

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

**MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE ZINCO EM MACRÓFAGOS COMO
ESTRATÉGIA ANTIFÚNGICA AO PATÓGENO *Cryptococcus neoformans***

Francine Melise dos Santos

Tese 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 Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Agosto de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para seu desenvolvimento, este trabalho contou com fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Dr. Charley C. Staats, pelo apoio e acessibilidade, desde o mestrado, e, além disso, por acreditar na minha capacidade ao longo do projeto desenvolvido;
- À professora Marilene H. Vainstein, por ter me acolhido, logo no início, no laboratório e, desta forma auxiliar no meu crescimento profissional;
- Aos professores, Dr. Rogério Margis e Dr. Diego Bonatto, membros da comissão de acompanhamento;
- À Lívia, que sempre se mostrou disponível para auxiliar e discutir sobre o trabalho e envolvida com os projetos do grupo;
- Ao pessoal da secretaria do PPGBCM, principalmente Luciano e Silvinha, pela disponibilidade e auxílio nas dúvidas que surgiam;
- Aos meus pais, que me ensinaram a sempre buscar mais e me deram apoio ao longo da pós-graduação;
- À Karine, amiga que a graduação me deu que seguiu sendo minha companheira ao longo do mestrado e doutorado, inclusive como colegas de apartamento, me dando força, conselhos e sendo companheira nas fases boas e ruins ao longo deste período;
- Ao Gustavo, que esteve presente desde os momentos bons até os mais desafiadores do doutorado, que exigiram de mim foco e persistência. Foi meu companheiro, meu confidente, foi minha clareza e determinação quando já não as tinha mais, meu suporte, meu amigo, meu tudo.
- Às amigas Júlia e Nicole, pelo apoio, incentivo e pelos momentos de descontração que, com certeza, tornaram esta etapa profissional mais divertida e leve;

- Ao Uriel, que dividiu comigo as dificuldades do projeto, obrigada pelo auxílio, disposição e discussões sérias até as descontraídas;
- À Amanda, amiga desde a faculdade, que me apresentou o laboratório e a todos e que, entre idas e vindas da nossa amizade, sempre se mostrou preocupada e companheira p todas as horas;
- À Alícia, Ane, Rafa, Camila, Rodrigo e Patrícia, meus colegas “de grupo”, que participaram desta etapa, sempre compartilhando coisas boas e ruins, que deixarão lembranças boas do doutorado, principalmente das nossas risadas;
- Aos demais colegas e ex-colegas de laboratório: Vanessinha, Solon, Carol, Evandro, Glaci, Heryk, Jackson, Eamim, Nati, Bárbara, Nicolau, pela companhia, convivência diária e ajuda no que foi necessário, com certeza houve momentos tensos mas também alegres, me sinto feliz em ter feito parte deste grupo animado e acolhedor que é nosso grupo.

Obrigada a todos vocês que, de forma direta ou indireta, auxiliaram na conclusão desta minha etapa, que serviram de exemplo para mim, de todas as formas possíveis.

*“Nothing is permanent.
Everything is subject to change.
Being is always becoming.”*

Buddha

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Infecções Fúngicas	13
1.2 O Gênero <i>Cryptococcus</i>	15
1.3 Criptococose e processo de infecção.....	18
1.3.1 Fatores de virulência.....	21
1.4 Imunidade às espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i>	24
1.4.1 Sistema Imune Inato	25
1.4.2 Interações entre macrófagos e espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i> ..	27
1.4.3 Sistema Imune Adaptativo	29
1.4.4 Imunidade Nutricional.....	32
1.5 Zinco e a sua essencialidade para a vida	33
1.5.1 Importância de zinco em funções biológicas.....	35
1.5.2 Regulação da homeostase de zinco	37
1.6 Imunidade Nutricional e Homeostase de Zinco	46
2. OBJETIVOS	52
2.1 Objetivos Específicos.....	52
3. RESULTADOS	53
3.1 Capítulo I: Alterations of zinc homeostasis in response to <i>Cryptococcus neoformans</i> in a murine macrophage cell line.	54
3.2 Capítulo II: Impacto da ativação de linhagens celulares na homeostase de zinco 70	
3.2.1 INTRODUÇÃO.....	70
3.2.2 METODOLOGIA.....	73
3.2.3 RESULTADOS.....	79
3.2.4 DISCUSSÃO	89
4. DISCUSSÃO GERAL	99
5. CONCLUSÕES GERAIS	104
6. PERSPECTIVAS.....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
8. CURRÍCULUM VITAE RESUMIDO.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

µm: micrômetro

µM: micromolar

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

BHE: barreira hemato-encefálica

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina, do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*

Cd: Cádmio

CDs: células dendríticas

CDF: facilitador de difusão de cátions, do inglês, *cation diffusion facilitator*

Co: cobalto

CO₂: dióxido de carbono

Cu: cobre

DAG: diacilglicerol

DMSO: dimetilsulfóxido

DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético, do inglês, *diethylenetriaminepentaacetic acid*

Fc: do inglês, *fragment crystallizable*

Fe: ferro

fM:femtomolar

FPN: ferroportina-1

GalGXM: Galactoxilomanana

GAS: sequências gama ativadas, do inglês, *gamma activated sequences*

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos, do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GXM: Glicuronoxilomanana

HIV: vírus da imunodeficiência humana, do inglês, *human immunodeficiency virus*

IFN-γ: interferon gama

IgA: imunoglobulina A

IgM: imunoglobulina M

IKK: quinase I de kappa B, do inglês, *IκB kinase*

IL: interleucina

iNOS: sintase de óxido nítrico induzida, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*

IRI: índice de replicação intrafagossômica

Irt1: do inglês, *Iron regulated transporter 1*

JAK: quinase Janus, do inglês, *Janus kinase*

Lcn2: lipocalina 2

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina, do inglês *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*

LPS: lipopolissacarídeo

MC: morto por calor

Mn: manganês

MTs: metalotioneínas

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*

NETs: redes extracelulares de neutrófilos, do inglês, *neutrophil extracellular trap*

NF-κB: fator nuclear kappa B, do inglês, *nuclear factor –kappa B*

nM: nanomolar

Nramp1: proteína 1 do macrófago associada à resistência natural, do inglês, *natural resistance-associated macrophage protein 1*

PAMPS: Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC: células mononucleares humanas do sangue periférico, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*

PBS: do inglês, *Phosphate buffered saline*

PKC: proteína quinase C, do inglês, *protein kinase C*

pM: picomolar

PMA: acetato miristato de forbol, do inglês, *phorbol-12-myristate-13-acetate*

Pra1: do inglês, *pH-regulated antigen 1*

RC: receptores do complemento

SNC: Sistema Nervoso Central

STAT: transdutores de sinal e ativadores de transcrição, do inglês, *signal transducing activator of transcription*

TGF- β : ator de transformação do crescimento beta, do inglês, *transforming growth factor beta*

Th1: T-helper 1

Th17: T- *helper* 17

Th2: T-*helper* 2

TLRs: receptores Toll-*like*, do inglês, *Toll-like receptors*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral, do inglês, *Tumor Necrosis Factor*

TPEN: do inglês, *N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*

Var.: variedade

ZIP: do inglês, *ZrT-,Irt-like protein*

Zn: zinco

ZnT: do inglês, *Zinc transporter*

ZrT: do inglês, *Zinc regulated transporter*

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Complexo de espécies de C. neoformans conforme primeiras classificações..</i>	16
<i>Figura 2. Patogênese da infecção por Cryptococcus sp.</i>	19
<i>Figura 3. Aumento da célula de Cryptococcus neoformans em modelo de infecção murino.</i>	24
<i>Figura 4. Microscopias de interações entre C. neoformans e macrófagos.</i>	27
<i>Figura 5. Interação C. neoformans: macrófagos.</i>	29
<i>Figura 6. Armazenamento e distribuição de zinco em compartimentos intracelulares.</i>	35
<i>Figura 7. Proteínas ligadoras de Zn associadas a processos biológicos em fungos.</i>	37
<i>Figura 8. Armazenamento e distribuição de Zn por transportadores ZIP e ZnTs em compartimentos intracelulares.</i>	38
<i>Figura 9. Topologia predita de transportadores da família ZIP/SLC39.</i>	40
<i>Figura 10. Topologia predita de transportadores da família ZnT/SLC30.</i>	41
<i>Figura 11. Proteínas envolvidas na homeostase de Zn em Saccharomyces cerevisiae.</i>	42
<i>Figura 12. Metabolismo de zinco na imunidade nutricional.</i>	48
<i>Figura 13. Modelo de sequestro de Zn de células hospedeiras em C. albicans.</i>	50
<i>Figura 14. Ensaio de viabilidade celular da linhagem celular J77.A1 exposta a diferentes concentrações de metais e quelantes de Zn.</i>	80
<i>Figura 15. Genes codificantes de transportadores de Zn em macrófagos mostram diferentes perfis de regulação quando diferentes metais estão disponíveis.</i>	82
<i>Figura 16. Transportador ZnT2 mostrou modulação na expressão após 2 h de exposição à privação de Zn.</i>	83
<i>Figura 17. Transportadores de macrófagos da família ZnT mostram modulação de expressão durante exposição à privação de Zn, enquanto expressão de MT1 não é alterada.</i>	84
<i>Figura 18. Aumento na disponibilidade de Zn não altera proliferação de C. neoformans em macrófagos não ativados ou ativados com PMA.</i>	86
<i>Figura 19. Macrófagos ativados com PMA não mostram alteração nos níveis de transcritos de transportadores de Zn bem como nos níveis intracelulares de Zn livre durante resposta a C. neoformans vivo.</i>	87
<i>Figura 20. Ativação de macrófagos com PMA permite maior recuperação das leveduras em comparação à ativação com IFN-γ e LPS.</i>	88

RESUMO

Interações patógeno-hospedeiro geram alterações em diversos mecanismos, tanto no hospedeiro quanto no patógeno. Neste contexto, nas células do sistema imune do hospedeiro ocorre modulação para impedir o desenvolvimento de patógenos, culminado em sua eliminação, como no caso de infecções por *Cryptococcus neoformans*. Macrófagos alveolares constituem o primeiro tipo celular a responder à levedura, a qual, após a fagocitose, é capaz de se proliferar e disseminar no hospedeiro. Como mecanismo de defesa, células hospedeiras podem reduzir a concentração de micronutrientes essenciais para o patógeno, mecanismo conhecido por imunidade nutricional. Zinco (Zn) é o segundo metal de transição mais abundante e um micronutriente essencial para todos os organismos e, com isto, macrófagos podem responder a patógenos com redução dos níveis de Zn para auxiliar na eliminação de patógenos. A fim de avaliar se macrófagos respondem com privação de Zn a a fungos, a alteração na homeostase de Zn em macrófagos infectados por *C. neoformans* foi avaliada bem como a influência da ativação celular nesta resposta. Demonstramos que macrófagos respondem com privação de Zn à infecção por *C. neoformans* uma vez que ocorreu (i) diminuição nos níveis intracelulares de Zn livre em macrófagos infectados com a levedura viável, (ii) redução na expressão de importadores do metal, (iii) redução nos níveis de Zn livre em leveduras após exposição a macrófagos, (iv) aumento na proliferação no interior de macrófagos e diminuição da taxa de exocitose de *C. neoformans* em condições de disponibilidade de Zn. Tal modulação de Zn na resposta a *C. neoformans* foi exercida por alguns transportadores de Zn que respondem significativamente a condições de privação de Zn, principalmente os da família ZnT, e a privação de Zn como mecanismo de imunidade nutricional foi evidente em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS. Macrófagos ativados com PMA não mostraram redução nos níveis intracelulares de Zn em resposta a *C. neoformans* ou modulação significativa nos níveis de transcritos de transportadores de Zn, como ZIP2 e ZnT7, em comparação a macrófagos ativados com IFN- γ e LPS. Além disso, de forma geral, macrófagos ativados continham maiores níveis intracelulares de Zn livre em comparação a macrófagos não ativados, sugerindo modulação do processo de ativação na homeostase de Zn em macrófagos J774.A1.

ABSTRACT

Host-pathogen interactions cause alterations on several mechanisms in both host and pathogen. In this context, host immune system cells are modulated to prevent pathogens growth, aiding in their elimination, as it occurs during *Cryptococcus neoformans* infections. Alveolar macrophages are the first cell type to respond to yeast infection. Once phagocytosed, cryptococcal cells are capable to proliferate and disseminate in the host. As a defense mechanism, host cells can reduce essential micronutrients concentration to the pathogen, a mechanism known as nutritional immunity. Zinc (Zn) is the second most abundant transition metal and an essential micronutrient for all organisms and thus, macrophages may respond to pathogens with reduced levels of Zn to aid pathogens elimination. In order to evaluate whether macrophages respond with Zn deprivation to fungi, alterations on Zn homeostasis in *C. neoformans*-infected macrophages was evaluated as well as the influence of cellular activation in this response. We demonstrate that macrophages respond with Zn deprivation to *C. neoformans* infection, as we could observe (i) a reduction of free intracellular Zn levels in macrophages infected with viable yeast, (ii) a reduced expression of Zn importers, (iii) a decreased free Zn concentration in yeasts exposed to macrophages, (iv) increased yeast proliferation within macrophages and decreased yeast exocytosis under Zn rich conditions. This Zn modulation in response to *C. neoformans* was exerted by some Zn transporters which respond significantly to Zn deprivation conditions, especially those of the ZnT family, and Zn deprivation as a nutritional immunity mechanism was evident in IFN- γ and LPS-activated macrophages. PMA-activated macrophages showed no reduction in intracellular Zn levels in response to *C. neoformans* or a significant modulation in Zn transporters transcript levels, such as ZIP2 and ZnT7, in comparison to IFN- γ - LPS-activated macrophages. In addition, in general, activated macrophages contained increased free intracellular Zn levels in comparison to non-activated macrophages, suggesting activation process modulation on Zn homeostasis in J774.A1 macrophages.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Infecções Fúngicas

Patógenos fúngicos causam grande impacto a nível global, como em segurança de alimentos, distúrbios em ecossistemas e extinção de espécies (Fisher *et al.*, 2012). Somado a isso, é reconhecido mundialmente o efeito destes patógenos na saúde humana e animal (Tabela 1). A incidência de cada uma das doenças fúngicas varia de acordo com (i) hábitos culturais, (ii) condições socioeconômicas e (iii) localização geográfica. As infecções invasivas tem menor incidência do que as superficiais, entretanto, as doenças invasivas exigem preocupação já que estão associadas a altos índices de mortalidade. Muitas espécies fúngicas são responsáveis por tais infecções, as quais estão associadas a cerca de 1.5 milhão de mortes por ano. Estima-se que a taxa de mortalidade em indivíduos com as 10 doenças fúngicas invasivas mais frequentes (Tabela 1) seja maior que a de tuberculose ou malária. Destas, mais de 90% de mortes por infecções fúngicas são causadas pelas espécies destes quatro gêneros: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* (Brown *et al.*, 2012).

Tabela 1: Estatística das 10 infecções fúngicas invasivas mais importantes. Adaptada de Brown et al, 2012.

Doença (Espécies mais comuns)	Local	Estimativa de número de infecções/ ano	Índice de Mortalidade
Micoses invasivas oportunistas			
Aspergilose (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Mundialmente	> 200.000	30 - 95 %
Candidíase (<i>Candida albicans</i>)	Mundialmente	> 400.000	46 - 75 %
Criptococose (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	Mundialmente	> 1.000.000	20- 70 %
Mucormicose (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Mundialmente	> 10.000	30 - 90 %
Pneumocistose (<i>Pneumocystis jirovecii</i>)	Mundialmente	> 400.000	20 - 80 %
Micoses dimórficas endêmicas			
Blastomicose (<i>Blastomyces dermatitidis</i>)	Meio oeste e região do Atlântico dos Estados Unidos	~ 3.000	<2 - 68%
Coccidioidomicose (<i>Coccidioides immitis</i>)	Sudoeste dos Estados Unidos	~ 25.000	<1 - 70 %
Histoplasmose (<i>Histoplasma capsulatum</i>)	Meio oeste dos Estados Unidos	~ 25.000	28 - 50 %
Paracoccidioidomicose (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	Brasil	~ 4.000	5 - 27 %
Peniciliose (<i>Penicillium marneffeii</i>)	Sudeste da Ásia	> 8.000	2 - 75 %

1.2 O Gênero *Cryptococcus*

A criptococose, em humanos e outros mamíferos, é predominantemente causada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2014), as quais são leveduras basidiomicéticas encapsuladas e patogênicas, geralmente encontradas no meio ambiente. Estas duas espécies divergiram há mais de 34 milhões de anos, de acordo com análises filogenômicas. Desta forma, duas espécies com diferenças patológicas e ecológicas específicas foram obtidas (Srikanta, Santiago-Tirado and Doering, 2014).

O complexo de espécies *C. neoformans* foi classificado pela primeira vez em 1950, de acordo com as variações estruturais nos polissacarídeos da cápsula, através de reações de aglutinação (Evans, 1950). Quatro sorotipos foram identificados: A, B, C e D, além do híbrido AD. Análises moleculares posteriores, entretanto, classificaram os sorotipos B e C como uma nova espécie, denominada *C. gattii* (Kwon-Chung and Varma, 2006). Por sua vez, os sorotipos restantes, A e D, foram considerados duas variedades (var.) de *C. neoformans*: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D). As duas espécies de *Cryptococcus* sp. foram subdivididas em quatro tipos moleculares de acordo com as técnicas de PCR *fingerprinting* e análise por Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP) (Figura 1)(Boekhout *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999; Ngamskulrunroj *et al.*, 2009).

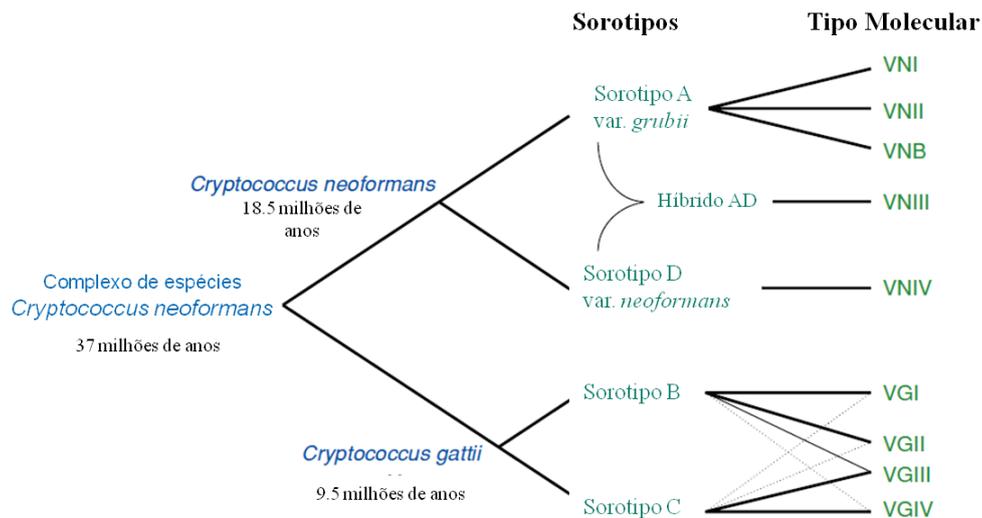


Figura 1: Complexo de espécies de *C. neoformans* conforme primeiras classificações. O complexo de espécies de *Cryptococcus* possui duas subespécies, *C. neoformans* e *C. gattii*. A primeira subespécie divergiu de um ancestral comum em cerca de 37 milhões de anos e, a segunda, em cerca de 18.5 milhões de anos. Estas duas subespécies foram classificadas em, basicamente, quatro sorotipos: *C. neoformans* em A, D (além do híbrido AD) e *C. gattii* em B e C, consistindo no total em pelo menos nove tipos moleculares. As linhas tracejadas significam que pode haver reação cruzada, ou seja, os limites entre sorotipos e tipos moleculares, principalmente na espécie *C. gattii*, não são bem delimitados. Adaptado de (Lin and Heitman, 2006).

As duas espécies possuem diferenças em relação aos fatores de suscetibilidade do hospedeiro e curso da doença. Desta forma, esta divisão possui grande importância epidemiológica e clínica, uma vez que os tipos moleculares VGI e VGII foram associados com a maioria dos casos de surtos da doença em pessoas saudáveis na América do Norte, enquanto os tipos VGIII e VGIV produzem doença, geralmente, em pacientes imunocomprometidos (como os que possuem HIV/AIDS), uma característica semelhante aos perfis epidemiológicos observados para infecções causadas por *C. neoformans* (Byrnes *et al.*, 2011).

Atualmente, sete espécies de *C. neoformans/C. gattii* foram propostas, as quais apresentam diferenças genéticas quando comparadas às outras espécies do complexo previamente descrito (Hagen *et al.*, 2015). Assim, uma nova taxonomia foi sugerida, a qual

reclassificou as espécies patogênicas de *Cryptococcus* de acordo com padrões genéticos e moleculares (Tabela 2).

Tabela 2: Mudanças propostas na taxonomia do complexo *C. neoformans* / *C. gattii*.
Adaptada de Hagen et al., 2015.

Nomenclatura atual	Genótipo por RFLP	Nova nomenclatura proposta
<i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	VNI; VNII; VNIII	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var <i>neoformans</i>	VNIV	<i>C. deneoformans</i>
Híbrido intervariedades <i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	VGI; VGII; VGIII; VGIV; VGIV/VGIIIc	<i>C. gattii</i> ; <i>C. bacillisporus</i> ; <i>C. deuterogattii</i> ; <i>C. tetragattii</i> ; <i>C. decagattii</i>
Híbrido <i>C. neoformans</i> var <i>neoformans</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	-	Híbrido <i>C. deneoformans</i> x <i>C. gattii</i>
Híbrido <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	-	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. gattii</i>
Híbrido <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP6/VGII	-	Híbrido <i>C. deneoformans</i> x <i>C. deuterogattii</i>

Apesar da descrição de uma nova nomenclatura para as leveduras deste complexo, neste trabalho será utilizada a nomenclatura antiga para *C. gattii* e *C. neoformans*, a fim de facilitar a compreensão e comparações com estudos já estabelecidos. Neste contexto, cerca de 95% das infecções são causadas por linhagens de *C. neoformans* do sorotipo A e o restante (4-5%) causadas por linhagens do sorotipo D de *C. neoformans* ou por *C. gattii* (sorotipos B/C). Enquanto as linhagens do sorotipo A de *C. neoformans* da variedade *grubii* são encontradas mundialmente, as leveduras do sorotipo D, var. *neoformans*, são observadas na Europa. Já *C. gattii* tem sido geograficamente restrito a regiões tropicais e

subtropicais, como Hawaii, Brasil, África central, Austrália. Entretanto, *C. gattii* já foi identificado em regiões de clima temperado, como a ilha de Vancouver (Canadá) e na região noroeste do pacífico dos Estados Unidos (Chayakulkeeree and Perfect, 2006). O tipo molecular VGII de *C. gattii* é o mais comum, compreendendo 47% dos isolados ambientais, seguido por VGI (34%), VGIII (11%) e VGIV (8%). Entretanto, em isolados clínicos, VGI e VGII são os predominantes seguidos por VGIII e VGIV (Chen *et al.*, 2014). VGII tem mostrado maior expansão no número de casos desde o surto na ilha de Vancouver, em 2001 (Byrnes and Heitman, 2009), até regiões próximas dos Estados Unidos (Dixit, Carroll and Qureshi, 2009) e Canadá. Isto sugere uma mudança na distribuição destas leveduras possivelmente relacionada a mudanças na temperatura global e umidade (Chen, Meyer and Sorrell, 2014; Du *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2004). Apesar da emergência de *C. gattii* como causador da criptococose, o número de casos da doença causados por esta espécie é menor em relação a *C. neoformans* (Srikanta, Santiago-Tirado and Doering, 2014).

1.3 Criptococose e processo de infecção

C. neoformans é geralmente encontrado em associação com excretas de certas aves, como pombas, em isópodes terrestres (tatus-bolas) ou amebas no ambiente, além de uma variedade de árvores. Já *C. gattii* está associado comumente com diversas espécies de árvores do tipo eucalipto, em clima tropical ou subtropical (Srikanta, Santiago-Tirado and Doering, 2014). De forma geral, a criptococose inicia-se pela inalação de leveduras dessecadas ou de basidiósporos, os quais atingem os pulmões do hospedeiro. Os propágulos são pequenos, contendo de 1,5 a 3,5 µm de tamanho, facilitando sua chegada

aos alvéolos pulmonares. Uma vez nos pulmões, as células da levedura entram em contato com macrófagos alveolares, podendo ser fagocitados por estas células (Figura 2). Os macrófagos ativados podem, então, recrutar outras células do sistema imune através da secreção de citocinas e quimiocinas a fim de desenvolver uma resposta Th1 (Kwon-Chung *et al.*, 2014). No interior do macrófago, o fungo é capaz de proliferar, sendo esta capacidade diretamente correlacionada à virulência da mesma (Srikanta, Santiago-Tirado and Doering, 2014). Após atingir a via hematogênica, as leveduras podem, então, invadir o sistema nervoso central (SNC) por cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) de diversas formas: (i) paracelular, cruzando uma BHE fragilizada, (ii) transcelular, atravessando células endoteliais cerebrais e alcançando o parênquima cerebral ou (iii) transcitose, quando no interior de macrófagos hospedeiros, mecanismo chamado de “cavalo de Tróia”(Taylor-Smith and May, 2016).

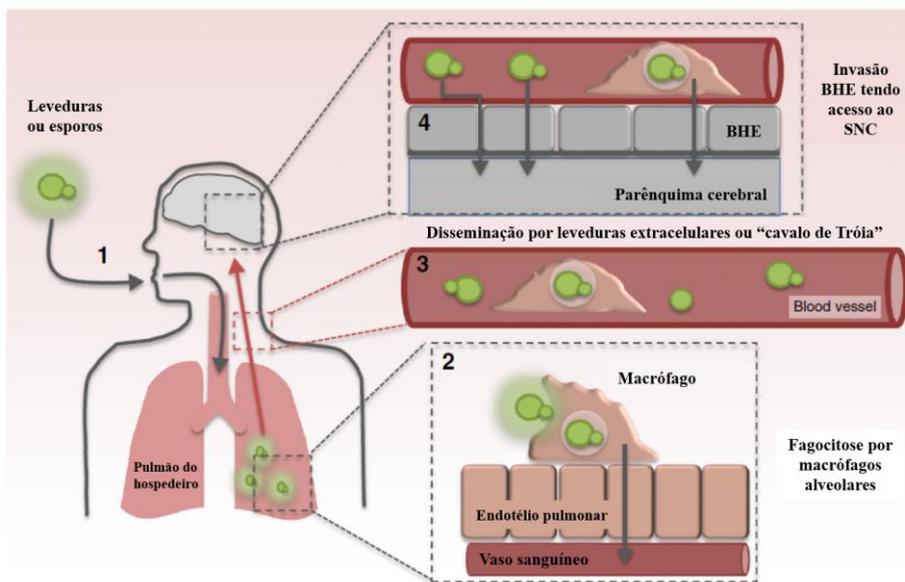


Figura 2. Patogênese da infecção por *Cryptococcus sp.* 1) Esporos ou leveduras dessecadas são inaladas pelo hospedeiro e atingem os pulmões. 2) A levedura sofre fagocitose por macrófagos alveolares e pode se disseminar pelo organismo hospedeiro quando no interior das células fagocíticas. 3) A levedura se dissemina pela corrente sanguínea do hospedeiro tanto como células isoladas como no interior de macrófagos, mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia”. 4) Invasão do SNC ocorre quando a levedura atravessa a BHE (Barreira hemato-encefálica). Adaptado de (Taylor-Smith and May, 2016).

Apesar das leveduras destas duas espécies possuírem entre 80-90% de identidade genética, o hospedeiro e as manifestações da doença, causadas por cada uma delas, são diferentes, tornando-se evidente que a resposta do hospedeiro contra o fungo tem grande importância na definição do curso da doença. *C. neoformans* causa doença predominantemente em indivíduos imunocomprometidos (como aqueles com AIDS ou sob terapia de imunossupressores) a qual pode resultar em pneumonia e, posteriormente, disseminação da levedura pelo organismo. Desta forma, *C. neoformans* possui predileção ao sistema nervoso central (SNC), podendo causar então, o quadro mais grave da doença conhecido como meningoencefalite. A infecção no SNC não tratada costuma ser fatal (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Além da meningoencefalite, pode ocorrer a formação de pequenos complexos de linfa-pulmão, nos quais as leveduras permanecem viáveis, mas latentes, enquanto os pacientes ainda são assintomáticos clinicamente. Tais pacientes apresentam sintomas quando sua imunidade é afetada por condições imunossupressoras, tais como as listadas anteriormente. Uma vez ativadas, as células fúngicas se disseminam através dos linfonodos do pulmão e atingem sítios extrapulmonares (Dromer *et al.*, 2011).

Em contraste, *C. gattii* acomete indivíduos imunocompetentes, com ou sem condições de base, e alguns genótipos podem apresentar baixa predileção pelo SNC (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). É descrito que a infecção pulmonar por *C. gattii* é mais comum do que por *C. neoformans* e que ambas as espécies possuem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, entretanto, *C. neoformans* consegue se desenvolver cerca de 10-100 vezes mais rápido que *C. gattii* no sangue de camundongos *naive* e soro. Tal fato sugere que, apesar da significativa similaridade de genomas e características de virulência, existe diferença na especificidade de órgão alvo entre as espécies, apesar de não

estarem bem elucidados ainda os mecanismos que governam estas diferenças (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Leopold Wager *et al.*, 2016; Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012).

No contexto de interação com o hospedeiro, as células fúngicas podem se adaptar às condições impostas pelo hospedeiro e evadir a resposta imune por diversos mecanismos associados aos fatores de virulência, já descritos para tais leveduras. Tais fatores, que possuem papel na sobrevivência da levedura no ambiente, também atuam na proteção quando a levedura entra em contato com diferentes hospedeiros, humanos ou não (Steenbergen, Shuman and Casadevall, 2001).

1.3.1 Fatores de virulência

Além da capacidade de se proliferar no interior de fagócitos, se destacam entre os fatores de virulência: (i) capacidade de proliferação a 37°C, (ii) formação do pigmento melanina na parede celular, (iii) secreção de enzimas e (iv) produção de cápsula polissacarídica (He *et al.*, 2003; Ma and May, 2009; Perfect *et al.*, 1998).

As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* possuem capacidade de se desenvolver na temperatura de 37°C do hospedeiro, o que diferencia-as das outras espécies não patogênicas do complexo *Cryptococcus*, as quais possuem capacidade de produção de melanina e cápsula polissacarídica, mas não de desenvolvimento em tais temperaturas (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Petter *et al.*, 2001). Nota-se, então, que uma das características mais evidentes e visíveis das leveduras do gênero *Cryptococcus* sp é a produção do pigmento marrom escuro, a melanina. Tal pigmento possui carga negativa, é hidrofóbico (Casadevall, Rosas and Nosanchuk, 2000), sintetizado por fenoloxidasas e acumula-se na parede celular da levedura. As enzimas, conhecidas como lacases, são codificadas pelos

genes *LAC1* e *LAC2*, e produzem o pigmento na presença de compostos fenólicos como L-DOPA ou catecolaminas presentes no SNC, fator que pode contribuir para a sobrevivência da levedura (Williamson, Wakamatsu and Ito, 1998). É conhecido o papel da melanina na proteção contra radiação, danos oxidativos e a altas e baixas temperaturas (Khajo *et al.*, 2011; Rosas and Casadevall, 1997). É considerado um importante antioxidante, pois protege contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio derivados de células do hospedeiro durante a resposta imune (Jacobson and Tinnell, 1993; Wang, Aisen and Casadevall, 1995) e contribui para resistência a antifúngicos (anfotericina B e caspofungina) (Duin, van, Casadevall and Nosanchuk, 2002; Wang and Casadevall, 1994).

Outros fatores de virulência enquadram a produção de diversas enzimas de degradação pelas leveduras *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre elas, destaca-se a urease e fosfolipase B, as quais são conhecidas por seu papel na patogenicidade do fungo, aumentando a sobrevivência intracelular da levedura e a disseminação da mesma do pulmão para o cérebro (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A enzima urease possui papel importante na propagação do fungo por causar acúmulo de células dendríticas imaturas e uma resposta Th2 não protetora (Osterholzer *et al.*, 2009) e é importante na capacidade do fungo de transpor a barreira hematoencefálica (Olszewski *et al.*, 2004). Por sua vez, a fosfolipase B é transportada para a superfície celular da levedura em vesículas e aumenta a adesão do fungo às células do epitélio pulmonar (Ganendren *et al.*, 2006). A fosfolipase auxilia na penetração no tecido hospedeiro, pois hidrolisa ligações de ésteres nos fosfolipídios de membrana e aumenta a sobrevivência intracelular do patógeno em macrófagos por relação com metabolismo de lipídios, um mecanismo-chave para disseminação para o cérebro (Wright *et al.*, 2004, 2007).

Já a cápsula polissacarídica, por sua vez, constitui o fator de virulência mais elucidado de *Cryptococcus* sp. Trata-se de uma estrutura dinâmica, que pode ter tamanhos diferentes e, desta forma, pode ser responsiva a diferentes condições associadas ao hospedeiro, como privação de ferro, níveis de dióxido de carbono (CO₂) elevados e pH neutro ou alcalino (Granger, Perfect and Durack, 1985; Vartivarian *et al.*, 1993). Já foi demonstrado que células acapsulares não são virulentas, uma vez que esta estrutura inibe a fagocitose da célula fúngica bem como outras respostas imune do hospedeiro contra o fungo (Doering, 2009).

