCherry* cells per gram of organ weight (Figure 3B). Imaging analysis demonstrated that *C. gattii* exhibited a reduced tendency to disseminate to other organs, as concluded from the detection of few or no cells out of the lungs (Figure 3A-B). This observation was supported by negative CFU counts. Interestingly, a 2.3-fold increase in *C. gattii* detection was observed between days 5 and 8 post-infection when the fluorescence-based analysis method was used ($P = 0.0118$) (Figure 3A-B). This difference was not detected by the CFU determination method ($P = 0.6237$) (Figure 3C).

Before performing the *in vivo* tests of antifungal susceptibility, we analyzed the *in vitro* effects of AMB and FLC against the *C. gattii::mCherry* strain and WT cells. Both strains showed similar profiles of susceptibility to the antifungal effects of AMB ($P = 0.1161$) and FLC ($P = 0.6779$) *in vitro* (Figure 4).

The *in vivo* comparison of antifungal tests using the fluorescence-based imaging system and CFU counting tests revealed several interesting particularities. The treatment of mice with AMB during the first 4 days monitored by fluorescence suggested a mild decrease in lung colonization by *C. gattii*, although this trend was not statistically significant ($P = 0.3701$) (Figure 5A). Parallel CFU counting gave average values that were similar for both untreated animals and AMB-treated mice ($P = 0.3293$)

(Figure 5A). Mice treated with AMB for 7 days displayed lower fluorescence values than untreated animals ($P = 0.0269$). CFU analysis, however, produced contradictory results because both drug-treated and control animals had similar fungal loads ($P = 0.5052$) (Figure 5B).

The administration of FLC did not reduce the fungal loads of infected mice, as concluded from the lack of significant differences between the control and antifungal-treated groups after 4 days (Figure 6A, $P = 0.7479$ and $P = 0.1998$ for fluorescence monitoring and CFU counting, respectively) and 7 days (Figure 6B, $P = 0.2487$ and $P = 0.9350$, respectively) of treatment.

Discussion

In this report, we tested a new system to monitor the dynamics of *C. gattii* infections and the response to antifungal therapy in mice using fluorescence-based *in vivo* imaging. Cryptococcosis is known to have a complex clinical course that may include pneumonia and meningoencephalitis as well as important tissue lesions, mainly represented by lung and brain cryptococcomas [2, 7]. The development of tissue lesions, therefore, is closely related to host immunological status [26]. The VGI molecular type of *C. gattii* has been recently reported to be endemic in Australia, causing mainly neurological disease [8]. The VGII genotype, in contrast, was the causative agent of outbreaks in the Vancouver and US Pacific Northwest, causing mainly lung disease with few cases of neurological damage [9, 7]. In the proposed system, our experimental evidence supports the proposed dynamics of *C. gattii* VGII infection through fluorescence-based *in vivo* imaging. Consistent findings from bioimaging and CFU counting demonstrated that a *C. gattii* VGII strain establishes pulmonary disease. This finding was associated with rare observations of the pathogen in the central nervous

system and other organs, consistent with the recent findings by Ngamskulrungro and colleagues [13,7].

Both CFU counting and imaging analysis demonstrated that FLC had no significant effects on controlling the *in vivo* growth of *C. gattii*. These results may be explained by the high inoculum used in the experiment but also by the relatively high antifungal resistance manifested by *C. gattii* [2, 10, 11, 12]. These results imply that FLC may have a low impact on controlling *C. gattii* cryptococcosis [27, 28]. AMB treatment, on the other hand, reduced pathogen burden after four days of therapy. This initial finding agrees with a previous report on the immediate effect of this drug by promoting changes in the yeast membrane permeability [29] and supports the Center for Disease Control recommendation that this drug be used to treat cryptococcosis. Our imaging analysis revealed a further decrease in *C. gattii* counts after seven days of AMB administration. This observation, however, conflicted with the data obtained from CFU determination. This divergence suggests that CFU-based techniques may underestimate fungal loads during infection, leading to erroneous interpretations of the pathogenic course of animal cryptococcosis and the efficacy of antifungals.

Although the imaging model of monitoring cryptococcosis appears to be promising, it is clear that some aspects of this protocol require optimization. For instance, the most appropriate fluorophore and suitable equipment may vary according to the host organism to be analyzed. The advantages of mCherry include its high photostability, fast maturation time, high extinction coefficient, suitability for N-terminal fusions and resistance to pH variations [30, 31]. The brightness and folding efficiency of mCherry at 37°C support its use as a fluorophore for long-term imaging [30, 31, 32]. In addition, the transformed cells in our model system retained full pathogenicity. Nevertheless, we were unable to detect *in situ* fluorescence in living

animals, and organ excision was necessary for fluorescence measurements. This experimental issue may be related to the fact that endogenous chromophores, such as hemoglobin, are likely able to preclude mCherry light transmission through tissues [14]. Assuming that subsequent studies will be necessary to solve the problem illustrated above, it is reasonable to suppose that the development of more sensitive probes might contribute to the development of deep tissue imaging and the optimization of the currently described model of monitoring animal cryptococcosis.

Acknowledgments

The authors thank Lucas Souza from University of São Paulo (USP) for technical support in using IVIS Lumina II equipment.

References

1. Chaturvedi V, Chaturvedi S (2011) *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal. Trends Microbiol 19: 564-71.
2. Byrnes EJ, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J (2011) *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. Microbes Infect 13: 895-907.
3. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS 23: 525-30.
4. Byrnes EJ, Heitman J (2009) *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. F1000 Biol Rep 64: 1-4.
5. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, et al. (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on

- Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17258–17263.
6. Byrnes EJ, Li W, Lewit Y, Perfect JR, Carter DA, et al. (2009) First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. Plos One 4: 1-12.
 7. Galanis E, Macdougall L (2010) Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. Emerg Infect Dis 16: 251-257.
 8. Chen SC, Slavin MA, Heath C H, Playford E G, Byth K, et al. (2012) Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. Clin Infect Dis 55: 789-798.
 9. Sorrell TC (2001) *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol 39: 155-168.
 10. Thompson GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, et al. (2009) Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 53: 309-311.
 11. Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Pujol I, Guarro J (2010) Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. Antimicrob Agents Chemother 54: 4074–4077.
 12. Trilles L, Fernández-Torres B, Lazéra MS, Wanke B, Guarro J (2004) In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. J Clin Microbiol 42: 4815–4817.
 13. Ngamskulrunroj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung KJ (2012) The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. MBio 3: 1-9.

