

NATULLY DE SOUZA SÜFFERT FOGAÇA

**MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE ZINCO EM MACRÓFAGOS
DURANTE A INTERAÇÃO COM *Cryptococcus neoformans***

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharela
em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

PORTO ALEGRE

2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Charley Christian Staats, que me recebeu no laboratório, me acompanhou durante toda iniciação científica e me auxiliou no desenvolvimento do trabalho. Obrigada por todo apoio e por todos os ensinamentos, e por sempre me elogiar e acreditar no meu potencial.

Aos professores Marilene Henning Vainstein e Augusto Schrank, que me acolheram no laboratório.

A Lívia, que me acompanhou durante toda iniciação científica, e que sempre esteve disposta a ajudar e ensinar da melhor maneira possível.

Aos colegas e amigos Rafael, Karoline, Moara e Vanessa, que foram grandes companheiros e sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis. Obrigada por todo apoio e carinho, e pelos momentos de descontração.

Aos colegas dos laboratórios 220 e 217, que de alguma maneira contribuíram para a realização do trabalho.

Aos colegas de graduação e amigos Carolina, Isabella, Lauryn, Rafael, Jordana e Luciana, que foram grandes companheiros durante todo o curso.

Ao meu namorado e à minha família, que sempre me apoiaram e incentivaram. Principalmente à minha mãe, que nunca me deixou duvidar do meu potencial e que se esforçou muito para que essa etapa fosse vencida mais tranquilamente.

RESUMO

A levedura basidiomicética *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, patologia que pode acometer diferentes órgãos do hospedeiro, incluindo pele, pulmões e sistema nervoso central. O ciclo infeccioso se inicia com a deposição de partículas infecciosas nas vias aéreas do hospedeiro. Neste ambiente, o micro-organismo se depara com diversas limitações impostas pelo hospedeiro para conter a progressão da infecção, sendo uma delas denominada imunidade nutricional, caracterizada pela criação de um ambiente com restrita disponibilidade de nutrientes. Visto que a privação de zinco constitui um exemplo de imunidade nutricional, os mecanismos de captação e metabolismo deste metal possivelmente estão relacionados ao processo de interação patógeno-hospedeiro. Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar a modulação da homeostase do metal zinco em macrófagos e a sua influência na atividade fungicida dessas células. Em ensaios de viabilidade celular de macrófagos murinos em concentrações crescentes de cloreto de zinco ($ZnCl_2$) ou do quelante de zinco DTPA, foi observada redução drástica da viabilidade celular apenas em concentrações de $ZnCl_2$ superiores a 500 μM . A taxa de desenvolvimento de *C. neoformans* foi alterada apenas na ausência de zinco (concentrações superiores a 50 μM de DTPA). Para avaliar se a privação de zinco influencia a atividade fungicida de macrófagos, realizamos testes de viabilidade de *C. neoformans* após a interação com células de macrófagos murinos. Observamos que a privação de zinco levou a menor atividade fungicida de macrófagos; entretanto, células de *C. neoformans* previamente tratadas com o quelante de zinco TPEN se mostraram mais sensíveis à atividade fungicida de macrófagos. Levando em consideração que a privação de zinco altera a sensibilidade de *C. neoformans* à atividade fungicida de macrófagos, foi realizada análise quantitativa dos níveis de transcritos de 10 genes da família ZnT e 4 genes da família ZIP de transportadores de zinco. Os genes ZnT-1, ZnT-5, ZnT-6 e ZnT-7 apresentaram uma redução significativa dos níveis relativos de transcritos após 3 ou 6 horas de interação com *C. neoformans*. Esta mesma redução foi observada para os níveis relativos dos transcritos referentes aos genes ZIP1, ZIP8, ZIP13 e ZIP14. Em ensaios para avaliar se ocorre mobilização de zinco intracelular em células de macrófagos durante a interação com *Cryptococcus*, não houve diferença significativa, sugerindo que os transportadores de zinco ZnT e ZIP não estão envolvidos na homeostase de zinco durante a infecção por *C. neoformans*, e que existem outros mecanismos que regulam a homeostase de zinco em macrófagos durante a infecção por essa levedura.

ABSTRACT

The basidiomycetic yeast *Cryptococcus neoformans* is the etiological agent of cryptococcosis, pathology that affects different organs in the host, including skin, lungs and central nervous system. The infectious cycle begins with the deposition of infective particles in the respiratory tract. In this environment, the microorganism faces several limitations imposed by the host to contain the spread of the infection, one of them called nutritional immunity, characterized by the creation of an environment with limited nutrient availability. Since zinc deprivation is one example of nutritional immunity, mechanisms of uptake and metabolism of this metal are possibly related to host-pathogen interaction. Hence, the aim of the present study was to evaluate the modulation of zinc homeostasis in macrophages and its influence on antifungal activity of these cells. To evaluate if external zinc availability affects the antifungal properties of macrophages, the cell viability of murine macrophages was assessed in increasing concentrations of zinc chloride (ZnCl_2) or zinc chelator DTPA; the cell viability was drastically decreased in ZnCl_2 concentrations above 500 μM . The growth rate of *C. neoformans* was altered in the lack of zinc (concentrations above 50 μM of DTPA). To evaluate if zinc deprivation affects the antifungal activity of macrophages, we performed viability tests of *C. neoformans* after interaction with macrophages. We observed that zinc deprivation led to lower antifungal activity; meanwhile, fungal cells pretreated with zinc chelator TPEN were more susceptible to antifungal activity of macrophages. Since zinc deprivation alters the sensitivity of *C. neoformans* to antifungal activity of macrophages, the relative transcript levels of 10 ZnT zinc transporters and 4 ZIP zinc transporters were quantified. ZnT-1, ZnT-5, ZnT-6 and ZnT-7 showed a significant decrease in expression after 3 and 6 hours of interaction with *C. neoformans* as well as ZIP1, 8, 13 and 14. We performed assays to evaluate if there is intracellular zinc mobilization in macrophages infected with *C. neoformans*, however the results had no statistical difference, suggesting that zinc transporters ZnT and ZIP are not involved in zinc homeostasis during cryptococcal infection, and that are other mechanisms involved in zinc homeostasis in macrophages during infection by *C. neoformans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus</i>	12
Figura 2. Mecanismos de interação com o sistema imune e disseminação para o sistema nervoso central.....	14
Figura 3. Localização subcelular dos transportadores de zinco das famílias ZIP e ZnT.	18
Figura 4. Análise da viabilidade celular de <i>Cryptococcus neoformans</i> em diferentes concentrações de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA.....	32
Figura 5. A disponibilidade de zinco altera as taxas fagocíticas e microbicidas de macrófagos contra <i>C. neoformans</i>	33
Figura 6. Análise da viabilidade celular de macrófagos em diferentes concentrações de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA.	34
Figura 7. Análise da viabilidade celular de <i>C. neoformans</i> na presença de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA.....	35
Figura 8. A privação de zinco torna <i>C. neoformans</i> mais suscetível à ação fungicida de macrófagos.....	36
Figura 9. O quelante de zinco TPEN não altera a viabilidade celular de <i>Cryptococcus neoformans</i> , mas torna as células fúngicas mais suscetíveis a atividade fungicida de macrófagos.....	37
Figura 10. A disponibilidade de zinco altera a taxa de fagocitose de <i>C. neoformans</i> por macrófagos.....	38
Figura 11. Avaliação quantitativa dos níveis relativos de transcritos de genes que codificam transportadores de zinco.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	adenosina trifosfato
ATP7	ATPases transportadoras de cobre tipo P
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CO ₂	dióxido de carbono
CP	ceruloplasmina
CTR	<i>copper transporter receptor 1</i>
Cu	cobre
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTPA	penta-acetato de dietilenotriamina
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GalXM	galactoxilomanana
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GXM	glucoroxilomanana
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
MEM	meio mínimo essencial
mL	mililitros
mM	milimolar
MTT	metil-tiazolil-tetrazólio
nm	nanômetros
NRAMP1	<i>natural resistance-associated macrophage protein one</i>
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino

pH	potencial hidrogeniônico
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino
UFC	unidades formadoras de colônia
YPD	<i>yeast-extract/peptone/dextrose</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
ZIP	<i>Zrt- and Irt-like proteins</i>
Zn	zinco
ZnCl ₂	cloreto de zinco
ZnT	<i>zinc transporter family</i>
μ M	micromolar
μ g	microgramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1	<i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	11
1.2	Resposta Imune à Criptococose	12
1.3	Imunidade Nutricional	14
1.3.1	Ferro.....	15
1.3.2	Cobre.....	16
1.3.3	Zinco.....	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
	ARTIGO CIENTÍFICO	21
	RESUMO	22
	ABSTRACT	23
1	INTRODUÇÃO	24
2	MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1	Linhagens celulares e meios de cultivo.....	26
2.2	Avaliação da viabilidade celular de macrófagos em condições de presença de zinco ou do quelante de zinco DTPA.....	26
2.3	Avaliação da viabilidade celular de <i>Cryptococcus neoformans</i> em condições de presença de zinco ou de quelantes de zinco.	27
2.4	Avaliação da atividade fungicida de macrófagos contra <i>C. neoformans</i> na presença de zinco ou de quelantes de zinco.	27
2.5	Avaliação do índice de fagocitose de <i>C. neoformans</i> por macrófagos na presença de zinco ou de quelantes de zinco.	28
2.6	Avaliação quantitativa da expressão de transportadores de zinco em células de macrófagos contendo células internalizadas de <i>C. neoformans</i>	29
2.7	Avaliação das concentrações de zinco intracelular em células de macrófagos contendo células internalizadas de <i>C. neoformans</i>	29
2.8	Análises Estatísticas.	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

REFERÊNCIAS	42
3 CONCLUSÃO	45
4 PERSPECTIVAS.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO GERAL

O grande avanço da medicina nos últimos anos vem acompanhado do aumento do número de transplantes, e conseqüentemente do uso de fármacos imunossupressores a fim de evitar a rejeição do órgão ou tecido transplantado. Associado a isto, o crescente número de casos de AIDS no mundo contribui para o aumento de infecções oportunistas. Uma das principais patologias fúngicas que acomete pacientes imunossuprimidos é a criptococose (Perfect, 2012), que tem como principais agentes etiológicos as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Em modelo murino de infecção, *Cryptococcus gattii* fica mais restrito ao pulmão, raramente se disseminando para o sistema nervoso central; já *Cryptococcus neoformans*, que possui tropismo pelo tecido cerebral, causa uma forma mais grave da doença, caracterizada por um quadro de meningoencefalite (Perfect, 2012).

Apesar da incidência da doença ter diminuído em países desenvolvidos após a introdução da terapia antirretroviral (Perfect *et al.*, 2010), estima-se que um milhão de pessoas no mundo sofram de meningite criptocócica e que mais de 60% morram três meses após o diagnóstico. A maioria dos casos está associada ao vírus HIV, sendo que 80% desses casos ocorrem na África Subsaariana (Sabiiti e May, 2012), onde ainda existe um alto índice de pacientes HIV-positivos não tratados. Sem o tratamento específico para meningite criptocócica, a taxa de mortalidade entre esses pacientes pode chegar a 100% duas semanas após o diagnóstico (Perfect *et al.*, 2010). Os casos persistentes em países desenvolvidos estão associados principalmente a pacientes recém-diagnosticados como portadores do vírus HIV, e pacientes em tratamento com altas doses de corticosteroides ou outras drogas imunossupressoras (Perfect *et al.*, 2010). No Brasil, a criptococose foi mencionada em 50,9% dos registros de morte em pacientes com AIDS entre 1996 e 2006, representando 23,9 casos a cada 1000 mortes relacionadas à AIDS, sendo predominante nas regiões Sul e Sudeste (Prado *et al.*, 2009).

A criptococose é de difícil tratamento, pois envolve uma combinação de fármacos antifúngicos com alto índice de efeitos colaterais ao paciente, como a anfotericina B, a flucitosina e o fluconazol. Além disso, a resistência a drogas fungicidas aumentou consideravelmente nas últimas três décadas (Simm *et al.*, 2011), principalmente na África, onde o fluconazol é amplamente prescrito profilaticamente e utilizado como monoterapia no tratamento da criptococose, o que torna cada vez mais necessária a descoberta de novas estratégias terapêuticas para a doença.