A cápsula está associada com a parede celular do fungo e é composta por dois polissacarídeos majoritariamente: glucuroxilomanana (GXM) e glucuronoxilogalactomanana (GalGXM)(Doering, 2009; Janbon and Doering, 2011), os quais possuem papel na virulência do fungo (Janbon and Doering, 2011). A secreção de polissacarídeos da cápsula através de vesículas é considerada um fator de virulência juntamente com a estrutura capsular total, uma vez que as vesículas contendo os polissacarídeos podem ser fagocitadas por macrófagos e as mesmas contem outros componentes fúngicos importantes (Oliveira *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2007, 2008). Uma vez no citoplasma de macrófagos, os polissacarídeos capsulares podem alterar funções da célula fagocítica ou causar sua lise, podem inibir a liberação de citocinas e a migração de leucócitos para sítios de inflamação (Vecchiarelli *et al.*, 1995; Bose *et al.*, 2003) e, ainda, o polissacarídeo GXM é capaz de induzir apoptose das células T do hospedeiro (Pericolini *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2006).

Para aumentar a evasão do sistema imune do hospedeiro, a levedura possui a capacidade de alterar a cápsula polissacarídica tanto em estrutura como em tamanho (Charlier *et al.*, 2005; Zaragoza, 2011). Durante a infecção primária pulmonar, as

leveduras podem formar as chamadas células *titan*, ou células gigantes, as quais possuem mais de 100 µm de diâmetro, tamanho significativamente maior em comparação com uma célula típica em cultivo *in vitro* de 5-7 µm (Figura 3). As células *titan* não são fagocitadas e produzem células-filhas de tamanho normal, sugerindo que elas existam como ponto estratégico de disseminação da levedura, inclusive favorecendo sua sobrevivência quando expostas a condições de estresse no hospedeiro (Zaragoza and Nielsen, 2013).

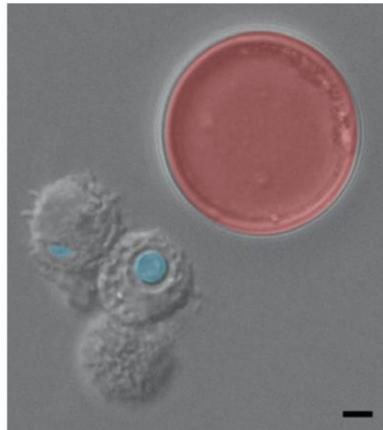


Figura 3. Aumento da célula de *Cryptococcus neoformans* em modelo de infecção murino. Lavado broncoalveolar de camundongo infectado mostra leveduras de tamanho típico, em azul, as quais são prontamente fagocitadas pelas células mononucleares do hospedeiro (em cinza). Em vermelho, célula *titan* de *C. neoformans*, a qual não sofre o processo de fagocitose pelas células hospedeiras. Barra =5 µm. Adaptado de: (Zaragoza and Nielsen, 2013).

1.4 Imunidade às espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*

A resposta imune a infecção por *Cryptococcus* sp. pode ser dividida em duas fases: (i) fase aferente, quando a resposta inata é presente e a resposta adaptativa está se desenvolvendo e (ii) fase eferente, na qual a resposta adaptativa exerce o papel. Além da resposta mediada por células pertencentes a cada um dos sistemas, diversas estruturas do organismo hospedeiro auxiliam na tentativa de eliminação do micro-organismo.

1.4.1 Sistema Imune Inato

1.4.1.1 Barreiras Anatômicas

O corpo humano possui diversas barreiras físicas para proteção contra agentes danosos. O sistema respiratório é adaptado para remover contaminantes presentes no ar através da ação conjunta da barreira mucosa epitelial com a turbulência do fluxo de ar e contenção de partículas no muco nasal. Além disso, as vias nasais contêm grande quantidade de IgA, a qual liga toxinas e partículas virais bem como impede invasão bacteriana nas células epiteliais e células dendríticas, responsáveis por eliminar micro-organismos através da fagocitose (Nicod, 2005).

1.4.1.2 Células do sistema imune inato

De forma geral, as células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, são a primeira linha de defesa contra micro-organismos que ultrapassam as barreiras anatômicas. Neutrófilos capturam e degradam micro-organismos e possuem papel no início do processo de inflamação em resposta à infecção (Gibson and Johnston, 2015). Durante infecção por *Cryptococcus* sp., os neutrófilos possuem mecanismos oxidativos e não oxidativos que auxiliam na tentativa de conter a proliferação fúngicas. Entretanto, a levedura é capaz de evadir tais respostas. A produção de peptídeos antimicrobianos, mais conhecida como defensinas, que possuem atividade citotóxica contra *C. neoformans*, também é descrita para neutrófilos. Entretanto, neutrófilos podem aumentar a formação de granulomas nos pulmões e a depleção destas células em modelo *in vivo* se mostrou

protetora contra infecção pulmonar por *C. neoformans* uma vez que mostrou menor inflamação (Mednick *et al.*, 2003). Assim, não é descrito papel essencial de tais células no controle da infecção por *Cryptococcus* sp. (Gibson and Johnston, 2015). Outras células polimorfonucleares, como os eosinófilos, também demonstram um efeito deletério para o hospedeiro na resposta à infecção por *Cryptococcus* sp., uma vez que mostraram ser forte fonte da citocina IL-4, a qual caracteriza uma resposta Th2 e excessiva inflamação pulmonar (Piehler *et al.*, 2011).

Além das células polimorfonucleares, é descrita a função de células dendríticas e macrófagos, essenciais para direcionar a resposta imune contra *Cryptococcus* sp através da fagocitose (Hole and Wormley, 2016). As células dendríticas (CDs) podem fagocitar as leveduras via complemento ou pela opsonização da levedura com anticorpo (Kelly *et al.*, 2005; Syme *et al.*, 2002). Tais células são capazes de internalizar as leveduras e mediar a eliminação do fungo através dos componentes lisossomais (Wozniak and Levitz, 2008). Além disso, a cápsula criptococócica ativa as células dendríticas e estimula a maturação das mesmas. E, após a fagocitose, ocorre a indução da expressão de moléculas MHC classe II e outras moléculas co-estimulatórias na superfície das CDs (Grijpstra *et al.*, 2009; Hole and Wormley, 2016). Assim, são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos para as células T (Syme *et al.*, 2002) e, desta forma, consistem na ponte entre resposta inata e resposta adaptativa e sua ativação é essencial para sobrevivência do hospedeiro. Entretanto, a atividade inicial de macrófagos nos locais primários de infecção também é essencial para o processo de resposta imune contra *C. neoformans* (Hole and Wormley, 2016).

1.4.2 Interações entre macrófagos e espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*

Os macrófagos alveolares constituem a primeira linha de defesa contra o patógeno e tal defesa ocorre, principalmente, pelo processo de fagocitose do fungo pela célula mamífera. Após a fagocitose, ocorre maturação do fagossomo recém formado na célula hospedeira, através de múltiplos passos, a fim de gerar um ambiente antimicrobiano. Por meio da fagocitose, espera-se que as células mamíferas consigam eliminar o fungo e iniciar uma resposta imune robusta, através de (i) liberação de citocinas, (ii) ativação e mobilização de células do sistema imune especializadas e (iii) apresentação de antígenos (Gibson and Johnston, 2015). *C. neoformans* possui capacidade de proliferação (Figura 4) dentro do fagossomo (Tucker and Casadevall, 2002; Voelz, Lammas and May, 2009), assim como de passar de um macrófago para outro ou de evadir o macrófago (Alvarez and Casadevall, 2007; Ma *et al.*, 2007).

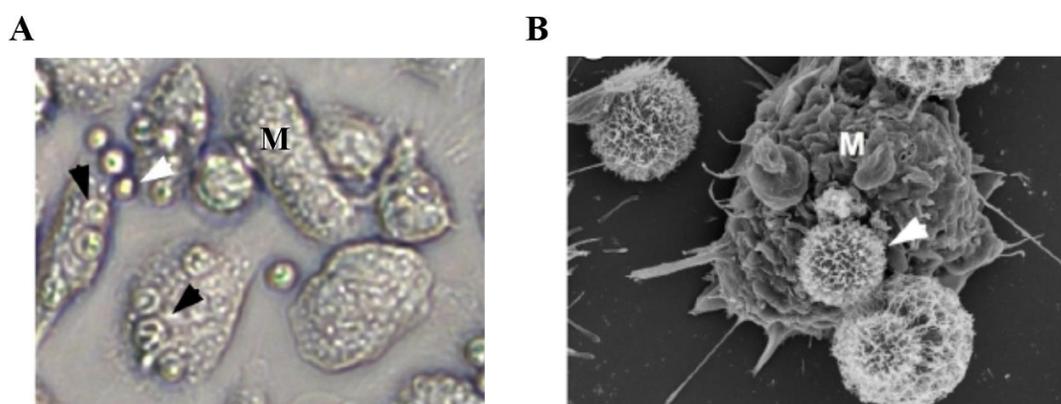


Figura 4. Microscopias de interações entre *C. neoformans* e macrófagos. (A) Microscopia de contraste ilustrando a interação de *C. neoformans* com macrófagos, com células fúngicas aderidas (setas brancas) aos fagócitos (M) e internalizadas (setas pretas) pelos fagócitos. (B) Microscopia eletrônica de varredura demonstrando interação de *C. neoformans* (seta branca) com macrófagos (M). Adaptado de (Coelho, Bocca and Casadevall, 2014).

As células fúngicas podem escapar dos macrófagos por lise, através da alta taxa de replicação fúngica intrafagossomal, a ponto que ocorre a ruptura da célula mamífera, ou pelo mecanismo de extrusão. Tal mecanismo também é conhecido como escape não lítico ou vomocitose, o qual se trata de uma exocitose independente de actina (Alvarez and Casadevall, 2006; Johnston and May, 2010; Ma *et al.*, 2006, 2007), que não causa danos à célula hospedeira. Já quando no interior de células fagocíticas, o fungo pode migrar e atravessar membranas celulares, incluindo a barreira hematoencefálica, processo conhecido como “cavalo de Tróia” (Chrétien *et al.*, 2002; Luberto *et al.*, 2003). As leveduras podem ser liberadas no sistema nervoso central (SNC) sem serem expostas ao sistema imune, aumentando sua capacidade de disseminação (Drevets and Leenen, 2000). Em um estudo de modelo de infecção animal, macrófagos que já continham células de *C. neoformans* fagocitadas previamente *in vitro* possuíam maior grau de disseminação, quando comparados com animais com células fagocíticas sem a levedura (Charlier *et al.*, 2009). Conjuntamente, as leveduras podem atravessar a barreira hematoencefálica pela (i) transcitose através da adesão a células epiteliais da barreira, envolvendo mudanças no citoesqueleto da célula hospedeira, ou (ii) entre as junções das células (Charlier *et al.*, 2005; Jong *et al.*, 2008; Srikanta, Santiago-Tirado and Doering, 2014). Tais mecanismos de disseminação da levedura quando no interior de macrófagos está sintetizado na Figura 5.

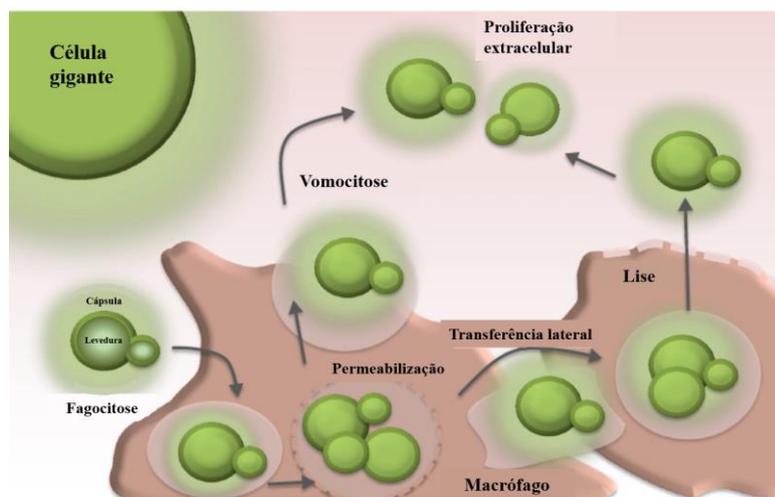


Figura 5. Interação *C. neoformans*: macrófagos. Macrófagos podem entrar em contato com leveduras e células gigantes da levedura. As células gigantes resistem à fagocitose de macrófagos. As leveduras fagocitadas, entretanto, podem se replicar no interior da célula fagocítica. O fagossomo pode sofrer permeabilização, a qual neutraliza o conteúdo fagossomal. *C. neoformans* pode interagir com um macrófago e ser liberado novamente para o ambiente extracelular pela lise do macrófago, por vomocitose, conhecida também por exocitose não-lítica, ou por transferência lateral para o interior de outro macrófago. Estas estratégias de sobrevivência e escape das células fagocíticas auxiliam na sua disseminação pelo organismo hospedeiro e proliferação em novos sítios. Adaptado de (Taylor-Smith and May, 2016).

1.4.3 Sistema Imune Adaptativo

A resposta imune adaptativa é essencial para resposta contra *C. neoformans* pela atividade das células T, uma vez que defeitos nestas células estão associados com pacientes que possuem AIDS, principais indivíduos que podem ser acometidos pela doença fúngica. Diversos tipos de linfócitos T estão envolvidos na resposta a *C. neoformans*, como CD4+, CD8+ e células gama delta T. As células CD4+ *naive* são ativadas durante a infecção e se diferenciam em Th1, Th2 ou Th17, de uma forma geral, dependendo das citocinas presentes. Uma vez ativadas, as células CD4+ sinalizam para as células B, macrófagos e CD8+ (Rohatgi and Pirofski, 2015).

Após a apresentação de antígenos de *Cryptococcus* sp. por células apresentadoras de antígenos (macrófagos ou células dendríticas), as células T são ativadas e ocorre a produção de citocinas pelas mesmas. Quando as células T são ativadas por componentes capsulares da levedura, as células CD4⁺ produzem citocinas Th2, resposta que se torna favorável para o desenvolvimento do patógeno. Sabe-se também que o polissacarídeo GXMGal inibe a proliferação das células T, possivelmente pela indução da apoptose destas células (Monari *et al.*, 2005). As células CD8⁺ possuem importância na eliminação de *C. neoformans*, mas tal processo é dependente de contato célula-célula mediado por granulicina e a depleção de CD8⁺ mostrou redução significativa na sobrevivência de camundongos infectados por *C. neoformans* (Mody *et al.*, 1994). Além disso, as células CD8⁺ reduzem a proliferação e sobrevivência da levedura no interior de macrófagos pela produção de IFN- γ de forma independente de CD4⁺ (Veerdonk, van de and Netea, 2010).

Já as células gama delta T regulam as respostas Th1-Th2 para *C. neoformans*. Tais células liberam citocinas Th2 quando Th1 é exacerbada. A depleção destas células causa aumento na produção de IFN- γ e eliminação da levedura em pulmão de camundongos infectados pela resposta mediada por Th1 (Uezu *et al.*, 2004).

As células T ainda podem gerar uma resposta em cadeia pela produção de citocinas, estimulando diversas células na resposta a leveduras do gênero *Cryptococcus* sp. O início de uma resposta imune do tipo Th1 pró-inflamatória é caracterizada pela liberação de Interleucina (IL)-2, IL-12, IL-18, IFN- γ e TNF- α . Tal resposta é protetora para o organismo hospedeiro contra a levedura. Já a resposta do tipo Th2 anti-inflamatória se caracteriza pelo predomínio de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, sendo que está associada com o avanço da doença. Além das respostas Th1 e Th2, também é descrita a

resposta Th17, a qual contribui para resposta contra a levedura, através da liberação de citocinas como IL-17A, IL-21, IL-22, IL-6 e TGF- β (Leopold Wager *et al.*, 2016).

Diversos estudos demonstram ainda que anticorpos, produzidos por células B, contra o polissacarídeo capsular GXM de *C. neoformans*, conferem proteção em camundongos infectados com a levedura (Casadevall *et al.*, 1998; Dromer *et al.*, 1987; Fleuridor; Less; Pirofski, 2001). Anticorpos naturais, predominantemente os da classe IgM, aumentam a ativação do sistema complemento, a fagocitose por macrófagos e a resposta imune adaptativa inicial contra o fungo (Heung, 2017). Uma vez que pacientes HIV positivos e infectados por *C. neoformans* possuem menor contagem de IgM ligante a GXM (Subramanian *et al.*, 2009), ressalta-se a importância dos anticorpos durante a resposta à criptococose. Em camundongos, a ausência de IgM (Subramanian *et al.*, 2010) e células B (Rohatgi; Pirofski, 2012) aumenta a suscetibilidade à doença pulmonar, pela redução da fagocitose por macrófagos e aumento na carga fúngica inclusive no cérebro (Rohatgi; Pirofski, 2012).

Além de mecanismos gerais de resposta imune inata e adaptativa contra as leveduras do gênero *Cryptococcus* sp., mecanismos de defesa do hospedeiro mediados pelas diversas células do sistema imune também englobam a privação de nutrientes para o patógeno como tentativa de conter a disseminação do mesmo. Este processo de alteração na disponibilidade de nutrientes no interior da célula hospedeira é chamado de imunidade nutricional (Hood and Skaar, 2012).

1.4.4 Imunidade Nutricional

Metais de transição como ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, desde procariotos a eucariotos, uma vez que estão envolvidos em diversos processos biológicos (Andreini *et al.*, 2006, 2008). Os metais podem ser associados a metaloproteínas, como fatores de transcrição, proteínas de armazenamento e metaloenzimas, destacando a importância de tais micronutrientes (Prashanth *et al.*, 2015). A atividade catalítica de certos metais potencializa a toxicidade dos mesmos e, desta forma, os níveis de metais necessitam ser mantidos em quantidades adequadas, sendo necessários mecanismos regulatórios eficientes. Entretanto, mecanismos de limitação de metais livres podem também ser utilizados como resposta contra patógenos invasores no organismo hospedeiro. Ambas as respostas, de intoxicação ou privação de metais, estão inclusas nos mecanismos de imunidade nutricional e exigem mudanças a nível molecular, tanto no patógeno quanto no hospedeiro (Hood and Skaar, 2012).

O contexto de imunidade nutricional para impedir o desenvolvimento de patógenos no organismo hospedeiro foi elucidado primeiramente para Fe. Em mamíferos, a maior parte do metal está associado ao grupamento heme, da hemoglobina, em eritrócitos (Cassat and Skaar, 2013). E, assim, já foi descrito que patógenos bacterianos desenvolveram mecanismos capazes de sequestrar Fe proveniente do heme, através da lise de eritrócitos e assimilação do Fe presente no grupamento heme. Entretanto, o hospedeiro possui ainda proteínas que se ligam à hemoglobina, chamadas haptoglobinas, ou ao heme, chamadas hemopexinas, de forma que sequestram hemoglobina e heme, respectivamente, quando liberados em condições de hemólise (Smith and McCulloh, 2015). Além disso, Fe

extracelular é ligado com alta afinidade à transferrina, além de proteínas com menor afinidade, como albumina, e também a citrato e aminoácidos. Dessa forma, há pouca disponibilidade de Fe livre para incorporação por patógenos (Soares and Weiss, 2015).

Macrófagos podem reduzir os níveis de Fe livre a partir do aumento na expressão do transportador intracelular de Fe, Nramp1 (do inglês, *natural resistance-associated macrophage protein 1*). Tal transportador reduz o conteúdo de Fe no citosol e endossomos, limitando a disponibilidade do metal para patógenos intracelulares (Jabado *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 1995). Além disso, macrófagos e neutrófilos podem sequestrar Fe com outras proteínas, como lipocalina 2 (Lcn2) ou através da ativação do fator de transcrição Nrf2, o qual induz a expressão de ferroportina-1 (FPN), quando há infecção por *Salmonella* sp. e *Mycobacterium* sp. (Nairz *et al.*, 2013).

1.5 Zinco e a sua essencialidade para a vida

Assim como o Fe, Zn é um metal de transição essencial para fungos, animais incluindo humanos, plantas e bactérias (Blindauer, 2015; Prasad, 2014). No corpo humano, há cerca de 2 a 3 gramas de Zn. Os músculos e ossos atuam como maiores reservatórios (Wapnir, 1990), perfazendo 60% e 30%, respectivamente, do Zn total no organismo. O fígado e pele armazenam cerca de 5% e 2 a 3 % do Zn total é armazenado em outros tecidos (Blindauer, 2015). A deficiência de Zn afeta mais de dois bilhões de pessoas mundialmente e são descritos diversos sintomas sistêmicos relacionados a esta condição, como perda de cabelo, lesões na pele e nos olhos, disfunção do sistema imune, retardo no crescimento e infertilidade. A toxicidade por Zn também pode causar sintomas, como febre, náuseas e vômitos e dor de cabeça (Broun *et al.*, 1990; Prasad, 2013, 2014). A

importância deste metal para a saúde tornou-se evidenciada na conferência Copenhagen Consensus, nos anos de 2008 e 2012, as quais classificaram como a atitude prioritária, para promoção do bem-estar global, o fornecimento de vitamina A e Zn para mais de 100 milhões de crianças desnutridas (Copenhagen Consensus Center, 2012; Prasad, 2013). Em humanos, cerca de 0,1% do Zn total é suplementado pela ingestão de alimentos e, assim, é absorvido principalmente pelo intestino delgado (Taylor *et al.*, 1991). Quando há excesso de Zn no organismo, o metal é secretado pelo trato gastrointestinal e células epiteliais da mucosa (Hambidge and Krebs, 2001; Krebs, 2013). Mais especificamente, menos de 1% de Zn total é encontrado no soro e 80% deste se encontra conjugado com a proteína sérica albumina, enquanto os outros 20% estão conjugados com α 2-macroglobulina (Barnett *et al.*, 2013; Hara *et al.*, 2017) .

Já em compartimentos celulares, 50% de Zn está localizado no citoplasma, 30 a 40% no núcleo e 10% nas membranas plasmática e de organelas. A concentração intracelular (Figura 6) é descrita perto de 10-100 μ M, porém, grande parte do metal se encontra associado a proteínas funcionais, sendo que as proteínas conjugadas a Zn possuem papel catalítico e estrutural e já foram descritas como proteoma do Zn (Eide, 2006). Zn ainda pode ser encontrado em organelas e vesículas no citosol, estimando-se que, neste compartimento, Zn esteja presente em uma concentração de 100 pM a 10 nM (Hara *et al.*, 2017). Em relação a organelas, descreve-se que na mitocôndria há 0,14 pM, no retículo endoplasmático cerca de 0,9 pM a 5 nM e, no Golgi, 0,2 pM (McCranor *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2011).

atua como cofator de mais de 300 enzimas e 2.000 fatores de transcrição; (ii) é um importante mediador de sinalização, cuja função é regulada por transportadores de Zn celular; (iii) atua como agente anti-inflamatório proporcionando estabilidade da membrana celular; (iv) atua como regulador de expressão gênica (Hara *et al.*, 2017; Vallee and Auld, 1993; Vallee and Falchuk, 1993).

Zinco também possui importante papel na resposta imune através da ativação e proliferação de células T (Haase and Rink, 2014), ativação e maturação de CDs (Mildner and Jung, 2014), quimiotaxia de monócitos, fagocitose e produção de citocinas em macrófagos, atividade antimicrobiana de neutrófilos dependentes ou não da liberação de proteínas extracelulares com função de sequestrar Zn (Corbin *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2007) e, até mesmo, como molécula intoxicante para patógenos (Haase and Rink, 2014).

Em bactérias, Zn também possui papel essencial para desenvolvimento e sobrevivência, desempenhando papel estrutural e catalítico em diversas proteínas. Foi descrito que 3 a 8 % do total de proteínas de bactérias são conjugadas a Zn e que, mais de 80 % delas, são enzimas (Wątyły, Potocki and Rowińska-Żyrek, 2016). Em fungos, é predito que cerca de 5 % do proteoma corresponde a proteínas ligadoras de Zn. Em *S. cerevisiae*, considerando apenas as proteínas ligadoras do metal, 25% delas estão associadas com processos biológicos incluindo regulação da transcrição. Além disso, várias apresentam função de ligação ao DNA e a grande maioria consiste em fatores de transcrição dedos de Zn, a maior família de reguladores transcricionais. Em *C. albicans*, 116 fatores de transcrição dedos de Zn são encontrados e 311 em *A. fumigatus*, conforme demonstra a Figura 7 (Staats *et al.*, 2013).

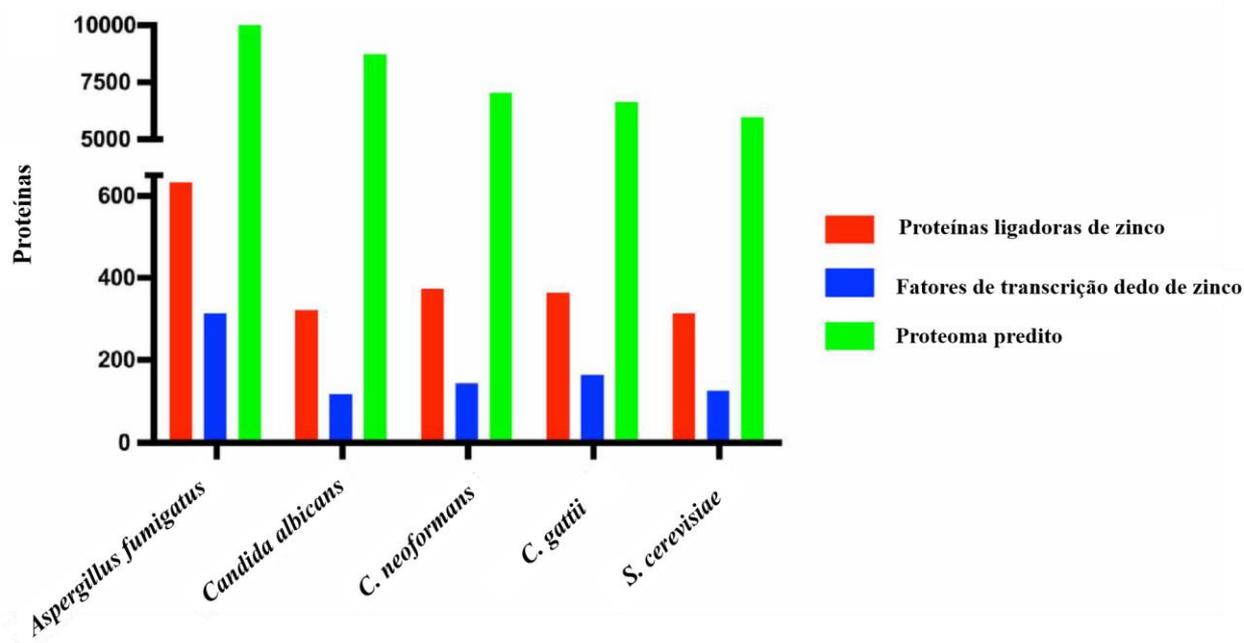


Figura 7. Proteínas ligadoras de Zn associadas a processos biológicos em fungos. O número de fatores de transcrição e proteínas ligadoras de Zn comparadas ao proteoma total de fungos. Adaptado de (Staats *et al.*, 2013).

Com vista na importância da correta homeostase de Zn para o funcionamento adequado tanto de mamíferos como micro-organismos, os níveis deste metal no interior das células deve passar por complexo sistema de regulação, pois tanto a deficiência quanto a presença de Zn em níveis elevados podem causar efeitos danosos a nível celular (Clayton, 2017).

1.5.2 Regulação da homeostase de zinco

A captação de Zn para as células e seu transporte para o interior ou exterior de organelas e vesículas intracelulares é dependente de proteínas transportadoras de Zn que possuem domínios transmembranas a fim de facilitar o movimento do metal (Eide, 2006). Em bactérias, existem três classes de transportadores de Zn: ABC, RND e CorA (Hantke,

2001). Já em eucariotos, foi descrito que algumas ATPases tipo-P tem papel no transporte do metal, entretanto, a homeostase de Zn em eucariotos é realizada majoritariamente por transportadores das famílias ZIP (SLC39) e CDF/ZnT (SLC30)(Cousins, Liuzzi and Lichten, 2006; Kambe *et al.*, 2004).

De uma forma geral, membros da família ZIP são responsáveis pelo aumento nos níveis de Zn no interior da célula, seja pela importação do metal do ambiente extracelular para o intracelular, como pela retirada de Zn do interior de vesículas ou organelas intracelulares para o citoplasma. Os transportadores da família ZnT são responsáveis pela redução nos níveis intracelulares de Zn, pelo transporte de Zn para o ambiente extracelular ou para compartimentos intracelulares (Hara *et al.*, 2017), conforme ilustra a Figura 8.

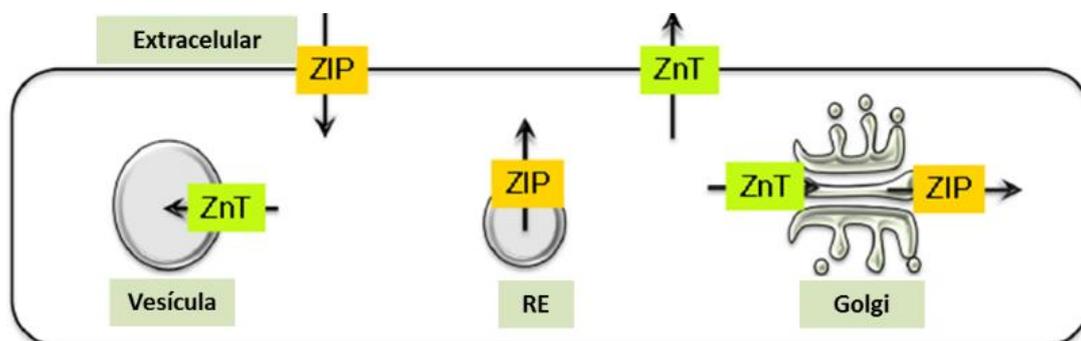


Figura 8. Armazenamento e distribuição de Zn por transportadores ZIP e ZnTs em compartimentos intracelulares. Direção do transporte de Zn (setas pretas) pelos transportadores ZIP (em amarelo) e ZnTs (verde) expressos em compartimentos celulares específicos. RE: retículo endoplasmático. Adaptado de (Hara *et al.*, 2017).

Considerando a atividade de transportadores de Zn e de proteínas ligadoras de zinco a fim de manter a homeostase do metal, este metal pode ser encontrado em quatro diferentes perfis no interior de uma célula: (i) conjugado a metaloproteínas, como um componente estrutural; (ii) compartimentalizado em organelas ou vesículas para armazenamento de Zn, o qual é mediado pela atividade dos transportadores acima citados;

(iii) conjugado a metalotioneínas com uma baixa afinidade, as quais são proteínas que sequestram Zn livre; e (iv) de forma livre no citosol, em concentrações baixas (Hara *et al.*, 2017). Destaca-se então, como principais reguladores da homeostase de Zn celular, os transportadores ZIP, ZnTs e as proteínas sequestradoras de Zn livre, as metalotioneínas (Kimura and Kambe, 2016).

A família ZIP (do inglês, *Zrt-Irt- like protein: Zinc-regulated transporter protein/ Iron-regulated transporter protein*) é denominada desta forma por ser semelhante à proteína ZrT1 (do inglês, *zinc-regulated transporter*) de levedura e Irt1 (do inglês, *iron-regulated transporter*) de *Arabidopsis*, a qual foi o primeiro organismo em que tais transportadores foram identificados e, atualmente, já é descrita a existência desta família em todos os níveis filogenéticos (Eide *et al.*, 1996; Grotz *et al.*, 1998; Zhao and Eide, 1996a). Em mamíferos, tal família de transportadores é chamada de SLC39 (do inglês, *Solute-like carrier 39*). A principal característica de tais transportadores, no geral, é que sua atividade ocasiona aumento no nível intracelular de Zn, conforme citado anteriormente (Eide, 2004). Tal transporte do metal é possível uma vez que a maioria das proteínas ZIP possuem 8 domínios transmembrana e topologia similar, com ambas as extremidades amino e carboxi-terminal localizadas na face externa da membrana celular (Gitan *et al.*, 2003) ou do lúmen de um compartimento intracelular (Hara *et al.*, 2017), conforme ilustra a Figura 9. Muitos membros desta família possuem um *loop* entre os domínios 3 e 4, onde também existe uma região rica em histidina, que contém potencial capacidade de ligação a metais, o que sugere sua participação no transporte de Zn (Eide, 2006).

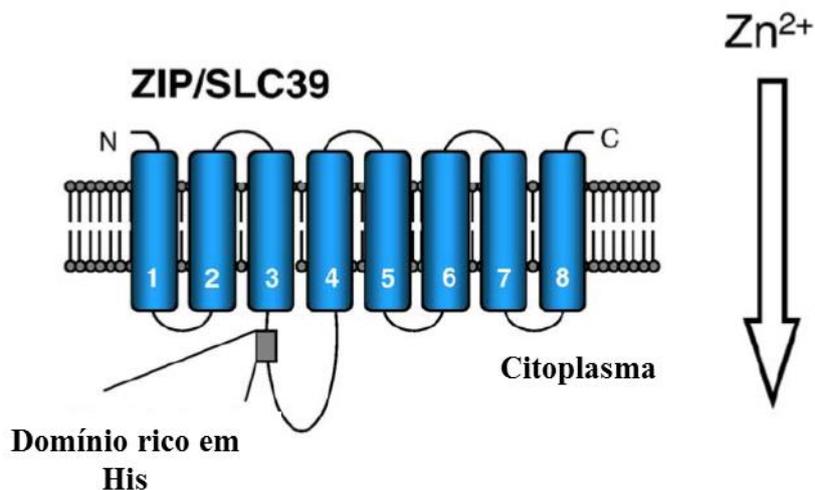


Figura 9. Topologia predita de transportadores da família ZIP/SLC39. Os domínios transmembrana estão numerados de 1 a 8 e o loop rico em histidina se encontra entre os domínios 3 e 4, na maioria dos transportadores desta família. Adaptado de (Eide, 2006).