14. Andreu N, Zelmer A, Wiles S (2011) Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. *FEMS Microbiol Rev* 35: 360-394.
15. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, et al. (2010) Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11531–11536.
16. Waterman SR, Park YD, Raja M, Qiu J, Hammoud DA, O'Halloran TV, et al. (2012) Role of CTR4 in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *MBio* 3: 1-11.
17. Doyle TC, Nawotka KA, Kawahara CB, Francis KP, Contag PR (2006) Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic *Candida albicans* strains transformed with the firefly luciferase gene. *Microb Pathog* 40: 82-90.
18. Brock M, Jouvion G, Droin-Bergère S, Dussurget O, Nicola MA, Ibrahim-Granet, et al. (2008) Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis. *Appl Environ Microbiol* 74: 7023–7035.
19. Kozubowski L, Heitman J (2010) Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 75: 658–675.
20. Toffaletti DL, Rude TH, Johnston SA, Durack DT, Perfect JR (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol* 175: 1405–1411.
21. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, et al. (2011) Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 9: 193-203.

22. Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A (2003) Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun* 71: 6155–6164.
23. Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira D L, et al. (2010) The vacuolar Ca²⁺ exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺ tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 9: 1798–1805.
24. Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M, Torelli R, Fiori B, et al. (2006) Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 74: 1352-1359.
25. Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L, Rice B (2004) Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* 3: 9-23.
26. Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, et al. (2000) Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin Infect Dis* 31: 499–508.
27. Kontoyiannis DP, Lewis RE (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359: 1135–1144.
28. Ma H, May RC (2009) Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology.* 67: 131-190.
29. Baginski M, Czub J (2009) Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. *Curr Drug Metab* 10: 459-69.
30. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909.

31. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, et al. (2004)
Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567-1572.
32. Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. (2007) Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 120: 4247-4260.

Figure Legends

Figure 1. Construction of a *C. gattii* strain that constitutively expresses the mCherry reporter gene. A. Strategy used to construct the pLKB25 plasmid for the introduction of the H3 promoter upstream of mCherry CDS. B. Southern blot analysis confirming the presence of 2 kb and 4 kb bands using the mCherry sequence as a probe. C. Confocal microscopy demonstrating fluorescence emission by *C. gattii*::mCherry (R265F) recombinant cells. D. Fluorescence detection required at least 10^6 cells. This corresponded to a value of radiance efficiency value of 1.07×10^{-6} .

Figure 2. Virulence determinants of the *C. gattii*::mCherry strain. A. Growth of WT and R265F strains on Niger agar for 48 h at 30°C for melanization tests. B. The same strains were cultivated in YPD for 48 h at 37°C. Both strains had similar growth rates, with no interference in fluorescence emission by the *C. gattii*::mCherry (R265F) cells. C. Determination of capsular dimensions revealed similar values for both strains, and both strains exhibited similar levels of survival after interaction with macrophages (D). E. Mortality curves of mice lethally infected with WT and *C. gattii*::mCherry (R265F), demonstrating similar values.

Figure 3. *Ex vivo* imaging and CFU determination after 5 and 8 days of infection. A. Illustration of the *ex vivo* imaging (5 and 8 days of infection) of the lungs, spleen, kidney and brain of mice infected with 10^7 fungal cells. B. Quantification of the fluorescence emission from *C. gattii*::mCherry (R265F) cells in the lungs after days 5 and 8 post infection (*, $P = 0.0118$). CFU determination of the organs analyzed in C ($P = 0.6237$).

Figure 4. Susceptibility of WT and *C. gattii*::mCherry strains to AMB and FLC.

Both WT and *gattii*::mCherry (R265F) strains had similar susceptibility to antifungals, as determined by agar diffusion tests against AMB ($P = 0.1161$) and FLC ($P = 0.6779$).

Figure 5. Determination of fungal loads in host organs by fluorescence detection and CFU counting after treatment with AMB.

Mice were infected with WT and *C. gattii*::mCherry (R265F) cells and left untreated (1 and 3) or treated with AMB (2 and 4; WT and *C. gattii*::mCherry, respectively). The results were quantified by fluorescence determination and CFU counting after 4 (A) and 7 (B) days of treatment.

Figure 6. Determination of fungal loads in host organs by fluorescence detection and CFU counting after treatment with FLC.

Mice were infected with WT or *C. gattii*::mCherry (R265F) cells and left untreated (1 and 3) or treated with FLC (2 and 4; WT and recombinant cells, respectively). The results were quantified by fluorescence determination and CFU counting after 4 (A) and 7 (B) days of treatment.

Figure 1.

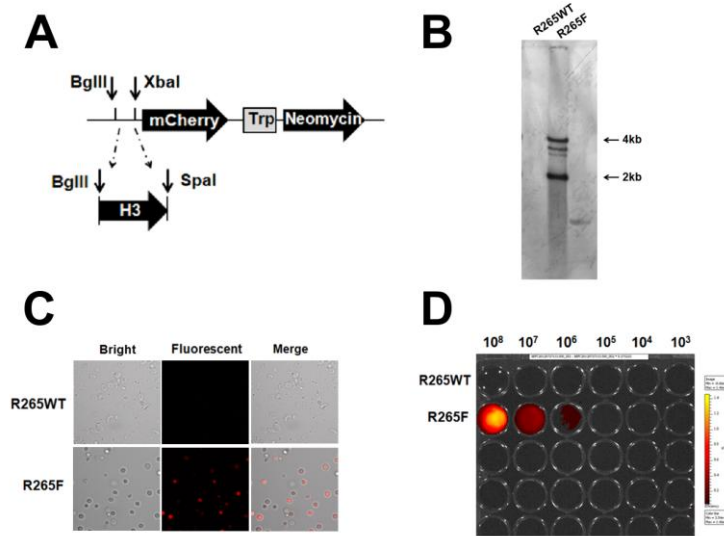


Figure 2.