1.1 *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* são basidiomicetos que podem acometer pele, pulmões e sistema nervoso central do hospedeiro (Sorrell, 2001). Os principais fatores de virulência são a produção de cápsula polissacarídica, a produção de melanina, o desenvolvimento a 37°C (Perfect *et al.*, 1998) e a produção de enzimas extracelulares, como a fosfolipase B e a urease (Kronstad *et al.*, 2012). A cápsula polissacarídica é composta por glucoroxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas, as quais possuem propriedades imunomoduladoras, estimulando a resposta imunológica mediada por células T (Kronstad *et al.*, 2011). A melanina é um pigmento produzido pela enzima lacase, sendo considerado um mecanismo de adaptação a condições ambientais e de defesa contra a radiação ultravioleta, além de conferir proteção contra o sistema fagocítico e contra a ação de fármacos antifúngicos. A síntese da lacase é estimulada por vários fatores, incluindo o metabolismo de cobre (Mauch, Cunha e Dias, 2013). *Cryptococcus* é relativamente termotolerante em comparação com outros fungos, o que permite seu desenvolvimento a temperatura fisiológica de hospedeiros mamíferos (Kronstad *et al.*, 2011). A fosfolipase B garante a integridade da parede celular, além de contribuir para a invasão do tecido pulmonar e disseminação do fungo. A urease catalisa a hidrólise da ureia em amônia, o que parece facilitar a disseminação de *C. neoformans* para o sistema nervoso central, devido ao efeito tóxico da amônia nas células endoteliais dos capilares cerebrais (Singh *et al.*, 2013).

De acordo com antígenos presentes na cápsula polissacarídica, *C. neoformans* é sub-classificado em sorotipos A, D e AD, os quais acometem tipicamente pacientes imunocomprometidos, ou seja, é considerado um patógeno oportunista e tem distribuição mundial. Já *C. gattii* é sub-classificado nos sorotipos B e C, sendo sua distribuição mais comum em locais com clima tropical e subtropical, e acometendo pacientes imunocompetentes, ou seja, é um patógeno primário. Entretanto, apesar de *C. gattii* ser mais comum em locais com clima tropical e subtropical, emergiu na Ilha de Vancouver, na Columbia Britânica, em 1999, a linhagem hipervirulenta R265. Recentemente foi descrito que *C. gattii* está distribuído por várias regiões dos Estados Unidos (Marr, 2012), também apresentando casos na Europa (Hagen *et al.*, 2012), e que não tem predileção por pacientes imunocompetentes (Capilla *et al.*, 2006).

1.2 Resposta Imune à Criptococose

O processo de infecção inicia com a inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes em excretas de pombos, no solo ou em eucaliptos, que vão para o pulmão, se alojam nos alvéolos, causando pneumonia, e podem se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningoencefalite (Figura 1). Entretanto, a maioria dos esporos ou das leveduras dessecadas que são inaladas nem sequer chegam aos pulmões e são eliminadas devido à turbulência do ar e da ação ciliar. A pequena quantidade de propágulos infectivos que atingem o parênquima pulmonar desencadeia uma resposta inflamatória imunoprotetora, que envolve a produção de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), e um infiltrado leucocitário composto de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas (Cheng, Sham e Kronstad, 2009).

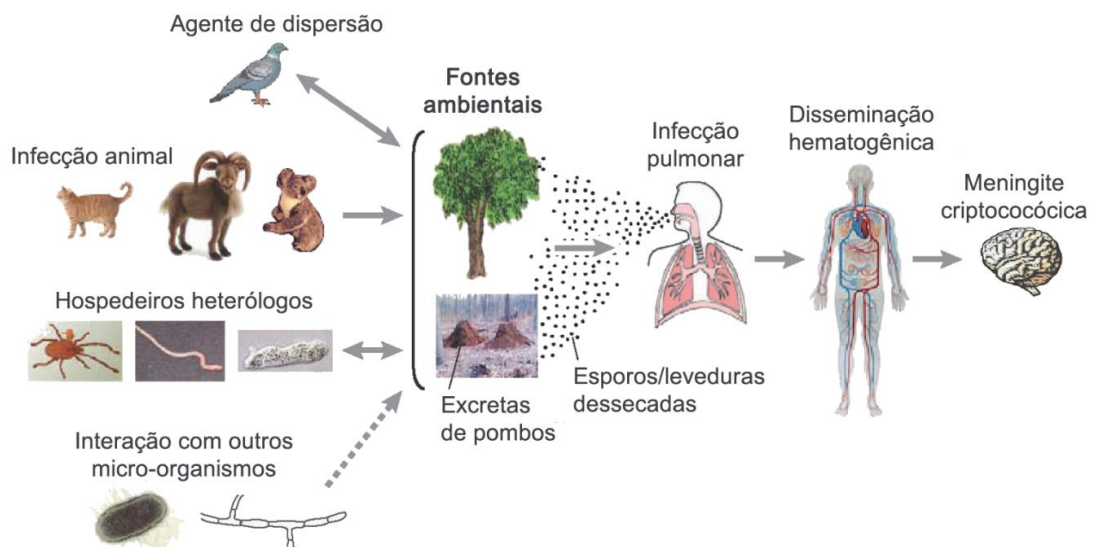


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Cryptococcus*.

O fungo sobrevive no solo geralmente associado a excretas de pombos e árvores, possuindo a capacidade de infectar outros hospedeiros, como gatos, coalas e cabras. Os pombos são considerados a principal forma de dispersão do fungo. A infecção ocorre por inalação de esporos ou células leveduriformes dessecadas, que se depositam nos alvéolos pulmonares, causando pneumonia, e podem se disseminar para o sistema nervoso central, por via hematogênica, causando uma forma mais grave da doença conhecida como meningoencefalite. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

Macrófagos são células do sistema imune especializadas na eliminação de patógenos por ingestão (fagocitose) e degradação, além de possuir outras funções, como produção de citocinas e quimiocinas e apresentação de antígeno (Nicola e Casadevall, 2012). Os macrófagos são essenciais para uma resposta imune eficaz contra *C. neoformans* (Mcquiston e Williamson, 2012), pois uma das primeiras linhas de defesa inata do hospedeiro contra infecções pulmonares são os macrófagos alveolares (Fan *et al.*, 2005). Existem três possibilidades após a fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos alveolares: (1) as células fúngicas são eliminadas em um esforço conjunto do sistema imune inato e adaptativo; (2) *C. neoformans* entra em estado de latência, podendo ser reativado e estabelecer o processo infeccioso, dependendo do estado imunológico em que o indivíduo se encontra; ou (3) *C. neoformans* sobrevive e estabelece a infecção pulmonar, podendo se disseminar para o sistema nervoso central (Mcquiston e Williamson, 2012). Uma vez internalizado, *C. neoformans* é capaz de se proteger de outros mecanismos de defesa inatos, tais como anticorpos, sistema complemento, soro, fatores imunes alveolares e até mesmo fármacos antifúngicos (Fan *et al.*, 2005). Além disso, também é capaz de se adaptar a um ambiente desfavorável do ponto de vista nutricional, modulando a expressão de genes envolvidos em diversos processos metabólicos, incluindo a homeostase de metais, como o ferro (Kronstad *et al.*, 2012).

Em pacientes imunocomprometidos, as células fúngicas podem ser transportadas dentro de macrófagos alveolares para o sistema nervoso central, o que permite sua disseminação sem o ataque completo do sistema imunológico (Sabiiti e May, 2012). Uma vez nos microcapilares cerebrais, as células fúngicas internalizadas atravessam o endotélio, sendo posteriormente expulsas no parênquima cerebral, mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”. As células fúngicas também podem alterar a sua morfologia para atravessar o endotélio; nesse processo, conhecido como transcitose direta, as células de *C. neoformans* adotam uma forma mais oval no local de interação com as células endoteliais (Kronstad *et al.*, 2011) (Figura 2).

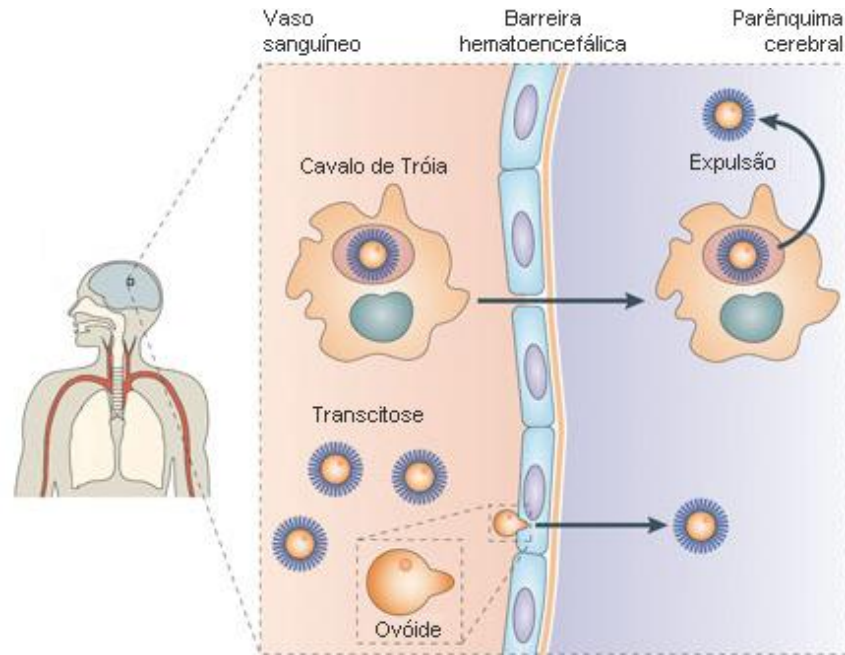


Figura 2. Mecanismos de interação com o sistema imune e disseminação para o sistema nervoso central.

Uma vez nos alvéolos pulmonares, as células fúngicas são fagocitadas, podendo ser transportadas dentro de macrófagos alveolares para o sistema nervoso central, o que permite sua disseminação sem o ataque completo do sistema imunológico. Uma vez nos microcapilares cerebrais, as células fúngicas internalizadas atravessam o endotélio, sendo posteriormente expulsas no parênquima cerebral, mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”. As células fúngicas também podem alterar a sua morfologia para atravessar o endotélio; nesse processo, conhecido como transcitose direta, as células de *C. neoformans* adotam uma forma mais oval no local de interação com as células endoteliais. Adaptado de (Kronstad *et al.*, 2011).

1.3 Imunidade Nutricional

Os metais de transição, como ferro, cobre e zinco, estão envolvidos em muitos processos biológicos importantes, portanto são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos. Estes metais são frequentemente incorporados em metaloenzimas, proteínas de armazenamento e fatores de transcrição (Hood e Skaar, 2012). Em microorganismos patogênicos, além de participar de diversos processos bioquímicos comuns a todos os organismos, íons metálicos participam da regulação de fatores de virulência e defesa contra estresse oxidativo. Portanto, para conter um processo infeccioso, o hospedeiro pode depletar alguns nutrientes, como glicose, ferro e zinco, para dificultar o crescimento de microorganismos; essa limitação imposta pelo hospedeiro é conhecida como imunidade nutricional (Cassat e Skaar, 2012). Além disso, o hospedeiro pode reter metais no interior da célula, tornando o ambiente intracelular tóxico para as células microbianas (Hood e Skaar, 2012).

1.3.1 Ferro

O ferro é o quarto elemento mais abundante na Terra, e o metal de transição mais abundante no corpo humano. Ele é essencial para todos os organismos vivos, pois atua como cofator de diversas enzimas, regulando, portanto, diversos processos fisiológicos como replicação do DNA, transcrição e vias metabólicas básicas (Hood e Skaar, 2012). A resistência natural a infecções é um mecanismo de proteção que depende de níveis extremamente baixos de ferro livre nos tecidos e fluidos corporais (Bullen *et al.*, 2006), mantidos por proteínas ligadoras de ferro, como transferrina e lactoferrina (Schaible e Kaufmann, 2004). Além de ser responsável pelo transporte de ferro como fonte de nutriente para a célula do hospedeiro, a transferrina também é responsável pelo sequestro de ferro no plasma e no líquido cefalorraquidiano (Weinberg, 2009), sendo uma das principais moléculas de defesa contra a invasão de micro-organismos (Schaible e Kaufmann, 2004).