Já os membros da família de proteínas ZnT, também denominados CDF (do inglês, *cation diffusion facilitator*) (Nies and Silver, 1995), possuem função contrária dos transportadores ZIP, visando a redução dos níveis de Zn no interior da célula (Eide, 2006). Assim como os transportadores da família ZIP, também são encontrados em todos os níveis filogenéticos (Gaither and Eide, 2001; Palmiter and Huang, 2004). A maioria dos membros desta família possui 6 domínios transmembrana e, semelhantes aos transportadores ZIP, possui domínios ricos em histidina, neste caso, geralmente, no *loop* entre os domínios 4 e 5 (Kambe, 2012; Persans, Nieman and Salt, 2001), como demonstrado na Figura 10.

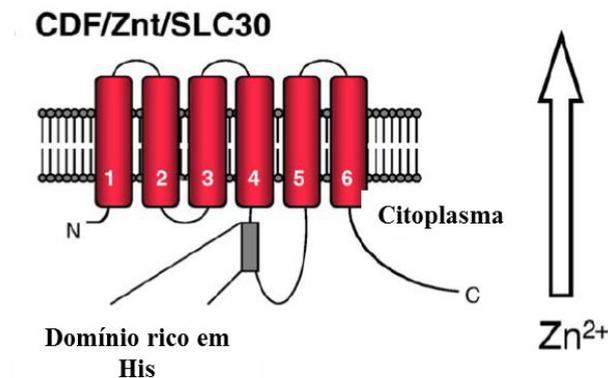


Figura 10. Topologia predita de transportadores da família ZnT/SLC30. Os domínios transmembrana estão numerados de 1 a 6 e o loop rico em histidina se encontra entre os domínios 4 e 5, na maioria dos transportadores desta família. Adaptado de (Eide, 2006).

As metalotioneínas (MTs), por sua vez, possuem capacidade de ligar íons de metais pesados, como Zn, cobre (Cu), cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) (Grzywacz *et al.*, 2015). Desta forma, desempenham papel importante na proteção celular contra intoxicação por metais, atuando contra estresse oxidativo (Andrews, 2000). Foram uma das primeiras proteínas descobertas com papel na homeostase de metais. Desde então, proteínas com propriedades similares foram isoladas em bactérias, fungos, plantas e animais (Blindauer, 2015).

1.5.2.1 Regulação da homeostase de zinco em leveduras

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o transportador Zrc1 foi o primeiro descrito associado à homeostase de Zn. Este transportador está localizado na membrana vacuolar e é responsável pela detoxificação de zinco intracelular do citoplasma (Kamizono *et al.*, 1989; Miyabe, Izawa and Inoue, 2001). Juntamente com este transportador, há o Cot1, que

também auxilia no transporte de Zn para o vacúolo, assim como de cobalto (Co) (Conklin *et al.*, 1992). Entretanto, os níveis vacuolares de Zn são também modulados pelo transportador Zrt3, um membro da família ZIP, descrito anteriormente (Figura 11). O transportador Zrt3 tem função contrária de Zrc1 e Cot1 uma vez que, em células com baixas concentrações de Zn, é responsável por mobilizar Zn do vacúolo para o citoplasma, a fim de aumentar a concentração intracelular de Zn (MacDiarmid, Gaither and Eide, 2000). Também estão associados ao transporte de zinco em outras organelas celulares os transportadores Msc2 e Zrg17, os quais são membros da família CDF de transportadores e estão localizados no retículo endoplasmático (RE) (Ellis, Macdiarmid and Eide, 2005; Li and Kaplan, 2001) (Figura 11).

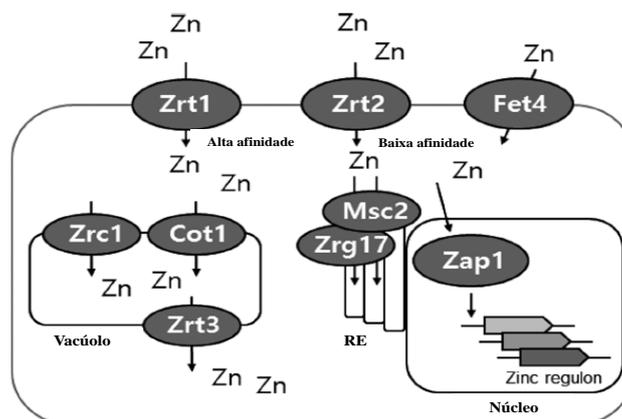


Figura 11. Proteínas envolvidas na homeostase de Zn em *Saccharomyces cerevisiae*. RE, retículo endoplasmático. Adaptado de Jung, 2015.

Além do transportador Zrt3, da família ZIP, os transportadores Zrt1 e Zrt2 medeiam a importação de Zn através da membrana plasmática da célula (Zhao and Eide, 1996a; b). Zrt1 foi originalmente descoberto como homólogo de Irt1 de *Arabidopsis thaliana*, um transportador de ferro. Entretanto, o mutante para tal gene se mostrou sensível em condições de privação de Zn. Outros estudos demonstraram que a expressão de Zrt1 é elevada em células sob privação de Zn (Zhao and Eide, 1996a). Desta forma, Zrt1

é um transportador de alta afinidade por Zn, já Zrt2 possui baixa afinidade. Apesar de também localizado na membrana plasmática, Zrt2 é responsável por captar Zn em células sob condições de disponibilidade de Zn (Zhao and Eide, 1996b), sendo seu papel minoritário.

Neste fungo, a expressão destes transportadores responsáveis pela homeostase de Zn é regulada pelo fator de transcrição Zap1. No genoma de *S. cerevisiae*, entre os 400 genes regulados por Zn, 80 deles, incluindo *ZRT1* e *ZRT2*, são alvos de Zap1 (Lyons *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008). O fator de transcrição Zap1 regula Zrt1 e Zrt2 por se ligar a elementos responsivos a Zn nos promotores dos genes codificadores de tais transportadores e a afinidade de ligação é controlada pelos níveis de Zn (Zhao and Eide, 1997) (Figura 11). Além destes, Zrc1 e Zrt3 também são regulados por Zap1 (Lyons *et al.*, 2000). Desta forma, diversos componentes e mecanismos regulam a homeostase de Zn em *S. cerevisiae*.

Nosso grupo descreveu a existência de um homólogo de Zap1 de *S. cerevisiae* em *C. gattii* e, conforme sua atividade em outros fungos, Zap1 regula positivamente a expressão de dois genes codificadores de transportadores de Zn da família ZIP: *ZIP1* e *ZIP2*. Nosso grupo caracterizou a função destes dois transportadores de Zn, uma vez que são transportadores de membrana e homólogos de Zrt1 e Zrt2 de *S. cerevisiae* (Schneider *et al.*, 2012).

A análise funcional de Zip1 mostrou que o mutante nulo $\Delta zip1$ apresentava desenvolvimento reduzido em condições de privação de Zn, o qual era restaurado quando Zn era disponibilizado para o fungo ou quando o gene era reconstituído ao mutante. Tal resultado foi confirmado pela análise de quantificação intracelular de Zn no mutante nulo para Zip1, o qual mostrou diminuição nos níveis de Zn, confirmando que Zip1 é o transportador principal de Zn em *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2015). Já no mutante nulo para

ZIP2 (*Azip2*), não foi demonstrado efeitos fenotípicos associados à homeostase de Zn, mas houve aumento significativo na expressão do gene codificante do transportador Zip1, sugerindo um papel compensatório de *ZIP1* na ausência de *ZIP2*. Entretanto, mutante nulo para *ZIP2* teve menor sobrevivência em ensaios com macrófagos murinos, sugerindo sua importância na sobrevivência no microambiente do hospedeiro. Por fim, o duplo mutante para *ZIP1* e *ZIP2* demonstrou virulência completamente atenuada em modelo *in vivo* de infecção murina. Desta forma, ambos os transportadores são importantes para virulência de *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2015).

Em *C. neoformans* também foram identificados os transportadores codificados pelos genes *ZIP1* e *ZIP2*. Assim como em *C. gattii*, Zip1 possui maior importância na captação de Zn e, em meio com privação de Zn, a linhagem mutante para tal transportador se mostrou deficiente no desenvolvimento, o qual foi restaurado com a adição do metal. Tal dado foi confirmado pela superexpressão do transportador Zip1, que ocasionou acúmulo de Zn no interior da célula fúngica. Entretanto, foi demonstrado que, em *C. neoformans*, a contribuição do transportador Zip1 na virulência pode ser um pouco diferente do papel em *C. gattii*. O mutante nulo para o gene *ZIP1* em *C. neoformans* teve virulência atenuada em modelo de infecção murina, enquanto o mutante nulo para o gene *ZIP1* de *C. gattii* mostrou a mesma virulência da linhagem selvagem em modelo murino de infecção. Além desta diferença, em *C. neoformans* o mutante nulo duplo para *ZIP1* e *ZIP2* se mostrou viável em modelo de infecção murina, sugerindo, então, a presença de algum outro transportador relacionado com o transporte de cátions divalentes, como já foi descrito para *S. cerevisiae* (Do *et al.*, 2016).

1.5.2.2 Regulação da homeostase de zinco em mamíferos

Os genomas de espécies mamíferas representativas (humanos, ratos e camundongos) codificam 14 transportadores da família ZIP e 10 transportadores da família ZnT. Alguns transportadores são expressos em todos os tipos celulares enquanto outros são expressos em tipos celulares específicos (Kambe, Hashimoto and Fujimoto, 2014; Schweigel-Röntgen, 2014). Assim, tanto os transportadores como proteínas ligadoras de Zn regulam a distribuição de Zn em células imunes para manutenção da homeostase do metal, inclusive durante processos infecciosos (Subramanian Vignesh and Deepe, 2016). Em mamíferos, as metalotioneínas MT-1 e MT-2 são expressas em muitos tipos celulares em diversos órgãos e tecidos, bem como em culturas celulares e desempenham o papel de sequestro de Zn. Ambas possuem sequencias similares de aminoácidos e são induzidas na resposta a Zn (Kimura and Kambe, 2016). A expressão das metalotioneínas é regulada pelo fator de transcrição MTF-1, o fator de transcrição responsivo a metal-1 (Kimura, Itoh and Andrews, 2009). Tal fator de transcrição é dependente de Zn e estimula a expressão de metalotioneínas e do transportador ZnT-1 quando há aumento na concentração de zinco. Aumentando a expressão de metalotioneínas e do exportador de Zn ZnT-1, ocorre a redução na toxicidade por Zn no citosol das células pela ligação destes íons em excesso às MTs e pela exportação de Zn para o ambiente extracelular (Günther, Lindert and Schaffner, 2012; Marreiro *et al.*, 2017; Sekler *et al.*, 2007).

1.6 Imunidade Nutricional e Homeostase de Zinco

Durante a resposta imune, a invasão de um patógeno pode causar um conflito entre hospedeiro e patógeno, no qual Zn se torna um nutriente compartilhado entre ambos. O hospedeiro gera resposta para impedir o desenvolvimento do patógeno de forma dependente de Zn, enquanto o patógeno busca alternativas para utilizar o metal disponível no hospedeiro como fonte para sua atividade metabólica. Neste contexto, a célula hospedeira pode reservar o metal em compartimentos e mantê-lo indisponível para o patógeno, bem como pode torna-lo disponível em níveis tóxicos para o micro-organismo (Figura 12). Adicionalmente, a célula promove mecanismos de prevenção contra sua própria suscetibilidade aos níveis de Zn elevados (Subramanian Vignesh and Deepe, 2016). Em contrapartida, para sobreviver à privação/intoxicação por zinco imposta pelo hospedeiro, os micro-organismos desenvolveram numerosos mecanismos para garantir a virulência e sobrevivência (Jung, 2015).

Durante infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, macrófagos humanos orquestram uma resposta de aumento exacerbado nos níveis de Zn, a fim de intoxicar a bactéria intracelular (Figura 12A- à direita). Ao mesmo tempo em que nota-se a resposta no hospedeiro, ocorrem alterações na homeostase de Zn na bactéria, o que confirma que a interação patógeno-hospedeiro modula a homeostase do metal em ambos os organismos (Subramanian Vignesh and Deepe, 2016). Por parte do hospedeiro, a infecção por *M. tuberculosis* gera um pool de Zn livre no interior dos macrófagos, aumentando a expressão das proteínas ligadoras de Zn, metalotioneínas 1 e 2 e a expressão do exportador de Zn, ZnT1 (Botella *et al.*, 2011). Tais eventos ocorrem porque, no aumento de Zn, o fator de transcrição MTF-1 se transloca para o núcleo induzindo a expressão de tais genes (Lichten

and Cousins, 2009). A intoxicação da bactéria ocorre pela liberação de Zn de compartimentos intracelulares ainda não descritos, provavelmente *zincossomos*, para o interior do fagolisossomo (Begum *et al.*, 2002).

Monócitos estimulados com componentes da parede celular de *Mycobacterium bovis* BCG mostraram aumento na expressão do transportador Zip8, o que sugere que tal transportador pode auxiliar na manutenção de níveis elevados de Zn através do aumento de importação de Zn e, conseqüentemente, ocorrendo uma transferência de Zn para o fagolisossomo (Begum *et al.*, 2002). Sugere-se ainda que, possivelmente, um transportador da família ZnT realize o transporte de Zn para *zincossomos* e fagolisossomos nestes fagócitos (Botella *et al.*, 2011).

Células do sistema imune também podem responder a diversos patógenos com a privação de Zn. Um dos exemplos melhores elucidados é a resposta ao fungo *Histoplasma capsulatum* (Figura 12A- à esquerda), o qual possui diversas características semelhantes às leveduras *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre tais características, destacam-se: (i) a infecção causada por tal fungo ocorre pela inalação de esporos da levedura; (ii) afeta indivíduos imunocomprometidos, assim como *C. neoformans* e (iii) logo que presentes no organismo hospedeiro, entram em contato com macrófagos alveolares, que geram uma resposta imune (Howard, 1964; Lane, Wu-Hsieh and Howard, 1991).

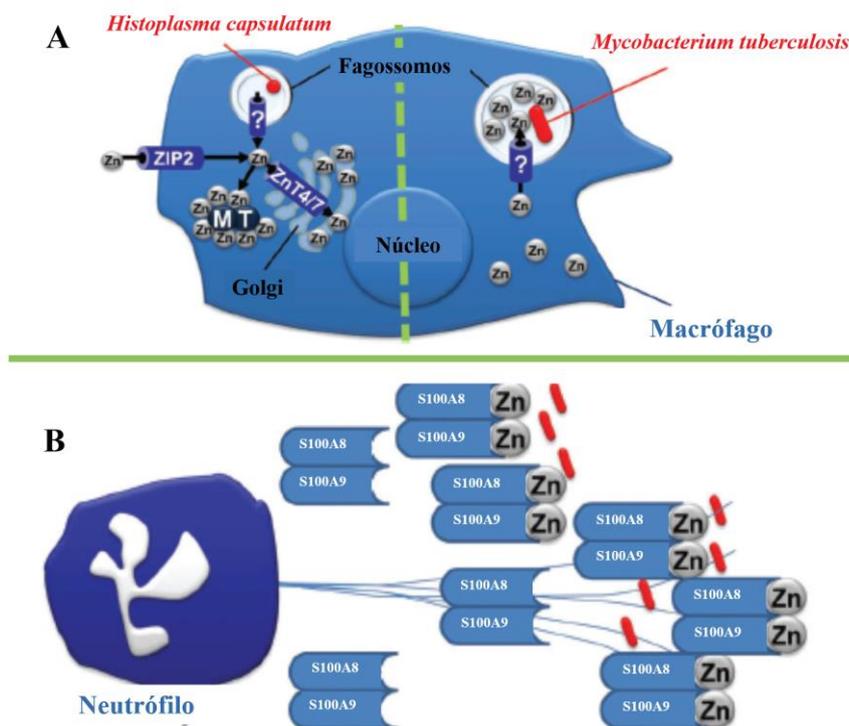


Figura 12. Metabolismo de zinco na imunidade nutricional. O sistema imune pode modular a homeostase de Zn no ambiente extracelular ou em compartimentos intracelulares especializados em resposta a estímulos. (A) Patógenos intracelulares podem ser eliminados no ambiente intracelular de macrófagos por mecanismos de privação de Zn (como demonstrado para *H. casulatum*) ou por intoxicação por Zn (como demonstrado para *M. tuberculosis*). (B) A calprotectina (dímero de S100A8 e S100A9), uma proteína antimicrobiana, pode ser secretada por neutrófilos de forma livre ou associadas a NETs. Estas proteínas exercem função antimicrobiana por sequestrar metais, como Zn. Adaptado de (Haase and Rink, 2014).

Foi descrito que macrófagos ativados com GM-CSF reduziram o desenvolvimento intracelular das leveduras (Winters *et al.*, 2010). Mais especificamente, foi vista uma alteração global nos mecanismos de homeostase de Zn, gerando uma diminuição nos níveis de Zn na levedura enquanto que, o macrófago, mostrou maior aquisição de Zn. Apesar da maior aquisição de Zn, houve um aumento no proteoma de Zn, sugerindo que funções celulares dependentes de Zn, como transcrição, função enzimática e metabolismo foram ativados na célula mamífera (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013). A homeostase de Zn no

interior do macrófago infectado por *H. capsulatum* foi resultado de mecanismos de expressão de transportadores e metalotioneínas, pelos quais se mostrou aumento na expressão do importador de Zn ZIP2 e, conseqüentemente, aumento nos níveis intracelulares de Zn. Com tal aumento de Zn intracelular, ocorreu aumento na expressão de metalotioneínas e dos exportadores ZnT4 e ZnT7, para manutenção de níveis basais de Zn para funções celulares (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013).

Outras células do sistema imune, além dos macrófagos, produzem uma resposta de imunidade nutricional a patógenos (Subramanian Vignesh and Deepe, 2016). Neutrófilos também são responsáveis pela detecção de patógenos e possuem rápido recrutamento para o sítio de infecção. Tais células produzem diversas moléculas antimicrobianas, como defensinas, enzimas proteolíticas e, até mesmo, quelantes de metais (Nauseef, 2007). Cerca de 40% do citoplasma de neutrófilos é constituído por calprotectina (Figura 12B), um heterodímero composto por duas subunidades das proteínas ligadoras de metais da família S100, S100A8 e S100A9 (Subramanian Vignesh and Deepe, 2016). O complexo da calprotectina é capaz de exercer atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Achouiti *et al.*, 2012), *Neisseria meningitides* (Lappann *et al.*, 2013), *Aspergillus fumigatus* (McCormick *et al.*, 2010), *Candida* spp., e *C. neoformans* (Fagerhol, Dale and Anderson, 1980; Steinbakk *et al.*, 1990). Foi visto, então, que a capacidade antimicrobiana advém da ligação de tal proteína a Zn e manganês, não a cálcio (Steinbakk *et al.*, 1990). A calprotectina é capaz de sequestrar Zn e manganês e inibir o desenvolvimento microbiano. Além disso, a calprotectina também pode ser liberada em NETs (do inglês, *neutrophil extracellular trap*) dos neutrófilos, durante um processo infeccioso, provavelmente para sequestrar Zn e manganês no ambiente extracelular. Foi

demonstrado que infecção por *C. albicans* causa liberação de calprotectina nas NETs e que, a falta de calprotectina em tais redes diminui o potencial antimicrobiano das mesmas. A calprotectina, então, tem papel fundamental no controle de infecções no hospedeiro por criar um ambiente deficiente em Zn, o qual não é favorável para o desenvolvimento microbiano (Subramanian Vignesh and Deepe, 2016).

De uma maneira geral, ao longo do processo de infecção das células hospedeiras, os patógenos desenvolvem mecanismos de defesa relacionados à imunidade nutricional de Zn imposta a eles pelas células mamíferas (Wątył, Potocki and Rowińska-Żyrek, 2016). *Candida albicans* possui um mecanismo de sequestro de Zn do ambiente além dos transportadores de Zn, a proteína Pra1 (Figura 13). Durante privação de Zn, tal proteína é secretada pelo fungo no ambiente extracelular, a qual se liga a Zn e, por sua vez, entrega o metal para o ortólogo de Zrt1 na membrana celular de *C. albicans*. Este sistema, chamado de sequestro de Zn mediado por Pra1-Zrt1 é considerado um sistema zincóforo e é importante para aquisição de Zn quando o fungo se encontra no interior de células endoteliais (Citiulo *et al.*, 2012).

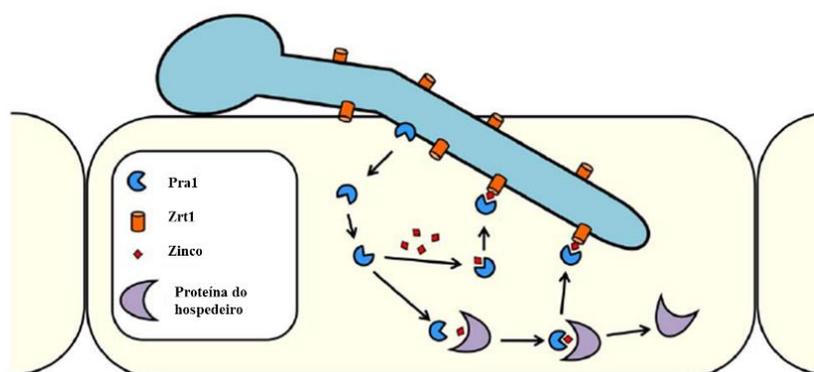


Figura 13. Modelo de sequestro de Zn de células hospedeiras em *C. albicans*. Após invasão da célula hospedeira, Pra1 é expressa e secretada para o ambiente extracelular. A porção extracelular se liga a Zn, de um pool celular diretamente ou a Zn de proteínas ligadoras de Zn do hospedeiro. A associação com a superfície do fungo é mediada via interação direta de Pra1-Zrt1. Adaptado de (Citiulo *et al.*, 2012).

Em contrapartida à estratégia de privação de metais, conforme descrito anteriormente, macrófagos podem causar intoxicação por Zn em *Mycobacterium tuberculosis*. Nestes casos, a resistência bacteriana à toxicidade por metais é resultado da atividade de sistemas de efluxo, principalmente os da família ATPase tipo P, em *M. tuberculosis* contra a toxicidade por Zn. Foi descrito que muitos genes desta família foram induzidos quando o bacilo estava infectando células humanas, o que sugere que o patógeno é submetido à intoxicação por metais (Botella *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007; Tailleux *et al.*, 2008). Dentre esta família de bomba de efluxo ATPase, CtpC é o sistema mais importante responsivo a Zn, com um aumento na sua expressão durante infecção em macrófagos (Botella *et al.*, 2011).

Desta forma, as interações patógeno-hospedeiro ocorrem em meio à complexa disputa por Zn tanto pelo patógeno quanto pelo hospedeiro. Tal disputa é caracterizada por inúmeras alterações na regulação da homeostase do metal em ambos os organismos. Visto que não há relatos de possível mecanismo de imunidade nutricional de macrófagos contra a levedura *C. neoformans*, é de interesse investigar se tais células, responsáveis pelo início da resposta imune do hospedeiro contra o fungo, são capazes de modular a homeostase de zinco durante infecção por *C. neoformans*. Tal mecanismo pode ser considerado uma estratégia adicional do sistema imune a fim de evitar a proliferação da levedura.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo analisar a modulação da homeostase de zinco em macrófagos como possível estratégia antifúngica a *Cryptococcus neoformans*.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar se zinco influencia a sobrevivência de *C. neoformans* após exposição a macrófagos murinos;
- Avaliar os níveis intracelulares de zinco livre de macrófagos expostos à levedura e da levedura após fagocitose por macrófagos;
- Determinar se *C. neoformans* causa alterações nos níveis de transcritos de transportadores de zinco e proteínas ligadoras de zinco de macrófagos expostos à levedura;
- Determinar o perfil de transcritos de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos expostos a *C. neoformans* e/ou zinco;
- Avaliar o perfil de transcritos de transportadores de zinco de macrófagos quando expostos a diferentes metais e à privação de zinco;
- Determinar se o processo de ativação de macrófagos influencia na proliferação da levedura e homeostase de zinco durante infecção por *C. neoformans*.

3. RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão distribuídos em dois capítulos. O primeiro capítulo (item 3.1) trata da visão geral da modulação da homeostase de zinco em macrófagos expostos a *C. neoformans*. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na forma de um artigo científico no periódico *Future Microbiology* (Santos, Dos *et al.*, 2017).

Já os resultados apresentados no segundo capítulo (item 3.2), referem-se à avaliação inicial do perfil transcricional de transportadores de Zn de macrófagos na presença de diferentes metais e privação de Zn e o efeito da ativação celular na resposta antifúngica a *C. neoformans* e modulação da homeostase de Zn.

3.1 Capítulo I: Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line.

Este capítulo apresenta o artigo publicado na revista *Future Microbiology* em 11 de maio de 2017 (Santos, Dos *et al.*, 2017).

RESEARCH ARTICLE

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line

Francine Melise Dos Santos¹, Alícia Corbellini Piffer¹, Rafael de Oliveira Schneider¹, Nicole Sartori Ribeiro¹, Ane Wichine Acosta Garcia¹, Augusto Schrank^{1,2}, Lívia Kmetzsch^{1,2}, Marilene Henning Vainstein^{1,2} & Charley Christian Staats^{*1,2}

Aim: To evaluate alterations of zinc homeostasis in macrophages exposed to *Cryptococcus neoformans*. **Materials & methods:** Using a fluorescent zinc probe-based flow cytometry and atomic absorption spectrometry, zinc levels were evaluated in J774.A1 cell lines exposed to *C. neoformans* H99 cells. The transcription profile of macrophage zinc related homeostasis genes – metallothioneins and zinc transporters (ZnTs) of the SLC30 and SLC39 (Zrt-Irt-protein) families – was analyzed by quantitative PCR. **Results:** Macrophage intracellular labile zinc levels decreased following exposure to *C. neoformans*. A significant decrease in transcription levels was detected in specific ZnTs from both the Zrt-Irt-protein and ZnT families, especially 24 h after infection. **Conclusion:** These findings suggest that macrophages may exhibit zinc depletion in response to *C. neoformans* infection.

First draft submitted: 12 August 2016; Accepted for publication: 28 November 2016; Published online: 11 May 2017

Cryptococcosis is one of the most common invasive fungal diseases and its dominant etiological agents are *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. These species are responsible for more than one million cases of life-threatening infections per year, mostly in individuals with suppressed immunity [1,2]. *Cryptococcus neoformans* causes disease with predilection of dissemination to the CNS with the primary outcome of meningoencephalitis. The infection process is generally initiated by inhalation of desiccated yeasts or basidiospores, which reach the lung alveoli [3]. Therefore, host lung phagocytes are the first line of defense to ingest and degrade yeast cells [4–6].

In order to hamper pathogen growth, the innate immune system exposes phagocytosed microbes to a harsh intracellular environment, characterized by the presence of reactive nitrogen and oxygen species, antimicrobial enzymes and peptides [7,8]. Engulfed microbial cells are also subjected to nutrient deprivation, a strategy known as nutritional immunity [9]. Although iron and glucose are established targets of nutritional immunity, zinc deprivation has only recently been identified as an immunological strategy [10,11].

Zinc is the second most abundant transition metal (after iron) and an essential micronutrient, with key catalytic and structural functions [12]. Zinc metalloproteins have diverse roles, including participation in cell division [13], DNA and protein synthesis [13,14], cellular respiration and immune functions [15]. Zinc can be sequestered on epithelial and mucosal surfaces by proteins secreted from keratinocytes, leading to inhibition of microbial growth [9]. Zinc chelation can also occur by calprotectin from neutrophils to impair the development of *C. neoformans* [16], *Aspergillus* spp. and *Candida* spp. [9]. In addition, zinc chelation by metallothioneins (MTs), as well its compartmentalization into

KEYWORDS

- *Cryptococcus neoformans*
- nutritional immunity
- zinc

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

²Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 51 3308 6091; Fax: +55 51 3308 7309; staats@cbiot.ufrgs.br

organelles, was reported as a macrophage defense mechanism during *Histoplasma capsulatum* [17]. Further analysis of the macrophage response against *H. capsulatum* described that zinc deprivation was a response of macrophages to hamper *H. capsulatum* development, and that this effect occurs through a multistep response in the mammalian cell through expression of zinc transporters (ZnTs) and MTs dependent upon stimulation with GM-CSF [18].

To promote zinc-based nutritional immunity, immune cells have specific systems to maintain host zinc homeostasis at different conditions. There are two major mammalian families of ZnTs, the SLC30 and the SLC39 (Zrt-Irt-protein; ZIPs) families. ZIP importers, ZnT exporters and MTs are the main determinants of intracellular zinc concentrations [19]. The import of zinc into the cytoplasm, either from the extracellular space or from organelles, is performed by ZIP transporters. There are 14 isoforms of ZIP transporters in mammals (ZIP1–ZIP14), and most have a similar protein structure with eight transmembrane domains and a cavity through which metals are transported [20].

To balance the influx of zinc into the cell, ZnT proteins mediate zinc export. This family of transporters is constituted by ten isoforms in mammals (ZnT1–ZnT10), which adjust zinc concentration in the cytoplasm. In Zn-excess conditions, ZnT proteins act by exporting zinc out to the extracellular space or by sequestering zinc into the intracellular compartments [21]. In addition, MTs function as zinc chelators, contributing to alleviate the stress caused by excess cytoplasmic zinc [22]. In this context, during macrophage *H. capsulatum* infection, the authors described an orchestrated response to reduce zinc availability to the fungi within the host cell. It was observed as an upregulation of ZnT4 and ZnT7 transporters, which was responsible for zinc storage at Golgi apparatus. Second, ZIP2 expression was increased and, consequently, zinc intracellular levels enhanced, in a way to maintain basal zinc homeostatic levels necessary to all cellular functions. Third, macrophages showed an increase at MTs 1 and 2 expression, reducing cytoplasmic zinc to the fungal cell [18].

In this way, zinc homeostasis is important for a proper immune response, as it also mediates the production of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β [23]. Despite the importance of zinc in the immune response,

the mechanism of Zn-based nutritional immunity against cryptococcal infections is poorly understood [16,24]. In this context, we present a general view on zinc modulation in macrophages infected by *C. neoformans*. The results of this study suggest that macrophages impair zinc bioavailability to fungal cells.

Materials & methods

• Yeast strain & cell line

The pathogenic yeast *C. neoformans* H99 strain was routinely maintained in YPD agar media (2% glucose, 2% peptone and 1% yeast extract; Sigma-Aldrich, MO, USA). For macrophage interaction experiments, cryptococcal cells were cultured in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) growth media at 30°C in a constant rotation platform. The murine peritoneal macrophage cell line, J774.A1, was obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ; accession number 0121). This cell line has been extensively used to study *C. neoformans*–mouse macrophage interactions [25] and was routinely cultured with DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco® Life Technologies, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco Life Technologies), 1 mM L-glutamine (Gibco Life Technologies), 1 mM sodium pyruvate (Gibco Life Technologies), 1% nonessential amino acids (Gibco Life Technologies) and penicillin 20 U/ml, streptomycin 20 μ g/ml (Gibco Life Technologies) and incubated at 37°C and 5% CO₂. Confluent cultures were passaged every 2–3 days to a maximum of ten passages.

• Macrophage–Cryptococcus interaction experiments

A total of 10⁵ J774.A1 cells were seeded into 96-well culture plates and activated overnight recombinant murine IFN- γ (100 U/ml; Sigma-Aldrich – catalog number I4777) and *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS; 500 ng/ml; Sigma-Aldrich – catalog number L4391). *Cryptococcus neoformans* cells were inoculated into YPD media for 18 h at 30°C. After growth, cryptococcal cells were washed three-times with phosphate-buffered saline (PBS), and 10⁶ cells were opsonized with anti-GXM antibody 18B7 (final concentration, 1 μ g/ml) and incubated for 1 h at 37°C. The activation with IFN- γ and LPS, the opsonization of fungal cells and the high fungi to macrophage cells rates (10:1) were used to maximize the number

of macrophage cells containing engulfed yeast cells [25,26]. IFN- γ - and LPS-activated J774.A1 cells were incubated with *C. neoformans* for 2 h to allow phagocytosis by macrophages. Next, each well was washed three-times with PBS to remove nonphagocytized yeast cells. One set of infected macrophages was lysed with ice-cold sterile MilliQ water, and lysate dilutions were plated in YPD agar for CFU analysis to determine the rate of phagocytosis. Another set of infected macrophages was further incubated with media containing increasing concentrations of zinc chloride ($ZnCl_2$; 0, 3 and 30 μM) for 24 h. Macrophage cells were then lysed and the number of CFU was determined in YPD agar both from cryptococcal cells present inside macrophages or recovered from supernatant.