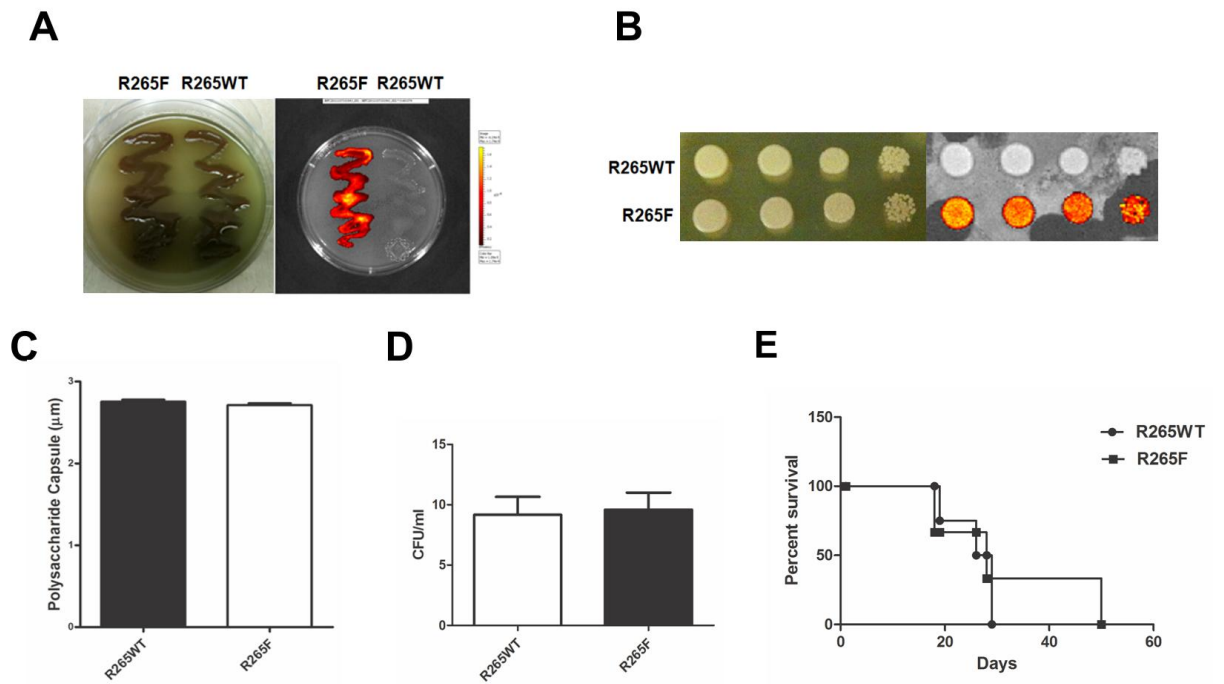


Figure 3.

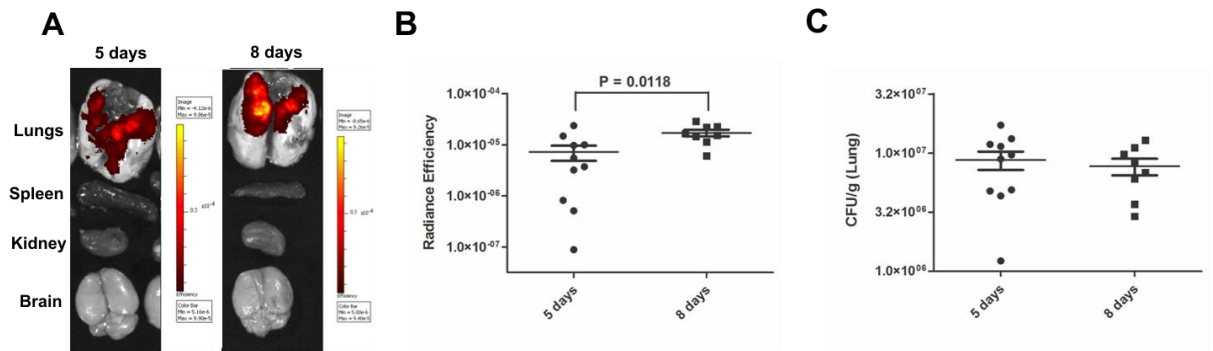


Figure 4.

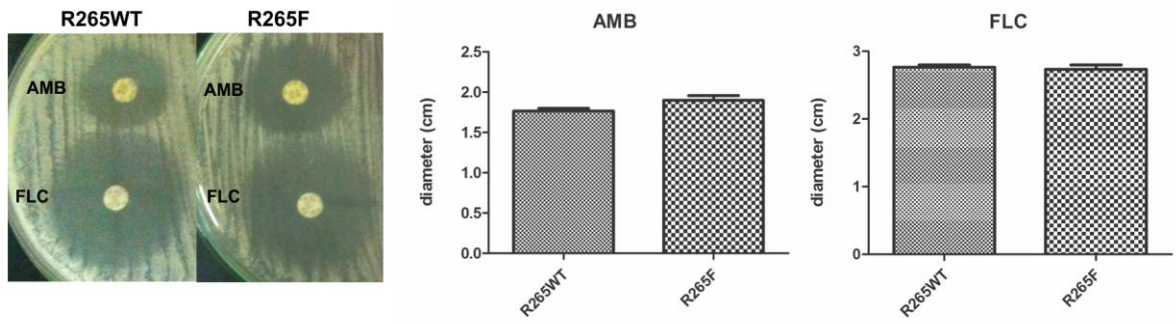


Figure 5.