Em macrófagos murinos, uma proteína de membrana endossomal tardia, conhecida como NRAMP1, realiza o transporte de ferro de compartimentos endossomais para o citoplasma, demonstrando ter um papel importante na resposta imune inata contra vários agentes patogênicos. Camundongos com uma mutação no gene *Nramp1* se mostraram mais suscetíveis a infecções. Essa proteína também pode atuar como fonte de ferro para a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Schaible e Kaufmann, 2004).

Em *Candida albicans* a privação de ferro induz redução do crescimento (Holbein e Mira De Orduña, 2010), e regula negativamente a expressão do gene *ERG11*, que codifica a enzima lanosterol 14- α desmetilase (Prasad *et al.*, 2006), responsável pela produção de ergosterol, importante constituinte da membrana fúngica (Zhang *et al.*, 2010). A redução da síntese de ergosterol resulta no aumento da fluidez da membrana celular, facilitando a difusão passiva de diversos fármacos, incluindo os antifúngicos fluconazol e nistatina, o que torna as células fúngicas mais suscetíveis a esses fármacos (Prasad *et al.*, 2006).

Sideróforos são pequenas moléculas ligadoras de ferro (Kronstad *et al.*, 2012) produzidas e exportadas por bactérias, fungos e plantas durante períodos de privação de nutrientes (Zheng e Nolan, 2012). O gene *SIDI* codifica a enzima L-ornitina monoxigenase, que catalisa a primeira etapa da produção de sideróforo em diversos fungos (Hwang *et al.*, 2008). Em *Histoplasma capsulatum*, o silenciamento de *SIDI* por RNAi tornou as células fúngicas incapazes de crescer em condições de privação de ferro, além de reduzir a virulência

em modelo murino de infecção pulmonar e o crescimento intracelular em macrófagos. (Hilty, George Smulian e Newman, 2011)

Em *C. neoformans*, o fator de transcrição Cir1 regula a expressão de genes envolvidos no transporte e na homeostase de ferro, além de regular a produção de melanina e a formação da cápsula polissacarídica (Choi *et al.*, 2012). O ferro é essencial para a disseminação para o sistema nervoso central; a privação de ferro reduz a produção de melanina e a capacidade de crescimento a 37°C, e induz defeitos na formação da cápsula polissacarídica (Kronstad *et al.*, 2012).

1.3.2 Cobre

O cobre é um metal de transição necessário para o crescimento fúngico, além de ser sequestrado por tampões biológicos e proteínas do hospedeiro, o que sugere um cenário de competição entre o patógeno e o hospedeiro pelo cobre disponível. Pacientes com AIDS encontram-se em desvantagem, visto que têm mostrado níveis elevados de cobre no soro (Waterman *et al.*, 2007). Apesar de sua grande importância tanto para o patógeno quanto para o hospedeiro, a concentração de cobre no organismo deve ser finamente regulada, pois o excesso de cobre possui grande potencial de se tornar tóxico para as células por sua capacidade reversível de doar e receber elétrons (Rees e Thiele, 2004), produzindo espécies reativas de oxigênio (Waterman *et al.*, 2012), e causando danos a proteínas, lipídios e DNA (Rees e Thiele, 2004).

Em macrófagos, a homeostase de cobre é mantida principalmente pelas proteínas CTR (CTR1/SLC31A1 e CTR2/SLC31A2), ATP7 (ATP7A e ATP7B) e Ceruloplasmina (CP). CTR1 é responsável pelo transporte de cobre da membrana plasmática para compartimentos endossomais quando os níveis de cobre extracelular encontram-se elevados; já CTR2 é expresso principalmente em vesículas intracelulares, incluindo endossomos e lisossomos. Normalmente ATP7A está localizada no aparelho de Golgi; quando as células são expostas a concentrações elevadas de cobre, ATP7A é responsável por exportar o excesso de cobre. LPS e IFN- γ aumentam a expressão de *Atp7a*; macrófagos induzidos por IFN- γ podem utilizar *Atp7a* para direcionar cobre para o fagossomo a fim de intoxicar o patógeno com o excesso de cobre. ATP7B é muito similar funcionalmente e estruturalmente a ATP7A (Stafford *et al.*, 2013), ou seja, também regula a concentração intracelular de cobre removendo o excesso do

metal de dentro da célula (Linz e Lutsenko, 2007), mas sua expressão não foi detectada em macrófagos murinos (Stafford *et al.*, 2013). A Ceruloplasmina (CP) é uma oxidase multicobre amplamente distribuída em vertebrados; é uma proteína de fase aguda e vários estímulos pró-inflamatórios, incluindo IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α e LPS, induzem a síntese de CP. Mais de 95% do cobre no soro de mamíferos está ligado à CP, sendo o restante ligado à albumina e outras proteínas (Stafford *et al.*, 2013).

A importância da homeostase do cobre em *C. neoformans* está relacionada à dependência de cobre por pelo menos dois fatores de virulência, a Cu/Zn superóxido dismutase e a enzima lacase (Waterman *et al.*, 2007). Além disso, o cobre pode afetar a homeostase de ferro, visto que o transportador de ferro de alta afinidade *Fet3* requer cobre como substrato (Waterman *et al.*, 2012). O cobre também parece ter importância terapêutica, pois estudos recentes propõem que a microplusina, um peptídeo quelante de cobre, apresenta potencial terapêutico contra a criptococose (Silva *et al.*, 2011). A deficiência de cobre em *C. neoformans* provoca redução do crescimento, defeitos na formação da cápsula e redução da produção de melanina, além de aumentar a taxa de fagocitose por macrófagos (Waterman *et al.*, 2012).

1.3.3 Zinco

A função de muitas proteínas depende do papel essencial do zinco, que age como um constituinte catalítico e como componente central de motivos estruturais (Eide, 2006); além disso, o zinco é essencial para o adequado funcionamento de quase todas as células do sistema imune (Wilson, Citiulo e Hube, 2012), e desempenha um papel importante na produção de citocinas (Haase e Rink, 2009).

A homeostase de zinco em mamíferos é mantida por diferentes proteínas envolvidas na captação, na excreção, no armazenamento e na distribuição de zinco; essas proteínas são proteínas de membrana que pertencem às famílias ZIP (*Zrt- and Irt-like proteins SLC39*) e ZnT (*Zinc Transporters SLC30*). A principal função dessas proteínas é fornecer zinco a proteínas recém-sintetizadas, importantes para diversas funções como expressão gênica, imunidade, reprodução ou proteção contra danos causados por radicais livres (Chimienti *et al.*, 2003). Os 14 membros da família ZIP transportam zinco do espaço extracelular ou de organelas para o citoplasma; os 10 transportadores da família ZnT realizam o efluxo de zinco

do citoplasma (Haase e Rink, 2009) para dentro de compartimentos intracelulares, como endossomos, grânulos secretórios, vesículas sinápticas, aparelho de Golgi, ou através da membrana plasmática (Palmiter e Huang, 2004). (Figura 3)

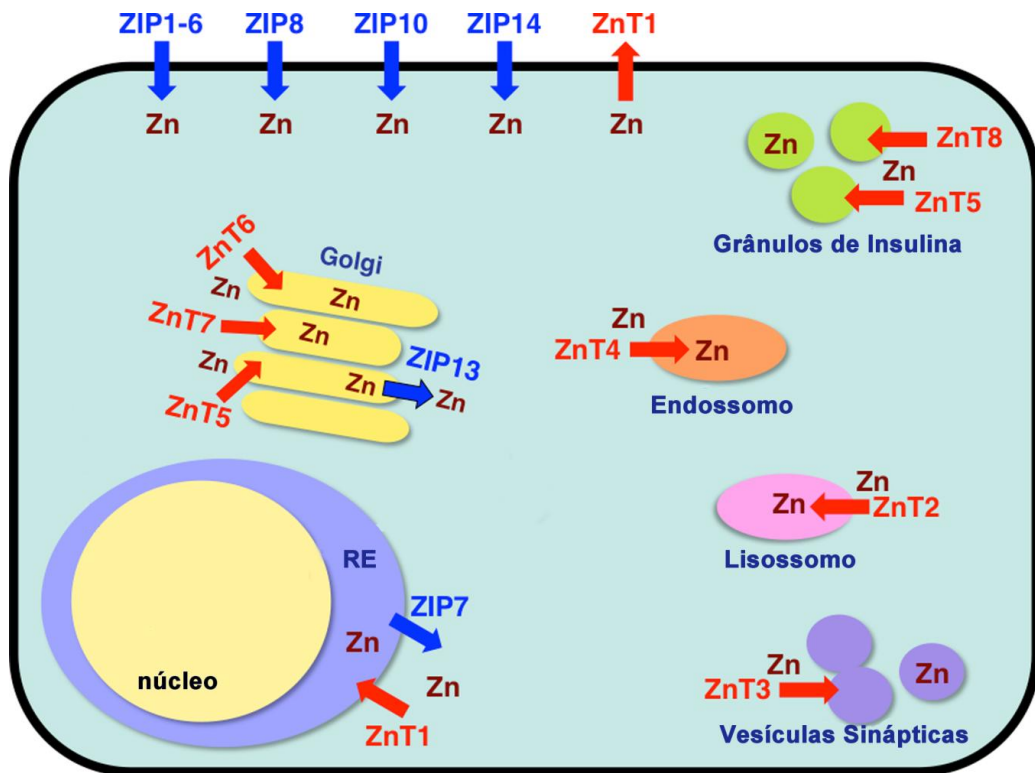


Figura 3. Localização subcelular dos transportadores de zinco das famílias ZIP e ZnT.

Localização e função dos transportadores de zinco da família ZIP (azul) e da família ZnT (vermelho). As flechas representam a direção predita da mobilização de zinco. Os transportadores de zinco da família ZIP transportam zinco do espaço extracelular ou de organelas para dentro do citoplasma; já os transportadores de zinco da família ZnT transportam zinco do citoplasma para dentro de compartimentos intracelulares, como endossomos, grânulos secretórios, vesículas sinápticas, aparelho de Golgi, ou através da membrana plasmática. RE: retículo endoplasmático. Adaptado de (Fukada *et al.*, 2011).

Entretanto, durante processos infecciosos, a homeostase de zinco pode ser alterada. Níveis séricos de zinco ligeiramente abaixo do normal parecem estar associados a uma melhor função fagocítica, e podem conter a disseminação de muitos micro-organismos (Kitamura *et al.*, 2006). Macrófagos infectados por *H. capsulatum* utilizam a privação de zinco como mecanismo de defesa (Winters *et al.*, 2010). Macrófagos também podem aumentar os níveis intracelulares de zinco, tornando o metal tóxico para o patógeno; macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* acumulam zinco no fagossomo como mecanismo de defesa (Botella *et al.*, 2011).

Recentemente, demonstramos que o adequado metabolismo de zinco em *C. gattii* é fundamental para o seu potencial infectivo (Schneider *et al.*, 2012). Entretanto, ainda não são plenamente conhecidos os mecanismos pelo qual macrófagos, elementos chaves no processo de defesa do hospedeiro contra a criptococose, elaboram um diferenciado metabolismo de zinco para conter a disseminação de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*. Frente ao papel essencial do zinco e à escassez de estudos sobre o metabolismo de zinco em *C. neoformans*, torna-se necessário o maior conhecimento do metabolismo desse metal na interação patógeno-hospedeiro, como promissor alvo para novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente projeto teve como objetivo avaliar a modulação da homeostase do metal zinco em macrófagos e a sua influência na atividade fungicida de macrófagos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a viabilidade celular de macrófagos em condições de presença de zinco ou de quelantes de zinco;

Avaliar a viabilidade celular de *C. neoformans* em condições de presença de zinco ou de quelantes de zinco;

Avaliar a atividade fungicida de macrófagos contra *C. neoformans* em condições de presença de zinco ou de quelantes de zinco;

Avaliar a concentração intracelular de zinco em células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans*;

Avaliar quantitativamente a expressão de transportadores de zinco em células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans*.

ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Modulação da Homeostase de Zinco na Interação Patógeno-Hospedeiro” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *BIOMETALS*. Para facilitar a análise, as figuras e suas respectivas legendas são apresentadas junto ao corpo do texto.

MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE ZINCO NA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

Modulation of Zinc Homeostasis in Host-Pathogen Interaction

Natully de Souza Süffert Fogaça^{1,*}, Karoline Flach¹, Rafael de Oliveira Schneider¹, Augusto Schrank^{1,2}, Marilene Henning Vainstein^{1,2}, Charley C. Staats^{1,2,**}.

¹Centro de Biotecnologia e ²Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

(*) E-mail: nfogaca@live.com

(**) Correspondência: Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 220. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Telefone +55 51 3308 6091; Fax +55 51 3308 7309.

E-mail: staats@cbiot.ufrgs.br

RESUMO

A levedura *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, patologia que pode acometer diferentes órgãos do hospedeiro, incluindo pele, pulmões e sistema nervoso central. O ciclo infeccioso inicia com a deposição de partículas infecciosas nas vias aéreas do hospedeiro. Neste ambiente, o micro-organismo se depara com diversas limitações impostas pelo hospedeiro para conter a progressão da infecção, sendo uma delas denominada imunidade nutricional, caracterizada pela criação de um ambiente com restrita disponibilidade de nutrientes. Visto que a privação de zinco constitui um exemplo de imunidade nutricional, os mecanismos de captação e metabolismo deste metal possivelmente estão relacionados ao processo de interação patógeno-hospedeiro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da homeostase de zinco em macrófagos e a sua influência na atividade fungicida de macrófagos. Observamos que a privação de zinco levou a menor atividade fungicida dos

macrófagos, entretanto células de *C. neoformans* previamente tratadas com o quelante de zinco TPEN se mostraram mais sensíveis à atividade fungicida de macrófagos. Como a privação de zinco altera a sensibilidade de *C. neoformans* à atividade fungicida de macrófagos, foi realizada análise quantitativa dos níveis de transcritos de 10 genes da família ZnT e 4 genes da família ZIP de transportadores de zinco. ZnT-1, 5, 6 e 7 apresentaram uma redução significativa da expressão após 3 e 6 horas de interação com *C. neoformans*, assim como ZIP1, 8, 13 e 14, sugerindo que existem outros mecanismos que regulam a homeostase de zinco em macrófagos durante a infecção por *C. neoformans*.

Palavras-chave: *Cryptococcus*. Macrófagos. Zinco. Transportadores de Zinco.

ABSTRACT

The basidiomycetic yeast *Cryptococcus neoformans* is the etiological agent of cryptococcosis, pathology that affects different organs in the host, including skin, lungs and central nervous system. The infectious cycle begins with the deposition of infective particles in the respiratory tract. In this environment, the microorganism faces several limitations imposed by the host to contain the spread of the infection; one of them is called nutritional immunity, characterized by the creation of an environment with limited nutrient availability. Since zinc deprivation is one example of nutritional immunity, mechanisms of uptake and metabolism of this metal are possibly related to host-pathogen interaction. Hence, the aim of the present study was to evaluate the modulation of zinc homeostasis in macrophages and its influence on antifungal activity of these cells. We observed that zinc deprivation led to lower fungicidal activity of macrophages, but fungal cells pretreated with zinc chelator TPEN were more sensitive to the antifungal activity of macrophages. Since zinc deprivation alters the susceptibility of *C. neoformans* to antifungal activity of macrophages, the relative transcript levels of 10 ZnT zinc transporters and 4 ZIP zinc transporters were quantified. ZnT-1, 5, 6 and 7 showed a significant decrease in expression after 3 and 6 hours of interaction with *C. neoformans* as well as ZIP1, 8, 13 and 14, suggesting that are other mechanisms involved in zinc homeostasis in macrophages during infection by *C. neoformans*.

Keywords: *Cryptococcus*. Macrophages. Zinc. Zinc Transporters.

1 INTRODUÇÃO

O grande avanço da medicina nos últimos anos vem acompanhado do aumento do número de transplantes, e conseqüentemente do uso de fármacos imunossupressores a fim de evitar a rejeição do órgão ou tecido transplantado. Associado a isto, o crescente número de casos de AIDS no mundo contribuiu para o aumento de infecções oportunistas. Uma das principais patologias que acomete pacientes imunossuprimidos é a criptococose (Perfect, 2012), que tem como principais agentes etiológicos as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. É estimado que um milhão de pessoas no mundo sofram de meningite criptococócica e que mais de 60% morram 3 meses após o diagnóstico (Sabiiti and May, 2012). A criptococose é de difícil tratamento, pois envolve uma combinação de fármacos antifúngicos extremamente tóxicos. Além disso, o aumento da resistência a drogas fungicidas aumentou consideravelmente nas últimas três décadas (Simm *et al.*, 2011), o que torna cada vez mais necessária a descoberta de novas estratégias terapêuticas para a doença.

C. neoformans e *C. gattii* são leveduras basidiomicéticas que podem acometer pele, pulmões e sistema nervoso central do hospedeiro (Sorrell, 2001). O processo de infecção inicia com a inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes em excretas de pombos, no solo ou em eucaliptos, que vão para o pulmão, se alojam nos alvéolos, causando pneumonia, e podem se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningoencefalite. Eventualmente a levedura é fagocitada por macrófagos, comportando-se como patógeno intracelular (Mitchell, 2006), podendo permanecer dormente por um longo período de tempo (Hagen *et al.*, 2012). Os principais fatores de virulência são a produção de cápsula polissacarídica, a produção de melanina, o crescimento a 37°C (Perfect *et al.*, 1998) e a produção de algumas enzimas, como fosfolipase, urease e superóxido dismutases (Kronstad *et al.*, 2012).

De acordo com antígenos presentes na cápsula polissacarídica, *C. neoformans* é sub-classificado em sorotipos A, D e AD, e acomete tipicamente pacientes imunocomprometidos, ou seja, é considerado um patógeno oportunista e tem distribuição mundial. Já *C. gattii* é sub-classificado em sorotipos B e C, sendo mais comum em locais com clima tropical e subtropical, e acomete pacientes imunocompetentes, ou seja, é um patógeno primário. Entretanto, apesar de *C. gattii* ser isolado com maior frequência em locais com clima tropical e subtropical, emergiu na Ilha de Vancouver, na Columbia Britânica, em 1999, a linhagem hipervirulenta R265, responsável por um surto de criptococose em pacientes hígidos naquela

região (Bartlett *et al.*, 2012). Recentemente foi descrito que *C. gattii* está distribuído por várias regiões dos EUA (Marr, 2012), também apresentando casos na Europa (Hagen *et al.*, 2012), e que não tem predileção por pacientes imunocompetentes (Capilla *et al.*, 2006).

Os metais de transição, como ferro, cobre e zinco, estão envolvidos em muitos processos biológicos importantes, portanto são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos. Estes metais são frequentemente incorporados em metaloenzimas, proteínas de armazenamento e fatores de transcrição (Hood and Skaar, 2012). Em micro-organismos patogênicos, além de participar de diversos processos bioquímicos comuns a todos os organismos, íons metálicos participam da regulação de fatores de virulência e defesa contra estresse oxidativo. Portanto, para conter um processo infeccioso, o hospedeiro pode diminuir a biodisponibilidade de alguns nutrientes, como glicose, ferro e zinco, para dificultar o crescimento de micro-organismos; essa limitação imposta pelo hospedeiro é conhecida como imunidade nutricional (Cassat and Skaar, 2012). Em *Candida albicans*, a privação de ferro induz redução do crescimento (Holbein and Mira de Orduña, 2010) e aumenta a suscetibilidade ao fluconazol (Prasad *et al.*, 2006). *Histoplasma capsulatum* depende de ferro para o crescimento intracelular em macrófagos (Hilty *et al.*, 2011). Em *C. neoformans*, o ferro é essencial para a disseminação para o SNC; a privação de ferro reduz a produção de melanina e a capacidade de crescimento a 37°C, e induz defeitos na formação da cápsula polissacarídica (Kronstad *et al.*, 2012). A deficiência de cobre em *C. neoformans* provoca redução do crescimento, defeitos na formação da cápsula e redução da produção de melanina, além de aumentar a taxa de fagocitose por macrófagos (Waterman *et al.*, 2012).

A função de muitas proteínas depende do papel essencial do zinco, que age como um constituinte catalítico e como componente central de motivos estruturais. Macrófagos infectados por *H. capsulatum* utilizam a privação de zinco como mecanismo de defesa (Winters *et al.*, 2010). Recentemente, demonstramos que o adequado metabolismo de zinco em *C. gattii* é fundamental para o seu potencial infectivo (Schneider *et al.*, 2012). Entretanto, ainda não são plenamente conhecidos os mecanismos pelo qual macrófagos, elementos chaves no processo de defesa do hospedeiro contra a criptococose, elaboram um diferenciado metabolismo de zinco para conter a disseminação de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*. Frente ao papel essencial do zinco e à escassez de estudos sobre o metabolismo de zinco em *C. neoformans*, torna-se necessário o maior conhecimento do metabolismo desse metal na interação patógeno-hospedeiro, como promissor alvo para novas estratégias terapêuticas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Linhagens celulares e meios de cultivo.

Para o desenvolvimento do projeto foi utilizada a linhagem H99 de *C. neoformans*, que foi rotineiramente cultivada em meio YPD (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura) ou YNB (*Yeast Nitrogen Base* – Difco), e incubada em plataforma giratória (200 RPM) na temperatura de 30°C. As linhagens celulares RAW264.7 e J774.1 de macrófagos murinos foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, HEPES 10 mM, MEM aminoácidos não-essenciais 1x, penicilina 20 U/mL e estreptomicina 20 µg/mL, e incubadas a 37°C em ambiente umidificado contendo 5% ou 7,5% de CO₂.

2.2 Avaliação da viabilidade celular de macrófagos em condições de presença de zinco ou do quelante de zinco DTPA.

Foram realizados cultivos de macrófagos RAW264.7 na presença de zinco (ZnCl₂) ou do quelante de zinco penta-acetato de dietilenotriamina (DTPA) em concentrações crescentes, e a avaliação da viabilidade celular foi realizada por ensaio de redução de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT), de acordo com metodologia previamente descrita (Morgan, 1998). Este ensaio se baseia na redução do MTT a formazan, que possui uma coloração azul-violeta, pela ação de desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas (Stockert *et al.*, 2012). Os macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM acrescido de concentrações crescentes de ZnCl₂ ou DTPA, e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com MTT (100 µg/mL em água milli-Q) por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. O MTT foi retirado e DMSO foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan e para posterior determinação da absorbância em espectrofotômetro de placas (Spectramax M5) nos comprimentos de onda de 560 nm e 670 nm (*background*).

2.3 Avaliação da viabilidade celular de *Cryptococcus neoformans* em condições de presença de zinco ou de quelantes de zinco.

A linhagem H99 de *Cryptococcus neoformans* foi cultivada em placas *deep well* contendo YNB ou YNB acrescido de concentrações crescentes de ZnCl₂ ou do quelante de zinco DTPA, ou ambos em concentrações equivalentes. Após 24 horas de cultivo a densidade óptica (600 nm) foi determinada. Para avaliar a viabilidade celular de *C. neoformans* na presença do quelante de zinco N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino (TPEN), a linhagem H99 foi cultivada em placa *deep well* contendo YPD, YDP acrescido de 10 µM de TPEN ou YPD acrescido de 10 µM de TPEN e concentrações crescentes de ZnCl₂. Após 24 horas de cultivo a densidade óptica (600 nm) foi determinada.