• Macrophage viability assay

To evaluate if the addition of $ZnCl_2$ affected macrophage viability, J774.A1 cells were incubated overnight in a 96-well plate at a concentration of 10^5 cells/well following activation with 100 U/ml IFN- γ (Sigma-Aldrich) and 500 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich). $ZnCl_2$ was added to a final concentration of 3, 10 and 30 μM in DMEM, with a control condition lacking zinc addition. Cells were exposed to zinc for 2 or 24 h. Following incubation, cells were washed three-times with warm PBS and 20 μl of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) solution, at 5 mg/ml, was added to each well and incubated for 3 h at 37°C in the dark. The MTT solution was removed and 200 μl of DMSO was added to each well. Absorbance was determined at 560 nm with a background of 670 nm using a Spectramax i3 spectrophotometer (Molecular Devices, CA, USA). Each experimental condition was performed in triplicate.

• Intracellular zinc measurement

FluoZinTM-3-AM reagent, an intracellular labile Zn^{2+} binding dye [27], was used to measure the intracellular labile zinc levels in macrophage cells. The reagent was dissolved in anhydrous DMSO and stored in the dark at -20°C until use. To measure zinc levels in macrophages, a total of 10^6 J774.A1 cells were seeded in 12-well plates and cultured overnight without (control) or with 100 U/ml IFN- γ (Sigma-Aldrich)

and 500 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) for cell activation. Opsonized cryptococcal cells and opsonized heat-killed *C. neoformans* (65°C, 30 min) were added to IFN- γ - and LPS-activated macrophages at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1, for 24 h. Medium was then removed and cells were washed three-times with warm PBS. FluoZin-3-AM (1 μM) was added to each well and cells were incubated for a further 30 min at 37°C and 5% CO_2 in the dark. After incubation, FluoZin-3-AM was removed and cells were washed three-times with PBS before being removed from the wells with a cell scraper. Fluorescence was inhibited and enhanced by pretreatment of macrophages for 30 min before analysis with 10 μM zinc chelator TPEN and 100 μM $ZnCl_2$, respectively, to confirm the zinc specificity of the assay. Another set of experiments to evaluate intracellular zinc levels in fungal cells recovered from activated macrophages was performed under the same macrophage culture conditions described above. IFN- γ and LPS-activated macrophages were incubated with opsonized cryptococcal at a MOI of 10:1 and phagocytosis was allowed to proceed for 2 h. Next, wells were washed three-times with warm PBS and DMEM with 10% FBS was added to one set of wells containing macrophages plus *C. neoformans*. To another set cultured under the same conditions, DMEM with 30 μM $ZnCl_2$ was added. Cells were incubated for further 24 h at 37°C and 5% CO_2 . After the interaction period, the macrophage cells were extensively washed to remove non-phagocytosed cryptococcal cells. Next, macrophages were lysed with ice-cold sterile MilliQ water and sonicated and cryptococcal cells were recovered by centrifugation. The determination of labile zinc levels in *C. neoformans* cells recovered from macrophages were determined by flow cytometry using FluoZin-3-AM, as previously described [28]. FluoZin-3-AM fluorescence from cells was measured using a Guava[®] easyCyte flow cytometer (Merck Millipore, MA, USA) with an excitation wavelength of 494 nm and emission detected at 516 nm. Data were analyzed with FlowJo Software (v. 10.2).

In order to quantify total zinc concentration in macrophages, cells were plated at 10^6 cells per well in a 12-well plate and incubated with *C. neoformans* H99 at an MOI of ten yeast cells per macrophage or incubated with DMEM supplemented with 10% FBS, DMEM supplemented with 30 μM $ZnCl_2$ or 10 μM of the

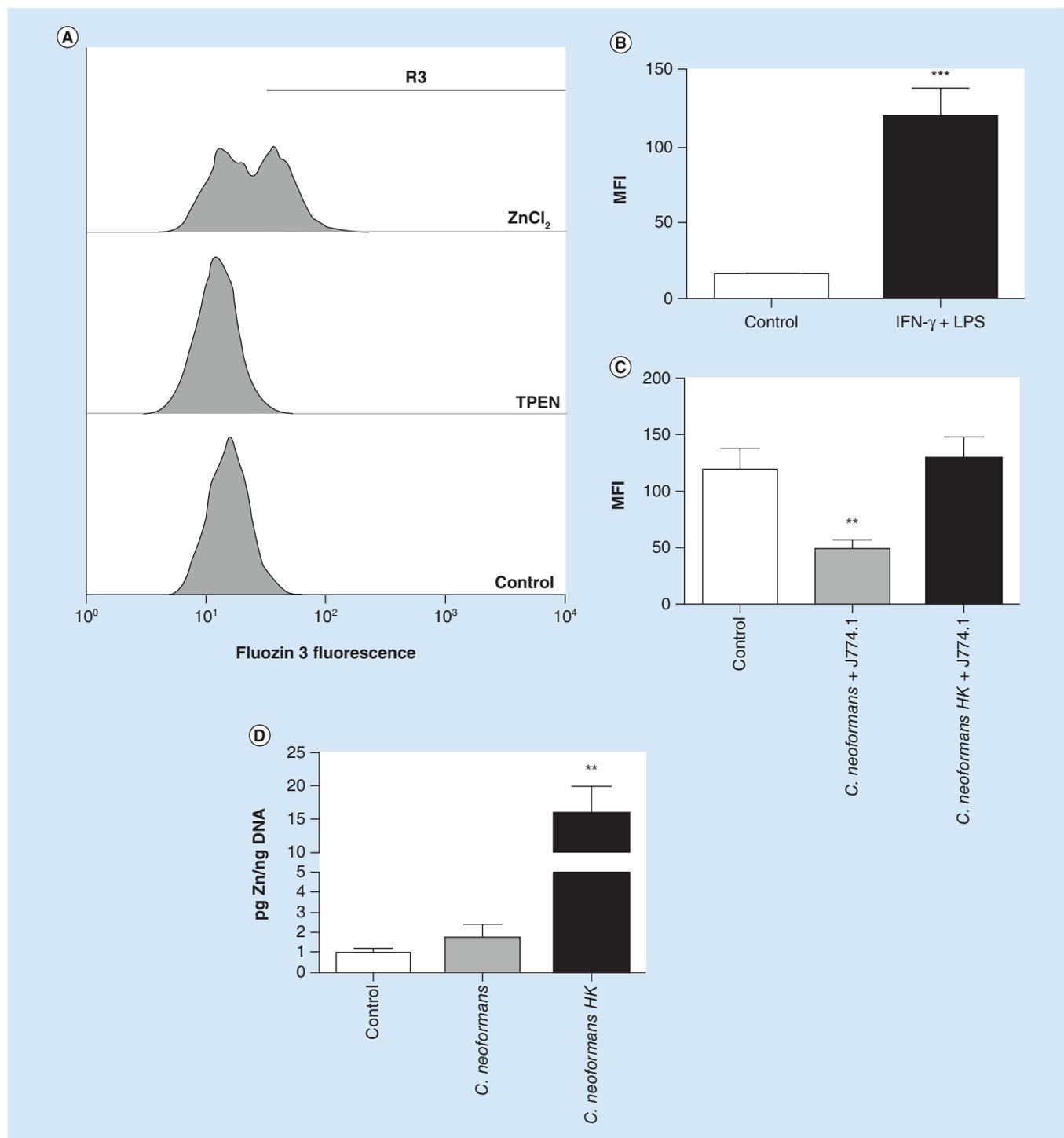


Figure 1. Macrophages reduced labile but not total zinc intracellular levels in response to *Cryptococcus neoformans*. (A) Cytometry histogram of fluozin-3AM fluorescence from IFN- γ - and LPS-treated J774.A1 cells incubated with: DMEM (Control), DMEM plus 10 μ M zinc chelator TPEN and DMEM plus 100 μ M ZnCl₂. (B) Mean fluorescence intensity of labile zinc of J774.A1 macrophages (control) or J774.A1-activated macrophages (IFN- γ and LPS). Data are shown as the mean \pm SD from three biological replicates. For each group, asterisks denote significant differences in comparison with control, obtained with analysis by Student's *t*-test. (C) Mean fluorescence intensity of labile zinc J774.A1-activated macrophages (IFN- γ and LPS) incubated with live *Cryptococcus neoformans* cells and DMEM plus heat killed cryptococcal cells, for 24 h. Data are shown as the mean \pm SD from three biological replicates. For each group, asterisks denote significant differences in comparison with control, obtained with analysis by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by

Tukey's multicomparison. **(D)** Quantification of total zinc concentration in macrophages by atomic absorption spectroscopy. Previously activated (IFN- γ and LPS) J774.A1 macrophages were incubated with DMEM (control) or *C. neoformans* for 24 h. Macrophages were lysed to release zinc from metalloproteins and zinc was quantified by atomic absorption spectrometry. Data are shown as the mean \pm SD from three biological replicates. For each group, asterisks denote significant differences in comparison with control, obtained with analysis by one-way ANOVA followed by Tukey's multicomparison test.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; HK: Heat killed; LPS: Lipopolysaccharide; SD: Standard deviation.

intracellular zinc chelator TPEN. After 24 h, macrophages were lysed with SDS following the protocol described by Winters *et al.* [16]. Supernatants were stored at -80°C before atomic absorption spectroscopy (AAS) analysis, developed at the Laboratório de Espectrometria Atômica of the Instituto de Química (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. Samples were analyzed by graphite furnace absorption spectrometry using PinAAcle™ 900T equipment (PerkinElmer, MA, USA) and a Lumina™ hollow cathode lamp (PerkinElmer) under a 15 mA current. A calibration curve using zinc concentrations of 3, 6, 8 and 10 g/l was constructed using standard commercially available zinc (Sigma-Aldrich) at a stock concentration of 1.000 mg/l. Total zinc concentration determined by AAS was normalized to total cellular DNA content to ensure that possible differences in zinc levels detected were not a result of different numbers of macrophages per triplicate.

• Quantitative real-time PCR

Macrophages activated with 100 U/ml IFN- γ and 500 ng/ml LPS were exposed to live *C. neoformans* or to heat-killed cryptococcal cells for 2 or 24 h for transcriptional analysis of ZnTs (*ZIP2*, *ZIP6*, *ZIP8*, *ZIP14*, *ZnT1*, *ZnT2*, *ZnT3*, *ZnT7* and *ZnT9*), MTs (*Mt1* and *Mt2*), *TNF- α* and IL-6. RNA extraction was performed using TriZol® reagent (Invitrogen, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel and quantification was performed by absorbance analysis using a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNAs were prepared from DNase (Promega, WI, USA)-treated total RNA samples (290 ng) using ImProm-II reverse transcriptase (Promega) and oligo-dT. qRT-PCR (Quantitative real-time PCR) was performed on a Fast 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, MA, USA) with the following thermal cycling conditions: initial step of 95°C for 10 min followed by 50 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s and 60°C for 60 s. Platinum® SYBR® green qPCR Supermix

(Invitrogen) was used as a reaction mix and supplemented with 5 pmol of each primer and 11 ng of cDNA template for a final volume of 20 μl . All experiments were performed in triplicate and each cDNA sample was also analyzed in triplicate for each primer pair. Melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm the presence of a single PCR product. Data were normalized to *GAPDH* cDNA, amplified in each set of PCR experiments. Relative expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [29]. The primers used in these analyses are listed in **Supplementary Table 1**.

• Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). All assays were performed under three experimental conditions, each with triplicate technical repetitions. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6, employing unpaired two-tailed *t*-tests or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multicomparison.

Results

• Zinc level modulation in macrophages exposed to *Cryptococcus neoformans*

In order to evaluate whether macrophages modulate zinc levels in response to cryptococcal infection, a flow cytometry assay employing an intracellular zinc probe was conducted. The cytometry histogram showed that fluozin-3AM fluorescence was inhibited when macrophages were exposed to 10 μM of the zinc chelator TPEN and enhanced by pre-treatment with 100 μM ZnCl_2 , confirming the zinc dependence and sensitivity of the assay (**Figure 1A**). The labile pool of zinc was determined in non-activated macrophages (control) and in LPS- and IFN- γ -activated macrophages (**Figure 1B**) as well in activated macrophages exposed to cryptococcal cells or to heat-killed cryptococcal cells (**Figure 1C**). A significant reduction in mean fluorescence intensity was observed in nonactivated and in IFN- γ - and LPS-activated macrophages infected with *C. neoformans* compared with activated macrophages or with

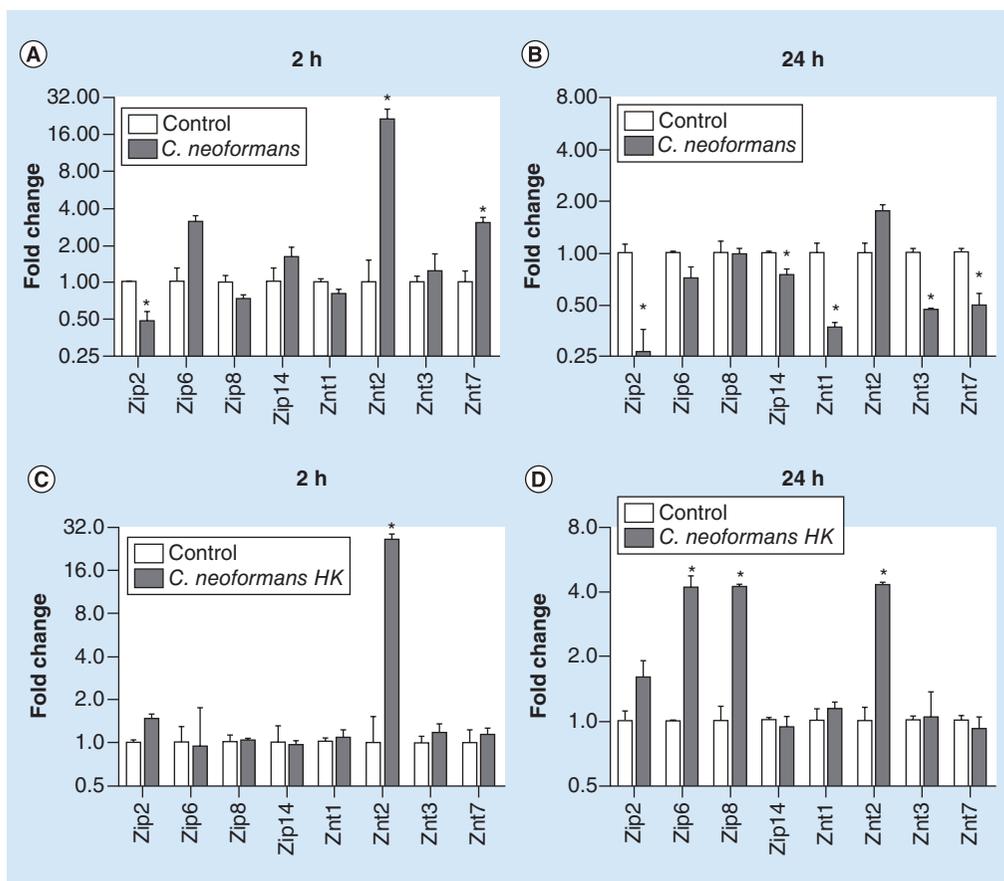


Figure 2. Macrophage zinc transporters showed a different expression pattern during interaction with live and heat-killed *Cryptococcus neoformans*. IFN- γ - and lipopolysaccharide-activated J774.A1 cells were incubated for 2 h (A & C) and 24 h (B & D) with *Cryptococcus neoformans* (A & B) and heat-killed cryptococcal cells (C & D). The measured quantity of zinc transporter mRNA in each sample was normalized using the threshold cycle values obtained for the *GAPDH* gene. Data are shown as the mean \pm standard deviation from three experimental replicates of three biological replicates. The asterisks denote statistically significant differences between transcript levels of macrophages exposed to live or dead *C. neoformans* and control conditions (* $p < 0.05$). Both comparisons were analyzed by unpaired *t*-tests.

HK: Heat killed.

activated macrophages exposed to heat-killed fungal cells. An analysis was also conducted to quantify total macrophage zinc concentration. Control and *C. neoformans*-infected macrophages were lysed with a strong detergent (SDS) to release zinc from metalloproteins and zinc was quantified by AAS. No significant differences were found between zinc levels in macrophages infected by *C. neoformans* compared with control conditions. However, an unexpectedly substantial increase (~15-fold) in zinc levels was observed in macrophages exposed to heat-killed *C. neoformans* cells (Figure 1C). Therefore, IFN- γ and LPS-activated

macrophages modulated the free pool of zinc levels in a manner dependent on live cryptococcal cells.

• Gene expression of zinc transporters in macrophages exposed to *Cryptococcus neoformans*

To understand the modulation of macrophage intracellular zinc levels in response to *C. neoformans*, the transcript levels of certain macrophage ZnTs were evaluated by qRT-PCR. The experimental design included a 2-h co-incubation period, when phagocytosis supposedly occurred, and a 24-h co-incubation period, when intracellular proliferation

of cryptococcal cells occurred. In response to live cryptococcal cells at the onset of phagocytosis, macrophages upregulated the expression of *Zip6*, *ZnT2* and *ZnT7*, while *Zip2* transcript levels were found to be slightly downregulated in comparison with control conditions (Figure 2A). However, the number of ZnTs where expression was altered when macrophages were infected with cryptococcal cells for a longer period was higher, with all showing downregulation. These include *Zip2*, *Zip14*, *ZnT1*, *ZnT3* and *ZnT7* (Figure 2B).

Transcriptional profiling of ZnTs was also performed to evaluate the impact of heat-killed cryptococcal cells on macrophage zinc homeostasis. In comparison with macrophages infected with live cryptococcal cells, the number of differentially expressed ZnTs was lower in macrophages exposed to dead *C. neoformans*. After 2 h of exposure, only *ZnT2* levels were raised compared with control (Figure 2C). The transcription levels of *Zip6*, *Zip8* and *ZnT2* were higher in comparison with control cells after 24 h of co-incubation with heat-killed cryptococcal cells (Figure 2D).

• Altered metallothionein expression in macrophages exposed to *Cryptococcus neoformans*

The transcription levels of the main metal-buffering proteins were also evaluated in

macrophages co-incubated with live or dead *C. neoformans* cells. *Mt1* and *Mt2* transcripts from macrophages were assayed by qRT-PCR using the same experimental design mentioned previously. After 2 h of co-incubation, live and dead cryptococcal cells did not significantly alter the expression of either *Mt1* or *Mt2* (Figure 3A). However, incubation of macrophages with live *C. neoformans* for 24 h led to decreased transcription levels of *Mt1* and *Mt2*, while dead *C. neoformans* caused an increase in *Mt1* transcription levels compared with control (Figure 3B).

• Extracellular zinc influence on *Cryptococcus neoformans* outcome from macrophages

As macrophages apparently reduced zinc levels to cryptococcal development, the next set of experiments was conducted to evaluate whether addition of zinc would alter the outcome of fungal cells after phagocytosis. First, the cytotoxic effect of $ZnCl_2$ on J774.A1 cells was evaluated. Macrophage viability was assessed by MTT assay following 2- and 24-h exposure to zinc. The assay showed that none of the $ZnCl_2$ concentrations had a significant effect on cell viability at either time point (data not shown). Therefore, $ZnCl_2$ at concentrations of 3 and 30 μM was chosen for further analysis. Next, the influence extracellular zinc supplementation on the

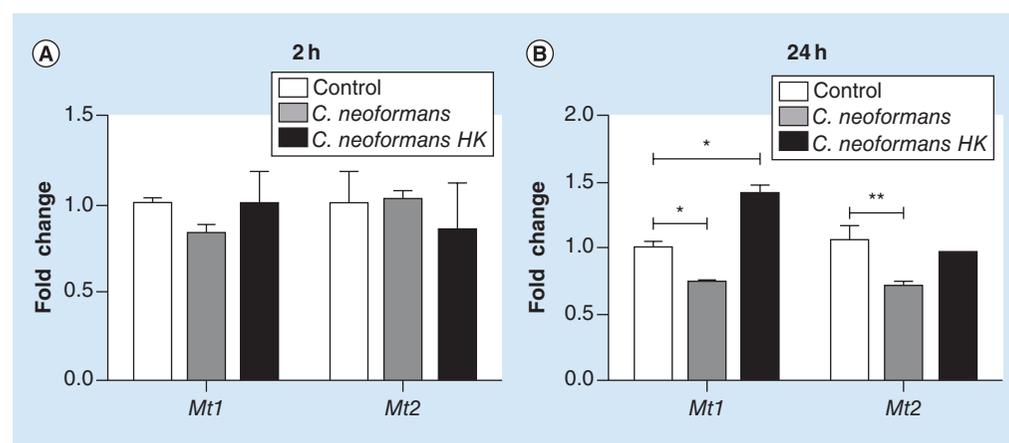


Figure 3. Macrophage metallothionein expression was altered by the presence of live and dead fungal cells (see previous page). IFN- γ - and lipopolysaccharide-activated J774.A1 cells were incubated for 2 h (A) and 24 h (B) with viable or heat-killed *Cryptococcus neoformans*. The quantity of *Mt1* and *Mt2* RNA in each sample was normalized using the threshold cycle values obtained for the *GAPDH* gene. Data are shown as the mean \pm standard deviation from three experimental replicates of three biological replicates. The asterisks denote statistically significant differences between transcript levels of macrophages exposed to live or dead *C. neoformans* and control conditions (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Both comparisons were analyzed by unpaired *t*-test. HK: Heat killed; Mt: Metallothionein.

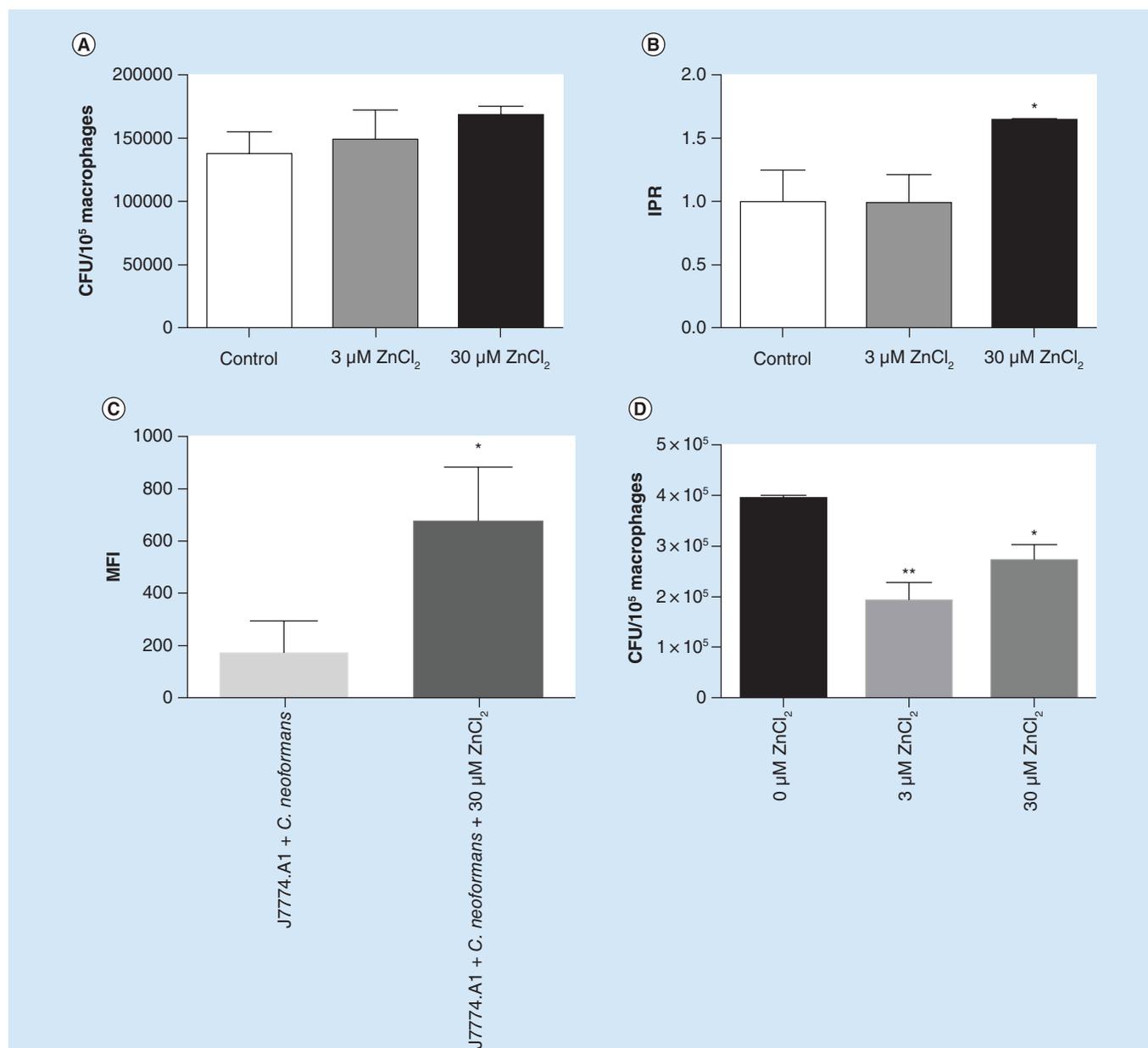


Figure 4. Increased zinc availability improved *Cryptococcus neoformans* intracellular proliferation and outcome from macrophages.

(A) J774.A1-activated (IFN- γ and lipopolysaccharide) cells were incubated with *Cryptococcus neoformans* in the presence of increasing ZnCl₂ concentrations for 2 h. Macrophages were lysed and yeast CFU recovery was performed in YPD agar. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. (B) J774.A1 cells were incubated with *C. neoformans* for 2 h to allow phagocytosis by macrophages. Next, ZnCl₂ was added to a final concentration of 3 and 30 μ M, and cells were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Macrophages were lysed, yeast CFU recovery was performed in YPD agar and cryptococcal IPR was evaluated. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. (C) Mean fluorescence intensity of labile zinc in cryptococcal cells recovered from J774.A1-activated macrophages incubated with live *C. neoformans* cells and with both *C. neoformans* cells plus 30 μ M ZnCl₂, for 24 h. Next, cells were washed with phosphate buffered saline lysed and *C. neoformans* cells incubated with fluoZin-3-AM for 30 min. Flow cytometry was used to detect the MFI of fluoZin-3-AM at each condition, where 5000 events were counted. Data are shown as the mean \pm SD from three biological replicates. (D) J774.A1 cells were incubated with *C. neoformans* for 2 h to allow phagocytosis by macrophages. Next, ZnCl₂ was added to a final concentration of 3 and 30 μ M, and cells were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Supernatant was evaluated for cryptococcal CFU counts to evaluate cryptococcal exocytosis. The asterisks denote statistically significant differences between the conditions (* p < 0.05; ** p < 0.01), compared by unpaired *t*-test (C). The asterisks denote significant differences obtained with analysis by one-way analysis of variance followed by

Dunnett's multicomparison test (A, B & D).

CFU: Colony forming unit; IPR: Intracellular proliferation rate; MFI: Mean fluorescence intensity; SD Standard deviation; YPD: Yeast extract-peptone-dextrose.

macrophage phagocytosis rate of *C. neoformans* was evaluated. Exposure to 3 or 30 μM of ZnCl_2 did not significantly alter the number of yeasts ingested by macrophages (Figure 4A). The rate of cryptococcal proliferation in macrophages (intracellular proliferation rate; IPR) in the presence of zinc was also evaluated. While addition of 3 μM ZnCl_2 did not influence the capability of *C. neoformans* to replicate within macrophages, addition of zinc at a physiological concentration (30 μM) significantly enhanced the cryptococcal IPR (Figure 4B). In line with these data, a higher concentration of labile zinc was detected employing fluoZin-3-AM in *C. neoformans* cells recovered from macrophages incubated with ZnCl_2 compared with the control condition (Figure 4C).

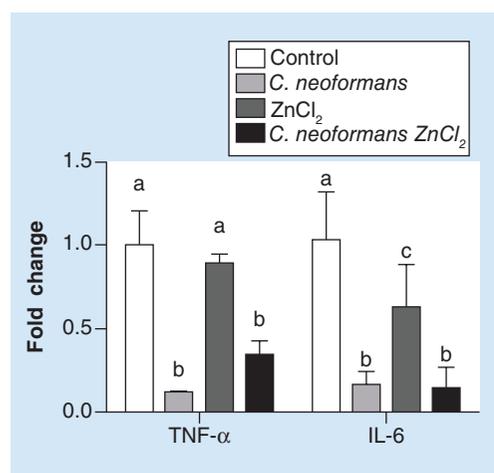


Figure 5. Improved outcome of cryptococcal cells after exposure to zinc did not occur through altered TNF- α and IL-6 expression.

IFN- γ - and lipopolysaccharide-activated J774. A1 cells were incubated with *Cryptococcus neoformans*, 30 μM ZnCl_2 and *C. neoformans* plus 30 μM ZnCl_2 for 24 h. The measured quantity of TNF- α and IL-6 mRNA in each sample was normalized using the threshold cycle values obtained for the *GAPDH* gene. Data are shown as the mean \pm standard deviation from three experimental replicates of three biological replicates. The letters a, b and c denote means which are significantly different ($p < 0.05$) in comparison to the other conditions. Comparisons were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's multicomparison test.

In addition, the quantification of cryptococcal cells present in supernatant was conducted to evaluate possible effects of zinc supplementation on nonlytic exocytosis. Compared with control condition (no zinc added), a significant reduction of CFU counts was observed in supernatants of interactions between macrophages and cryptococcal cells when 3 or 30 μM zinc was present (Figure 4D).

To evaluate if the increased proliferation of *C. neoformans* from Zn-treated macrophage cells was due to alterations in zinc bioavailability to fungal cells or in macrophage functionality, the transcriptional profiling of the cytokines TNF- α and IL-6 in macrophages or Zn-treated macrophages, both exposed to *C. neoformans*. qRT-PCR analysis of TNF- α and IL-6 in macrophages co-incubated with *C. neoformans* cells for 24 h revealed a decrease in transcription levels of such cytokines compared with control conditions. Moreover, 30 μM of ZnCl_2 in cocultures of macrophages and cryptococcal cells did not alter TNF- α transcription levels compared with cocultures without metal exposure. Addition of zinc to macrophage cells in the absence of cryptococcal cells did not alter TNF- α transcription levels. However, IL-6 levels were reduced at such conditions, but distinct from those observed in fungal infected macrophages (Figure 5). These results confirmed that the higher cryptococcal IPR in Zn-treated macrophages was not due to altered response to cryptococcal cells by macrophages.

Discussion

In the context of an immune response, invasion by pathogens generates a struggle for zinc with the host, as this metal represents a shared resource for microbial nutrition and host cell function [30]. The development and/or virulence of some bacterial and fungal pathogens is affected by zinc deprivation, as described for *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* [31], *H. capsulatum* [17] and *C. gattii* [28], among others. However, to overcome zinc deprivation or intoxication within the host, pathogenic bacterial and fungi evolved mechanisms to ensure adequate zinc concentration for their survival within the host. The fungi *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* and

C. gattii showed a variable expression of zinc transporters, during interaction with the host, and *C. albicans* showed ability to sequester zinc from the environment and within endothelial cells through Pra1 protein [32] to maintain zinc available to their proper biological functions. Therefore, zinc exerts a multitude of effects in biological systems, including those important for host–pathogen interactions.

In the present study, the nutritional immunity developed by macrophages against *C. neoformans* was characterized. Three lines of evidence confirmed that macrophages alter free zinc levels to hamper cryptococcal development: assays employing FluoZin-3-AM confirmed that labile zinc levels were reduced in macrophages exposed to *C. neoformans*; transcription levels of macrophage ZnTs were highly modulated by the presence of cryptococcal cells and addition of extracellular zinc enhanced the intracellular proliferation of *C. neoformans*. Furthermore, the presence of additional extracellular zinc did not alter the expression of a pivotal fungicidal cytokines (TNF- α) and IL-6. Therefore, it is feasible to assume that one mechanism by which IFN- γ - and LPS-activated macrophages impair cryptococcal growth is the restriction of zinc access.

The increase of cryptococcal IPR inside macrophages by extracellular zinc appears to be dependent upon specific stimuli. This phenotype was observed in IFN- γ - and LPS-activated macrophages, but not in macrophages treated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Protein kinase C (PKC) isoforms function in cell signaling to promote a large diversity of cellular responses [33], being activated by PMA [34]. IFN- γ activates macrophages through JAK1/2-Stat1 pathway. In conjunction with LPS, IFN- γ leads to an effective classical macrophage activation [35]. In this way it is feasible to hypothesize that PMA-activated macrophages would have a broader anticryptococcal response compared with IFN- γ - and LPS-activated macrophages. Probably, zinc limitation would play a minor contribution to the response to *C. neoformans* in PMA-activated macrophages. In line with these assumptions, CD4⁺ T cells treated with PMA showed an increase of intracellular labile zinc levels in an independent fashion of extracellular zinc supplementation [36]. Associated with the fact that PMA activation releases zinc ions from zinc finger domains in PKC proteins [37],

another hypothesis raised here refers that PMA activation itself would mask the zinc restriction activity played by macrophages in response to *C. neoformans*. However, these assumptions remain to be experimentally evaluated.

Zinc restriction as an antifungal strategy was first elucidated in macrophages infected by *H. capsulatum* [17,18]. The mechanisms by which macrophages restrict zinc to such fungal cells occurs in a GM-CSF dependent manner and is driven by upregulation of MTs. Such proteins are able to chelate intracellular labile zinc, reducing its availability to the fungal cells [18]. As several cellular processes depend upon a minimum zinc concentration, macrophages cells infected by *H. capsulatum* alter the expression of zinc importers. The most drastic effect occurs in Zip2, which provides zinc for the normal cellular homeostasis [18]. The zinc restriction program developed by macrophages in response to cryptococcal cells described here presents some differences compared with the response against *H. capsulatum*. The reduction in zinc availability appears to be dependent mostly on the activity of zinc transporters, mainly by the reduction of expression of ZIP2. In macrophage infected with cryptococcal cells, the minimum zinc quota is maintained by the reduced expression of zinc exporters (ZnT1) and proteins associated with compartmentalization of zinc, as ZnT3 and ZnT7. In this way, macrophage cells appear to develop distinct zinc restriction mechanisms to different fungi.