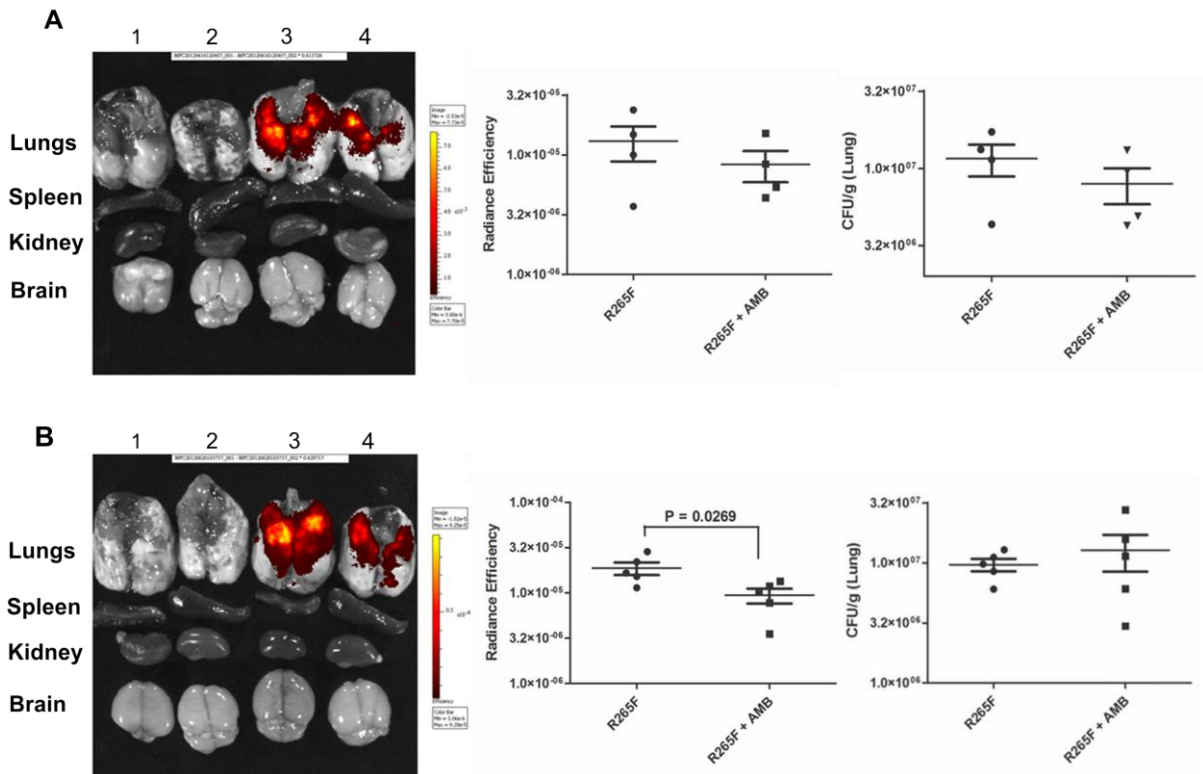
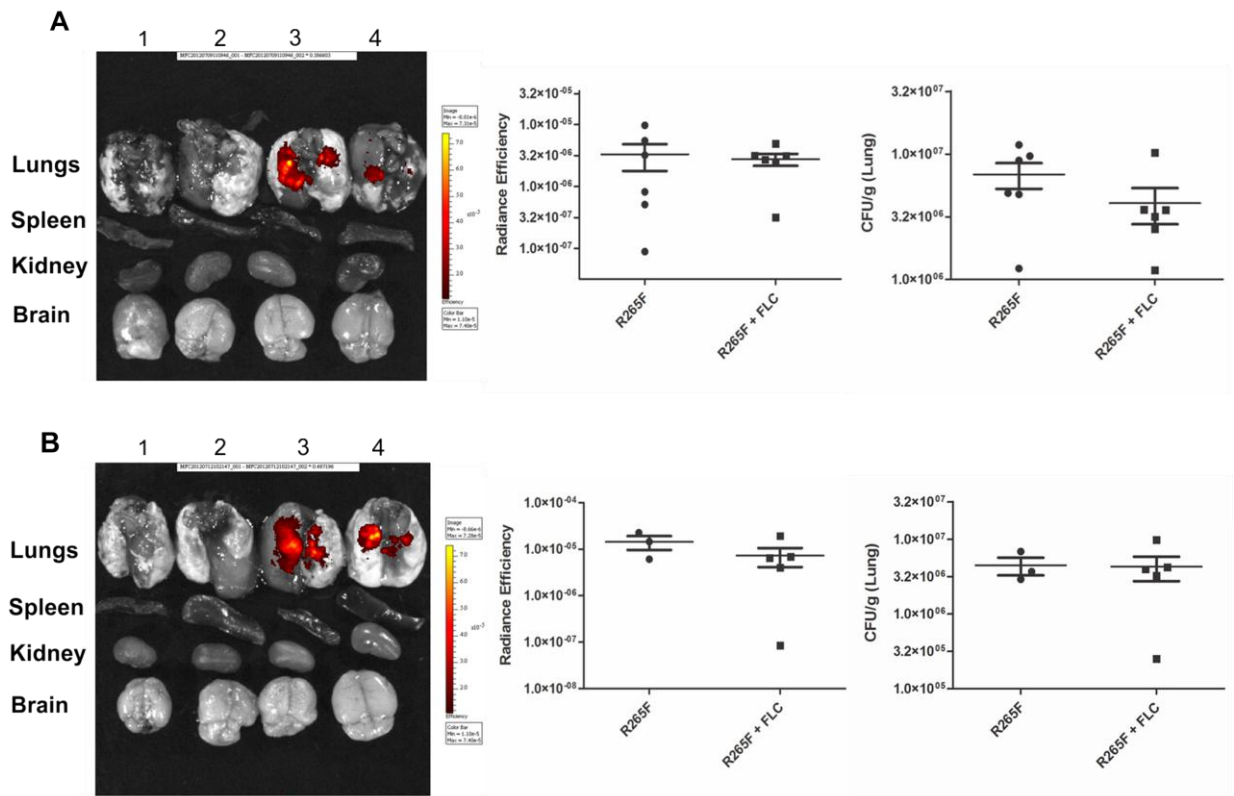


Figure 6.



4. DISCUSSÃO

O modelo proposto de monitoramento *ex vivo* da infecção causada por *C. gattii* revelou-se um sistema bastante promissor. Através de um procedimento rápido e prático, o sistema de análise por imagem permite a localização do patógeno em um determinado órgão, ideal para a avaliação dos efeitos de diferentes tratamentos com antifúngicos ou vacinas sobre a infecção. Como vantagem, a utilização de marcadores fluorescentes exclui a necessidade da adição de outros componentes no sistema, diferentemente da bioluminescência, que, na sua grande maioria, depende do acréscimo de um substrato para a atividade da enzima luciferase (Brock *et al.* 2012). Em *Cryptococcus*, a adição de um componente no sistema, além de ser financeiramente bastante oneroso, pode representar um problema, já que a presença da cápsula polissacarídica nesse patógeno atua como uma barreira física, dificultando o contato enzima-substrato e impedindo a análise da imagem. Além disso, a utilização da proteína fluorescente mCherry como biomarcador permite análises experimentais de longa duração devido à elevada foto estabilidade e, ao mesmo tempo, possibilita outras fusões com diferentes proteínas para a caracterização da função destas no estabelecimento e no curso da infecção (Shaner *et al.* 2005).