A viabilidade celular de *C. neoformans* também foi avaliada em condições que mimetizam a interação com macrófagos. 10⁷ células/mL de *C. neoformans* foram cultivadas em placa de 96 poços contendo DMEM, DMEM acrescido de 50 µM de ZnCl₂, DMEM acrescido de 100 µM de DTPA ou DMEM acrescido de 50 µM de ZnCl₂ e 100 µM de DTPA. Após 20 horas de cultivo a 37°C e 7,5% de CO₂, os poços foram lavados com PBS e as células fúngicas semeadas em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

2.4 Avaliação da atividade fungicida de macrófagos contra *C. neoformans* na presença de zinco ou de quelantes de zinco.

Para avaliação do efeito da presença de zinco ou de quelantes de zinco na atividade fungicida de macrófagos, ensaios de fagocitose foram realizados, de acordo com protocolo previamente descrito (Nicola and Casadevall, 2012) e adaptado. Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e induzidos com 0,5 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) e 100 U/mL de interferon-gama (IFN-γ). Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 (10 µg/mL, 1 hora a 37°C), o qual reconhece o componente majoritário da cápsula polissacarídica GXM, e inoculadas na proporção 10:1 (para cada macrófago são inoculadas 10 células de *C. neoformans*). A interação foi realizada em DMEM, DMEM contendo 50 µM de ZnCl₂,

DMEM contendo 50 μM de ZnCl_2 e 100 μM de DTPA ou DMEM contendo apenas 100 μM de DTPA. IFN- γ e LPS foram adicionados em todas as condições. Após 20 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS para remover os macrófagos não aderidos e as células de *C. neoformans* não fagocitadas, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

A atividade fungicida de macrófagos também foi avaliada com a pré-incubação das células de *C. neoformans* em YPD, YPD contendo 100 μM de ZnCl_2 , YPD contendo 100 μM de DTPA, YPD contendo 10 μM de TPEN ou YPD contendo 50 μM de ZnCl_2 e 10 μM de TPEN. As células foram lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. A interação foi realizada apenas em DMEM contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de IFN- γ e 100 U/mL de LPS. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS para remover os macrófagos não aderidos e as células de *C. neoformans* não fagocitadas, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

2.5 Avaliação do índice de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos na presença de zinco ou de quelantes de zinco.

Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM, e induzidos com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e 100 U/mL de IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram pré-incubadas *overnight* em YPD, YPD contendo 100 μM de ZnCl_2 , YPD contendo 10 μM de TPEN ou YPD contendo 10 μM de TPEN e 100 μM de ZnCl_2 . As células foram lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7, coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC – 500 $\mu\text{g/mL}$ em PBS) e inoculadas na proporção 10:1. A interação foi realizada apenas em DMEM contendo IFN- γ e LPS. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS para remover os macrófagos não aderidos e as células de *C. neoformans* não fagocitadas, e *trypan blue* foi adicionado nos poços em uma concentração final de 400 $\mu\text{g/mL}$, com o objetivo de bloquear a emissão de fluorescência proveniente das células fúngicas não internalizadas. A leitura e a quantificação da fluorescência foram

realizadas no equipamento Spectramax M5 (λ de excitação de 494 nm e λ de emissão de 518 nm).

2.6 Avaliação quantitativa da expressão de transportadores de zinco em células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans*.

Para avaliação da expressão dos 10 transportadores de zinco da família ZnT (*SLC30*) e de 4 transportadores da família ZIP (*SLC39*), identificados pelos genes presentes no genoma de *Mus musculus*, foi realizado PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Os macrófagos foram cultivados em DMEM, DMEM contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de IFN- γ e 100 U/mL de LPS ou DMEM contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de IFN- γ , 100 U/mL de LPS e *C. neoformans*. Após 3 ou 6 horas de interação a 37°C e 5% de CO₂, o RNA dos macrófagos foi isolado com reagente Trizol® (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. A síntese de cDNA, o PCR em tempo real e a quantificação da expressão relativa dos genes foi realizada com protocolos já descritos e utilizados no laboratório (Schneider *et al.*, 2012).

2.7 Avaliação das concentrações de zinco intracelular em células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans*.

Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de IFN- γ e 100 U/mL de LPS. Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. A interação foi realizada apenas em DMEM contendo IFN- γ e LPS. Após 2 ou 24 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO₂, os poços foram lavados com PBS para remover os macrófagos não aderidos e as células de *C. neoformans* não fagocitadas, o sistema foi lisado com tampão de lise (Tris-HCl 62 mM pH 6,8 e SDS 2%) e transferido para placa de 96 poços com fundo preto. FluoZin 3 foi adicionado nos poços em uma concentração final de 10 μM , para posterior leitura e quantificação da fluorescência (VICTOR X3 – λ de excitação de 494 nm e λ de emissão de 516 nm).

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de qRT-PCR.

Primer	Sequência	Tamanho (pb)
<i>GAPDH forward</i>	5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3'	21
<i>GAPDH reverse</i>	5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3'	23
<i>SLC30A1 forward</i>	5' GGAAGCGGAAGACAACAGGG 3'	20
<i>SLC30A1 reverse</i>	5' CAAGGCATTCACGACCACG 3'	19
<i>SLC30A2 forward</i>	5' CGGAGCCCGGTCCTTCTTA 3'	19
<i>SLC30A2 reverse</i>	5' GCATGGCAATAATGGTTGCTCT 3'	22
<i>SLC30A3 forward</i>	5' GAAGAGTCTTTTCACAGAGCCC 3'	22
<i>SLC30A3 reverse</i>	5' TGTGTGCTAAATACCCACCAAC 3'	22
<i>SLC30A4 forward</i>	5' AAGCGCCTCAAATCCCTGC 3'	19
<i>SLC30A4 reverse</i>	5' CCACCACGACTCGAAGTTTATT 3'	22
<i>SLC30A5 forward</i>	5' TGGACCACTAAGGACCTTGCT 3'	21
<i>SLC30A5 reverse</i>	5' CAGCCCCTCTTGTCTTTGC 3'	19
<i>SLC30A6 forward</i>	5' ATGGGGACGATTCATCTCTTTCG 3'	23
<i>SLC30A6 reverse</i>	5' CACAGCACGTTGATTGCACC 3'	20
<i>SLC30A7 forward</i>	5' GGATGATGAATACAAACCACCCA 3'	23
<i>SLC30A7 reverse</i>	5' AAAGCGAAAGAGAGGTTTCAGG 3'	21
<i>SLC30A8 forward</i>	5' AGCCACCAAGATGTACGCC 3'	19
<i>SLC30A8 reverse</i>	5' CTTGCTTGCTCGACCTGTT 3'	19
<i>SLC30A9 forward</i>	5' TATGTGGTTCCCGACATTCACC 3'	22
<i>SLC30A9 reverse</i>	5' TGATGGGACTTTGTCAGCTTTT 3'	22
<i>SLC30A10 forward</i>	5' GGCCGTTACTCAGGCAAGAC 3'	20
<i>SLC30A10 reverse</i>	5' GCATGTTGAACGAGTCCGAGA 3'	21
<i>SLC39A1 forward</i>	5' TCATCGCCATCGTTTGCATCA 3'	21
<i>SLC39A1 reverse</i>	5' CTCTGGTGAAGGGCTGTGAC 3'	20
<i>SLC39A8 forward</i>	5' GCCAAGTCATGTACCTGTCT 3'	21
<i>SLC39A8 reverse</i>	5' AAGATGCCCAATCGCCAA 3'	19
<i>SLC39A10 forward</i>	5' TCATCGCCATCGTTTGCATCA 3'	21
<i>SLC39A10 reverse</i>	5' CTCTGGTGAAGGGCTGTGAC 3'	20
<i>SLC39A13 forward</i>	5' AGTGGCTATCTCAACCTGCTT 3'	21
<i>SLC39A13 reverse</i>	5' GCCCGATCTTTTGTCTCACAA 3'	21
<i>SLC39A14 forward</i>	5' GTGTCTCACTGATTAACCTGGC 3'	22
<i>SLC39A14 reverse</i>	5' AGAGCAGCGTTCCAATGGAC 3'	20

2.8 Análises Estatísticas.

Os valores são expressos como média das replicatas \pm desvio padrão. Os gráficos e as análises estatísticas por *Student t test* ou *One-way ANOVA* (com *Tukey post-test*) foram realizados utilizando o software *Graph Pad Prism 6*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar se a disponibilidade de zinco influencia o crescimento de *C. neoformans*, ensaios para avaliar a toxicidade de diferentes quelantes de zinco foram realizados. Para tanto, uma quantidade determinada de células foi cultivada em YNB contendo diferentes concentrações de DTPA, ZnCl_2 , ou a combinação de ambos. A partir da concentração de $50 \mu\text{M}$ de DTPA, pode ser observada uma redução mais acentuada do crescimento, a qual é revertida pela adição da mesma concentração de ZnCl_2 (Figura 4). Em *Histoplasma capsulatum*, o quelante DTPA também reduziu o crescimento celular, e este efeito foi parcialmente recuperado com a adição de ZnSO_4 (Winters *et al.*, 2010); o mesmo efeito foi observado em outros fungos patogênicos, como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (Lulloff *et al.*, 2004).

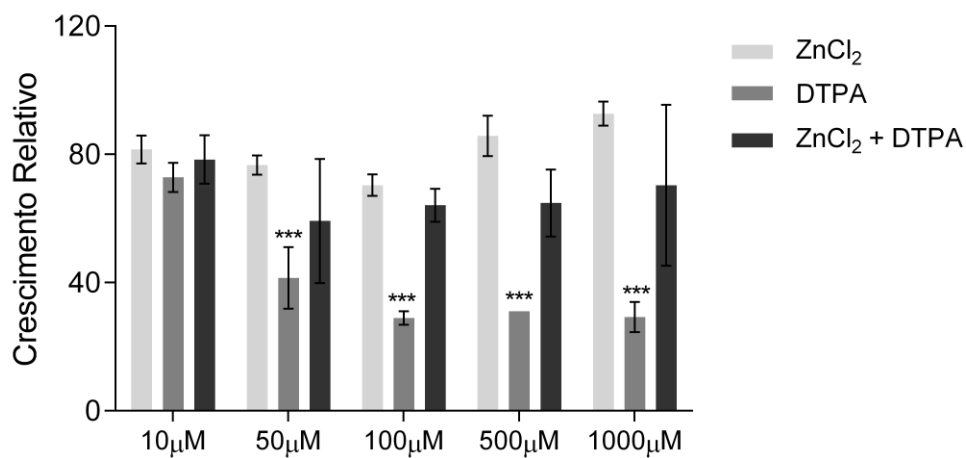


Figura 4. Análise da viabilidade celular de *Cryptococcus neoformans* em diferentes concentrações de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA.

A linhagem H99 de *Cryptococcus neoformans* foi cultivada em YNB ou YNB contendo concentrações crescentes de ZnCl_2 ou do quelante de zinco DTPA, ou ambos em concentrações equivalentes. Após 24 horas de cultivo a densidade óptica (600 nm) foi determinada. Dados normalizados em relação ao cultivo apenas em YNB. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por *One-way ANOVA*: (***) $p < 0.05$.

Para então avaliar se a privação de zinco influencia a atividade fungicida de macrófagos, realizamos testes de viabilidade de células de *C. neoformans* após a interação com células de macrófagos murinos J774.1 na presença de zinco ou do quelante de zinco DTPA. Observamos que a privação de zinco acarretou em uma menor atividade fungicida dos macrófagos, visto que um maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi recuperado de sistemas macrófagos:leveduras tratadas com o agente quelante de zinco DTPA. Esta diminuição da atividade fungicida foi revertida pela incubação dos macrófagos com DTPA e $ZnCl_2$. A incubação do sistema apenas com $ZnCl_2$, por sua vez, não acarretou na alteração da atividade fungicida (Figura 5).

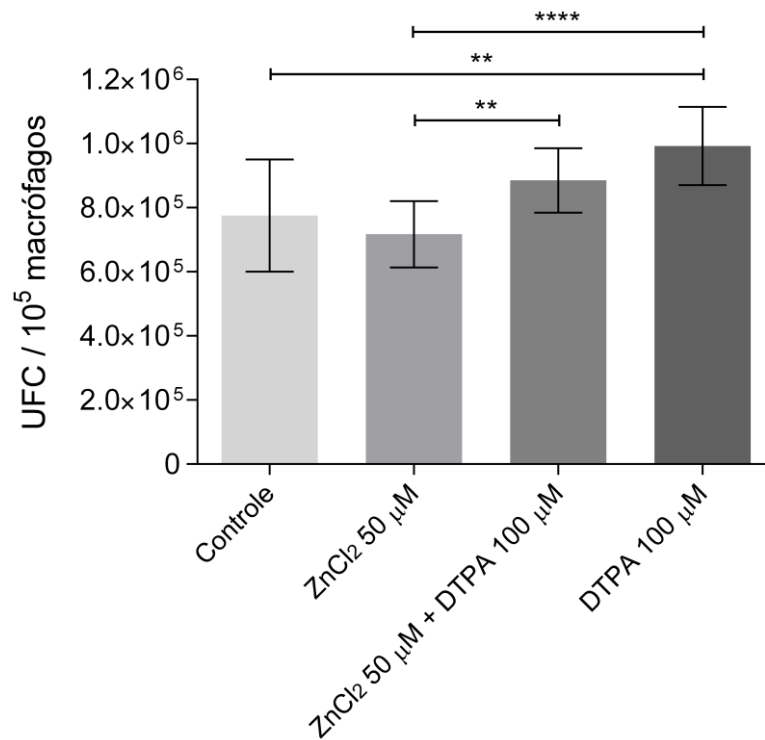


Figura 5. A disponibilidade de zinco altera as taxas fagocíticas e microbicidas de macrófagos contra *C. neoformans*.

Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e ativados com LPS e IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. A interação foi realizada em DMEM, DMEM contendo 50 μ M de $ZnCl_2$, DMEM contendo 50 μ M de $ZnCl_2$ e 100 μ M de DTPA ou DMEM contendo 100 μ M de DTPA. Após 20 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). As barras representam a média de ensaios realizados em quintuplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por *Student t test*: (**) $p < 0.005$, (****) $p < 0.0001$.

Com o intuito de verificar se a redução da atividade fungicida de macrófagos se devia a redução da viabilidade dos mesmos, realizamos ensaios de viabilidade celular utilizando a taxa de atividade metabólica por intermédio da oxidação do substrato MTT. Pudemos observar que apenas concentrações de ZnCl_2 acima de $100 \mu\text{M}$ acarretaram em um potente efeito citotóxico, ao passo que DTPA, mesmo em concentrações de 1 mM , não tiveram um efeito tão acentuado (Figura 6).

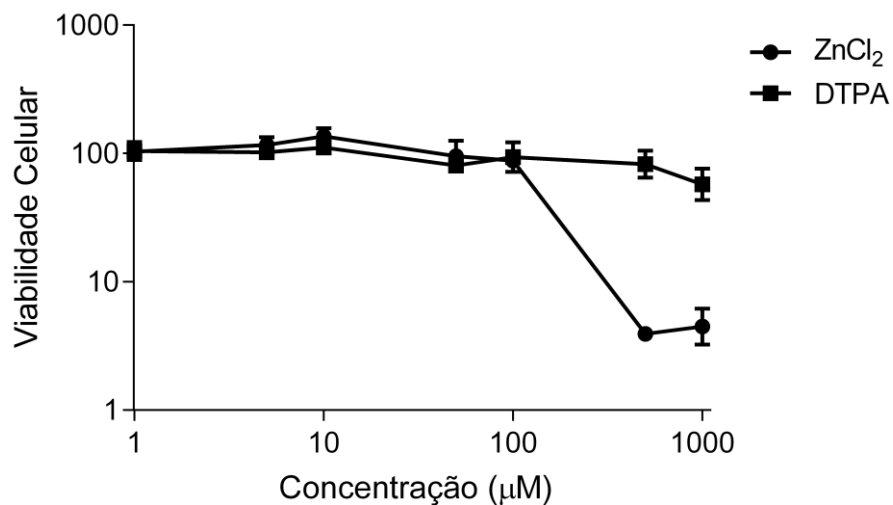


Figura 6. Análise da viabilidade celular de macrófagos em diferentes concentrações de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA.

Macrófagos RAW264.7 foram cultivados em meio DMEM acrescido de concentrações crescentes de ZnCl_2 ou DTPA, e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com MTT por 3 horas a 37°C e 5% de CO_2 . O MTT foi retirado e DMSO foi adicionado para posterior leitura a 560 nm e 670 nm (*background*). Dados normalizados em relação ao cultivo apenas em DMEM. Os pontos representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão.

Analizamos também se, nas mesmas condições, estes componentes poderiam alterar o desenvolvimento de *C. neoformans*. Não foi possível notar qualquer diferença no número de UFCs recuperadas após cultivo na presença do quelante DTPA nas concentrações utilizadas no ensaio de interação (Figura 7), o que pode ser devido ao limitado crescimento de *C. neoformans* em condições que mimetizam a interação, ou seja, cultivo em DMEM e presença de CO_2 . Esse resultado sugere que a redução da atividade fungicida se deve à alteração da disponibilidade de zinco nos macrófagos.

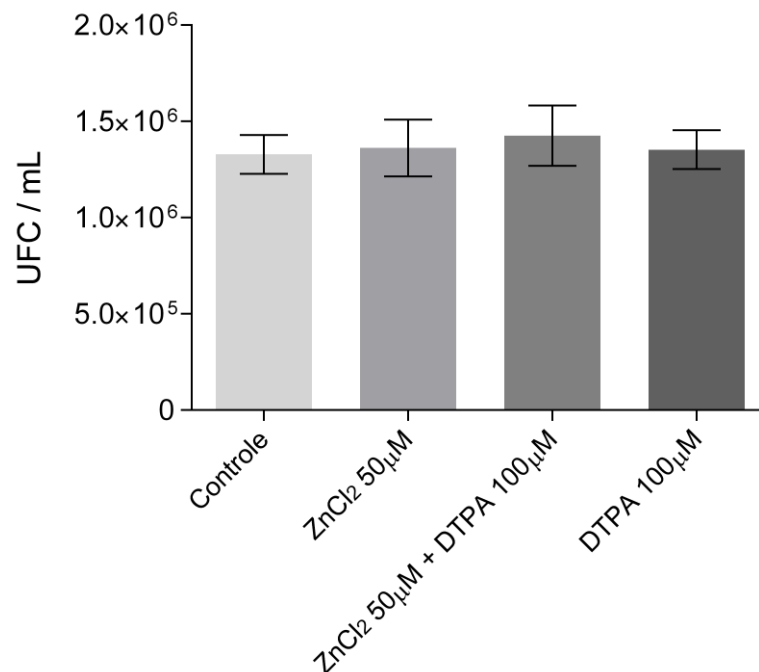


Figura 7. Análise da viabilidade celular de *C. neoformans* na presença de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA.

10^7 células/mL de *C. neoformans* foram cultivadas em meio DMEM, DMEM contendo 50 µM de ZnCl₂, DMEM contendo 50 µM de ZnCl₂ e 100 µM de DTPA ou DMEM contendo 100 µM de DTPA, e incubadas por 20 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e semeadas em meio YPD sólido para determinação do número de UFC. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão.

Tendo em vista que a alteração da disponibilidade de zinco promove alterações na atividade fungicida de macrófagos, foi realizado um experimento para avaliar se células de *C. neoformans* previamente tratadas com os quelantes de zinco DTPA (não permeável à membrana) e TPEN (permeável à membrana), assim como o próprio zinco, influenciariam a sensibilidade da levedura à atividade fungicida de macrófagos. A pré-incubação com o quelante TPEN causou um aumento considerável da sensibilidade de *C. neoformans* a atividade fungicida de macrófagos (Figura 8).

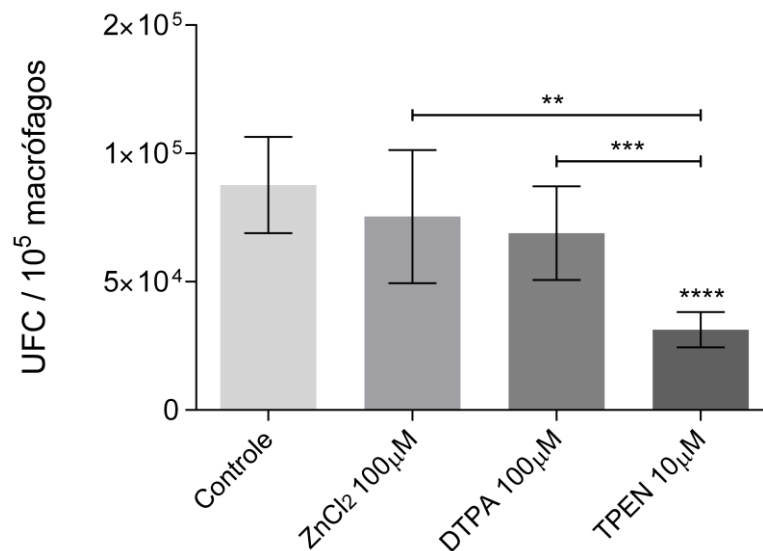


Figura 8. A privação de zinco torna *C. neoformans* mais suscetível à ação fungicida de macrófagos.

Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e induzidos com LPS e IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram cultivadas *overnight* em YPD, YPD contendo 100 μ M de ZnCl₂, YPD contendo 100 μ M de DTPA ou YPD contendo 10 μ M de TPEN, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO₂, os poços foram lavados com PBS, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por *Student t test*: (**) $p < 0.005$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$.

Para confirmar que o efeito marcante do quelante TPEN sobre a viabilidade fúngica durante a interação com macrófagos se dava por efeito da atividade fungicida destes, realizamos ensaios para avaliar se o TPEN não causaria alterações no desenvolvimento de *C. neoformans*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no desenvolvimento das células fúngicas quando cultivadas na presença de TPEN ou TPEN acrescido de diferentes concentrações de cloreto de zinco (Figura 9A). Em *H. capsulatum* o mesmo não foi observado, visto que o TPEN reduziu o crescimento do fungo, que foi parcialmente recuperado com a adição de ZnSO₄ (Winters *et al.*, 2010).

Apesar de o TPEN não ter alterado o crescimento de *C. neoformans*, o quelante foi capaz de reduzir o crescimento fúngico de *H. capsulatum* durante a interação com macrófagos (Winters *et al.*, 2010). Portanto, visto que o quelante de zinco TPEN não altera a viabilidade celular de *C. neoformans*, avaliamos se o pré-cultivo das células fúngicas na presença de TPEN ou TPEN acrescido de ZnCl₂ alteraria a suscetibilidade de *C. neoformans* a atividade fungicida de macrófagos. Pudemos observar que a presença de TPEN torna as células

fúngicas mais suscetíveis à ação fungicida de macrófagos após 2 horas de interação, o que não foi observado com a adição de $ZnCl_2$ (Figura 9B).

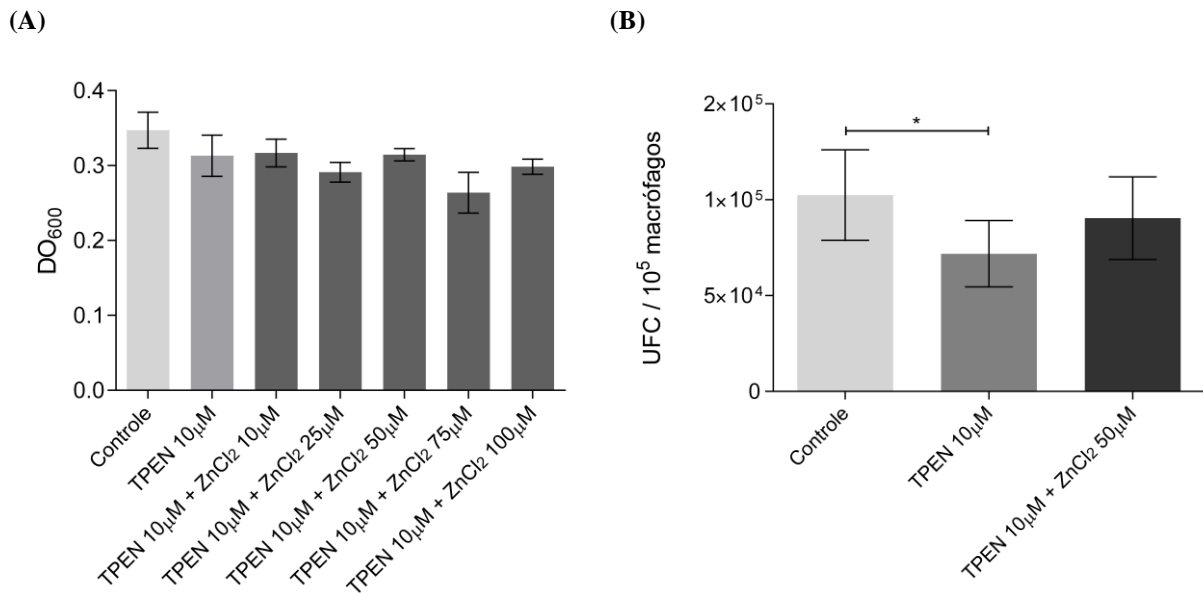


Figura 9. O quelante de zinco TPEN não altera a viabilidade celular de *Cryptococcus neoformans*, mas torna as células fúngicas mais suscetíveis a atividade fungicida de macrófagos.