Little is known about phagosome nutritional composition, but this organelle has been reported to contain low concentrations of carbon and amino acid sources [38,39]. Fungal-containing phagolysosomes have been suggested as a Zn-poor environment [40]. According to the results presented in this study, Zn-labile concentrations were reduced when macrophages were exposed to live *C. neoformans*, suggesting that macrophages may store zinc in other organelles to render it less available to fungal cells. This mechanism has been previously described in murine peritoneal and bone marrow macrophages infected with *H. capsulatum* [17,18]. Indirect evidence also suggests that cryptococcal cells are exposed to low zinc concentrations inside macrophages, as a member of the ZIP family of zinc importers (CNAG_00895) is upregulated in yeast cells phagocytosed by murine macrophages [41]. Members of this

family were previously characterized both in *C. neoformans* and *C. gattii* and shown to play fundamental roles in zinc uptake [24,42], thus confirming the assumption that macrophages actively reduced intracellular labile zinc levels after infection with *C. neoformans*. This contrasts with total zinc levels, which are not altered in macrophages infected with *C. neoformans* compared with control conditions. Due to a large number of Zn-binding proteins, the labile concentration of free zinc is in order below that of the total concentration, which typically ranges from 0.1 to 0.5 mM [43]. In this way, macrophages appear to alter the free zinc pool in response to cryptococcal infection, maintaining the minimum zinc concentration for proper cell physiology.

Zinc level homeostasis is essentially maintained by ZnTs and Zn-binding proteins, mainly MTs. Transporters such as ZIP2, ZIP6, ZIP8 and ZIP14 are localized at the plasma membrane of phagocytes [44,45], but ZIP8 can also be localized at the endosomes [44,46,47]. While ZnT1 is localized at the plasma membrane [44], ZnT2 is localized at intracellular compartments such as lysosomes/endosomes [19,44,48] while ZnT3 is localized at the vesicular compartments and ZnT7 is localized at the Golgi apparatus [18–19,44]. Based on the qRT-PCR results, we hypothesize that the reduced expression of ZIP2 and ZIP14 led to lowered intracellular zinc levels in macrophages. ZIP2 is known to be present at the cell membrane and to transport zinc into cells; consequently, intracellular zinc levels increase through the activity of this transporter [49]. More specifically, it was recently suggested that reduced expression of ZIP2 transporter is responsible for inhibiting intracellular yeast cells [30]. Another observation that corroborates with the hypothesis of decreased intracellular zinc levels through a reduction in ZIP transporter expression is decreased ZIP14 expression. The transcription of this transporter increased during zinc depletion [50], suggesting that ZIP14 is also involved in zinc uptake from the extracellular space. In this way, the reduced expression of such transporters could reduce intracellular zinc levels. Export of zinc from the cytoplasm to the extracellular space or to organelles is associated with ZnT proteins. Hamon *et al.* reported that decreased *ZnT1*, *ZnT3*, *ZnT5* and *ZnT6* transcription levels also helped to conserve cytosolic zinc [45]. ZnT1

was the first ZnT transporter characterized, and functions primarily to alleviate the toxic effects of excess zinc inside cells [51]. In accordance with these characteristics, macrophages infected with live *C. neoformans* had decreased intracellular zinc levels and therefore decreased *ZnT1* transcript levels.

A striking observation in this study was the significant increase in total zinc concentration in macrophages exposed to heat-killed cells. One hypothesis is that the increase may occur due to recycling of cryptococcal-derived molecules inside macrophages, which subsequently release intracellular fungal zinc into the macrophages. However, the assumption that dead cryptococcal cells could elicit a bacterial-like induced zinc influx [52] cannot be ruled out. Therefore, another hypothesis is that the upregulation of the zinc importers ZIP8 and ZIP6 contribute to the increase in total zinc concentration within cells, as previously observed in monocytes infected by live or heat-killed *Mycobacterium* [46]. To prevent the toxic effects of zinc, the expression of MT1 and ZnT2 was also upregulated in order to buffer or to store zinc in the vesicular intracellular compartments, respectively. Such a possibility seems likely, given that ZIP8 expression was induced in monocytes infected by live or heat-killed *Mycobacterium* [46].

It is well documented that *C. neoformans* negatively modulates phagocytes through its capsule [53], and one of the strategies behind this mechanism is reduced TNF- α expression [54]. Given that TNF- α is downregulated in macrophages infected by live cryptococcal cells and enhanced under zinc supplementation conditions [23], the effect of zinc in the immune response was evaluated during TNF- α expression. As the results showed, zinc did not influence the expression of this cytokine when *C. neoformans* was present, demonstrating that the immune response was unchanged and did not affect the outcome of the fungal cells. This observation was confirmed when zinc was added to macrophages infected by *C. neoformans*, and the intracellular zinc levels of yeast cells recovered from macrophages increased compared with those recovered from cells without zinc supplementation. This demonstrates zinc assimilation by macrophages and, consequently, more zinc was available inside macrophages, thus improving *C. neoformans* proliferation.

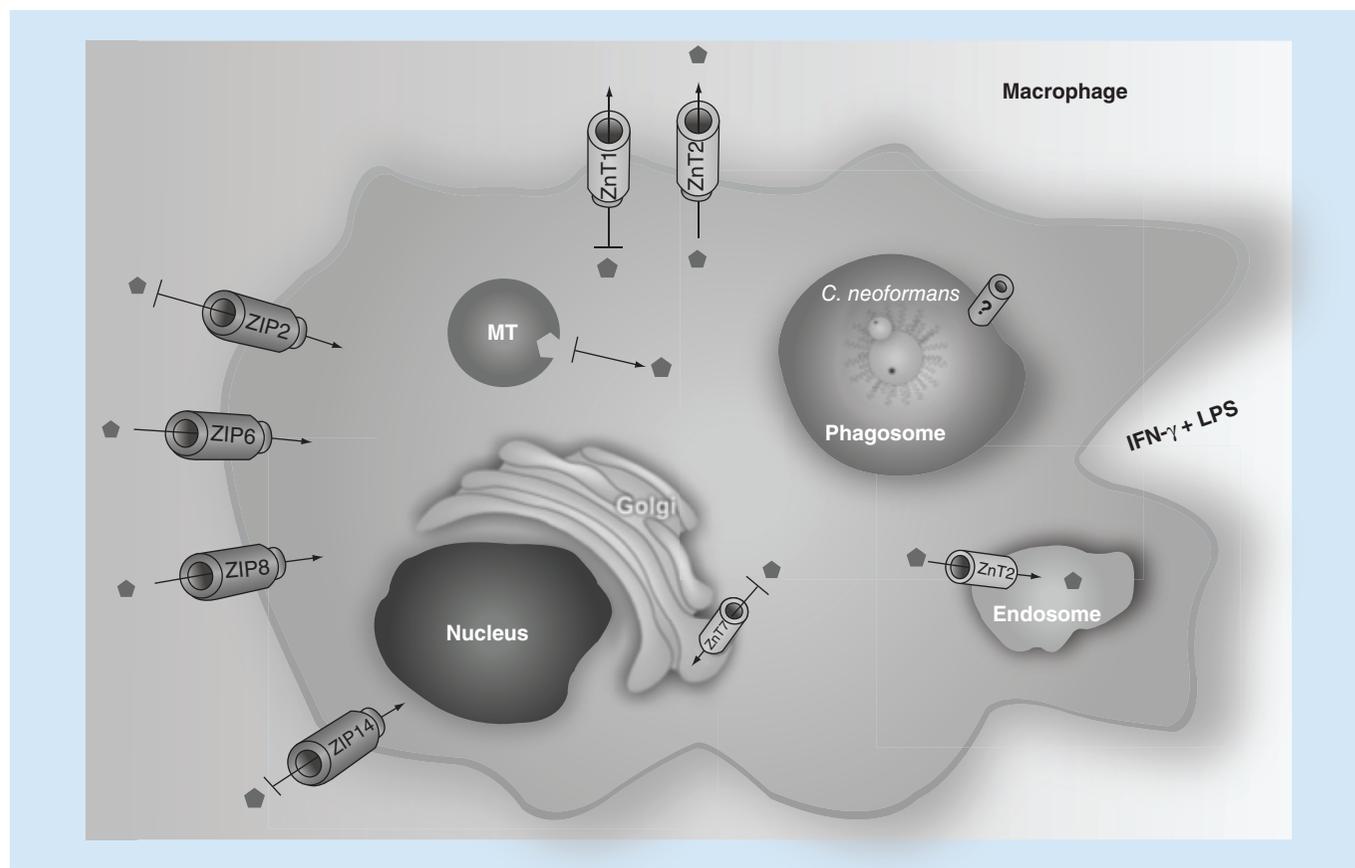


Figure 6. Proposed model of macrophage zinc modulation in response to *Cryptococcus neoformans*. Inhibited expression of two zinc importers (ZIP2 and ZIP14) and enhanced expression of zinc exporter ZnT2 leads to a reduced cytosolic zinc concentration into the IFN- γ - and lipopolysaccharide-activated macrophage, after 24 h of interaction with *Cryptococcus neoformans*. However, in order to maintain cytoplasmic zinc to proper cell function, downregulation of zinc transporters ZnT1 and ZnT7 and metallothioneins leads to an increase in cytosolic zinc by importation or through its release from intracellular organelles, such as Golgi apparatus. LPS: Lipopolysaccharide; MT: Metallothionein.

In this way, it is feasible to assume that the reduced labile zinc inside macrophages exposed to *C. neoformans* is due to an orchestrated strategy: reduced uptake of zinc caused by reduced expression of Zip2, and possibly Zip6 and Zip14, mobilization of zinc into vesicles by increased expression of ZnT2. However, some ZnTs and MTs coding genes had their expression reduced in order to provide cytoplasmic zinc to proper cell function. This proposed model of macrophage response against *C. neoformans* is schematized in **Figure 6**.

Conclusion

These results confirmed that macrophages alter zinc availability to viable fungal cells in order to reduce fungal cell proliferation. Two key events contribute to this observation: reduced expression of zinc importers in macrophages infected by *C. neoformans* and the increased

capability of cryptococcal cells to replicate inside macrophages under Zn-rich conditions.

Acknowledgements

The authors would like to thank A Casadevall (John Hopkins Bloomberg School of Health) for kindly donating the anti-GXM 18-B7 antibody, and I da Silva Vaz Jr (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for critical review of the manuscript.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb-2016-0160

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Grant numbers 312408/2014-5 and 474445/2012-7) and Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). FM Dos Santos, AC Piffer, RO Schneider, NS Ribeiro and AWA Garcia are recipients of CAPES scholarships. A Schrank, MH Vainstein and CC Staats are recipients of CNPq scholarships. The authors declare that there is no conflict of interest. Editorial support, in the form of English proofreading was provided by Proofreading Service, UK. The funders had no role

in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

SUMMARY POINTS

- Macrophage-like J774.1A reduces its labile pool of zinc, but not the total zinc levels, in response to cryptococcal infection.
- Heat-killed *Cryptococcus neoformans* cells causes an increase of total zinc levels in J774.1A cells.
- Addition of zinc to the interaction media allowed the recovery of more cryptococcal cells.
- Live *C. neoformans* cells caused a drastic alteration in the transcriptional profile of zinc transporters and metallothioneins coding genes.

References

- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4(165), 165rv113 (2012).
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23(4), 525–530 (2009).
- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4(7), a019760 (2014).
- Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL Jr. *Cryptococcus* and phagocytes: complex interactions that influence disease outcome. *Front. Microbiol.* 7, 105 (2016).
- Rohatgi S, Pirofski LA. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* 10(4), 565–581 (2015).
- Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet. Biol.* 78, 76–86 (2015).
- Lauvau G, Loke P, Hohl TM. Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Semin. Immunol.* 27(6), 397–409 (2016).
- Underhill DM, Pearlman E. Immune interactions with pathogenic and commensal fungi: a two-way street. *Immunity* 43(5), 845–858 (2015).
- Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(8), 525–537 (2012).
- Diaz-Ochoa VE, Jellbauer S, Klaus S, Raffatellu M. Transition metal ions at the crossroads of mucosal immunity and microbial pathogenesis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4, 2 (2014).
- Caza M, Kronstad JW. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 3, 80 (2013).
- Bonaventura P, Benedetti G, Albareda F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun. Rev.* 14(4), 277–285 (2015).
- Heyneman CA. Zinc deficiency and taste disorders. *Ann. Pharmacother.* 30(2), 186–187 (1996).
- Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet Assoc.* 101(3), 294–301 (2001).
- Solomons NW. Mild human zinc deficiency produces an imbalance between cell-mediated and humoral immunity. *Nutr. Rev.* 56(1 pt 1), 27–28 (1998).
- Mambula SS, Simons ER, Hastey R, Selsted ME, Levitz SM. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 68(11), 6257–6264 (2000).
- Winters MS, Chan Q, Caruso JA, Deepe GS. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *J. Infect. Dis.* 202(7), 1136–1145 (2010).
- Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA, Deepe GS Jr. Granulocyte Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity* 39(4), 697–710 (2013).
- Kimura T, Kambe T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: an overview and perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 17(3), (2016)
- Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Aspects Med.* 34(2–3), 612–619 (2013).
- Huang L, Tepasamordech S. The SLC30 family of zinc transporters – a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol. Aspects Med.* 34(2–3), 548–560 (2013).
- Maret W, Krezel A. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Mol. Med.* 13(7–8), 371–375 (2007).
- Mayer LS, Uciechowski P, Meyer S, Schwerdtle T, Rink L, Haase H. Differential impact of zinc deficiency on phagocytosis, oxidative burst, and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Metallomics* 6(7), 1288–1295 (2014).

- 24 Schneider RD, Diehl C, Dos Santos FM *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Sci. Rep.* 5, 10104 (2015).
- 25 Nicola AM, Casadevall A. *In vitro* measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. *Methods Mol. Biol.* 844, 189–197 (2012).
- 26 Mukherjee S, Lee SC, Casadevall A. Antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages. *Infect. Immun.* 63(2), 573–579 (1995).
- 27 Dean KM, Qin Y, Palmer AE. Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1823(9), 1406–1415 (2012).
- 28 Schneider RD, Fogaca NDS, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE* 7(8), e43773 (2012).
- 29 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25(4), 402–408 (2001).
- 30 Subramanian Vignesh K, Deepe GS. Immunological orchestration of zinc homeostasis: the battle between host mechanisms and pathogen defenses. *Arch. Biochem. Biophys.* 611, 66–78 (2016).
- 31 Luloff SJ, Hahn BL, Sohnle PG. Fungal susceptibility to zinc deprivation. *J. Lab. Clin. Med.* 144(4), 208–214 (2004).
- 32 Jung WH. The zinc transport systems and their regulation in pathogenic fungi. *Mycobiology* 43(3), 179–183 (2015).
- 33 Lim PS, Sutton CR, Rao S. Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. *Immunology* 146(4), 508–522 (2015).
- 34 Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenbark GR. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80(1), 36–40 (1983).
- 35 Ma J, Chen T, Mandelin J *et al.* Regulation of macrophage activation. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(11), 2334–2346 (2003).
- 36 Rice JM, Zweifach A, Lynes MA. Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4(+) T cell activation. *BMC Immunol.* 17(1), 13 (2016).
- 37 Korichneva I, Hoyos B, Chua R, Levi E, Hammerling U. Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J. Biol. Chem.* 277(46), 44327–44331 (2002).
- 38 Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412(6842), 83–86 (2001).
- 39 Schnappinger D, Ehrst S, Voskuil MI *et al.* Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J. Exp. Med.* 198(5), 693–704 (2003).
- 40 Crawford A, Wilson D. Essential metals at the host–pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res.* 15(7), (2015).
- 41 Derengowski Lda S, Paes HC, Albuquerque P *et al.* The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryot. Cell* 12(5), 761–774 (2013).
- 42 Do E, Hu G, Caza M, Kronstad JW, Jung WH. The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 54(6), 605–615 (2016).
- 43 Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta* 1763(7), 711–722 (2006).
- 44 Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA, Deepe GS. Zinc sequestration: arming phagocyte defense against fungal attack. *PLoS Pathog.* 9(12), e1003815 (2013).
- 45 Hamon R, Homan CC, Tran HB *et al.* Zinc and zinc transporters in macrophages and their roles in efferocytosis in COPD. *PLoS ONE* 9(10), e110056 (2014).
- 46 Begum NA, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* 80(6), 630–645 (2002).
- 47 Wang CY, Jenkitkasemwong S, Duarte S *et al.* ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *J. Biol. Chem.* 287(41), 34032–34043 (2012).
- 48 Falcón-Pérez JM, Dell’Angelica EC. Zinc transporter 2 (SLC30A2) can suppress the vesicular zinc defect of adaptor protein 3-depleted fibroblasts by promoting zinc accumulation in lysosomes. *Exp. Cell. Res.* 313(7), 1473–1483 (2007).
- 49 Inoue Y, Hasegawa S, Ban S *et al.* ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 289(31), 21451–21462 (2014).
- 50 Iyengar V, Pullakhandam R, Nair KM. Coordinate expression and localization of iron and zinc transporters explain iron–zinc interactions during uptake in Caco-2 cells: implications for iron uptake at the enterocyte. *J. Nutr. Biochem.* 23(9), 1146–1154 (2012).
- 51 Palmiter RD. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(14), 4918–4923 (2004).
- 52 Botella H, Peyron P, Levillain F *et al.* Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* 10(3), 248–259 (2011).
- 53 Lupo P, Chang YC, Kelsall BL *et al.* The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infect. Immun.* 76(4), 1581–1589 (2008).
- 54 Kawakami K, Qifeng X, Tohyama M, Qureshi MH, Saito A. Contribution of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.* 106(3), 468–474 (1996).

Supplementary Table 1: List of primers used in this work.

Primer	GeneID Genbank	Sequence
<i>GAPDH forward</i>	14433	5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3'
<i>GAPDH reverse</i>		5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3'
<i>SLC30A1 forward</i>	22782	5' GGAAGCGGAAGACAACAGGG 3'
<i>SLC30A1 reverse</i>		5' CAAGGCATTACGACCACG 3'
<i>SLC30A2 forward</i>	230810	5' CGGAGCCCGGTCCTTCTTA 3'
<i>SLC30A2 reverse</i>		5' GCATGGCAATAATGGTTGCTCT 3'
<i>SLC30A3 forward</i>	22784	5' GAAGAGTCTTTTCACAGAGCCC 3'
<i>SLC30A3 reverse</i>		5' TGTGTGCTAAATACCCACCAAC 3'
<i>SLC30A7 forward</i>	66500	5' GGATGATGAATACAAACCACCCA 3'
<i>SLC30A7 reverse</i>		5' AAAGCGAAAGAGAGGTTTCAGG 3'
<i>SLC39A2 forward</i>	214922	5'GGTTCCAGATGGATGCAGCTA 3'
<i>SLC39A2 reverse</i>		5' CTC CACGTAACTAGAAGCAGC 3'
<i>SLC39A6 forward</i>	106957	5' TGGTAAAAACAATCGGAAAGC CT 3'
<i>SLC39A6 reverse</i>		5' GCTTGCACTCTCCTTGATGTTC 3'
<i>SLC39A8 forward</i>	67547	5' GCCAAGCTCATGTACCTGTCT 3'
<i>SLC39A8 reverse</i>		5' AAGATGCCCAATCGCCAA 3'
<i>SLC39A14 forward</i>	213053	5' GTGTCTCACTGATTAACCTGGC 3'
<i>SLC39A14 reverse</i>		5' AGAGCAGCGTTCCAATGGAC 3'
<i>MT1 forward</i>	17748	5' AAGAGTGAGTTGGGACACCTT 3'
<i>MT1 reverse</i>		5' CGAGACAATACAATGGCCTCC 3'
<i>MT2 forward</i>	17750	5' GCCTGCAATGCAAACAATGC 3'
<i>MT2 reverse</i>		5' AGCTGCACTTGTCGGAAGC 3'
<i>TNF-α forward</i>	21926	5'AGCCTCTTCTCATTCTGC 3'
<i>TNF-α reverse</i>		5' GGAGGCCATTTGGGAACT 3'
<i>IL-6 forward</i>	16193	5' ACAACCACGGCCTTCCTACTT 3'
<i>IL-6 reverse</i>		5'CACGATTTCAACAACCACGGCCT 3'

3.2 Capítulo II: Impacto da ativação de linhagem de macrófago na homeostase de zinco

3.2.1 INTRODUÇÃO

Linhagens celulares e culturas primárias de células são amplamente utilizadas em estudos de interações patógenos-hospedeiros. As linhagens celulares, entretanto, apresentam vantagens como a: rapidez na infecção por patógenos, alta taxa de proliferação e possibilidade de longo período de manutenção em cultura e manutenção do fenótipo. Tais características permitem estudos longos, reprodutibilidade e consistência por ser uma população celular homogênea (Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2010). Um estudo comparativo da resposta de linhagens de macrófagos derivados de medula de camundongos e J774.A1 à infecção por *M. tuberculosis* mostrou que apresentam diferença na intensidade e tempo da resposta. Entretanto, é ressaltado que genes diferencialmente expressos em períodos maiores de infecção (24 h) eram similares entre os dois tipos de macrófagos estudados (Andreu *et al.*, 2017). Por tais razões, a cultura de linhagens imortalizadas é uma ferramenta válida para estudos *in vitro* de estudos de interação com patógenos, apesar das limitações em corresponder completamente igual a modelos de doenças em humanos (Chingwaru *et al.*, 2016).

O uso da linhagem J774.A1 em laboratório normalmente requer a sua ativação para responder a algum estímulo externo. Para isto, a ativação clássica de macrófagos é formada em resposta a dois sinais: IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS). IFN- γ ativa os fatores de transcrição STAT1/2, os quais se ligam a sequências gama ativadas (*GAS, do inglês gamma activated sequences*) em genes efetores. Enquanto LPS constitui um ligante para

receptores Toll-like (TLRs, do inglês, *Toll-like receptors*) presentes nas células imunes. Tal ligante pode ser classificado como um dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). A ativação de TLRs, neste caso, TLR-4 principalmente, induzem a expressão da citocina Fator de Necrose Tumoral (TNF, do inglês, *Tumor Necrosis Factor*), a qual atua de forma autócrina para estimular macrófagos (Mosser and Zhang, 2008).

Mais especificamente, a ativação com LPS acarreta na ativação de fatores de transcrição da família NF- κ B. Em células não ativadas, NF- κ B se encontra ligado à proteína inibitória I κ B. A fosforilação e degradação proteolítica de I κ B libera NF- κ B do complexo, o qual se transloca rapidamente para o núcleo, liga-se ao elemento κ B de genes alvo e, desta forma, ativa a expressão de genes quiescentes (Baeuerle and Henkel, 1994). Em contraste, IFN- γ utiliza a via JAK/STAT para transdução de sinal. A ligação do IFN- γ ao seu receptor causa o recrutamento de JAK1 e JAK2, duas tirosina quinases chamadas Janus, as quais induzem a fosforilação da tirosina da proteína citoplasmática STAT1 (do inglês, *signal transducing activator of transcription 1*). STAT1 migra para o núcleo e se liga a sítios gama ativados de genes cujos produtos geram os efeitos de IFN- γ (Darnell, Kerr and Stark, 1994). Tanto LPS quanto IFN- γ induzem o fator regulatório de IFN- γ , apesar de genes diferentes serem ativados por cada um dos elementos. O fator regulatório é essencial para ativação da sintase de óxido nítrico induzida (iNOS, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*) (Kamijo *et al.*, 1994), sendo que o óxido nítrico atua de diversas formas, entre elas, na defesa do hospedeiro contra micro-organismos intracelulares (Lorsbach, Murphy, Lowenstein and *et al.*, 1993).

Outras opções de ativação celular também são descritas, como o uso de acetato miristato de forbol, conhecido como PMA (do inglês, *phorbol myristate acetate*) um

ativador de classe lipídica e análogo de diacilglicerol (do inglês, *DAG*). Tal molécula ativa a proteína quinase, conhecida como PKC (do inglês, *protein kinase C*). Sabe-se que tais proteínas possuem pelo menos 11 isoformas que apresentam diferenças em sua estrutura, função biológica e distribuição celular, de forma que foram divididas em três grupos: as convencionais ou clássicas, as novas e as atípicas (Jaken, 1996). As isoformas convencionais (como α , β I, β II e γ) e as novas (δ , ϵ , η e θ) podem ser ativadas por PMA ou DAG (Mut, Amos and Hussaini, 2010). As proteínas PKC possuem diversos efeitos em vias de sinalização celulares incluindo a ativação de NF- κ B (Holden *et al.*, 2008). Desta forma, a ativação com LPS e IFN- γ bem como PMA resultam na ativação final de NF- κ B.

Durante infecção por leveduras do gênero *Cryptococcus* sp., a infecção pulmonar tem melhor resolução quando macrófagos são classicamente ativados (resposta M1) e, após eliminação do patógeno pode ocorrer polarização de M1 para M2 para resolução da inflamação (Davis *et al.*, 2013), assim como para a resposta de células T (Th1 ou Th2). Sabe-se que macrófagos ativados com citocinas Th1/ Th17 geram uma resposta anti-criptocócica, causando redução na proliferação fúngica e, assim, macrófagos necessitam de uma ativação Th1/Th17 para eficiência na eliminação da levedura (Voelz, Lammas and May, 2009). Tal característica de melhor resolução da doença coincide com a atividade de STAT1 através da via de sinalização IFN- γ -JAK1/2-STAT1 (Hardison *et al.*, 2012). Desta forma, para obtenção de uma resposta clássica, ou M1, de macrófagos, a ativação destas células envolve, geralmente, IFN- γ e LPS (Mosser and Zhang, 2008).

Existem evidências de que as vias de sinalização que resultam na ativação de NF- κ B, como LPS e PMA, também podem ser reguladas pelos níveis de Zn no microambiente celular (Haase *et al.*, 2008). Desta forma, decidiu-se avaliar a homeostase de Zn em macrófagos a partir de duas frentes. A primeira, analisa a função de transportadores de Zn

em macrófagos quando expostos a diferentes metais ou à privação de Zn, enquanto a segunda, engloba a influência da ativação celular dos macrófagos na resposta antifúngica envolvendo a homeostase de Zn contra *C. neoformans*.

3.2.2 METODOLOGIA

3.2.2.1 . Linhagens utilizadas

A levedura *C. neoformans* linhagem H99 foi mantida em meio YPD sólido (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura). Para ensaios de interação com macrófagos, as leveduras foram cultivadas em meio YPD líquido, a 30°C sob agitação constante. A linhagem J774.A1 de macrófago peritoneal murino foi obtida do Banco de Célula do Rio de Janeiro (BCRJ, número de acesso 0121). A linhagem foi rotineiramente cultivada em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco® Life Technologies), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (SFB; Gibco® Life Technologies), 1 mM L-glutamina (Gibco® Life Technologies), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco® Life Technologies), 1 % de aminoácidos não essenciais (Gibco® Life Technologies) e 20 U/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco® Life Technologies). A linhagem foi incubada a 37°C e 5% CO₂. Culturas confluentes foram expandidas a cada 2-3 dias em no máximo 10 processos de expansão.

3.2.2.2 .Ensaio de viabilidade celular

Foram realizados ensaios de viabilidade celular para avaliar se adição de metais como zinco ($ZnCl_2$), ferro ($FeCl_3$), manganês ($MnSO_4$), quelante de Zn intracelular e extracelular TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine; Sigma Aldrich) e do quelante extracelular de Zn DTPA (ácido dietilentríaminopentaacético) possuem efeitos citotóxicos na linhagem J77.A1. Para isto, as células J774.A1 foram incubadas por 18 h na concentração de 10^5 células por poço, em placas de cultivo de 96 poços, a 37 °C, 5 % CO_2 , conforme item 3.2.1.1. Após, foi adicionado apenas DMEM contendo 10 % de SFB (condição controle), meio DMEM contendo 10 % de SFB suplementado com concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 μM de TPEN ou suplementado com 1; 5; 10; 50 e 100 μM de DTPA.

Em um segundo conjunto de experimentos, foi adicionado apenas DMEM contendo 10 % de SFB (condição controle) ou meio DMEM contendo 10 % de SFB suplementado com 30 μM de $FeCl_3$ ou $MnSO_4$. Em ambos os conjuntos de experimentos, as células foram incubadas por 2 h e 24 h, a 37 °C e 5 % CO_2 . Após os períodos de incubação, as células foram lavadas com PBS, adicionou-se 20 μL de solução de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue; Thermo Scientific) na concentração de 5 mg/mL e as células foram incubadas por 3 h, a 37 °C e 5 % CO_2 , no escuro. A solução de MTT foi removida e 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) foi adicionado a cada poço. A absorbância foi determinada a 560 nm com background de 670 nm no espectrofotômetro Spectramax i3 (Molecular Devices). Cada condição foi realizada em triplicata técnica.

3.2.2.3 . Experimentos de interação macrófago-*Cryptococcus*

A linhagem J774.A1 foi utilizada de três formas: (i) não ativada, (ii) ativada com IFN- γ e LPS *overnight* ou (iii) ativada com PMA (do inglês, *phorbol-12-myristate-13-acetate*). Para condições de não ativação e ativação com PMA, as células foram incubadas apenas com o meio de cultivo suplementado com SFB, por 18 h, como descrito acima. Para condição de ativação com IFN- γ e LPS, as células J774.A1 foram incubadas por 18 h com meio de cultivo suplementado com IFN- γ (100 U/mL, Sigma Aldrich) e LPS (500 ng/mL, Sigma Aldrich). Células de *C. neoformans* foram cultivadas em meio YPD líquido por 18 h, sob agitação, a 30°C. Após as 18 h, as leveduras passaram por lavagens com tampão PBS (do inglês, *Phosphate buffered saline*) e foram opsonizadas com 1 μ g/mL de anticorpo anti-GXM, 18B7. As leveduras foram incubadas por 1 h, a 37°C. Conjuntamente, a linhagem de macrófago da condição de ativação com PMA, passou por lavagens com PBS e, após, 50 nM de PMA em DMEM puro sem suplementação foi adicionado aos poços, por 1 h, a 37°C e 5 % CO₂. Após opsonização da levedura e ativação com PMA, as células fúngicas foram adicionadas nos poços contendo macrófagos, em uma proporção de 10:1.

3.2.2.4 . Ensaios de fagocitose

Macrófagos não ativados ou macrófagos ativados com IFN- γ e LPS ou PMA (conforme item 3.2.1.1.) foram, então, incubados com a levedura por 2 h. Após o período de incubação, os poços foram lavados com PBS para remoção de leveduras não internalizadas e realizou-se a lise dos macrófagos com água MilliQ gelada. O lisado celular

foi diluído e cultivado em placas de YPD sólido para determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.2.2.5 . Índice de proliferação intracelular (IPI)

Para análise de IPI (do inglês, *intracellular proliferation rate, IPR*), 10^5 células de macrófagos (i) não ativados e ativados (ii) com IFN- γ e LPS ou (iii) PMA foram cultivados *overnight* em placas de cultivo de 96 poços, conforme item 3.2.1.1. Posteriormente, foram incubados com 10^6 células de *C. neoformans* opsonizadas, por 2 h, para que a fagocitose ocorresse. Após, os poços foram lavados com PBS e, em um conjunto deles procedeu-se com a etapa de lise celular e cultivo do lisado em placa de YPD sólido para determinação de UFC. No outro conjunto de poços, foi adicionado meio DMEM suplementado ou não com $30 \mu\text{M}$ de ZnCl_2 , por mais 24 h. Após, o sistema foi lavado com PBS e realizou-se a lise dos macrófagos com água MilliQ gelada e determinação de UFC.

3.2.2.6 . PCR em tempo real

Foi realizada a avaliação da influência (i) de metais e (ii) da ativação das células fagocíticas na resposta à levedura no perfil de transcrição de transportadores de Zn em macrófagos, empregando análises de RT-PCR em tempo real. Para avaliação da influência da ativação das células fagocíticas no perfil de transcrição de transportadores de Zn quando macrófagos expostos a *C. neoformans* vivo ou morto, macrófagos foram cultivados em placas de cultivo de 12 poços, em uma concentração de 10^6 células por poço, por 18 h.

Após, foram ativados com 50 nM de PMA, por 1 h, (item 3.2.2.2.) e expostos, por um período de 24 h, à células opsonizadas de *C. neoformans* vivas ou mortas por calor (MC, a 65 °C, por 30 minutos).

Para análise da influência de metais como zinco (ZnCl₂), ferro (FeCl₃), manganês (MnSO₄) e quelante TPEN no perfil de transcrição de transportadores de Zn de macrófagos, as células J774.A1 foram incubadas por 18 h na concentração de 10⁶ células por poço, em placas de cultivo de 12 poços, a 37 °C, 5 % CO₂. Após, foi adicionado apenas DMEM contendo 10 % de SFB (condição controle), meio DMEM contendo 10 % de SFB suplementado com (i) 30 µM de cada uma das soluções de metais, (ii) 30 µM de ZnCl₂ + 45 µM DTPA ou (iii) 1 µM de TPEN. As células foram incubadas por 2 h e 24 h, a 37 °C e 5 % CO₂. Posteriormente, para ambas as análises, realizou-se a extração de RNA utilizando o reagente Trizol ® (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A quantificação foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA tratado com DNase (Promega) utilizando a enzima transcriptase reversa Improm II (Promega) e primers oligo-dT. A reação de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no equipamento StepOne real-time PCR (Applied Biosystems) com as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 15s e 60°C por 60 s. Foi utilizado o kit Platinum SYBR green qPCR Supermix (Invitrogen) como mix para reação suplementado com cada primer e 11 ng do cDNA molde, com volume final da reação de 20 µL. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e biológica. Os dados foram normalizados com os níveis de expressão de GAPDH. A expressão relativa dos transportadores de Zn foi determinada pelo ΔCt.