Em nossos estudos, o sistema de análise por imagem permitiu caracterizar o perfil de disseminação da levedura patogênica *C. gattii* e sua resposta ao tratamento com os antifúngicos AMB e FLC. Interessantemente, corroborando estudos anteriores (Sorrell *et al.* 2001; Galanis *et al.* 2010, Ngamskulrunroj *et al.* 2012), o padrão de disseminação de *C. gattii*, especialmente o tipo molecular VGII, caracterizou-se principalmente pelo estabelecimento da infecção nos pulmões, com pouca ou nenhuma propagação para o sistema nervoso central. Pesquisas recentes, no entanto, descrevem a criptococose causada majoritariamente por *C. gattii* VGI, principalmente na Austrália,

como uma doença endêmica com aspectos clínicos envolvendo predominantemente danos neurológicos (Chen *et al.* 2012). A distinção entre os padrões de disseminação de diferentes populações dessa espécie instiga a utilização do modelo de análise por imagem para realização de estudos comparativos entre diferentes genótipos e até mesmo entre subtipos moleculares variados, a fim de esclarecer possíveis correlações entre características intrínsecas e perfil clínico da doença. A análise comparativa entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* também se torna de extrema relevância, devido a significativas distinções descritas entre o perfil clínico de pacientes imunocompetentes, acometidos principalmente por *C. gattii*, e indivíduos imunocomprometidos, infectados majoritariamente por *C. neoformans* (Chen *et al.* 2000). Além disso, o conhecimento do padrão de disseminação das duas espécies é essencial para a determinação dos diferentes tratamentos, já que atualmente a recomendação terapêutica da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA, *Infectious Diseases Society of America*) permanece a mesma para as duas espécies (Byrnes *et al.* 2011a).

Nesse contexto, nossas análises dos efeitos dos antifúngicos tradicionais AMB e FLC por metodologias avançadas de bioimagem são de extrema importância. Dados referentes aos efeitos do FLC foram compatíveis com os obtidos pela metodologia de determinação de UFC, não apresentando efeitos significativos na contenção do patógeno na condição experimental. No entanto, considerando o tratamento com AMB, significativa diferença foi verificada em análises comparativas entre as metodologias de análise por imagem e de contagem de UFC. Dados referentes às técnicas mostraram uma tendência semelhante de redução na quantidade de patógeno no pulmão após 4 dias de tratamento. Após 7 dias de administração de AMB, uma tendência contínua de redução foi observada durante a análise de imagem, resultando numa diminuição substancial da quantidade de *C. gattii* presente nos pulmões. Contudo, a determinação

de CFU mostrou uma tendência contrária, de aumento na quantidade de patógeno nos pulmões no mesmo período de tratamento. Além disso, uma variação expressiva de 2.3 vezes na quantidade de células do patógeno comparando 5-8 dias de infecção também foi verificada durante a análise da progressão da infecção por *C. gattii* pelo método de bioimagem, que não foi detectada pela contagem de UFC.

Estas flutuações nos resultados pode ser consequência da variabilidade nas células recuperadas de órgãos macerados durante a metodologia de contagem de UFC, gerando dados imprecisos. Isso possivelmente é resultado de uma sequência de procedimentos robustos, laboriosos e sujeitos a erros de execução, de um estreito intervalo padrão de contagem e da influência de vários parâmetros relativos às características físicas, como o tamanho, a forma e as sobreposições colônias (Sutton *et al.* 2006; Goldman *et al.* 2009; Clarke *et al.* 2010; Brugger *et al.* 2012). Estas propriedades constituem limitações a essa técnica, podendo afetar a identificação do aumento ou da redução da quantidade de células em tecido pulmonar.

Por outro lado, o sistema de imagem baseado na emissão de fluorescência apresentou uma notável capacidade e sensibilidade de detectar a variação na emissão de fluorescência, resultando na identificação do aumento da quantidade de agente patogênico nos pulmões e a sua redução após 7 dias de tratamento com o antifúngico AMB. No entanto, é importante considerar o fato de que existe um mínimo de células necessário para a detecção do sinal de fluorescência que podem, eventualmente, estar ocultando uma oscilação na quantidade de células abaixo deste limite. Isto pode estar contribuindo para a discordância dos resultados obtidos a partir dos métodos de bioimagem por fluorescência e a determinação de UFC.

Além disso, existem alguns desafios associados ao sistema de análise por fluorescência, os quais envolvem a escolha do fluoróforo e o uso de equipamentos

apropriados. Em nossos estudos, mCherry provou possuir características técnicas adequadas, suportando o ambiente do hospedeiro sem prejudicar a patogenicidade do fungo. No entanto, apesar da expressão constitutiva desta proteína, algumas dificuldades foram enfrentadas durante detecção da imagem *in vivo* relativas à propagação da luz através do tecido e detecção pelo equipamento. Cromóforos endógenos, tais como a hemoglobina, são capazes de absorver luz até aproximadamente 600 nm, provavelmente impedindo a transmissão de luz através do tecido, reduzindo o sinal e tornando-se indetectáveis pelo aparelho IVIS Lumina (Andreu *et al.* 2011). Ao mesmo fato é atribuído o baixo sinal bioluminescente e, conseqüentemente, as dificuldades que Doyle e colaboradores (2008) obtiveram em monitorar *in vivo* a infecção causada por *C. Albicans*, em um sistema de bioluminescência no equipamento IVIS (Doyle *et al.* 2008; Brock *et al.* 2012). No entanto, Waterman e colaboradores (2012) obtiveram sucesso nas análises *in vivo* da expressão da proteína transportadora CTR4 fusionada a proteína fluorescente mCherry durante a infecção causada por *C. neoformans*. Nesse sistema, foi utilizado um equipamento similar ao IVIS Lumina II, conhecido como Maestro 2.2. A principal característica desse equipamento, e importante diferença para o IVIS Lumina II, é a presença de Filtro de Cristal Líquido Ajustável (LCTF, *Liquid Crystal Tunable Filter*), que possui uma faixa menor de passagem da frequência (20nm), transmitindo o comprimento de onda desejável, e rejeitando as que estão fora desse intervalo (PerkinElmer, 2013). Com isso, LCTF permite a obtenção de informações mais detalhadas do perfil de emissão de fluorescência e, portanto, sendo o responsável por proporcionar uma melhor resolução, velocidade e sensibilidade durante a detecção da imagem (Leblond *et al.* 2010; PerkinElmer, 2013a). No IVIS Lumina II, a composição base dos filtros de emissão padrão, os quais vêm acoplados ao sistema, possui uma faixa maior de passagem de frequência, aceitando comprimentos de ondas indesejáveis,