(A) A linhagem H99 de *Cryptococcus neoformans* foi cultivada em YPD, YPD contendo 10 μ M de TPEN ou YPD contendo 10 μ M de TPEN e concentrações crescentes de $ZnCl_2$. Após 24 horas de cultivo a densidade óptica (600 nm) foi determinada. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. (B) Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM, e induzidos com LPS e IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, YPD contendo 10 μ M de TPEN ou YPD contendo 10 μ M de TPEN e 50 μ M de $ZnCl_2$, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por *Student t test*: (*) $p < 0.05$.

Para avaliar se a maior suscetibilidade de *C. neoformans* à atividade fungicida de macrófagos era devido a um aumento do índice de fagocitose, ou a uma menor sobrevivência dentro dos macrófagos, o índice de fagocitose foi avaliado. Não pode ser observado um aumento do índice de fagocitose somente na presença de 100 μ M de $ZnCl_2$ ou 10 μ M de TPEN, mas o índice aumenta na presença de ambos (Figura 10). Esse resultado sugere que o pré-cultivo das células de *C. neoformans* na presença do quelante TPEN não aumenta o índice de fagocitose, mas reduz a capacidade de sobrevivência dentro dos macrófagos.

O aumento do índice de fagocitose na presença de TPEN e $ZnCl_2$ não teve diferença estatística em relação a condição controle, o que demonstra que a adição de zinco é capaz de reverter o efeito do quelante TPEN.

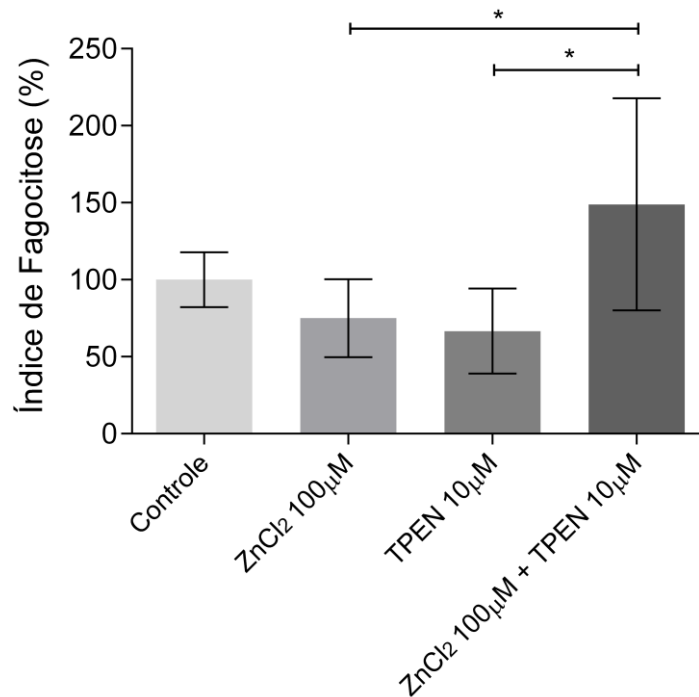


Figura 10. A disponibilidade de zinco altera a taxa de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos.

Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e induzidos com LPS e de $IFN-\gamma$. Células de *C. neoformans* foram pré-incubadas em YPD, YPD contendo 100 µM de $ZnCl_2$, YPD contendo 10 µM de TPEN ou YPD contendo 10 µM de TPEN e 100 µM de $ZnCl_2$. As células foram lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7, coradas com FITC e inoculadas na proporção 10:1. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e *trypan blue* foi adicionado para leitura e quantificação da fluorescência das células fúngicas internalizadas. As barras representam a média de ensaios realizados em quintuplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por *One-way ANOVA*: (*) $p < 0.05$.

O zinco é o segundo metal de transição mais abundante no corpo humano (Wilson *et al.*, 2012), e desempenha funções importantes no organismo, atuando como cofator de diversas proteínas, além de ser crucial para o adequado funcionamento dos sistemas imune inato e adaptativo (Kehl-Fie and Skaar, 2010). Fungos patogênicos também dependem de zinco para o seu crescimento; a habilidade de micro-organismos patogênicos de assimilar nutrientes do hospedeiro é um dos aspectos fundamentais da infecção (Wilson *et al.*, 2012). Frente à importância do zinco para o estabelecimento da infecção, e considerando que o

excesso deste metal é potencialmente tóxico, macrófagos podem fazer uso de duas estratégias para impedir o crescimento do patógeno: (1) limitar a disponibilidade de zinco através dos transportadores ZnT, que são responsáveis pelo transporte de zinco do citoplasma para dentro de organelas ou para fora da célula; ou (2) tornar os níveis intracelulares de zinco tóxicos através dos transportadores ZIP, que transportam zinco de fora da célula ou de dentro de organelas para o citoplasma (Wilson *et al.*, 2012).

Levando em consideração que a privação de zinco altera a sensibilidade de *C. neoformans* frente à atividade fungicida de macrófagos, levantamos a hipótese de que os macrófagos podem exercer parte de sua atividade fungicida por meio da restrição da disponibilidade de zinco intracelular para a levedura. Para avaliar essa hipótese realizamos análise quantitativa dos níveis de transcritos referentes aos 10 genes da família ZnT (*SLC30*) e a 4 genes da família ZIP (*SLC39*) de transportadores de zinco nas células de macrófagos. Os transportadores ZnT-2, ZnT-3, ZnT-4, ZnT-8, ZnT-9 e ZnT-10 não apresentaram níveis relativos de transcritos quantificáveis. ZnT-1, ZnT-5, ZnT-6 e ZnT-7 apresentaram uma redução significativa da expressão após 3 e 6 horas de interação com *C. neoformans*, assim como ZIP1, ZIP8, ZIP13 e ZIP14 (Figura 11). Em algumas condições, a redução da expressão pode ser atribuída somente à presença de IFN- γ e LPS, visto que não houve diferença significativa em relação a condição de interação com *C. neoformans*, o que ocorreu com ZIP1 em 3 e 6 horas de interação, e com ZIP8 e ZIP13 após 3 horas de interação.

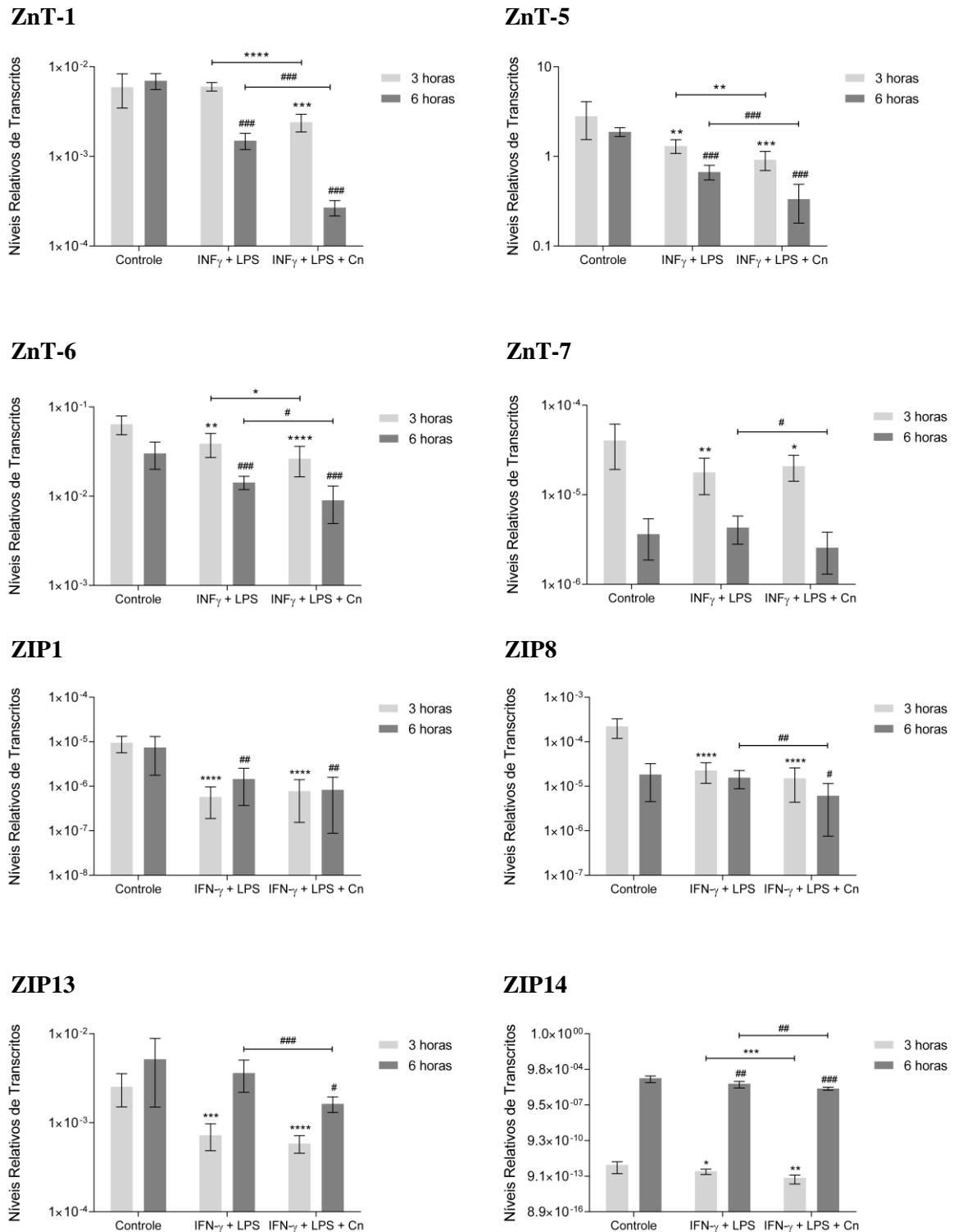


Figura 11. Avaliação quantitativa dos níveis relativos de transcritos de genes que codificam transportadores de zinco.

A expressão dos 10 transportadores de zinco da família ZnT e de 4 transportadores de zinco da família ZIP foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real a partir do RNA extraído de macrófagos. A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de Ct obtidos para os transcritos referentes ao gene GAPDH. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*: (***) $p < 0.0001$, (***) $p \leq 0.0007$, (**) $p \leq 0.008$, (*) $p \leq 0.02$; (###) $p \leq 0.0009$, (##) $p \leq 0.007$, (#) $p \leq 0.02$. Análises representadas por * se referem às comparações entre as interações no tempo de 3 horas, ao passo que as representadas por # se referem ao tempo de 6 horas.

Para verificar se a maior suscetibilidade de *C. neoformans* a atividade fungicida de macrófagos era devido à redução de zinco intracelular, co-cultivos entre macrófagos J774.1 e leveduras, assim como o controle, não contendo leveduras, foram utilizados para determinação de zinco intracelular com base em quantificações fluorométricas utilizando o fluoróforo FluoZin 3. Após 2 ou 24 horas de interação não houve diferença significativa da quantidade de zinco intracelular, indicando que a quantidade de zinco livre dentro de macrófagos infectados com *C. neoformans* não é alterado (dados não mostrados).

Os resultados obtidos sugerem que a disponibilidade de zinco altera a atividade fungicida de macrófagos contra *C. neoformans*, e altera a suscetibilidade de *C. neoformans* à fagocitose por macrófagos; mas a modulação da homeostase desse metal provavelmente não está associada ao acúmulo de zinco intracelular a fim de tornar o ambiente intracelular tóxico, como ocorre em *Mycobacterium tuberculosis* (Botella *et al.*, 2011). Em macrófagos infectados por *Histoplasma capsulatum* os níveis intracelulares de zinco se mostraram reduzidos (Winters *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo foi observado que o pré-tratamento com IFN- γ reduziu os níveis intracelulares tanto de ferro quanto de zinco. Portanto, considerando que DTPA e TPEN também agem como quelantes de ferro (Winters *et al.*, 2010), e que IFN- γ foi adicionado em todos os ensaios de interação, os resultados obtidos podem ser devido à baixa concentração de ferro, ou à baixa concentração de ambos os metais, durante a interação.