Para macrófagos expostos aos metais, o perfil transcricional de ZIP2, ZnT7 e ZIP14 foram analisados e, para exposição a TPEN, ZnT2, ZnT3, ZnT7 e Mt1. Somado a isso, o perfil transcricional dos genes codificantes dos transportadores ZIP2 e ZnT7 foram avaliados em macrófagos ativados com PMA expostos a *C. neoformans* vivo ou MC. Uma vez que tais transportadores mostraram significativa regulação em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS e expostos à levedura, seguiu-se com a avaliação dos níveis de transcritos dos mesmos nas condições citadas acima.

3.2.2.7 Medida de zinco intracelular em macrófagos ativados com PMA

A linhagem J774.A1 foi cultivada, por 18 h, em placas de 12 poços sem ativação e, após este período, foi ativada com 50 nM de PMA e exposta a células de *C. neoformans*, na proporção de 1: 10, por 24 h, conforme descrito no item 3.2.2.2. Após 24 h de interação macrófago: levedura, o meio foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS. FluoZin-3-AM foi adicionado aos poços em uma concentração final de 1 μ M e incubou-se o sistema por mais 30 minutos, a 37 °C e 5 % CO₂, no escuro. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS e removidas dos poços com o auxílio de *cell-scrapper*. O nível intracelular de Zn de macrófagos expostos ou não a *C. neoformans* foi avaliado por citometria de fluxo, através da medida da fluorescência de FluoZin-3-AM utilizando o citômetro de fluxo Guava® easyCyte (Merck Millipore, MA, EUA), com comprimento de onda de excitação de 494 nm e emissão de 516 nm. Os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo (versão 10.2).

3.2.2.8 Análise estatística

Dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica. As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 6, aplicando o teste *t* não pareado ou *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de multicomparação Dunnet.

3.2.3 RESULTADOS

A fim de avaliar o perfil transcricional de transportadores de Zn na presença de metais como zinco (ZnCl_2), ferro (FeCl_3) e manganês (MnSO_4), as células J774.A1 foram, primeiramente, expostas a tais metais, por 2 h e 24 h e, a viabilidade celular das mesmas determinada pelo ensaio de MTT. Tendo em vista que a concentração predita como basal de Zn para as células é de cerca de 30 μM , metais como ferro e manganês também foram avaliados em relação a um possível efeito citotóxico para as células J774.A1 na concentração de 30 μM . Tanto ferro como manganês não causaram redução na viabilidade da linhagem celular de macrófagos (Figura 14A), bem como o quelante extracelular DTPA, que não mostrou toxicidade para as células fagocíticas nem nas concentrações mais elevadas (100 μM) (Figura 14B). Para TPEN, concentrações menores do quelante já mostraram influência na viabilidade das células, especificamente no período de 24 h: concentrações de até 1 μM de TPEN não foram tóxicas enquanto que, concentrações de 5 μM e 10 μM causaram redução significativa na viabilidade das células (Figura 14C).

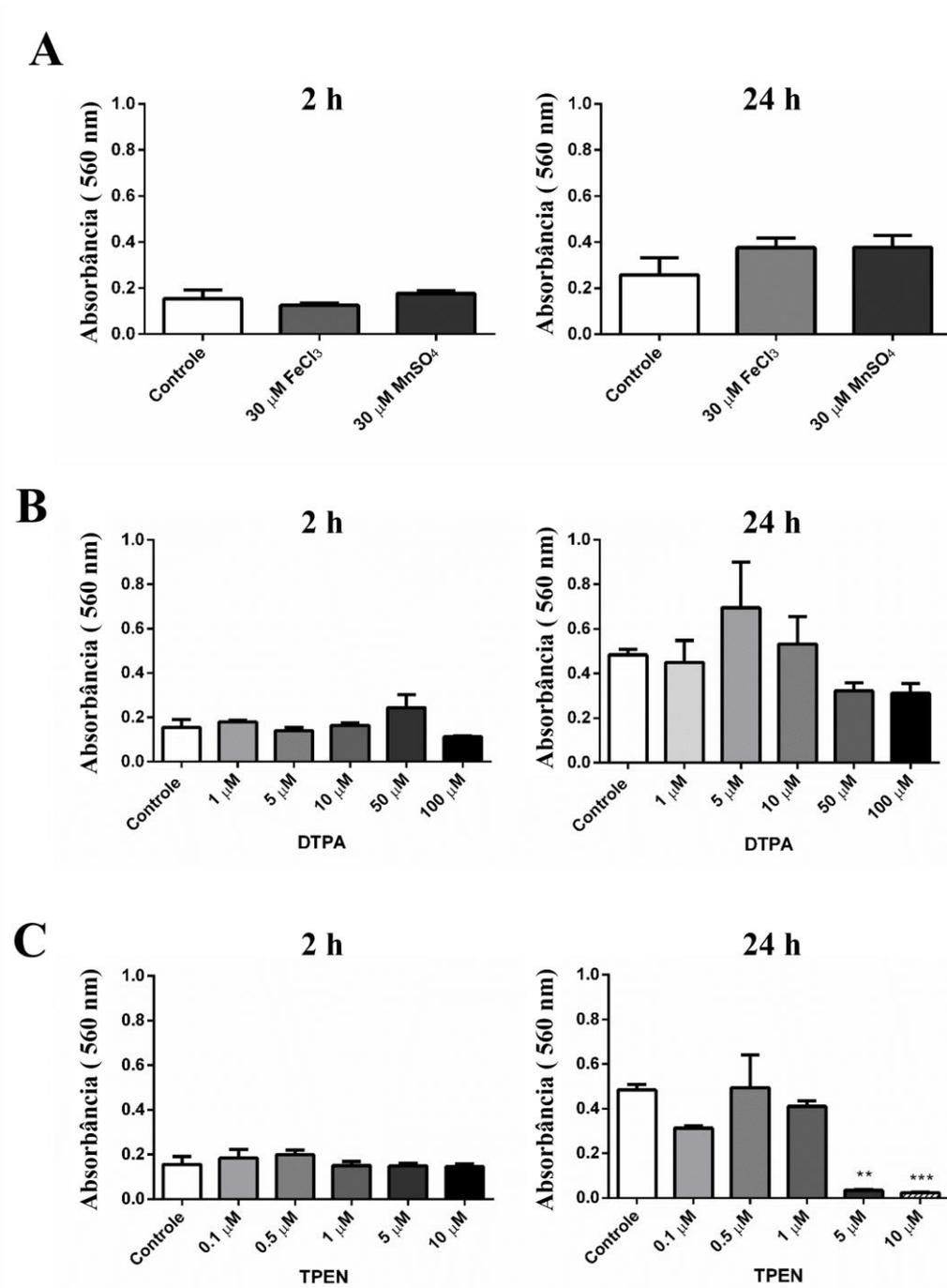


Figura 14. Ensaio de viabilidade celular da linhagem celular J77.A1 exposta a diferentes concentrações de metais e quelantes de Zn. Viabilidade das células foi analisada por ensaio de MTT, após incubação com (A) 30 μM de FeCl₃ ou MnSO₄ e concentrações crescentes de (B) quelante de Zn extracelular DTPA (1 μM a 100 μM) ou (C) quelante de Zn intra e extracelular TPEN (0,1 μM a 10 μM), por 2 h e 24 h. Asteriscos (*) demonstram diferença estatística significativa em relação à condição controle, analisado por *One Way ANOVA* com pós-teste de multicomparação de Dunnet.

Em contrapartida, a concentração de ferro e manganês de 30 μM não altera a viabilidade dos macrófagos. Como é descrito que a adição de Zn em culturas celulares ocasiona rápida assimilação do metal pelas células (Haase *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2008), o que também foi visto em nossos experimentos descritos no capítulo I, levantou-se a hipótese da possível influência da exposição das células a metais, como Zn, Fe e Mn, no perfil de expressão de transportadores de Zn dos macrófagos. Então, seguiu-se com a exposição dos macrófagos com metais a fim de esclarecer o perfil transcricional de transportadores de Zn, como *zip2*, *znt7* e *zip14*, na presença destes metais, além de Zn (Figura 15). O gene *znt7* mostrou aumento da transcrição na presença de 30 μM de ZnCl_2 , enquanto que, na adição de Zn conjuntamente com quelante extracelular DTPA ocorreu redução nos níveis de transcritos (Figura 15A). Já os outros metais não causaram alteração significativa nos níveis de transcritos deste gene em relação à condição controle, sugerindo que a regulação da sua expressão é principalmente realizada por Zn. Surpreendentemente, o gene *zip2* não mostrou diferença estatística nas condições avaliadas (Figura 15B). Enquanto que o gene *zip14* mostrou (i) aumento nos níveis de transcritos quando macrófagos foram expostos a ferro e (ii) redução nos níveis de transcritos quando na presença de Zn acrescido de DTPA (Figura 15C).

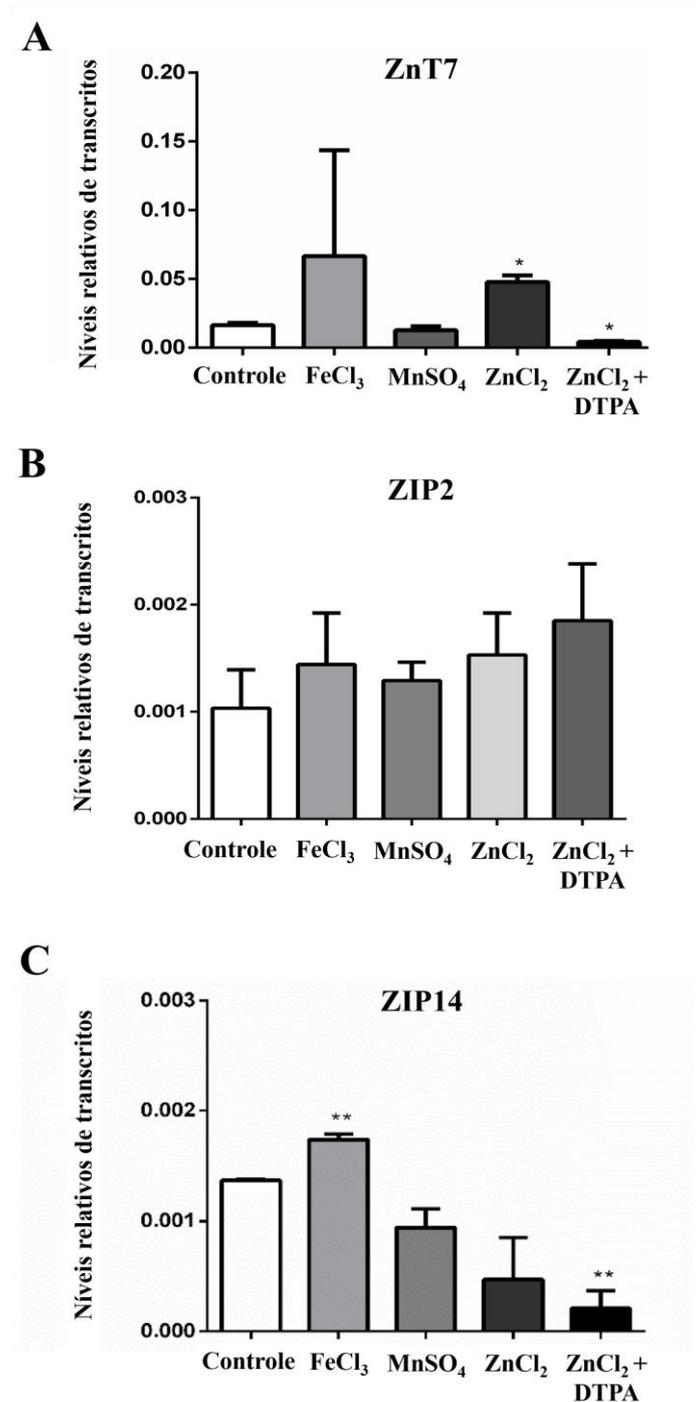


Figura 15. Genes codificantes de transportadores de Zn em macrófagos mostram diferentes perfis de regulação quando diferentes metais estão disponíveis. Linhagem J774.A1 foi incubada por 24 h com 30 μ M de FeCl₃, MnSO₄, ZnCl₂ ou 30 μ M de ZnCl₂ + 45 μ M de DTPA. A quantidade de mRNA dos genes (A) *znt7*, (B) *zip2*, (C) *zip14* foi avaliada em cada amostra e normalizada pelo gene GAPDH. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão de cada triplicata experimental e biológica. Asteriscos (*) representam diferença estatisticamente significativa em relação à condição controle, avaliada por One Way ANOVA com pós-teste de multicomparação de Dunnet.

De forma que o gene *znt7* mostrou modulação na sua expressão em resposta à presença de Zn e Zn + DTPA, o perfil transcricional de outros genes transportadores da família ZnT, os quais previamente também se mostraram papel no transporte de Zn durante resposta do macrófago a *C. neoformans*, foi analisado nas condições de privação do metal. Tal análise foi realizada através da adição do quelante intra e extracelular do metal, TPEN, na concentração máxima não tóxica definida de 1 μ M. Os níveis dos genes *znt2*, *znt3*, *znt7* e do gene codificantes da metalotioneína 1 (*mt-1*) de macrófagos foram determinados. Em 2 h, apenas o transportador ZnT2 mostrou diferença em relação à condição controle, com aumento significativo nos níveis de transcritos quando macrófagos foram expostos à privação de Zn (Figura 16).

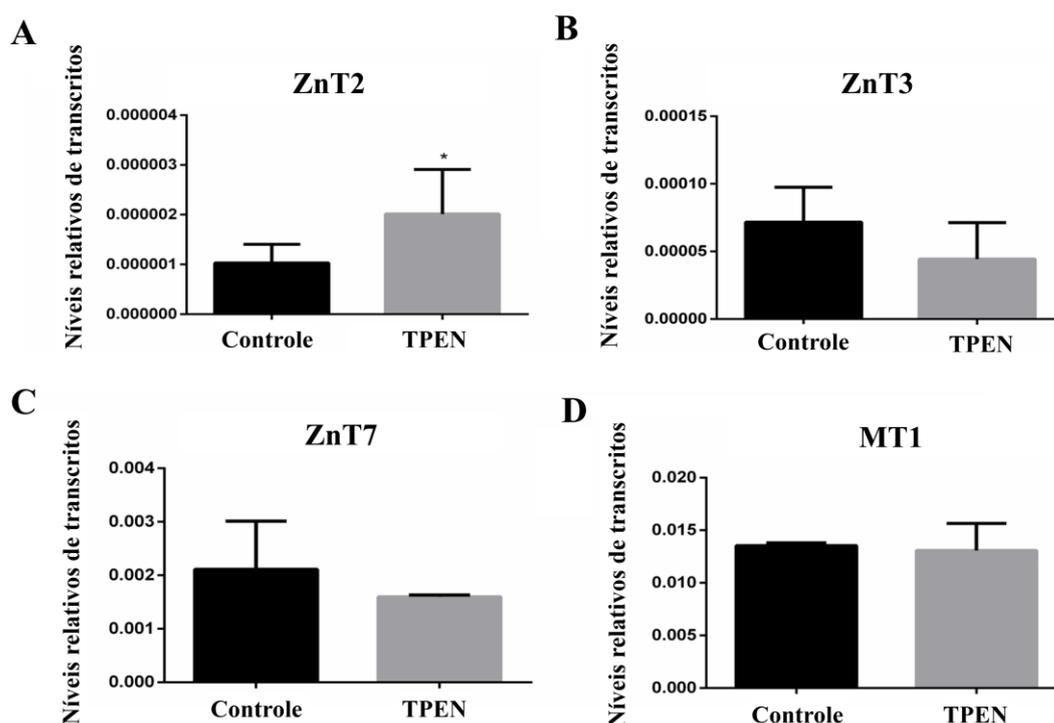


Figura 16. Transportador ZnT2 mostrou modulação na expressão após 2 h de exposição à privação de Zn. Linhagem J774.A1 foi incubada por 2 h com 1 μ M do quelante intra e extracelular de Zn, TPEN. A quantidade de mRNA dos genes (A) *znt2*, (B) *znt3*, (C) *znt7* e (D) *mt-1* foi avaliada em cada amostra e normalizada pelo gene GAPDH. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão de cada triplicata experimental e biológica. Asteriscos (*) representam diferença estatisticamente significativa em relação à condição controle, avaliada por teste *t* não pareado.

Em 24 h de exposição das células à condição de privação de Zn, houve redução significativa nos níveis de transcritos de todos os transportadores da família ZnT avaliados. ZnT2, ao contrário do perfil encontrado em 2 h de exposição, mostrou redução significativa nos níveis de seus transcritos (Figura 17A). Os genes *znt3* (Figura 17B) e *znt7* (Figura 17C) também mostraram redução significativa nos níveis de transcritos em 24 h de exposição a TPEN. Entretanto, o gene *mt-1* não apresentou diferença na expressão quando macrófagos expostos à privação de Zn, em ambos os tempos avaliados (Figuras 16 D e 17D).

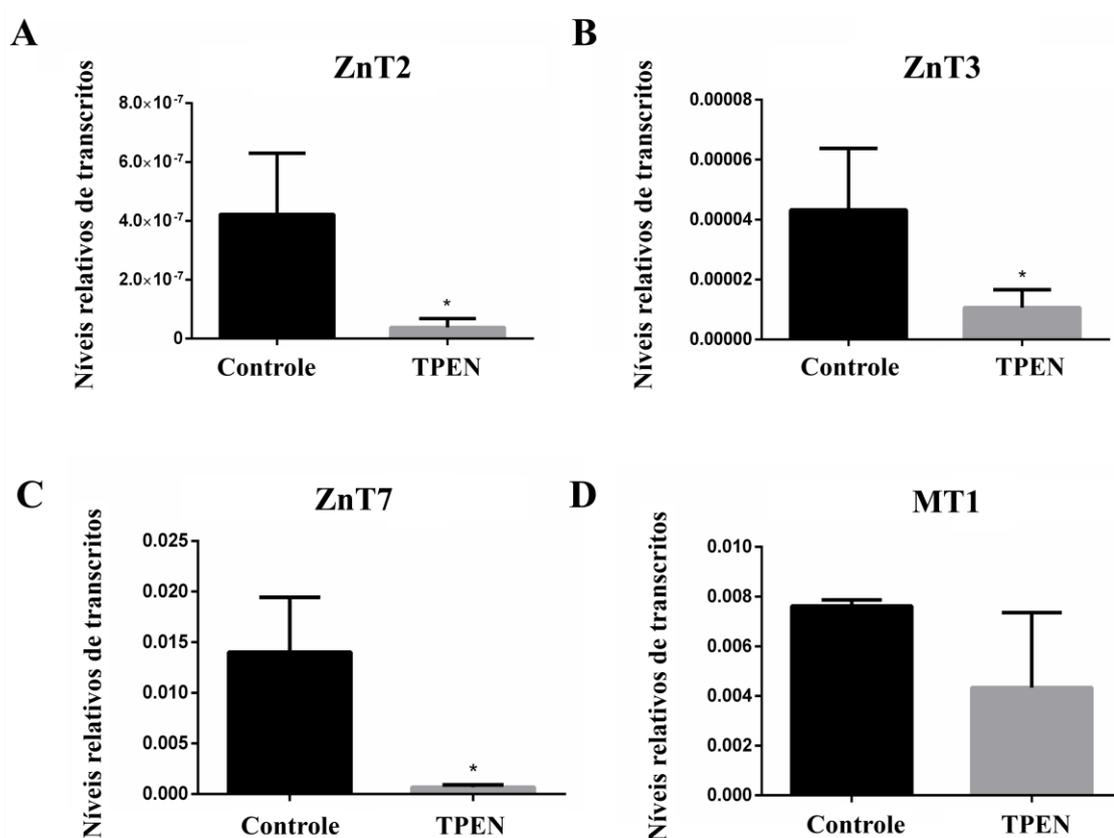


Figura 17. Transportadores de macrófagos da família ZnT mostram modulação de expressão durante exposição à privação de Zn, enquanto expressão de MT1 não é alterada. Linhagem J774.A1 foi incubada por 24 h com 1 μ M do quelante intra e extracelular de Zn, TPEN. A quantidade de mRNA dos genes (A) ZnT2, (B) ZnT3, (C)ZnT7 e (D) MT1 foi avaliada em cada amostra e normalizada pelo gene GAPDH. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão de cada triplicata experimental e biológica. Asteriscos (*) representam diferença estatisticamente significativa em relação à condição controle, avaliada por teste *t* não pareado.

Tendo em vista que (i) na presença ou privação de Zn, os níveis de expressão de alguns genes que codificam transportadores de Zn específicos são regulados; (ii) os níveis intracelulares de Zn, medidos por citometria com FluoZin-3AM em macrófagos não ativados ou ativados com IFN- γ e LPS mostraram diferença estatística (capítulo I); (iii) pode ocorrer modulação diferencial da homeostase de metais de acordo com o mecanismo de ativação dos macrófagos (Haase *et al.*, 2008; Korichneva *et al.*, 2002; Winters *et al.*, 2010), tornou-se importante avaliar se a forma de ativação da linhagem J774.A1 pode modular a homeostase de Zn e, conseqüentemente, alterar a resposta antifúngica contra *C. neoformans*. Para isto, foi realizado o ensaio de índice de proliferação intracelular (IPI) da levedura no interior do macrófago quando adicionado Zn extracelular. Tal análise foi realizada com as diferentes condições de ativação: (i) células não ativadas, (ii) ativadas com IFN- γ e LPS ou (iii) ativadas com PMA e expostas a *C. neoformans* e, posteriormente, acrescidas de 30 μ M de ZnCl₂.

De forma geral, foi visto que a adição de 3 μ M e 30 μ M de ZnCl₂ não causou aumento na proliferação do fungo quando no interior de macrófagos não ativados ou ativados com PMA, enquanto que, com macrófagos ativados com IFN- γ e LPS houve um aumento na proliferação intracelular da levedura quando Zn foi acrescido ao meio na concentração de 30 μ M (Figura 18).

Visto que a proliferação fúngica na presença de Zn não é similar entre as condições com diferentes processos de ativação, levantou-se a hipótese que a ativação poderia potencializar a resposta antifúngica de macrófagos à levedura e, conjuntamente, a imunidade nutricional. Para confirmar tal hipótese, foi avaliado o perfil transcricional de genes codificantes dos transportadores ZIP2 e ZnT7, os quais mostraram papel importante

na homeostase de Zn em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS quando expostos a *C. neoformans* vivo ou MC mas, desta em vez, em macrófagos ativados com PMA.

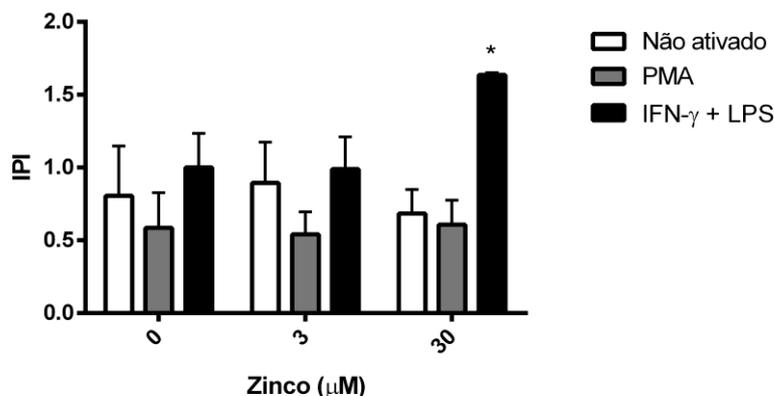


Figura 18. Aumento na disponibilidade de Zn não altera proliferação de *C. neoformans* em macrófagos não ativados ou ativados com PMA. Macrófagos J774.A1 não ativados e ativados com IFN- γ e LPS ou PMA foram incubados com *C. neoformans* por 2 h para que a fagocitose ocorresse. Após, as leveduras não internalizadas foram retiradas do sistema por etapas de lavagem com PBS. ZnCl₂ foi adicionado nas concentrações finais de 3 e 30 μ M, além da condição controle sem adição de Zn. As células foram incubadas por mais 24 h, a 37°C e 5% CO₂. Macrófagos foram lisados e foi realizada a determinação de UFC em YPD sólido para avaliação de IPI. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão de triplicatas técnicas e biológicas. Asteriscos (*) representam diferença estatisticamente significativa em relação à condição controle, avaliada por *One-Way ANOVA* com pós-teste de multicomparação de Dunnet.

Em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS foi visto que os genes *zip2* e *znt7* mostram redução nos níveis de transcritos quando expostos a *C. neoformans* vivo (Figura 19A), como descrito no capítulo I. Entretanto, quando as células são ativadas com PMA e, então, expostas a *C. neoformans* vivo ou morto por calor (MC), a resposta não é similar (Figura 19B). Não ocorre modulação significativa nos níveis de transcritos dos genes codificante destes transportadores, ao passo que a expressão está semelhante aos níveis da condição controle. Levantando a hipótese de que, ativação de macrófagos com PMA, de alguma forma, limita a imunidade nutricional imposta pelas células fagocíticas em resposta às leveduras. Isto foi confirmado com a análise por citometria de fluxo avaliando os níveis

intracelulares de Zn livre em macrófagos ativados com PMA e expostos a *C. neoformans*, os quais não mostraram redução significativa quando em comparação ao controle, sem exposição à levedura (Figura 19C) e se mostrou significativamente diferente da resposta de macrófagos ativados com IFN- γ e LPS (capítulo I).

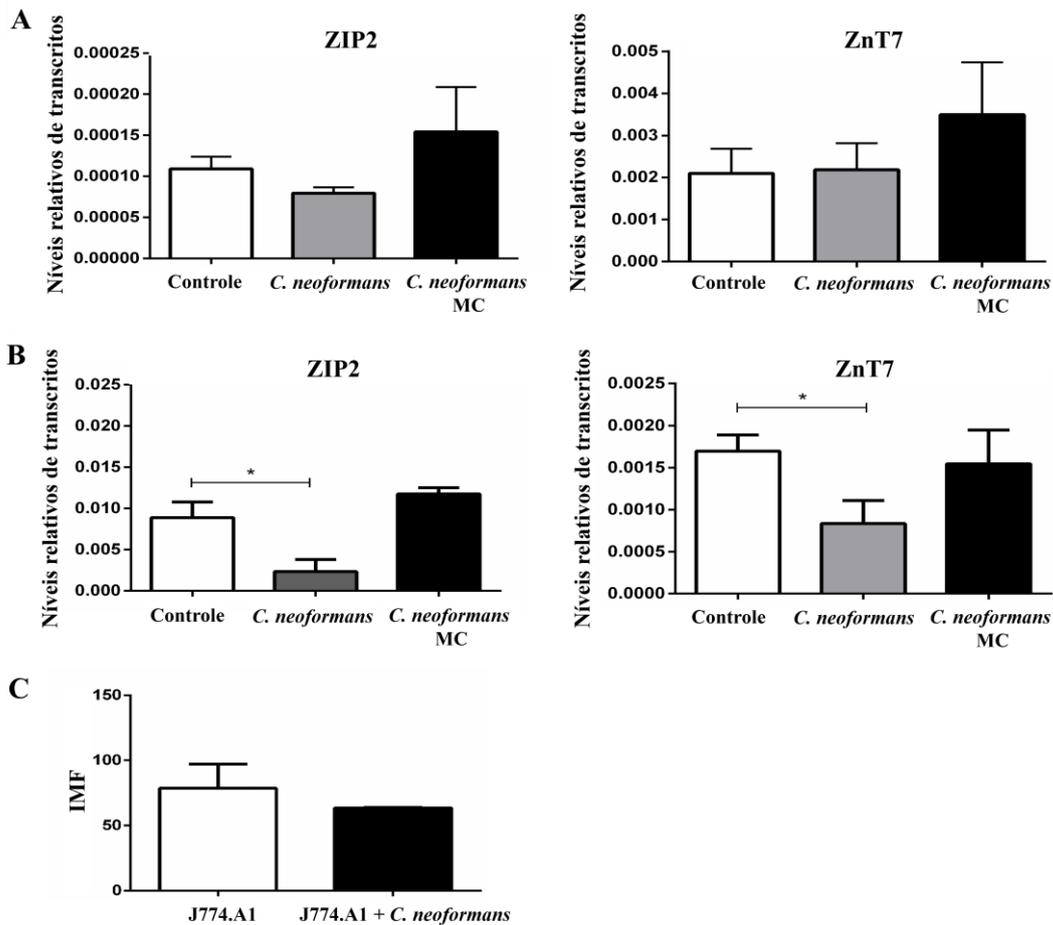


Figura 19. Macrófagos ativados com PMA não mostram alteração nos níveis de transcritos de transportadores de Zn bem como nos níveis intracelulares de Zn livre durante resposta a *C. neoformans* vivo. Linhagem J774.A1 ativada com IFN- γ e LPS (A) ou PMA (B) foi incubada por 24 h com *C. neoformans* vivo ou morto por calor (MC). A quantidade de mRNA respectivo a cada gene avaliado em cada amostra foi normalizada pelo gene GAPDH. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão de cada triplicata experimental e biológica. Asteriscos (*) representam diferença estatisticamente significativa em relação à condição controle, avaliada por *One Way ANOVA* com pós-teste de multicomparação de Dunnet. (C) Intensidade Média da Fluorescência (IMF) de FluoZin-3-AM de macrófagos ativados com PMA e expostos ou não a *C. neoformans* vivo, por 24 h. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão de cada triplicata experimental e biológica.

Considerando que a proliferação fúngica diferente em células ativadas com PMA em relação às aquelas ativadas com IFN- γ e LPS pode ser relacionada à produção diferencial de citocinas e, conseqüentemente favorecer maior fagocitose da levedura por macrófagos e posterior proliferação fúngica, comparamos os dados da taxa de fagocitose da levedura por macrófagos ativados com IFN- γ e LPS ou com PMA. Foi observada maior recuperação fúngica de macrófagos ativados com PMA, e não com IFN- γ e LPS (Figura 20), descartando tal hipótese inicial.

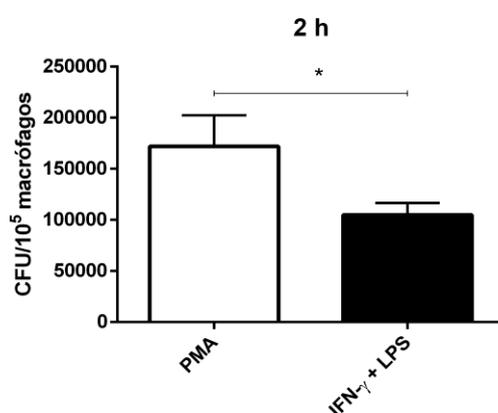


Figura 20. Ativação de macrófagos com PMA permite maior recuperação das leveduras em comparação à ativação com IFN- γ e LPS. Macrófagos ativados com PMA ou IFN- γ e LPS foram expostos a *C. neoformans* opsonizado por 2 h para análise de fagocitose. Após, foram retiradas as leveduras aderidas ou não internalizadas por lavagens com PBS. Os macrófagos foram lisados com água MilliQ gelada e as leveduras internalizadas foram recuperadas em placas de YPD sólido para análise de UFC. (*) Asteriscos demonstram diferença significativa estatisticamente através de análise por teste *t* não pareado.

Neste contexto, determinando que a maior proliferação fúngica em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS não foi devido à maior fagocitose inicial das leveduras pelos macrófagos, torna-se importante avaliar a influência de Zn extracelular na ativação da linhagem celular por PMA ou IFN- γ e LPS e seu papel na produção de citocinas que possam impedir o desenvolvimento da levedura.

3.2.4 DISCUSSÃO

Uma vez que zinco é importante para funções estruturais e regulatórias e vem sendo descrito seu papel na regulação da proliferação e morte celular, não é surpresa que a utilização de quelantes de Zn causem disfunções, alterações na viabilidade de células mamíferas e indução de apoptose (Hashemi *et al.*, 2007). Por isto, antes de avaliar a influência da presença ou ausência de Zn no perfil de expressão de transportadores de Zn nos macrófagos, foi avaliada a citotoxicidade de dois importantes quelantes do metal, DTPA e TPEN na linhagem J774.A1. DTPA se trata de um quelante impermeável às células enquanto TPEN é um quelante intra e extracelular. Desta forma, já foi demonstrado que TPEN possui maior capacidade de causar apoptose em células como hepatócitos enquanto DTPA, não (Nakatani *et al.*, 2000). Entretanto, de forma geral, ambos os quelantes podem causar alterações na viabilidade celular, como descrito para células cancerígenas (Carraway and Dobner, 2012; Hashemi *et al.*, 2007), células epiteliais da retina (Hyun *et al.*, 2001), neurônios (Zhang *et al.*, 2017), linfócitos T (Kolenko *et al.*, 2001). Somado a isso, o efeito citotóxico é dose e tempo dependentes, como foi visto em nossos ensaios com a linhagem de macrófagos. Concentrações inferiores a 10 μM de TPEN foram suficientes para causar efeito citotóxico na linhagem J774.A1 a longo prazo (24 h), o que não foi visto em 2 h. Inclusive, há estudos com uso de concentração de 16 μM de TPEN com monócitos THP-1 em que não houve alteração na viabilidade celular, porém, a exposição da célula mamífera ao quelante foi de apenas 4 h (Hamon *et al.*, 2014).