possivelmente reduzindo a resolução e sensibilidade, dificultando a captura da imagem (Caliper, 2008). O acréscimo nesse sistema de filtros específicos para o comprimento de onda do fluoróforo a ser analisado, como os filtros da série 500, série 600 e série 700 com faixa de passagem de frequência menor (20nm), possivelmente deve permitir a detecção do sinal durante análises *in vivo* (Caliper, 2008). Recentemente, no entanto, a empresa fornecedora PerkinElmer abdicou da venda do equipamento IVIS Lumina II, sendo disponibilizado atualmente no mercado o IVIS Lumina Series III (PerkinElmer, 2013b). Dessa forma, os avanços nas tecnologias e equipamentos têm-se revelado determinantes para o imageamento e monitoramento *in vivo* da infecção causada pela espécie *Cryptococcus*.

Alternativamente à utilização de mCherry como biomarcador, a proteína vermelha Katushka (Shcherbo *et al.* 2007) recentemente desenvolvida e utilizada para estudos *in vivo* apresenta propriedades bastante promissoras. Além de possuir um comprimento de onda de emissão mais elevado (635 nm), evitando a interferência dos cromóforos endógenos, esse fluoróforo apresenta maior fotoestabilidade, tempo de maturação mais rápido e 1.4 vezes mais brilho que a proteína mCherry, tornando-o um excelente biomarcador para análises *in vivo* (Andreu *et al.* 2011). Portanto, estudos subsequentes são necessários para o desenvolvimento de sondas otimizadas e detectores sensíveis o suficiente para a captação da imagem profunda no tecido e para a otimização e estabelecimento deste novo modelo. Dessa forma, o melhoramento constante dos biomarcadores, dos equipamentos e softwares asseguram avanços contínuos na investigação e entendimento de diversos sistemas patológicos.

5. REFERÊNCIAS

- Andreu, N.; Zelmer, A.; Wiles, S. Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 360-394, 2011.
- Baginski, M.; Czub, J. Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. *Curr Drug Metab*, 10: 459-69, 2009.
- Boekhout, T.; Theelen, B.; Diaz, M.; Fell, J. W.; Hop, W. C.; Abeln, E. C.; Dromer, F.; Meyer, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147: 891-907, 2001.
- Bovers, M.; Hagen, F.; Kuramae, E. E.; Boekhout, T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol*, 45: 400-21, 2008.
- Brock, M.; Jouvion, G.; Droin-Bergère, 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, 2008.
- Brock, M. Application of bioluminescence imaging for *in vivo* monitoring of fungal infections. *Int J Microbiol*, 2012: 1-9, 2012.
- Brugger, S. D.; Baumberg, C.; Jost, M.; Jenni, W.; Brugger, U.; Mühlemann, K. Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLoS One*, 7: e33695, 2012.
- Byrnes, E. J.; Bartlett, K. H.; Perfect, J. R.; Heitman, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*, 13: 895-907, 2011a.
- Byrnes, E. J.; Li, W.; Ren, P.; Lewit, Y.; Voelz, K.; Fraser, J. A.; Dietrich, F. S.; May, R. C.; Chaturvedi, S.; Chaturvedi, V.; Heitman, J. A diverse population of

Cryptococcus gattii molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. *PLoS Pathog*, 7: e1002205, 2011b.

Byrnes, E. J.; Heitman, J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol Rep*, 64: 1-4, 2009a.

Byrnes, E. J.; Li, W.; Lewit, Y.; Perfect, J. R.; Carter, D. A.; Cox, G. M.; Heitman, J. First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. *Plos One*, 4: 1-12, 2009b.

Casadevall, A.; Perfect, J. *Cryptococcus neoformans*. *ASM Press*, 1998.

Caliper, 2008. Disponível em

<http://www.thermofisher.com.au/Uploads/file/Scientific/Life-Science-Research-Technologies/In-Vivo-Imaging/In-vivo-Imaging-Systems/IVIS-LuminaII.pdf>

Calvo, E.; Pastor, F. J.; Rodríguez, M. M.; Pujol, I.; Guarro, J. Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 4074–4077, 2010.

Charlier, C.; Nielsen, K.; Daou, S.; Brigitte, M.; Chretien, F.; Dromer, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77: 120-7, 2009.

Chaturvedi, V.; Chaturvedi, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal. *Trends Microbiol*, 19: 564-71, 2011.

Chen, S. C.; Slavin, M. A.; Heath, C. H.; Playford, E. G.; Byth, K.; Marriott, D.; Kidd, S. E.; Bak, N.; Currie, B.; Hajkovicz, K.; Korman, T. M.; McBride, W. J.; Meyer, W.; Murray, R.; Sorrell, T. C. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis*, 55: 789-798, 2012.

- Chen, S.; Sorrell, T.; Nimmo, G.; Speed, B.; Currie, B.; Ellis, D.; Marriott, D.; Pfeiffer, T.; Parr, D.; Byth, K. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin Infect Dis*, 31: 499–508, 2000.
- Cheng, P. Y.; Sham, A.; Kronstad, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77: 4284-94, 2009.
- Chowdhary, A.; Randhawa, H. S.; Boekhout, T.; Hagen, F.; Klaassen, C. H.; Meis J. F. Temperate Climate Niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. *Emerg Infect Dis*, 18: 172–174, 2012.
- Chrisman, C. J.; Albuquerque, P.; Guimaraes, A. J.; Nieves, E.; Casadevall, A. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog*, 7: e1002047, 2011.
- Clarke, M. L.; Burton, R. L.; Hill, A. N.; Litorja, M.; Nahm, M. H; Hwang, J. Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry A*, 77: 790-7, 2010.
- Cogliati, M.; Chandrashekar, N.; Esposto, M. C.; Chandramuki, A.; Petrini, B.; Viviani, M. A. *Cryptococcus gattii* serotype-C strains isolated in Bangalore, Karnataka, India. *Mycoses*, 55: 262-8, 2012.
- Cogliati, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, 2013: 1-23, 2013.
- 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.