A privação de zinco em macrófagos pode ser considerada um mecanismo de defesa contra *C. neoformans*, como observado em *Histoplasma capsulatum* (Winters *et al.*, 2010), mas pode envolver mecanismos mais complexos do que a modulação da expressão de transportadores de zinco. Provavelmente os transportadores ZnT e ZIP estejam mais envolvidos na modulação fisiológica de zinco, e não diretamente na defesa dessas células contra patógenos intracelulares. Portanto são necessários estudos mais aprofundados da homeostase desse metal na interação patógeno-hospedeiro, a fim de elucidar a influência da disponibilidade de zinco em células do sistema imune do hospedeiro e na patogenicidade de fungos que se comportam como patógenos intracelulares.

Agradecimentos:

Bolsa de Iniciação Científica: PIBIC CNPq-UFRGS.

Financiamento do Projeto: CNPq.

REFERÊNCIAS

- Bartlett KH, Cheng PY, Duncan C, Galanis E, Hoang L, Kidd S, Lee MK, Lester S, MacDougall L, Mak S, Morshed M, Taylor M, Kronstad J (2012) A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. *Mycopathologia* 173:311-319. doi: 10.1007/s11046-011-9475-x
- Botella H, Peyron P, Levillain F, Poincloux R, Poquet Y, Brandli I, Wang C, Tailleux L, Tilleul S, Charrière GM, Waddell SJ, Foti M, Lugo-Villarino G, Gao Q, Maridonneau-Parini I, Butcher PD, Castagnoli PR, Gicquel B, de Chastellier C, Neyrolles O (2011) Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* 10:248-259. doi: 10.1016/j.chom.2011.08.006
- Capilla J, Maffei CM, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA (2006) Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. *Med Mycol* 44:601-610. doi: 10.1080/13693780600810040
- Cassat JE, Skaar EP (2012) Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. *Semin Immunopathol* 34:215-235. doi: 10.1007/s00281-011-0294-4
- Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, Torres-Rodriguez JM, Cogliati M, Velegraki A, Burggraaf A, Kamermans A, Sweere JM, Meis JF, Klaassen CH, Boekhout T (2012) Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* 18:1618-1624. doi: 10.3201/eid1810.120068
- Hilty J, George Smulian A, Newman SL (2011) *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. *Med Mycol* 49:633-642. doi: 10.3109/13693786.2011.558930
- Holbein BE, Mira de Orduña R (2010) Effect of trace iron levels and iron withdrawal by chelation on the growth of *Candida albicans* and *Candida vini*. *FEMS Microbiol Lett* 307:19-24. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01956.x
- Hood MI, Skaar EP (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10:525-537. doi: 10.1038/nrmicro2836
- Kehl-Fie TE, Skaar EP (2010) Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* 14:218-224. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.11.008
- Kronstad J, Saikia S, Nielson ED, Kretschmer M, Jung W, Hu G, Geddes JM, Griffiths EJ, Choi J, Cadieux B, Caza M, Attarian R (2012) Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot Cell* 11:109-118. doi: 10.1128/EC.05273-11
- Lulloff SJ, Hahn BL, Sohnle PG (2004) Fungal susceptibility to zinc deprivation. *J Lab Clin Med* 144:208-214. doi: S0022214304001891 [pii] 10.1016/j.lab.2004.07.007

- Marr KA (2012) *Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:637-643. doi: 10.1586/eri.12.48
- Mitchell AP (2006) Cryptococcal virulence: beyond the usual suspects. *J Clin Invest* 116:1481-1483. doi: 10.1172/JCI28842
- Morgan DM (1998) Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol* 79:179-183.
- Nicola AM, Casadevall A (2012) In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. *Methods Mol Biol* 844:189-197. doi: 10.1007/978-1-61779-527-5_14
- Perfect JR (2012) The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. *MBio* 3:doi: 10.1128/mBio.00165-12
- Perfect JR, Wong B, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Williamson PR (1998) *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. *Med Mycol* 36 Suppl 1:79-86.
- Prado M (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:513-521. doi: 10.1590/S0074-02762009000300019
- Prasad T, Chandra A, Mukhopadhyay CK, Prasad R (2006) Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3597-3606. doi: 10.1128/AAC.00653-06
- Sabiiti W, May RC (2012) Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol* 7:1297-1313. doi: 10.2217/fmb.12.102
- Schneider ReO, Fogaça NeS, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC (2012) Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 7:e43773. doi: 10.1371/journal.pone.0043773
- Simm C, Luan CH, Weiss E, O'Halloran T (2011) High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. *PLoS One* 6:e25136. doi: 10.1371/journal.pone.0025136
- Sorrell TC (2001) *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 39:155-168.
- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A (2012) MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* 114:785-796. doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006
- Waterman SR, Park YD, Raja M, Qiu J, Hammoud DA, O'Halloran TV, Williamson PR (2012) Role of CTR4 in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *MBio* 3:doi: 10.1128/mBio.00285-12

Wilson D, Citiulo F, Hube B (2012) Zinc exploitation by pathogenic fungi. PLoS Pathog 8:e1003034. doi: 10.1371/journal.ppat.1003034

Winters MS, Chan Q, Caruso JA, Deepe GS, Jr. (2010) Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. J Infect Dis 202:1136-1145. doi: 10.1086/656191

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a disponibilidade de zinco altera a atividade fungicida de macrófagos murinos, assim como a suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* à fagocitose. Em condições de privação de zinco os macrófagos apresentam uma menor atividade fungicida contra *Cryptococcus neoformans*, entretanto, quando as células fúngicas são pré-tratadas com o quelante de zinco TPEN, elas se tornam mais suscetíveis à fagocitose por macrófagos.

Ocorre a redução dos níveis de transcritos de transportadores de zinco da família ZnT e ZIP em células de macrófagos infectadas com *C. neoformans*, mas os níveis intracelulares de zinco não são alterados durante a interação, o que sugere que existem mecanismos mais complexos envolvidos na privação de zinco como mecanismo de defesa de macrófagos contra fungos patogênicos intracelulares. Provavelmente esses transportadores estão envolvidos na regulação fisiológica das concentrações de zinco, ou na modulação durante processos inflamatórios, mas sem participar da modulação desse metal como um mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares.

Além disso, os quelantes de zinco DTPA e TPEN podem agir como quelantes de ferro, portanto os resultados obtidos também podem estar associados à privação desse metal de transição.

4 PERSPECTIVAS

Repetir ensaios de fagocitose utilizando maiores concentrações de DTPA e adicionando TPEN durante a interação.

Realizar ensaios de fagocitose na presença de $ZnCl_2$, $ZnCl_2$ e DTPA ou DTPA em tempos menores.

Avaliar a viabilidade celular da linhagem J774.1 de macrófagos murinos na presença de $ZnCl_2$ ou DTPA.

Avaliar a viabilidade celular de *C. neoformans* na presença de TPEN ou TPEN acrescido de concentrações crescentes de $ZnCl_2$ através de contagem de UFC.

Investigar o papel do metal de transição ferro na modulação da homeostase de zinco.

Quantificar níveis relativos de transcritos do gene que codifica actina e de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias.

Quantificar níveis relativos de transcritos de gene controle para deficiência de zinco em *C. neoformans*, como *Zap1*.

Analisar a quantidade intracelular de zinco e de outros metais por ICP MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado) e ICP OES (espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado) em macrófagos e *C. neoformans*.

Investigar outros mecanismos que possam estar envolvidos na modulação da homeostase de zinco em macrófagos durante a interação com *Cryptococcus neoformans*.

REFERÊNCIAS

- BOTELLA, H. *et al.* Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 3, p. 248-59, Sep 2011. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925112> >.
- BULLEN, J. J. *et al.* Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 3, p. 251-8, Mar 2006. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476787> >.
- CAPILLA, J. *et al.* Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. **Med Mycol**, v. 44, n. 7, p. 601-10, Nov 2006. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071553> >.
- CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 215-35, Mar 2012. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048835> >.
- 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**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827> >.
- CHIMIANTI, F. *et al.* Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Curr Drug Targets**, v. 4, n. 4, p. 323-38, May 2003. ISSN 1389-4501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699353> >.
- CHOI, J. N. *et al.* Influence of iron regulation on the metabolome of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41654, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911836> >.
- EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 7, p. 711-22, Jul 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675045> >.
- FAN, W. *et al.* *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1420-33, Aug 2005. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087747> >.
- FUKADA, T. *et al.* Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. **J Biol Inorg Chem**, v. 16, n. 7, p. 1123-34, Oct 2011. ISSN 1432-1327 (Electronic) 0949-8257 (Linking).
- HAASE, H.; RINK, L. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. **Annu Rev Nutr**, v. 29, p. 133-52, 2009. ISSN 1545-4312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400701> >.

HAGEN, F. *et al.* Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 10, p. 1618-24, Oct 2012. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017442> >.

HILTY, J.; GEORGE SMULIAN, A.; NEWMAN, S. L. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Med Mycol**, v. 49, n. 6, p. 633-42, Aug 2011. ISSN 1460-2709 (Electronic) 1369-3786 (Linking).

HOLBEIN, B. E.; MIRA DE ORDUÑA, R. Effect of trace iron levels and iron withdrawal by chelation on the growth of *Candida albicans* and *Candida vini*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 307, n. 1, p. 19-24, Jun 2010. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402789> >.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 525-37, Aug 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796883> >.

HWANG, L. H. *et al.* *Histoplasma* requires *SIDI1*, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 4, p. e1000044, Apr 2008. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404210> >.

KITAMURA, H. *et al.* Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. **Nat Immunol**, v. 7, n. 9, p. 971-7, Sep 2006. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892068> >.

KRONSTAD, J. *et al.* Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 2, p. 109-18, Feb 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140231> >.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346> >.

LINZ, R.; LUTSENKO, S. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 5-6, p. 403-7, Dec 2007. ISSN 0145-479X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000748> >.

MARR, K. A. *Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 6, p. 637-43, Jun 2012. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22734955> >.

MAUCH, R. M.; CUNHA, V. E. O.; DIAS, A. L. The copper interference with the melanogenesis OF *Cryptococcus neoformans*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 117-20, 2013 Mar-Apr 2013. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563765> >.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 1, p. 1-9, Feb 2012. ISSN 1437-7780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045161> >.

NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 844, p. 189-97, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262444> >.

PALMITER, R. D.; HUANG, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 744-51, Feb 2004. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748859> >.

PERFECT, J. R. The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. **MBio**, v. 3, n. 4, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782526> >.

PERFECT, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

_____. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 79-86, 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988495> >.

PRASAD, T. *et al.* Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3597-606, Nov 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954314> >.

REES, E. M.; THIELE, D. J. From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 175-84, Apr 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063856> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 12, p. 946-53, Dec 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550940> >.

SCHNEIDER, R. E. O. *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43773, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916306> >.

SILVA, F. D. *et al.* Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 324, n. 1, p. 64-72, Nov 2011. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092765> >.

SIMM, C. *et al.* High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25136, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980385> >.

SINGH, A. *et al.* Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653445> >.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346263> >.

STAFFORD, S. L. *et al.* Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: Emerging roles for zinc and copper. **Biosci Rep**, Jun 2013. ISSN 1573-4935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738776> >.

WATERMAN, S. R. *et al.* Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 794-802, Mar 2007. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

_____. Role of CTR4 in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 3, n. 5, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033470> >.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-5, Jul 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675317> >.

WILSON, D.; CITIULO, F.; HUBE, B. Zinc exploitation by pathogenic fungi. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 12, p. e1003034, Dec 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308062> >.

WINTERS, M. S. *et al.* Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **J Infect Dis**, v. 202, n. 7, p. 1136-45, Oct 1 2010. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking).

ZHANG, Y. Q. *et al.* Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000939, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532216> >.

ZHENG, T.; NOLAN, E. M. Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens. **Metallomics**, v. 4, n. 9, p. 866-80, Aug 2012. ISSN 1756-591X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22854844> >.