Quanto ao DTPA, em ambos os períodos de avaliação, nenhuma das concentrações se mostrou tóxica para os macrófagos. Vale ressaltar que mesmo concentrações muito mais altas de DTPA, em relação às concentrações utilizadas de TPEN, não causaram efeitos ou

disfunções na linhagem fagocítica, o que também foi observado previamente. Desta forma, conforme já descrito, TPEN é um agente quelante com efeito mais pronunciado que DTPA (Hashemi *et al.*, 2007).

Desta forma, a exposição a quelantes que causem privação de Zn ou ao metal em si, causa modulação nas células, inclusive nos níveis de transportadores de Zn nas células (Cao *et al.*, 2001; Cousins *et al.*, 2003). Levantamos a hipótese da influência de outros metais no perfil de transcrição de transportadores de Zn na linhagem J774.A1 e foi visto que o transportador ZnT7, descrito como um transportador vinculado ao transporte de Zn ao complexo de Golgi (Kirschke and Huang, 2003) se mostrou responsivo às condições de aumento ou reversão da concentração de Zn no ambiente extracelular durante cultivo da linhagem J774.A1. Tal perfil já foi demonstrado em monócitos THP1, com transcrição regulada positivamente por níveis adicionais de Zn e negativamente quando há privação do metal (Cousins *et al.*, 2003). Também foi visto na linhagem NRK, tipo de fibroblasto isolado de ratos, que, em condições de exposição a Zn, há um aumento na fluorescência referente a ZnT7 na região do Golgi (Kirschke and Huang, 2003), corroborando com a resposta encontrada na linhagem de macrófago murino J774.A1.

Quanto ao transportadores da família ZIP, ZIP2 e ZIP14, a influência de Zn foi menos evidente. Especificamente para ZIP2, nenhum metal utilizado foi capaz de causar alterações nos seus níveis de transcritos, nem mesmo Zn. De uma forma geral, sabe-se que, em resposta à adição de Zn, ocorre uma redução nos níveis de transcritos de ZIP2 em monócitos THP-1 (Cousins *et al.*, 2003), levantando duas questões relevantes para tal análise: a concentração do metal utilizada e o tempo de exposição. A concentração de Zn utilizada foi relativamente baixa e o tempo de análise foi maior, ambos quando comparados a outros estudos (Cao *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2014), de forma que tais

parâmetros podem ser dose, tempo e tipo celular dependentes, o que merece futuras investigações.

ZIP14 é um transportador de vários metais, não apenas Zn, transportando também ferro, manganês e cádmio. Não há relatos específicos da função deste transportador em macrófagos, mas sabe-se que em oócitos o transporte de ferro é maior em relação aos outros metais e que o transporte de zinco e ferro por ZIP14 responde aos mesmos parâmetros, como pH (7,5) e temperatura (15 – 30 °) (Pinilla-Tenas *et al.*, 2011). Além disso, ratos sob dieta com excesso de Fe, mostraram aumento nos níveis de ZIP14 em células hepáticas (Nam *et al.*, 2013). Tais dados podem auxiliar na compreensão da influência da adição de ferro na expressão de ZIP14 em macrófagos da linhagem J774.A1, nos quais ocorreu um aumento na transcrição quando o metal foi adicionado e, quando Zn conjuntamente com DTPA foram adicionados, houve redução. Este último resultado pode ser embasado em duas hipóteses. A primeira é de que DTPA, além de sequestrar Zn, sequestra Fe, como já é descrito na literatura (Polvi *et al.*, 2016), e a redução nos níveis de transcritos de ZIP14, quando macrófagos expostos a Zn acrescido de DTPA, pode ser resultado do sequestro de ferro no meio extracelular, e não somente de Zn em si. Já a segunda se baseia em evidências de hepatócitos que, quando em privação de Zn, ocorre aumento de ZIP14 (Franklin *et al.*, 2012; Liuzzi *et al.*, 2005). Desta forma, ZIP14 pode estar sendo majoritariamente regulado pelos níveis de Fe, mas não podemos excluir a possibilidade de que concentrações maiores que a utilizada de Zn possam exercer influência nos níveis de transcritos do transportador em macrófagos.

Além da influência de metais nos níveis de transcritos de transportadores de Zn, o perfil de transcrição dos mesmos também foi realizada na condição de privação do metal através da exposição a TPEN. Tal análise é demonstrada em diversos tipos celulares.

Monócitos THP-1 expostos a TPEN mostraram redução nos níveis de transcritos de transportadores ZnT1, ZnT5, ZnT6, ZnT7 e MT1, conjuntamente com aumento significativo de ZIP2. Quando expostos a Zn, o efeito foi revertido em todos os genes codificantes de tais transportadores de Zn (Cousins *et al.*, 2003). Em células INS-1E também expostas a TPEN, a mesma redução foi observada para ZnT3, ZnT5 e MT1 (Nygaard *et al.*, 2014). Para ZnT2, até hoje não há relatos da sua atividade em células fagocíticas, apenas em glândulas mamárias, células pancreáticas, intestinais e de Paneth (Bostanci *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2010; Liuzzi *et al.*, 2004; Podany *et al.*, 2016), entretanto, em células intestinais de ratos sob dieta com restrição de Zn, houve redução nos níveis de expressão de tal transportador (Liuzzi, Blanchard and Cousins, 2001).

Nossos dados corroboram com achados da literatura para os transportadores da família ZnT, em 24 h de exposição a TPEN. Entretanto, surpreendentemente, na linhagem J774.A1, não houve redução significativa nos níveis de MT1 quando macrófagos foram submetidos à privação de Zn, sendo controverso em relação ao que se encontra descrito na literatura. Para isto, levantam-se as hipóteses: (i) de que, neste caso, pode ocorrer uma modulação mediada pela outra isoforma da metalotioneína, a MT2, como é observada em *zebrafish* com a relação positiva de expressão de ZnT1 e MT2 (Zheng *et al.*, 2008) bem como (ii) que o efeito de privação ou excesso de Zn na regulação de diferentes genes relacionados à homeostase de Zn pode ser célula-específico (Devergnas *et al.*, 2004), o que ainda deve ser esclarecido na linhagem utilizada no presente estudo. Além disso, ZnT2 mostrou aumento significativo quando houve privação de Zn por 2 h e, apesar de não haver evidências sobre o papel de tal transportador na homeostase de Zn em macrófagos, sabe-se que: TPEN aumenta a morte celular por apoptose de forma induzida por citocinas, como TNF- α (Meerarani *et al.*, 2000) e que, durante a apoptose de células epiteliais mamárias,

tal citocina aumenta a expressão de ZnT2, de forma que tal transportador se desloca para o lisossomo e ocasiona um aumento de Zn neste compartimento (Hennigar and Kelleher, 2015). Desta forma, levanta-se a hipótese que ocorreu um aumento nos níveis de transcritos de ZnT2, quando macrófagos foram expostos à privação de Zn, como uma resposta inicial a um agente potencial de apoptose, o quelante TPEN. Desta forma, o papel de exportadores de Zn se confirma para os transportadores da família ZnT que, maior atividade e expressão é visível quando há aumento na concentração do metal, o qual poderá ser exportado da célula para o ambiente extracelular ou para o interior de vesículas e outros compartimentos intracelulares (Hojyo and Fukada, 2016).

Com base nisto, a modulação de Zn é responsiva a diferentes estímulos, como a presença ou ausência do metal. Entretanto, é descrita a influência de diferentes moléculas ativadoras de células imune na homeostase de metais (Haase *et al.*, 2008; Korichneva *et al.*, 2002; Winters *et al.*, 2010). Somado a isso, vimos no capítulo I que a ativação da linhagem J774.A1 causou aumento nos níveis intracelulares de Zn livre quando em comparação com macrófagos não ativados. Neste sentido, evidenciamos que a resposta antifúngica e de privação de Zn contra *C. neoformans* foi dependente da ativação celular. Neste aspecto, vem sendo demonstrado a influência do estímulo utilizado como ativador em diversas linhagens celulares nos níveis intracelulares de Zn. Haase e colaboradores (2008) mostraram que a ativação com PMA de células Jurkat, linhagem imortalizada de linfócito T humano, ocasiona aumento nos níveis intracelulares de Zn (Haase *et al.*, 2008). O mesmo foi demonstrado em fibroblastos NIH 3T3 (Hoyos *et al.*, 2002; Korichneva *et al.*, 2002). Como citado anteriormente, PMA é capaz de ativar as células através da atividade da proteína PKC (Kazanietz *et al.*, 1994), a qual, por sua vez, pode ser ativada também por mecanismos redox que convertem-na para forma cataliticamente ativa (Gopalakrishna and

Anderson, 1989; Knapp and Klann, 2000; Konishi *et al.*, 1997). PMA pode causar alterações nas concentrações intracelulares de Zn, pois causa liberação de Zn presente na proteína PKC α e, ao mesmo tempo, translocação da proteína para a membrana plasmática. PKC possui domínios de cisteína nos quais Zn está ligado, quando a proteína está inativa e, com a ligação de PMA nestes domínios, ocorre a liberação de Zn. Desta forma, a proteína PKC α é uma fonte de Zn livre intracelular (Korichneva *et al.*, 2002). PMA também causa liberação de cálcio, além de Zn (Haase *et al.*, 2008) e comporta-se como um ativador da via NADPH oxidase, para gerar estresse oxidativo em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (Gieche *et al.*, 2001), porém, PMA não causou efeito na produção de óxido nítrico em RAW 264.7 e causou ativação de NF-kB como esperado (Jones *et al.*, 2007).

A ativação de RAW 264.7 com LPS, ao contrário da ativação com PMA, induz a produção de óxido nítrico e induz a ativação de NF-kB (Jones *et al.*, 2007) uma vez que, LPS é um componente bacteriano que induz diversas respostas biológicas em células mamíferas e inicia o processo de inflamação (Held *et al.*, 1999). Surpreendentemente, quando PMA é adicionado conjuntamente com LPS, há redução na duração da ativação de NF-kB, provavelmente pela redução da produção de óxido nítrico pelo PMA (Jones *et al.*, 2007). Quanto à homeostase de Zn, foi visto em monócitos, granulócitos e linhagens celulares RAW 264.7 ou monocítica humana Mono Mac1, um aumento nos níveis intracelulares de Zn quando estimulados com LPS, sugerido como necessário para produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (Haase *et al.*, 2008). Além disso, tal aumento é correspondente ao aumento na expressão do transportador ZIP8 tanto em monócitos quanto em macrófagos (Begum *et al.*, 2002; Pyle *et al.*, 2017).

Neste contexto, pode-se levantar o questionamento sobre a proporção de aumento de Zn intracelular nos macrófagos causado pelos diferentes agentes ativadores, LPS + IFN-

γ ou PMA, liberação de outros metais (como cálcio) e tempo de liberação, os quais poderiam ofuscar a influência da adição de Zn extracelular na proliferação da levedura (figura 18). Além disso, também se torna relevante avaliar as rotas de assimilação de Zn extracelular por outras vias de sinalização importantes, como a produção de citocinas, que podem influenciar a resposta antifúngica do macrófago contra *C. neoformans*. É descrito que IFN- γ tem um papel sinérgico ao de LPS, visto uma conexão entre as vias de sinalização JAK2 e NF-kB (Digicaylioglu and Lipton, 2001). IFN- γ é uma citocina chave na resposta do hospedeiro contra micro-organismos intracelulares (Kaufmann, 1993) e aumenta a capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais (Cross *et al.*, 1995).

A adição de LPS e IFN- γ aumentam a ativação de NF-kB e a produção de óxido nítrico (Gao *et al.*, 1997; Lorsbach, Murphy, Lowenstein, Snyder, *et al.*, 1993), tornando os macrófagos mais responsivos (Held *et al.*, 1999). De uma forma complementar LPS aumenta ligação de STAT1 ativado por IFN- γ ao DNA, bem como também é demonstrado que pode ativar STAT3, o qual se liga a receptores de IFN- γ (Held *et al.*, 1999; Pfeffer *et al.*, 1997). Somado a esta rede, citocinas induzidas por LPS, como IL-1, IL-6 e TNF- α também podem aumentar a resposta de IFN- γ , o que pode indicar que as citocinas podem potencializar a resposta do macrófago. Tais dados sugerem a existência de um *loop* autócrino envolvendo citocinas que pode contribuir para o efeito primário de IFN- γ na ativação de NF-kB regulada por LPS (Held *et al.*, 1999). Quanto ao PMA, não há relatos sobre a sua influência na produção de citocinas em macrófagos. Entretanto, este éster é capaz de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias em linfócitos, porém, quando adicionado conjuntamente com ionóforos (Barr *et al.*, 2007), enquanto apenas PMA não causou aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias em linfócitos (Ebtekar and Khansari, 1996).

Neste contexto, determinamos a influência da ativação na fagocitose inicial das leveduras pelos macrófagos e comprovamos que a maior proliferação fúngica em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS não foi devido à maior fagocitose inicial das leveduras pelos macrófagos. Com isto, tornou-se importante avaliar a influência de Zn extracelular na ativação da linhagem celular por PMA ou IFN- γ e LPS e seu papel na produção de citocinas que possam impedir o desenvolvimento da levedura. Zinco influencia a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6 e os efeitos são contraditórios e dependentes da concentração do metal utilizada. Alguns estudos mostram que tratamento com Zn inibe a produção destas citocinas (Bao *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004) enquanto outros relatam que Zn estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e que pode atuar sinergicamente com LPS, se adicionados conjuntamente (Driessen *et al.*, 1994; Wellinghausen, Driessen and Rink, 1996). Em monócitos THP-1, por exemplo, mais de 1.000 genes envolvidos em processos de transdução de sinal, função imune e produção de citocinas são regulados por Zn (Cousins *et al.*, 2003). Zn parece ativar diretamente monócitos, enquanto que, em outras células, como células T, o efeito do metal é induzido através de citocinas derivadas de monócitos (Wellinghausen, Martin and Rink, 1997). Desta forma, em monócitos, as flutuações nas concentrações de Zn já são descritas como importantes em funções regulatórias e transdução de sinal (Haase and Rink, 2007).

Como visto no capítulo I, a adição de Zn não causou alterações na produção de TNF- α , enquanto que, IL-6 mostrou leve redução em macrófagos ativados com IFN- γ e LPS, o que pode indicar um papel de Zn na regulação da produção de tal citocina nesta linhagem de macrófago murino. Já foi demonstrado que, em células de câncer de próstata, Zn inibe a ativação de NF-kB, auxiliando na terapia anti-câncer (Uzzo *et al.*, 2002). Neste

contexto, a via de NF- κ B atua a partir de diversos ativadores e inibidores, sendo que A20 é um potencial inibidor desta via, o qual trata-se de um fator dedo de zinco transativador que se liga ao DNA produzindo a proteína A20, que inibe a ativação de NF- κ B induzida por TNF- α (Krikos, Laherty and Dixit, 1992; Song, Rothe and Goeddel, 1996). Prasad e colaboradores (2004), demonstraram que Zn aumenta a produção do inibidor A20 em células HL-60, uma linhagem de leucemia mielóide diferenciada em monócito, ativadas com PMA ou LPS, inibindo, então, NF- κ B e as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (Prasad *et al.*, 2004). O que corrobora com dados de monócitos THP-1 que, ativados com PMA mas em condição de privação de Zn, mostram aumento das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 (Bao *et al.*, 2003). Já em macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS, foi demonstrada a inativação de NF- κ B através da inibição da quinase I de κ B (IKK, do inglês, *I κ B kinase*) por Zn (Jeon, Jeong and Jue, 2000). Entretanto, já foi relatada que há interação direta de LPS com Zn, antes mesmo da ligação de LPS ao receptor em monócitos, de forma que aumenta a fluidez de LPS e a produção de citocinas em células mononucleares humanas do sangue periférico (PBMCs, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*). Também é descrito que LPS aumenta a assimilação de ferro em células endoteliais HAEC (Li and Frei, 2009), levantando o questionamento se também pode aumentar assimilação de Zn, uma vez que a influência de Zn em LPS já existe. Além disso, foi demonstrado que exposição a Zn aumenta a produção de IFN- γ em linfócitos T (Aydemir *et al.*, 2009).

Com base nisto, levanta-se a hipótese de que a ativação celular auxilia na resposta antifúngica de macrófagos e, conseqüentemente, modula a homeostase de Zn no interior das células. Desta forma, pode ocorrer o bloqueio da via de NF- κ B por Zn em macrófagos ativados com PMA de tal forma que a resposta antifúngica seja alterada e se torne similar à de macrófagos não ativados, apesar de um aumento no nível intracelular de Zn. Enquanto

que, com IFN- γ e LPS, ocorre uma ativação overnight prévia, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, que, apesar da adição de Zn, geram um *loop* de produção autócrina, favorecendo a atividade antifúngica do macrófago contra a levedura e, ao mesmo tempo, uma resposta de imunidade nutricional mais evidente.

4. DISCUSSÃO GERAL

Zinco é o segundo metal mais abundante no corpo humano e, desde 1960, vem sendo descrito seu papel indispensável em diversos processos celulares como proliferação celular, diferenciação e sobrevivência em humanos (Prasad, 2012). Quando há deficiência de tal metal pode ocorrer alteração na homeostase e funções dos sistemas imune inato e adaptativo. Zn atua como cofator de proteínas e afeta a estrutura e funções catalíticas de enzimas e fatores de transcrição (Hojyo and Fukada, 2016). Entretanto, este metal não é apenas uma molécula estática, fazendo parte da estrutura de proteínas, mas também um componente de transdução de sinal (Haase *et al.*, 2008).

Para tais funções, a homeostase de Zn é regulada por transportadores de Zn (ZIPs e ZnTs) e metalotioneínas que são essenciais na manutenção da homeostase do metal, desde a sua aquisição, transporte e distribuição (Hara *et al.*, 2017). Por isto, é descrito o papel fisiológico destes transportadores em que mutações em camundongos e humanos em determinados genes codificadores de transportadores de Zn, podem causar severas doenças ou alterações morfológicas e no sistema imune (Hojyo and Fukada, 2016). A expressão destes transportadores de Zn responde a diversos estímulos, como foi visto que TPEN modula negativamente a expressão dos transportadores ZnT em macrófago da linhagem J774.A1 utilizada neste trabalho (capítulo II), bem como positivamente a expressão de alguns transportadores ZIP, como ZIP2, em linhagens monocíticas e macrófagos (Cao *et al.*, 2001; Cousins *et al.*, 2003; Hamon *et al.*, 2014). Ao passo que também podem ser regulados por outros metais, como ZIP14, que pode ter sua expressão modulada inclusive pelos níveis de ferro (capítulo II) em macrófagos J774.A1, corroborando com dados da literatura de hepatócitos e oócitos (Pinilla-Tenas *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Somado a

isso, a homeostase de Zn também pode ser modulada, através da expressão de transportadores de Zn, em resposta à presença de patógenos intracelulares obrigatórios ou facultativos, como mecanismo de imunidade nutricional (Hood and Skaar, 2012).

Conforme demonstrado no capítulo I, macrófagos da linhagem J774.A1 mostram redução nos níveis intracelulares de Zn livre quando expostos à levedura *C. neoformans* viva e tal redução pode ser atribuída à redução nos níveis de transcritos de ZIP2 e ZIP14. O mecanismo de privação de Zn foi descrito para macrófagos peritoniais e de medula infectados com *H. capsulatum* (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013; Winters *et al.*, 2010). Além de *H. capsulatum*, *C. glabrata* e *C. neoformans* são expostos a longos períodos no interior de células imunes, principalmente macrófagos (Crawford and Wilson, 2015) e são submetidos à privação de metais. A privação de Zn impede o desenvolvimento de diversos patógenos e fungos como *C. gattii* e *Paracoccidioides brasiliensis* produzem espécies reativas de oxigênio e passam por condições de estresse (Parente *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2015). Assim, nosso estudo também avaliou o papel de adição de Zn na capacidade de *C. neoformans* se replicar no interior de macrófagos. Foi visto que a capacidade de proliferação do fungo aumentou, enquanto que a taxa de fagocitose por parte do macrófago não foi alterada. Conjuntamente, as leveduras recuperadas da interação com macrófagos com suplementação de Zn demonstraram maiores níveis intracelulares de Zn, demonstrando que a suplementação com Zn aumentou a disponibilidade do metal para a levedura no interior do macrófago, ocasionando menor população fúngica no ambiente extracelular da interação com macrófagos. Tais dados demonstraram que a assimilação de Zn pelos macrófagos, como já descrito (Haase *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2008), conseqüentemente gera maior quantidade de Zn disponível para a levedura quando presente no ambiente intracelular do fagócito, sugerindo a privação de metal como um

adicional mecanismo de imunidade nutricional de macrófagos contra a levedura *C. neoformans*.

Com isto, propomos que macrófagos J774.A1 utilizem a privação de Zn como mecanismo de defesa adicional contra a levedura, em que, a redução de expressão do transportador ZIP2, causa menor importação de Zn para o interior da célula, uma vez que foi demonstrado que, em queratinócitos, quando ZIP2 é silenciado, os níveis intracelulares de Zn sofrem redução (Inoue *et al.*, 2014). No estudo de Subramanian Vignesh e colaboradores (2013), que descreveu a privação de Zn como resposta de macrófagos para impedir o desenvolvimento de *H. capsulatum*, elucidou que esta resposta também ocorre através de vários passos na célula mamífera hospedeira, através da expressão de transportadores de Zn e metalotioneínas (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013). Vale ressaltar que a relação ZnTs:ZIPs foi diferente durante resposta de diferentes tipos de macrófagos a *H. capsulatum* e a *C. neoformans*, mas ZIP2 e ZnT7 se mostraram envolvidos na resposta contra os fungos em ambas as células (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013). Desta forma, a resposta de imunidade nutricional pode ser célula-específico envolvendo transportadores específicos.

Além da modulação de Zn durante resposta contra diversos patógenos, conjuntamente com a atividade de transportadores de Zn, o metal se comporta como molécula mensageira, de forma similar à de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina, do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*) e cálcio (Fukada, Hojyo and Bin, 2014). Por exemplo, Zn atua como neurotransmissor, de forma que neurônios respondem a estímulos excitatórios pela liberação de Zn vesicular no meio circundante, o qual é assimilado por neurônios pós-sinápticos adjacentes e células da glia através de canais permeáveis, atuando, desta forma, como neurotransmissor (Colvin *et al.*, 2003; Hojyo and Fukada,

2016; Li *et al.*, 2001), além de possuir funções similares a de hormônios, fatores de crescimento e citocinas (Beyersmann and Haase, 2001). A sinalização por Zn, por sua vez, é dependente dos transportadores do metal. Em relação a isso, é descrito que Zn transportado por ZIP6 controla embriogênese durante transição epitelial mesenquimal em *zebrafish* (Yamashita *et al.*, 2004). Já a via ZIP8-NF-kB regula negativamente NF-kB por redução da atividade da quinase I κ B em respostas pró-inflamatórias (Liu *et al.*, 2013). Neste contexto, transportadores de Zn formam vias de sinalização para gerar eventos de sinalização distintos (Hojyo and Fukada, 2016).

A homeostase de Zn também pode ser influenciada por estímulos como LPS e PMA, importantes agentes ativadores de células *in vitro*. Como descrito ao longo deste trabalho, pode-se perceber que há aumento nos níveis intracelulares de Zn quando macrófagos são estimulados com PMA ou IFN- γ e LPS. É conhecido que, tanto LPS quanto PMA, podem causar maior liberação do metal no interior da célula (Haase *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2007) e, com isso, pode ocorrer alteração na liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1, TNF- α), visto que ambas as vias de ativação refletem na ativação de NF-kB e citocinas correspondentes (Baeuerle and Henkel, 1994; Holden *et al.*, 2008). Com isso, a homeostase de Zn pode ser alterada pelo perfil de citocinas originado pelo processo de ativação e, conseqüentemente, pode alterar a resposta imune contra patógenos, através da modulação de Zn. Tal evento já foi descrito para macrófagos expostos a *H. capsulatum* e previamente ativados com IL-4 (Winters *et al.*, 2010). Este estudo, originalmente caracterizou a resposta de privação de Zn em macrófagos ativados com GM-CSF e, então expostos a *H. capsulatum*. Entretanto, quando ativados com a citocina anti-inflamatória IL-4, a resposta foi contrária: IL-4 reverteu as propriedades inibidoras do desenvolvimento do fungo no

interior do macrófago e aumentou os níveis de Zn nas células fagocíticas e no fungo (Winters *et al.*, 2010).

Tal evidência, conjuntamente com nossos dados de alteração na (i) resposta de imunidade nutricional e (ii) perfil transcricional de transportadores de Zn em macrófagos ativado com PMA e exposto a *C. neoformans*, em comparação aos ativado com IFN- γ e LPS, abre uma vasta gama de possibilidades a serem investigadas. Apesar das evidências e hipóteses iniciais, pode-se perceber que a modulação de Zn ocorre em diversos níveis, em resposta a diversos estímulos internos ou externos nas células de forma que, as vias de ativação – liberação de citocinas – níveis intracelulares de Zn – níveis de transcritos de transportadores de Zn e metalotioneínas estão interconectadas, tornando o Zn uma molécula mensageira em diversos processos biológicos, sendo abordada como uma molécula permissiva para determinados processos por alguns estudos (Hojyo and Fukada, 2016; Yamasaki *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou que macrófagos modulam adaptações frente à exposição a diferentes estímulos, os quais, por sua vez, causam alterações dinâmicas na homeostase de Zn. Foi demonstrado que *C. neoformans* está, possivelmente, sob condição de privação de Zn enquanto no interior de macrófagos e a redução nos níveis do metal ocorre conjuntamente com alterações nos níveis de transcritos de transportadores de Zn e metalotioneínas. Entretanto, além da exposição à levedura, a ativação celular também se mostrou importante fator modulador da concentração intracelular de Zn em macrófagos, uma vez que a resposta de imunidade nutricional, através de Zn à levedura, foi mais evidente sob ativação com IFN- γ e LPS do que com PMA e que ambos os ativadores mostraram aumentar as concentrações intracelulares de Zn. Tais dados, levantaram diversos questionamentos sobre os agentes ativadores nos macrófagos e produção de citocinas, através da modulação de NF-kB e, desta forma, possível papel da ativação celular na resposta antifúngica e nutricional contra *C. neoformans*.

6. PERSPECTIVAS

O estudo levantou questionamentos importantes sobre a função de Zn e, conjuntamente, da ativação celular com PMA e IFN- γ e LPS na resposta de imunidade nutricional contra *C. neoformans*. Assim, se mostra necessário avaliar as hipóteses abordadas através de diversos experimentos.

Quanto à imunidade nutricional, é relevante realizar a avaliação do fluxo de Zn no interior do macrófago durante a infecção por *C. neoformans*, uma vez que a concentração total do Zn não se mostrou alterada durante a infecção, apenas a porção livre do metal teve redução. Tal análise por microscopia *time-lapse* com sondas fluorescentes para Zn, como FluoZin-3-AM, pode elucidar um pouco mais o processo de privação do metal. Ainda neste aspecto, o papel dos transportadores ZIP2 e ZnT7 durante resposta a *C. neoformans* merece maior investigação, através de silenciamento de cada um dos transportadores por transfecção com siRNAs na linhagem de macrófagos RAW 264.7. Tal linhagem seria escolhida para futuras análises uma vez que (i) a linhagem J774.A1 se mostrou altamente suscetível ao processo de transfecção realizado previamente neste estudo (dados não mostrados), e (ii) aparentemente, em ensaios prévios do nosso grupo, a resposta de RAW 264.7 é similar à de J774.A1 em relação aos níveis de transcritos dos transportadores de Zn em resposta a *C. neoformans*, sugerindo uma modulação de Zn conservada entre as linhagens. Todo o perfil da modulação da homeostase de Zn nesta linhagem está sendo realizada atualmente pelo grupo. Desta forma, com o silenciamento de ZIP2 e ou ZnT7, podemos analisar a atividade antifúngica do macrófago e a alteração resultante na homeostase de Zn durante exposição a *C. neoformans*, através de (i) ensaios de citometria de fluxo com FluoZin-3-AM para determinação dos níveis intracelulares de Zn livre, (ii)

análise de índice de proliferação intracelular da levedura em macrófagos silenciados, (iii) análises por microscopia *time-lapse* de macrófagos WT e silenciados para transportadores de Zn com adição de sondas fluorescentes para determinação da localização do metal durante infecção por *C. neoformans*. Somado a isso, é relevante realizar o perfil da modulação da homeostase de Zn em macrófagos infectados pela outra linhagem patogênica do complexo *Cryptococcus* sp., *C. gattii* R265 e contra a linhagem, construída pelo nosso grupo, mutante para transportador de Zn ZIP1 (*Azip1*).

Quanto à influência do processo de ativação celular na homeostase de Zn e imunidade nutricional, diversos aspectos necessitam ser testados experimentalmente. O primeiro seria a avaliação da homeostase de Zn em macrófagos ativado com citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, e infectados pelas leveduras como indício de vínculo com a produção de citocinas na imunidade nutricional, através das mesmas análises realizadas no presente trabalho. A partir disto, a determinação do perfil de citocinas produzidas por macrófagos não ativado e ativado com PMA em resposta a *C. neoformans* e *C. gattii* e a avaliação da atividade de Zn na produção de tais citocinas também é necessária, a fim de determinar uma possível relação de ativação ou inibição por Zn do sistema NF-kB destas linhagens. Caso ocorra regulação aparente, a via de NF-kB poderia ser analisada durante a resposta de imunidade nutricional contra as leveduras em macrófagos silenciados para transportadores de Zn. Desta forma, pode ser analisada a resposta de imunidade nutricional em si, conjuntamente com a atividade de Zn e seu papel como molécula secundária em vias de sinalização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUITI, A. *et al.* Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in gram-negative pneumonia derived sepsis. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 10, p. e1002987, 25 out. 2012.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Current Biology*, v. 16, n. 21, p. 2161-2165, 7 nov. 2006.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunology*, v. 8, p. 16, 16 ago. 2007.
- ANDREINI, C. *et al.* Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research*, v. 5, n. 11, p. 3173-3178, nov. 2006.
- ANDREINI, C. *et al.* Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 13, n. 8, p. 1205-1218, nov. 2008.
- ANDREU, N. *et al.* Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific reports*, v. 7, p. 42225, 8 fev. 2017.
- ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, n. 1, p. 95-104, 1 jan. 2000.
- AYDEMIR, T. B. *et al.* Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN- γ expression in activated human T cells. *Journal of leukocyte biology*, 28 abr. 2009.
- BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annual review of immunology*, 1994.
- BAO, B. *et al.* Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 285, n. 5, p. E1095-102, nov. 2003.
- BARNETT, J. P. *et al.* Allosteric modulation of zinc speciation by fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, n. 12, p. 5456-5464, dez. 2013.
- BARR, T. A. *et al.* TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European Journal of Immunology*, v. 37, n. 11, p. 3040-3053, nov. 2007.
- BEGUM, N. A. *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics*, v. 80, n. 6, p. 630-645, dez. 2002.
- BEYERSMANN, D.; HAASE, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, v. 14, n. 3-4, p. 331-341, dez. 2001.
- BLINDAUER, C. A. Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. *Chemical Communications*, v. 51, n. 22, p. 4544-4563, 18 mar. 2015.
- BOEKHOUT, T. *et al.* Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *International journal of systematic bacteriology*, v. 47, n. 2, p. 432-442, abr. 1997.

- BOSTANCI, Z. *et al.* Prolactin receptor attenuation induces zinc pool redistribution through ZnT2 and decreases invasion in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, v. 321, n. 2, p. 190-200, 15 fev. 2014.
- 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. 248-259, 15 set. 2011.
- BROUN, E. R. *et al.* Excessive zinc ingestion. A reversible cause of sideroblastic anemia and bone marrow depression. *The Journal of the American Medical Association*, v. 264, n. 11, p. 1441-1443, 19 set. 1990.
- BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.
- BYRNES, E. J. *et al.* *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 11, p. 895-907, out. 2011.
- BYRNES, E. J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biology Reports*, v. 1, 17 ago. 2009.
- CAO, J. *et al.* Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, n. 4, p. 559-566, out. 2001.
- CARRAWAY, R. E.; DOBNER, P. R. Zinc pyrithione induces ERK- and PKC-dependent necrosis distinct from TPEN-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1823, n. 2, p. 544-557, fev. 2012.
- CASADEVALL, A. *et al.* Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 6, p. 1437-1446, jun. 1998.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 354-358, ago. 2000.
- CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Iron in infection and immunity. *Cell Host & Microbe*, v. 13, n. 5, p. 509-519, 15 maio 2013.
- CHARLIER, C. *et al.* Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *The American Journal of Pathology*, v. 166, n. 2, p. 421-432, fev. 2005.
- CHARLIER, C. *et al.* Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 1, p. 120-127, jan. 2009.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 20, n. 3, p. 507-44, v, set. 2006.
- CHEN, S. C.-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 4, p. 980-1024, out. 2014.

CHINGWARU, W. *et al.* Mammalian cell cultures as models for *Mycobacterium tuberculosis*-human immunodeficiency virus (HIV) interaction studies: A review. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 9, n. 9, p. 832-838, set. 2016.

CHRÉTIEN, F. *et al.* Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 4, p. 522-530, 15 ago. 2002.

CITIULO, F. *et al.* *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 6, p. e1002777, 28 jun. 2012.

CLAYTON, P. T. Inherited disorders of transition metal metabolism: an update. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16 mar. 2017.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, v. 87, p. 1-41, 2014.