- Cox, G. M.; Harrison, T. S.; McDade, H. C.; Taborda, C. P.; Heinrich, G.; Casadevall, A.; Perfect, J. R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun*, 71: 173–180, 2003.
- Del Poeta, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 3: 1067-75, 2004.
- Diaz, M. R.; Boekhout, T.; Theelen, B. & Fell, J. W. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Syst Appl Microbiol*, 23: 535–545, 2000.
- Dong, Z. M.; Murphy, J. W. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect Immun*, 63: 2632–2644, 1995.
- 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. *Microb Pathog*, 40: 82-90, 2006.
- Eisenman, H. C.; Casadevall, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 93: 931-40, 2012.
- Feldmesser, M.; Kress, Y.; Novikoff, P.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun*, 68: 4225–4237, 2000.
- Fonseca, F. L.; Nohara, L. L.; Cordero, R. J.; Frases, S.; Casadevall, A.; Almeida, I. C.; Nimrichter, L.; Rodrigues, M. L. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infect Immun*, 78: 3861-70, 2010.

- Galanis, E.; Macdougall, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg Infect Dis*, 16: 251-257, 2010.
- Gazzoni, A. F.; Severo, C. B.; Salles, E. F.; Severo, L. C. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 51: 255-9, 2009.
- Goldman, E.; Green, L. H. Quantitation of Microorganisms. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 17-18, 2009.
- Goldman, D.; Lee, S. C.; Casadevall, A. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. *Infect Immun*, 62: 4755-61, 1994.
- Granger, D. L.; Perfect, J. R.; Durack, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest*, 76: 508–16, 1985.
- Guarner, J.; Brandt, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*, 24: 247-80, 2011.
- Guimarães, A. J.; Frases, S.; Cordero, R. J.; Nimrichter, L.; Casadevall, A.; Nosanchuk, J. D. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. *Cell Microbiol*, 12: 740-53, 2010.
- Hicks, J.K.; Heitman, J. Divergence of protein kinase A catalytic subunits in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* illustrates evolutionary reconfiguration of a signaling cascade. *Eukaryot Cell*, 6: 413-20, 2007.
- Jarvis, J. N.; Harrison, T. S. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, 21: 2119–2129, 2007.
- Jung, W. H.; Sham, A.; White, R.; Kronstad, J. W. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol*, 4: e410, 2006.

- Kidd, S. E.; Sorrell, T. C.; Meyer, W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from insect frass. *Medical Mycology*, 41: 171–176, 2003.
- Kidd, S. E.; Hagen, F.; Tscharke, R. L.; Huynh, M.; Bartlett, K. H.; Fyfe, M.; Macdougall, L.; 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*, 101: 17258–17263, 2004.
- Kidd, S. E.; Chow, Y.; Mak, S.; Bach, P. J.; Chen, H.; Hingston, A. O.; Kronstad, J.W.; Bartlett, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol*, 73: 1433–1443, 2007.
- Kmetzsch, L.; Staats, C. C.; Simon, E.; Fonseca, F. L.; de Oliveira, D. L.; Sobrino, L.; Rodrigues, J.; Leal, A. L.; Nimrichter, L.; Rodrigues, M. L.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. 2010. The vacuolar Ca(2)(+) exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca(2)(+) tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 9: 1798–1805, 2011.
- Kozubowski, L.; Heitman, J. Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 75: 658–675, 2010.
- Kontoyiannis, D. P., Lewis, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, 359: 1135–1144.19, 2002.
- Kraus, P. R.; Boily, M. J.; Giles, S. S.; Stajich, J. E.; Allen, A.; Cox, G. M.; Dietrich, F. S.; Perfect, J. R.; Heitman, J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic 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. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, 9: 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: 804–806, 2002.
- Kwon-Chung, K. J.; Rhodes, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 51: 218–223, 1986.
- Leblond, F.; Davis, S. C.; Valdés, P. A.; Pogue, B. W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B*. 98: 77-94, 2010.
- Lian, T.; Simmer, M. I.; D'Souza, C. A.; Steen, B. R.; Zuyderduyn, S. D.; Jones, S. J.; Marra, M. A.; Kronstad, J. W. Iron regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 55: 1452–72, 2005.
- Litvintseva, A. P., Thakur, R., Reller, L. B., and Mitchell, T. G. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis*, 192: 888–892, 2005.
- Ma, H.; Hagen, F.; Stekel, D. J.; Johnston, S. A.; Sionov, E.; Falk, R.; Polacheck, I.; Boekhout, T.; May, R. C. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 12980-5, 2009.
- Ma, H.; May, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology*, 67: 131-190, 2009.
- McFadden, D. C.; Jesus, M.; Casadevall, A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J. Biol. Chem*, 281: 1868–1875, 2006.

- McFadden, D. C.; Fries, B.C.; Wang, F.; Casadevall, A. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 6: 1464-73, 2007.
- Manicassamy, B.; Manicassamy, S.; Belicha-Villanueva, A.; Pisanelli, G.; Pulendran, B.; García-Sastre, A. Analysis of *in vivo* dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 11531–11536, 2010.
- Martins, L. M.; Wanke, B.; Lazera, M. S.; Trilles, L.; Barbosa, G. G.; Macedo, R. C. L.; Cavalcanti, M. A. S.; Eulálio, K. D.; Castro, J. A. F.; Silva, A. S.; Nascimento, F. F.; Gouveia, V. A.; Monte, S. J. H. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106: 725-730, 2011
- Meyer, W.; Castaneda, A.; Jackson, S.; Huynh, M.; Castaneda, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 9: 189–95, 2003.
- Narasipura, S.D.; Ault, J. G.; Behr, M. J.; Chaturvedi, V.; Chaturvedi, S. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol*, 47: 1681-94, 2003.
- Ngamskulrungraj, 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: 1-9, 2012.
- Ngamskulrungraj, P.; Himmelreich, U.; Breger, J. A.; Wilson, C.; Chayakulkeeree, M.; Krockenberger, M. B.; Malik, R.; Daniel, H. M.; Toffaletti, D.; Djordjevic, J. T.; Mylonakis, E.; Meyer, W.; Perfect, J. R. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun*, 77: 4584-96, 2009a.

- Ngamskulrungrroj, P.; Meyer, W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. *Australasian Mycologist*, 28: 9–15, 2009b.
- Ngamskulrungrroj, P.; Price, J.; Sorrell, T.; Perfect, J. R.; Meyer, W. *Cryptococcus gattii* virulence composite: candidate genes revealed by microarray analysis of high and less virulent Vancouver island outbreak strains. *PLoS One*, 6: e16076, 2011a.
- Ngamskulrungrroj, P.; Serena, C.; Gilgado, F.; Malik, R.; Meyer, W. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. *Clin Microbiol Infect*, 17: 251-8, 2011b.
- Okagaki, L. H.; Strain, A. K.; Nielsen J. N.; Charlier, C., Baltes, N. J.; Chrétien, F.; Heitman, J.; Dromer, F.; Nielsen, K.; Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog*, 6: e1000953, 2010.
- Park, B. J.; Wannemuehler, K. A.; Marston, B. J.; Govender, N.; Pappas, P. G.; Chiller, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23: 525-30, 2009.
- Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immuno Med Microbiol*, 45: 395–404, 2005. PerkinElmer. Maestro Series. 2013a. Disponível em <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Category/ID/Maestro%20Series>
- PerkinElmer. IVIS Lumina Series III. 2013b. Disponível em <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Category/ID/IVIS%20Lumina%20Series%200III>
- Qiu, Y.; Davis, M. J.; Dayrit, J. K.; Hadd, Z.; Meister, D. L.; Osterholzer, J. J.; Williamson, P. R.; Olszewski, M. A. Immune Modulation Mediated by Cryptococcal Laccase Promotes Pulmonary Growth and Brain Dissemination of Virulent *Cryptococcus neoformans* in Mice. *PLoS One*, 7: e47853, 2012.

- Ren, P.; Springer, D. J.; Behr, M.; Samsonoff, W. A.; Chaturvedi, S.; Chaturvedi, V. Transcription factor STE12a has distinct roles in morphogenesis, virulence and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell*, 5: 1065–1080, 2006.
- Rosa, E. S. L. K.; Staats, C. C.; Goulart, L. S.; Morello, L. G.; Pelegrinelli Fungaro, M. H.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol*, 159: 221–229, 2008.
- Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; La Sorda, M.; Torelli, R.; Fiori, B.; Santangelo, R.; Delogu, G.; Fadda, G. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 74: 1352-1359, 2006.
- Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22: 1567-1572, 2004.
- Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2: 905-909, 2005.
- Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci*, 120: 4247-4260, 2007.
- Shcherbo, D.; Merzlyak, E. M.; Chepurnykh, T. V.; Fradkov, A. F.; Ermakova, G. V.; Solovieva, E. A.; Lukyanov, K. A.; Bogdanova, E. A.; Zaraisky, A. G.; Lukyanov, S. & Chudakov, D. M. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods*, 4: 741–746, 2007.
- Shi, M.; Li, S. S.; Zheng, C.; Jones, G. J.; Kim, K. S.; Zhou, H.; Kubes, P.; Mody, C. H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest*, 120: 1683-93. 2010.

- Shi, M.; Calaruso, P.; Mody, C. H. Real-time in vivo imaging of fungal migration to the central nervous system. *Cell Microbiol.* 14: 1819-27. 2012.
- Springer, D. J.; Ren, P.; Raina, R.; Dong, Y.; Behr, M.J.; McEwen, B.F.; Bowser, S. S.; Samsonoff, W. A.; Chaturvedi, S.; Chaturvedi, V. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PLoS One*, 5: e10978, 2010.
- Springer, D.J.; Phadke, S.; Billmyre, B.; Heitman, J. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen? *Curr Fungal Infect Rep*, 6: 245-256, 2012.
- Sorrell, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*, 39: 155-168, 2001.
- Sutton, S. Counting Colonies. *Pharm. Microbiol Forum Newslett*, 12: 2, 2006.
- Toffaletti, D. L.; Rude, T. H.; Johnston, S. A.; Durack, D. T.; Perfect, J. R. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol*, 175: 1405–1411, 1993.
- Trilles, L.; Fernández-Torres, B.; Lazéra, M. S.; Wanke, B.; Guarro, J. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*, 42: 4815–4817, 2004.
- Troy, T.; Jekic-McMullen, D.; Sambucett, L.; Rice, B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging*, 3: 9-23, 2004.
- United States Food and Drug Administration. Yeasts, Molds and Mycotoxins. *Bacteriological Analytical Manual*. Capítulo 18, 2001. Disponível em <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm>

- United States Pharmacopeia. Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles. US Pharmacopeial Convention, USP-29, 1227: 3053-3055, 2006. Disponível em http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1227.html
- Vanbreuseghem, R.; Takashio, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. *nov.* *Ann. Soc. Belges. Med. Trop. Parasitol. Mycol.* 50: 695–702, 1970.
- Varma, A.; Kwon-Chung, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 2303-11, 2010.
- Vartivarian, S. E.; Anaissie, E. J.; Cowart, R. E.; Sprigg, H. A.; Tingler, M. J.; Jacobson, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis*, 167: 186–90, 1993.
- Waterman, S. R.; Park, Y. D.; Raja, M.; Qiu, J.; Hammoud, D. A.; O'Halloran, T. V.; Williamson, P. R.; Role of CTR4 in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, 3: 1-11, 2012.
- Fries, B. C.; Casadevall, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun*, 71: 6155–6164, 2003.
- 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.
- Zaragoza, O.; García-Rodas, R.; Nosanchuk, J. D.; Cuenca-Estrella, M.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Casadevall A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog*, 6: e1000945, 2010.