COLVIN, R. A. *et al.* Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *European Journal of Pharmacology*, v. 479, n. 1-3, p. 171-185, 31 out. 2003.

CONKLIN, D. S. *et al.* COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 12, n. 9, p. 3678-3688, set. 1992.

COPENHAGEN CONSENSUS CENTER (CCC). Micronutrient Supplements: Vitamin A and Zinc, 2012. Disponível em: < <http://www.copenhagenconsensus.com/guide-giving/micronutrient-supplements-vitamin-and-zinc>>. Acessado em: 10 de julho de 2017.

CORBIN, B. D. *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*, v. 319, n. 5865, p. 962-965, 15 fev. 2008.

COUSINS, R. J. *et al.* A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 12, p. 6952-6957, 10 jun. 2003.

COUSINS, R. J.; LIUZZI, J. P.; LICHTEN, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 34, p. 24085-24089, 25 ago. 2006.

CRAWFORD, A.; WILSON, D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Research*, v. 15, n. 7, nov. 2015.

CROSS, A. *et al.* The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 96, n. 2, p. 676-686, ago. 1995.

DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, v. 264, n. 5164, p. 1415-1421, 3 jun. 1994.

DAVIS, M. J. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*, v. 4, n. 3, p. e00264-13, 18 jun. 2013.

DERENGOWSKI, L. DA S. *et al.* The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights

into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 5, p. 761-774, maio 2013.

DEVERGNAS, S. *et al.* Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, n. 4, p. 699-709, 15 ago. 2004.

DIGICAYLIOGLU, M.; LIPTON, S. A. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, v. 412, n. 6847, p. 641-647, 9 ago. 2001.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, p. 840452, 25 maio 2009.

DO, E. *et al.* The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, v. 54, n. 6, p. 605-615, 1 ago. 2016.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 223-247, 2009.

DREVETS, D. A.; LEENEN, P. J. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 13, p. 1609-1618, nov. 2000.

DRIESSEN, C. *et al.* Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine and cytokine research*, v. 13, n. 1, p. 15-20, fev. 1994.

DROMER, F. *et al.* Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 3, p. 742-748, mar. 1987.

DROMER, F. *et al.* *Cryptococcus neoformans*: latency and disease. *Cryptococcus*, 2011.

DU, L. *et al.* Systemic review of published reports on primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent patients. *Mycopathologia*, v. 180, n. 1-2, p. 19-25, ago. 2015.

DUIN, D. VAN; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, nov. 2002.

EBTEKAR, M.; KHANSARI, N. Differential antigenic stimulation influences cytokine production patterns in T cells and CD4+ subpopulations. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 43, n. 4, p. 391-397, abr. 1996.

EIDE, D. *et al.* A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 11, p. 5624-5628, 28 maio 1996.

EIDE, D. J. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, v. 447, n. 5, p. 796-800, fev. 2004.

EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1763, n. 7, p. 711-722, jul. 2006.

ELLIS, C. D.; MACDIARMID, C. W.; EIDE, D. J. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 31, p. 28811-28818, 5 ago. 2005.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *Journal of Immunology*, v. 64, n. 5, p. 423-430, maio 1950.

FAGERHOL, M. K.; DALE, I.; ANDERSON, T. Release and quantitation of a leucocyte derived protein (L1). *European Journal of Haematology*, v. 24, n.5, p.393-398, dez. 1980.

FISHER, M. C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 11 abr. 2012.

FLEURIDOR, R.; LEES, A.; PIROFSKI, L. A cryptococcal capsular polysaccharide mimotope prolongs the survival of mice with *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of Immunology*, v. 166, n. 2, p. 1087-1096, 15 jan. 2001.

FRANKLIN, R. B. *et al.* ZIP14 zinc transporter downregulation and zinc depletion in the development and progression of hepatocellular cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*, v. 43, n. 2, p. 249-257, jun. 2012.

FUCHS, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, v. 176, n. 2, p. 231-241, 15 jan. 2007.

FUKADA, T.; HOJYO, S.; BIN, B. H. Zinc signal in growth control and bone diseases. In: *Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders*, p. 249- 267, 26 ago.2014.

GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, v. 14, n. 3-4, p. 251-270, dez. 2001.

GANENDREN, R. *et al.* Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection*, v. 8, n. 4, p. 1006-1015, abr. 2006.

GAO, J. *et al.* An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 2, p. 1226-1230, 10 jan. 1997.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 76-86, maio 2015.

GIECHE, J. *et al.* Protein oxidation and proteolysis in RAW264. 7 macrophages: effects of PMA activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v.1538, p. 321-328, 23 abr. 2001.

GITAN, R. S. *et al.* A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 41, p. 39558-39564, 10 out. 2003.

GOPALAKRISHNA, R.; ANDERSON, W. B. Ca²⁺ and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, n. 17, p. 6758-6762, set. 1989.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 76, n. 2, p. 508-516, ago. 1985.

GRIJPSTRA, J. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* cap10 and cap59 mutant strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 142-150, nov. 2009.

GROTZ, N. *et al.* Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 12, p. 7220-7224, 9 jun. 1998.

GRZYWACZ, A. *et al.* Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta biochimica Polonica*, v. 62, n. 3, p. 491-498, 3 set. 2015.

GÜNTHER, V.; LINDERT, U.; SCHAFFNER, W. The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1823, n. 9, p. 1416-1425, set. 2012.

GUO, L. *et al.* STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 7, p. 2818-2823, 16 fev. 2010.

HAASE, H. *et al.* Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *Journal of Immunology*, v. 181, n. 9, p. 6491-6502, 1 nov. 2008.

HAASE, H.; RINK, L. Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions. *Biometals*, v. 20, n. 3-4, p. 579-585, jun. 2007.

HAASE, H.; RINK, L. Multiple impacts of zinc on immune function. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, v. 6, n. 7, p. 1175-1180, jul. 2014.

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 16-48, maio 2015.

HAMBIDGE, M.; KREBS, N. F. Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements. *Annual review of nutrition*, v. 21, p. 429-452, 2001.

HAMON, R. *et al.* Zinc and zinc transporters in macrophages and their roles in efferocytosis in COPD. *Plos One*, v. 9, n. 10, p. e110056, 28 out. 2014.

HANTKE, K. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals*, v. 14, n. 3-4, p. 239-249, dez. 2001.

HARA, T. *et al.* Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *The Journal of Physiological Sciences*, v. 67, n. 2, p. 283-301, mar. 2017.

HARDISON, S. E. *et al.* Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *Journal of Immunology*, v. 189, n. 8, p. 4060-4068, 15 out. 2012.

HARRIS, J. R. *et al.* *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, n. 12, p. 1188-1195, dez. 2011.

HASHEMI, M. *et al.* Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 557, n. 1, p. 9-19, 14 fev. 2007.

HE, W. *et al.* Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 2, p. 930-936, fev. 2003.

HELD, T. K. *et al.* Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 206 - 212, jan. 1999.

HENNIGAR, S. R.; KELLEHER, S. L. TNF α Post-Translationally Targets ZnT2 to Accumulate Zinc in Lysosomes. *Journal of Cellular Physiology*, v. 230, n. 10, p. 2345-2350, out. 2015.

HEUNG, L. Innate immune responses to *Cryptococcus*. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 3, p. 35, 2 jul. 2017.

HOJYO, S.; FUKADA, T. Roles of zinc signaling in the immune system. *Journal of immunology research*, v. 2016, p. 6762343, 31 out. 2016.

HOLDEN, N. S. *et al.* Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cellular Signalling*, v. 20, n. 7, p. 1338-1348, jul. 2008.

HOLE, C.; WORMLEY, F. L. Innate host defenses against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 202-211, mar. 2016.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 10, n. 8, p. 525-537, 16 jul. 2012.

HOWARD, D. H. Intracellular behavior of *Histoplasma capsulatum*. *Journal of bacteriology*, 1964.

HOYOS, B. *et al.* Activation of c-Raf kinase by ultraviolet light. Regulation by retinoids. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 26, p. 23949-23957, 28 jun. 2002.

HYUN, H. J. *et al.* Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 42, n. 2, p. 460-465, fev. 2001.

INOUE, Y. *et al.* ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 31, p. 21451-21462, 1 ago. 2014.

JABADO, N. *et al.* Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 192, n. 9, p. 1237-1248, 6 nov. 2000.

JACOBSON, E. S.; TINNELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 21, p. 7102-7104, nov. 1993.

- JAKEN, S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 8, n. 2, p. 168-173, abr. 1996.
- JANBON, G.; DOERING, T. L. Biosynthesis and genetics of the *Cryptococcus* capsule. *Cryptococcus*, 2011.
- JEON, K. I.; JEONG, J. Y.; JUE, D. M. Thiol-reactive metal compounds inhibit NF-kappa B activation by blocking I kappa B kinase. *Journal of Immunology*, v. 164, n. 11, p. 5981-5989, 1 jun. 2000.
- JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 8, p. e1001041, 12 ago. 2010.
- JONES, E. *et al.* Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCepsilon and JAK2 in RAW macrophages. *Journal of inflammation (London, England)*, v. 4, p. 23, 24 nov. 2007.
- JONG, A. *et al.* Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. *Cellular Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 1313-1326, jun. 2008.
- KAMBE, T. *et al.* Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 61, n. 1, p. 49-68, jan. 2004.
- KAMBE, T. Molecular architecture and function of ZnT transporters. *Current topics in membranes*, v. 69, p. 199-220, 2012.
- KAMBE, T.; HASHIMOTO, A.; FUJIMOTO, S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 8 abr. 2014.
- KAMIJO, R. *et al.* Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science*, v. 263, n. 5153, p. 1612-1615, 18 mar. 1994.
- KAMIZONO, A. *et al.* Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG*, v. 219, n. 1-2, p. 161-167, out. 1989.
- KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. *Annual Review of Immunology*, v. 11, p. 129-163, 1993.
- KAZANIETZ, M. G. *et al.* Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 15, p. 11590-11594, 15 abr. 1994.
- KELLY, R. M. *et al.* Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 1, p. 592-598, jan. 2005.
- KHAJO, A. *et al.* Protection of melanized *Cryptococcus neoformans* from lethal dose gamma irradiation involves changes in melanin's chemical structure and paramagnetism. *Plos One*, v. 6, n. 9, p. e25092, 22 set. 2011.
- KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 7 dez. 2004.

KIMURA, T.; ITOH, N.; ANDREWS, G. K. Mechanisms of heavy metal sensing by metal response element-binding transcription factor-1. *Journal of Health Science*, 2009.

KIMURA, T.; KAMBE, T. The functions of metallothionein and ZIP and znt transporters: an overview and perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 3, p. 336, 4 mar. 2016.

KIRSCHKE, C. P.; HUANG, L. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 6, p. 4096-4102, 7 fev. 2003.

KNAPP, L. T.; KLANN, E. Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 31, p. 24136-24145, 4 ago. 2000.

KOLENKO, V. M. *et al.* Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. *Apoptosis*, 2001.

KONISHI, H. *et al.* Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 21, p. 11233-11237, 14 out. 1997.

KORICHNEVA, I. *et al.* Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 46, p. 44327-44331, 15 nov. 2002.

KREBS, N. F. Update on zinc deficiency and excess in clinical pediatric practice. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v. 62 Suppl 1, p. 19-29, 3 maio 2013.

KRIKOS, A.; LAHERTY, C. D.; DIXIT, V. M. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 25, p. 17971-17976, 5 set. 1992.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 7, p. a019760, 1 jul. 2014.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, v. 6, n. 4, p. 574-587, jun. 2006.

LANE, T. E.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Iron limitation and the gamma interferon-mediated antihistoplasma state of murine macrophages. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 7, p. 2274-2278, jul. 1991.

LAPPANN, M. *et al.* In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. *Molecular Microbiology*, v. 89, n. 3, p. 433-449, ago. 2013.

LEOPOLD WAGER, C. M. *et al.* *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 105, 9 fev. 2016.

LEUNG, K. W. *et al.* Expression of ZnT and ZIP zinc transporters in the human RPE and their regulation by neurotrophic factors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 49, n. 3, p. 1221-1231, mar. 2008.

- LI, L.; FREI, B. Prolonged exposure to LPS increases iron, heme, and p22phox levels and NADPH oxidase activity in human aortic endothelial cells: inhibition by desferrioxamine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 29, n. 5, p. 732-738, maio 2009.
- LI, L.; KAPLAN, J. The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 7, p. 5036-5043, 16 fev. 2001.
- LI, Y. *et al.* Rapid translocation of Zn(2+) from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *Journal of Neurophysiology*, v. 86, n. 5, p. 2597-2604, nov. 2001.
- LICHTEN, L. A.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual review of nutrition*, v. 29, p. 153-176, 2009.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIU, M.-J. *et al.* ZIP8 regulates host defense through zinc-mediated inhibition of NF- κ B. *Cell reports*, v. 3, n. 2, p. 386-400, 21 fev. 2013.
- LIU, T. *et al.* CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 1, p. 60-68, jan. 2007.
- LIUZZI, J. P. *et al.* Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 40, p. 14355-14360, 5 out. 2004.
- LIUZZI, J. P. *et al.* Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 19, p. 6843-6848, 10 maio 2005.
- LIUZZI, J. P.; BLANCHARD, R. K.; COUSINS, R. J. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *The Journal of Nutrition*, v. 131, n. 1, p. 46-52, jan. 2001.
- LORSBACH, R. B.; MURPHY, W. J.; LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H.; *et al.* Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 3, p. 1908-1913, 25 jan. 1993.
- LUBERTO, C. *et al.* Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 7, p. 1080-1094, out. 2003.
- LYONS, T. J. *et al.* Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 14, p. 7957-7962, 5 jul. 2000.
- MA, H. *et al.* Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Current Biology*, v. 16, n. 21, p. 2156-2160, 7 nov. 2006.
- MA, H. *et al.* Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunology*, v. 8, p. 15, 16 ago. 2007.

MA, H.; MAY, R. C. Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus Species*. In: Advances in Applied Microbiology. [s.l.] Elsevier, 2009. v. 67p. 131-190.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, v. 19, n. 12, p. 2845-2855, 15 jun. 2000.

MARREIRO, D. DO N. *et al.* Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, v. 6, n. 2, 29 mar. 2017.

MCCORMICK, A. *et al.* NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 12-13, p. 928-936, nov. 2010.

MCCRANOR, B. J. *et al.* Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an in vitro model of ischemia/reperfusion. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 44, n. 2, p. 253-263, abr. 2012.

MEDNICK, A. J. *et al.* Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. *European Journal of Immunology*, v. 33, n. 6, p. 1744-1753, jun. 2003.

MEERARANI, P. *et al.* Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 71, n. 1, p. 81-87, jan. 2000.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, v. 20, n. 8, p. 1790-1799, jun. 1999.

MILDNER, A.; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, v. 40, n. 5, p. 642-656, 15 maio 2014.

MIYABE, S.; IZAWA, S.; INOUE, Y. The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 282, n. 1, p. 79-83, 23 mar. 2001.

MODY, C. H. *et al.* In vivo depletion of murine CD8 positive T cells impairs survival during infection with a highly virulent strain of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 125, n. 1, p. 7-17, jan. 1994.

MONARI, C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *Journal of Immunology*, v. 174, n. 6, p. 3461-3468, 15 mar. 2005.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of murine macrophages. *Current protocols in immunology*, nov. 2008.

MUT, M.; AMOS, S.; HUSSAINI, I. M. PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turkish neurosurgery*, v. 20, n. 3, p. 277-285, jul. 2010.

NAIRZ, M. *et al.* Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 5, p. 855-873, 6 maio 2013.

NAKATANI, T. *et al.* Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 125, n. 3, p. 151-163, 15 mar. 2000.

NAM, H. *et al.* ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload: implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica*, v. 98, n. 7, p. 1049-1057, jul. 2013.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*, v. 219, p. 88-102, out. 2007.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *Plos One*, v. 4, n. 6, p. e5862, 10 jun. 2009.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et a.* The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio*, v. 3, n. 3, 8 maio 2012.

NICOD, L. P. Lung defences: an overview. *European Respiratory Review*, 2005.

NIES, D. H.; SILVER, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of industrial microbiology*, 1995.

NYGAARD, S. B. *et al.* Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro β -cell function in INS-1E cells. *BMC Research Notes*, v. 7, p. 84, 7 fev. 2014.

OLIVEIRA, D. L. *et al.* Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 4, p. 1601-1609, abr. 2010.

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American Journal of Pathology*, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, maio 2004.

OSTERHOLZER, J. J. *et al.* Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *The American Journal of Pathology*, v. 174, n. 3, p. 932-943, mar. 2009.

OUTTEN, C. E.; O'HALLORAN, T. V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, v. 292, n. 5526, p. 2488-2492, 29 jun. 2001.

PALMITER, R. D.; HUANG, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, v. 447, n. 5, p. 744-751, fev. 2004.

PARENTE, A. F. A. *et al.* A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. *Fungal biology*, v. 117, n. 6, p. 399-410, jun. 2013.

PERFECT, J. R. *et al.* *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. *Medical Mycology*, v. 36 Suppl 1, p. 79-86, 1998.

PERSANS, M. W.; NIEMAN, K.; SALT, D. E. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 17, p. 9995-10000, 14 ago. 2001.

PETTER, R. *et al.* A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. *Microbiology*, v. 147, n. Pt 8, p. 2029-2036, ago. 2001.

PFEFFER, L. M. *et al.* STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science*, v. 276, n. 5317, p. 1418-1420, 30 maio 1997.

PIEHLER, D. *et al.* Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. *The American Journal of Pathology*, v. 179, n. 2, p. 733-744, ago. 2011.

PINILLA-TENAS, J. J. *et al.* Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 301, n. 4, p. C862-71, out. 2011.

PODANY, A. B. *et al.* ZnT2-Mediated Zinc Import Into Paneth Cell Granules Is Necessary for Coordinated Secretion and Paneth Cell Function in Mice. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, v. 2, n. 3, p. 369-383, maio 2016.

POLVI, E. J. *et al.* Metal chelation as a powerful strategy to probe cellular circuitry governing fungal drug resistance and morphogenesis. *PLoS Genetics*, v. 12, n. 10, p. e1006350, 3 out. 2016.

PRASAD, A. S. *et al.* Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 37, n. 8, p. 1182-1190, 15 out. 2004.

PRASAD, A. S. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 26, n. 2-3, p. 66-69, 2 jun. 2012.

PRASAD, A. S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 28, n. 4, p. 357-363, out. 2014.

PRASHANTH, L. *et al.* A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health*, v. 4, n. 2, p. 75- 85, 12 jun. 2015.

PYLE, C. J. *et al.* Zinc Modulates Endotoxin-Induced Human Macrophage Inflammation through ZIP8 Induction and C/EBP β Inhibition. *Plos One*, v. 12, n. 1, p. e0169531, 5 jan. 2017.

QIN, Y. *et al.* Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 18, p. 7351-7356, 3 maio 2011.

RODRIGUES, M. L. *et al.* Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 1, p. 48-59, jan. 2007.

RODRIGUES, M. L. *et al.* Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, v. 7, n. 1, p. 58-67, jan. 2008.

ROHATGI, S.; PIROFSKI, L. Molecular characterization of the early B cell response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of Immunology*, v. 189, n. 12, p. 5820-5830, 15 dez. 2012.

ROHATGI, S.; PIROFSKI, L.A. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 565-581, 2015.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters*, v. 153, n. 2, p. 265-272, 15 ago. 1997.

SANTOS, F. M. DOS *et al.* Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. *Future Microbiology*, v. 12, p. 491-504, 11 maio 2017.

SCHNEIDER, R. DE O. *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *Plos One*, v. 7, n. 8, p. e43773, 20 ago. 2012.

SCHNEIDER, R. DE O. *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Scientific reports*, v. 5, p. 10104, 7 maio 2015.

SCHWEIGEL-RÖNTGEN, M. The families of zinc (SLC30 and SLC39) and copper (SLC31) transporters. *Current topics in membranes*, v. 73, p. 321-355, 2014.

SEKLER, I. *et al.* Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Molecular medicine*, v. 13, n. 17-18, p. 337-343, jul-ago. 2007.

SMITH, A.; MCCULLOH, R. J. Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Frontiers in physiology*, v. 6, p. 187, 30 jun. 2015.

SOARES, M. P.; WEISS, G. The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Reports*, v. 16, n. 11, p. 1482-1500, nov. 2015.

SONG, H. Y.; ROTHE, M.; GOEDDEL, D. V. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 13, p. 6721-6725, 25 jun. 1996.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, v. 31, n. 2, p. 47-60, fev. 2014.

STAATS, C. C. *et al.* Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, p. 65, 14 out. 2013.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 18 dez. 2001.

STEINBAKK, M. *et al.* Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *The Lancet*, v. 336, n. 8718, p. 763-765, 29 set. 1990.

SUBRAMANIAM, K. *et al.* IgM(+) memory B cell expression predicts HIV-associated cryptococcosis status. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 200, n. 2, p. 244-251, 15 jul. 2009.

SUBRAMANIAM, K. S. *et al.* The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5755-5767, 15 maio 2010.

SUBRAMANIAN VIGNESH, K. *et al.* Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity*, v. 39, n. 4, p. 697-710, 17 out. 2013.

SUBRAMANIAN VIGNESH, K.; DEEPE, G. S. Immunological orchestration of zinc homeostasis: The battle between host mechanisms and pathogen defenses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 611, p. 66-78, 1 dez. 2016.

SUHY, D. A. *et al.* Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 14, p. 9183-9192, 2 abr. 1999.

SYME, R. M. *et al.* Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc γ receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 11, p. 5972-5981, nov. 2002.

TAILLEUX, L. *et al.* Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages. *Plos One*, v. 3, n. 1, p. e1403, 2 jan. 2008.

TAYLOR, C. M. *et al.* Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 53, n. 3, p. 755-763, mar. 1991.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. *Current Opinion in Microbiology*, v. 34, p. 67-74, dez. 2016.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 5, p. 3165-3170, 5 mar. 2002.

UEZU, K. *et al.* Accumulation of $\gamma\delta$ T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 12, p. 7629-7634, 15 jun. 2004.

UZZO, R. G. *et al.* Zinc inhibits nuclear factor- κ B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clinical Cancer Research*, v. 8, n. 11, p. 3579-3583, nov. 2002.

VALLEE, B. L.; AULD, D. S. Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 7, p. 2715-2718, 1 abr. 1993.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, v. 73, n. 1, p. 79-118, jan. 1993.

VARTIVARIAN, S. E. *et al.* Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 167, n. 1, p. 186-190, jan. 1993.

VEERDONK, F. L. VAN DE; NETEA, M. G. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Current fungal infection reports*, v. 4, n. 4, p. 238-243, dez. 2010.

VIDAL, S. *et al.* The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 182, n. 3, p. 655-666, 1 set. 1995.

- VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 8, p. 3450-3457, ago. 2009.
- WANG, C.-Y. *et al.* ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 41, p. 34032-34043, 5 out. 2012.
- WANG, F. *et al.* Immortalized mouse dental papilla mesenchymal cells preserve odontoblastic phenotype and respond to bone morphogenetic protein 2. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, v. 49, n. 8, p. 626-637, set. 2013.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, ago. 1995.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, n. 11, p. 2648-2650, nov. 1994.
- WAPNIR, R. A. Protein nutrition and mineral absorption. 1990.
- WAŃŁY, J.; POTOCKI, S.; ROWIŃSKA-ŻYREK, M. Zinc Homeostasis at the Bacteria/Host Interface-From Coordination Chemistry to Nutritional Immunity. *Chemistry*, v. 22, n. 45, p. 15992-16010, 2 nov. 2016.
- WELLINGHAUSEN, N.; DRIESSEN, C.; RINK, L. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine*, v. 8, n. 10, p. 767-771, out. 1996.
- WELLINGHAUSEN, N.; MARTIN, M.; RINK, L. Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *European Journal of Immunology*, v. 27, n. 10, p. 2529-2535, out. 1997.
- WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 6, p. 1570-1572, mar. 1998.
- WINTERS, M. S. *et al.* Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 202, n. 7, p. 1136-1145, 1 out. 2010.
- WOZNIAK, K. L.; LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 10, p. 4764-4771, out. 2008.
- WRIGHT, L. C. *et al.* Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *The Biochemical Journal*, v. 384, n. Pt 2, p. 377-384, 1 dez. 2004.
- WRIGHT, L. C. *et al.* Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 1, p. 37-47, jan. 2007.
- WU, C.-Y. *et al.* Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, v. 9, p. 370, 1 ago. 2008.

WU, L. *et al.* Immortalized mouse floxed Bmp2 dental papilla mesenchymal cell lines preserve odontoblastic phenotype and respond to BMP2. *Journal of Cellular Physiology*, v. 225, n. 1, p. 132-139, out. 2010.

XIA, W. *et al.* Structure of a nickel chaperone, HypA, from *Helicobacter pylori* reveals two distinct metal binding sites. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 29, p. 10031-10040, 29 jul. 2009.

YAMASAKI, S. *et al.* Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of Cell Biology*, v. 177, n. 4, p. 637-645, 21 maio 2007.

YAMASHITA, S. *et al.* Zinc transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*, v. 429, n. 6989, p. 298-302, 20 maio 2004.

ZARAGOZA, O. Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in microbiology*, v. 2, p. 181, 6 set. 2011.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Current Opinion in Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 409-413, ago. 2013.

ZHANG, F. *et al.* TPEN, a Specific Zn(2+) Chelator, Inhibits Sodium Dithionite and Glucose Deprivation (SDGD)-Induced Neuronal Death by Modulating Apoptosis, Glutamate Signaling, and Voltage-Gated K(+) and Na(+) Channels. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 37, n. 2, p. 235-250, mar. 2017.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 6, p. 2454-2458, 19 mar. 1996a.

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 38, p. 23203-23210, 20 set. 1996b.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, n. 9, p. 5044-5052, set. 1997.

ZHENG, D. *et al.* Regulation of ZIP and ZnT zinc transporters in zebrafish gill: zinc repression of ZIP10 transcription by an intronic MRE cluster. *Physiological Genomics*, v. 34, n. 2, p. 205-214, 15 jul. 2008.

ZHOU, Z. *et al.* Abrogation of nuclear factor- κ B activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and liver injury. *The American journal of Pathology*, v.164, n. 5, p. 1547 - 1556, mai. 2004.

8. CURRICULUM VITAE resumido

DOS SANTOS, F.M.; SANTOS, F.M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Francine Melise dos Santos

Local e data de nascimento: Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, 5 de junho de 1989.

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500; Setor 4; Prédio 43421; Lab. 219; Porto Alegre, RS; CEP: 91501-970

Telefone profissional: +55 51 33087767

E-mail: francinemelise@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Curso de graduação: Biomedicina, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Período: 2007-2010.

Título: Avaliação dos níveis de cortisol salivar nos trabalhadores da área da emergência hospitalar.

Orientador: Alexandre Ehrhardt.

Curso de Pós-Graduação: Mestrado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: 2012-2013.

Título: Análise de microRNAs- like em *Cryptococcus gattii*.

Orientador: Charley Christian Staats.

Coorientador: Marilene Henning Vainstein.

Curso de Pós-Graduação: Doutorado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: 2013-2017.

Título: Modulação da homeostase de zinco em macrófagos como estratégia antifúngica ao patógeno *Cryptococcus neoformans*.

Orientador: Charley Christian Staats.

Coorientador: Marilene Henning Vainstein.

1.1. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso Excel Avançado. Carga horária: 10h. Período: 2017 – 2017. Sigma Treinamentos.

Curso Interações Medicamentosas em Pacientes Crônicos e Geriátricos. Carga horária: 8h. Período: 2017 – 2017. Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade, ICTQ, Brasil.

Curso Biologia e Genética Forense. Carga horária: 10h. Período: 2016 – 2016. Instituto Galeno, IG, Brasil.

Curso Genômica Funcional de Plelmintos Parasitas. Carga horária: 40h. Período: 2013 – 2013. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Curso Análise *in silico* de proteínas. Carga horária: 5h. Período: 2012- 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Curso DNA Forense. Carga horária: 80h. Período: 2010 – 2010. Portal da Educação, PORTAL EDUCAÇÃO, Brasil.

Curso Tratamento de Efluentes. Carga horária: 4h. Período: 2010-2010. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

Curso Microbiologia da Água. Carga horária: 4h. Período: 2010-2010. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

III Curso de Interpretação de Hemograma. Carga horária: 8h. Período: 2009- 2009. Universidade de Passo Fundo, UPF, Brasil

Curso Nivelamento em Matemática. Carga horária: 68h. Período: 2008- 2008. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

3. ESTÁGIOS

Vínculo: Monitoria. Instituição: Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Período: 2010-2010. Atividades: Monitoria com a função de produzir materiais necessários para uso dos alunos do curso de Biomedicina durante as aulas práticas (meios de cultura, materiais estéreis, entre outros), realizar o descarte apropriado de materiais utilizados e auxiliar na manutenção e disponibilidade dos produtos de laboratório. Responsável: Alexandre Ehrhardt.

Vínculo: Estágio curricular. Instituição: Hemocentro Regional de Passo Fundo, HEMOPASSO, Brasil. Período: 2010- 2010. Atividades: realizar cadastro dos doadores de sangue, realizar fracionamento das bolsas de sangue nos demais hemocomponentes para armazenamento das amostras biológicas, controle de qualidade das amostras bem como dos equipamentos e sala de armazenamento das bolsas de sangue, auxiliar na organização dos estoques de amostras e envio para pacientes e hospitalais.

Vínculo: Estágio Extracurricular. Instituição: Laboratório de Análises Clínicas UNIDOS, Passo Fundo, Brasil. Período: 2010- 2010. Atividades: realizar análises hematológicas, bioquímicas e de urina de amostras de pacientes.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

FERRAREZE, PATRÍCIA ALINE GRÖHS; STREIT, RODRIGO SILVA ARAUJO; **DOS SANTOS, FRANCINE MELISE**; SCHRANK, AUGUSTO; KMETZSCH, LIVIA; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN. sRNAs as possible regulators of retrotransposon activity in *Cryptococcus gattii* VGII. *BMC GENOMICS*, v. 18, p. 298, 2017.

DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; PIFFER, ALÍCIA CORBELLINI; SCHNEIDER, RAFAEL DE OLIVEIRA; RIBEIRO, NICOLE SARTORI; GARCIA, ANE WICHINE ACOSTA; SCHRANK, AUGUSTO; KMETZSCH, LÍVIA ; VAINSTEIN, MARILENE HENNING ; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN. Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. *Future Microbiology*, v. 12, p. 25, 2017.

SCHNEIDER, RAFAEL DE OLIVEIRA; DIEHL, CAMILA; **DOS SANTOS, FRANCINE MELISE**; PIFFER, ALÍCIA CORBELLINI; GARCIA, ANE WICHINE ACOSTA ; KULMANN, MARCOS IURI ROOS; SCHRANK, AUGUSTO; KMETZSCH, LÍVIA ; VAINSTEIN, MARILENE HENNING ; STAATS, CHARLEY C. . Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Scientific Reports*, v. 5, p. 10104, 2015.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

PIFFER, A.C.; DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; SCHNEIDER, RAFAEL DE OLIVEIRA; GERBER, A. L.; VASCONCELOS, A. T. R.; KMETZSCH, L. ; VAINSTEIN, M.H. ; STAATS, C.C. Transcriptional profiling of macrophage response to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: *28 Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 2015, Florianópolis. Congresso Brasileiro de Microbiologia - Anais, 2015, 2015.

RIBEIRO, N. S.; FLACH, K.; DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; PIFFER, A.C.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M.H.; STAATS, CHARLEY C. Evaluation of copper transporter CTR1 in macrophages infected by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. In: *28º Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 2015, Florianópolis. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia - Anais, 2015, 2015.

DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; PIFFER, A.C.; SCHNEIDER, RAFAEL DE OLIVEIRA; RIBEIRO, N. S.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M.H. ; STAATS, CHARLEY C. Modulation of zinc homeostasis in macrophages by *Cryptococcus neoformans*. In: *28º Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 2015, Florianópolis. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia - Anais, 2015, 2015.

RIBEIRO, N. S.; FLACH, K.; DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; PIFFER, A.C.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, AUGUSTO; VAINSTEIN, M.H. ; STAATS, C.C. Evaluation

of copper transporters expression. In macrophages infected by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. In: *XII International Meeting on Paracoccidioidomycosis*, 2014, Brasília. XII International Meeting on Paracoccidioidomycosis, Anais- 2014, 2014.

PIFFER, A.C.; DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; GARCIA, A. W. A.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M.H.; STAATS, C.C. Pulmonary epithelial cells presente antifungal activity through the expression of zinc binding proteins in a *Cryptococcus gattii* model. In: *XII International Meeting on Paracoccidioidomycosis*, 2014, Brasília. XII International Meeting on Paracoccidioidomycosis - Anais, 2014, 2014.

DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; GUTIERRES, M.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, AUGUSTO; VAINSTEIN, M.H.; STAATS, C.C. . Analysis of miRNAs-like in *Cryptococcus gattii*. In: *27º Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia- Anais, 2013, 2013.

SANTOS, P. R.; DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; KMETZSCH, L.; STAATS, C.C. ; SCHRANK, AUGUSTO ; VAINSTEIN, M.H. . Transcriptome of copper deprivation in *Cryptococcus gattii*. In: *28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos*, 2012, Foz do Iguaçu. 28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos- Resumos, 2012, 2012.

SANTOS, P. R.; DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; KMETZSCH, L.; STAATS, C.C. ; SCHRANK, AUGUSTO ; VAINSTEIN, M.H. . Transcriptome of the infection by *Cryptococcus gattii* in vivo. In: *28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos*, 2012, Foz do Iguaçu. 28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos- Resumos, 2012, 2012.