

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

**HOMEOSTASE DE ZINCO NA VIRULÊNCIA DE *Cryptococcus gattii* E NA  
INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRO**

TESE DE DOUTORADO

Rafael de Oliveira Schneider

Porto Alegre, Julho 2016

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

**HOMEOSTASE DE ZINCO NA VIRULÊNCIA DE *Cryptococcus gattii* E NA  
INTERAÇÃO COM HOSPEDEIRO**

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 Doutor em Ciências.

**Rafael de Oliveira Schneider**

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Julho de 2016

O presente 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. Bolsa de doutorado financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Parte deste trabalho foi realizada no “Host-Pathogen Interaction Laboratory” situado no “Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham” em Birmingham no Reino Unido. Bolsa de doutorado sanduiche financiada pelo CNPq-Ciências sem Fronteiras (Processo número: 233243/2014-3).

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Professor Dr. Charley Christian Staats, pela oportunidade, confiança e incentivo para a minha formação. Exemplo de que trabalho e esforço sempre compensam.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Marilene Henning Vainstein pela confiança, oportunidade e ensinamentos durante esse percurso.

Aos Professores Dr. Augusto Schrank e Dra. Livia Kmetzsch, pela grande contribuição na geração de dados, críticas construtivas e reconhecimento dos acertos.

Ao Professor Dr. Robin May, pelo reconhecimento, recepção em seu laboratório e por ser um exemplo de humildade.

À Camila, Francine, Alicia, Ane e Marcos pela boa vontade e eficiência para realização de experimentos e discussão dos resultados.

Ao Luciano e a Silvinha, por não medirem esforços para ajudar os alunos do PPGBCM.

À Emily, Courtney, Ewa, Leanne, Paula e Ria, pelos dias de trabalho mais divertidos que já tive.

A todos os colegas dos laboratórios 220 e 217. Especialmente Eamim, Júlia, Vanessa, Glaci e Nicole, pela parceria e boa vontade para discussão dos resultados.

Aos irmãos que o trabalho me deu, Amanda, William, Ane e Marcos.

Ao meu irmão/primo Vicente Schneider, pela parceria e ombro amigo.

À minha família, pela educação e investimento na minha formação. Especialmente à minha mãe, exemplo de caráter, ambição e força de vontade.

Ao PPGBCM pela estrutura e organização do programa.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPERGS.

*“The greatest fear in the world is of the  
opinions of the others. And the moment  
you are unafraid of the crowd you are no  
longer a sheep, you became a lion. A  
great roar arises in your heart,  
the roar of freedom”*

Osho

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	VIII
RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XI
1. JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISAO DA LITERATURA .....	3
2.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> .....	3
2.1.1 ECOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA .....	5
2.1.2 CRIPTOCOCOSE .....	7
2.1.3 FATORES E MECANISMOS DE VIRULÊNCIA .....	10
2.1.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA.....	11
2.1.3.2 PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA .....	12
2.1.3.3 DESENVOLVIMENTO À 37 °C.....	13
2.1.3.4 REPLICAÇÃO INTRAFAGOSSOMAL.....	14
2.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA <i>Cryptococcus</i> .....	15
2.2.1 IMUNIDADE NUTRICIONAL DE MICRONUTRIENTES .....	18
2.2.1.1 FERRO .....	18
2.2.1.2 COBRE.....	21
2.2.1.3 ZINCO .....	24
2.3 HOMEOSTASE DE ZINCO E FUNGOS PATOGÊNICOS.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 CAPÍTULO I: <i>Effects of zinc transportes on Cryptococcus gattii virulence.</i> 32	
4.2 CAPÍTULO II - Metabolismo de zinco durante interação de macrófagos e <i>Cryptococcus gattii</i> .....	53
4.2.1 INTRODUÇÃO .....	53
4.2.2 METODOLOGIA .....	55
4.2.2.1 LINHAGENS CELULARES E ENSAIOS DE INTERAÇÃO .....	55
4.2.2.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	56

4.2.2.3	ANÁLISES POR MICROSCOPIAS.....	57
4.2.2.4	ANÁLISE DE EVENTOS DE VOMOCITOSE .....	58
4.2.2.5	ENSAIO DE PERMEABILIZAÇÃO DE FAGOSSOMO .....	58
4.2.2.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ZNT4 .....	59
4.2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
4.2.3.1	Baixos níveis de zinco durante o processo de interação causam efeitos na fagocitose .....	60
4.2.3.2	Aumento nos níveis de zinco em células de <i>C. gattii</i> internalizadas por macrófagos.....	62
4.2.3.3	Permeabilização do fagossomo está relacionado com eventos de aumento na concentração de Zn <sup>2+</sup> em <i>C. gattii</i> internalizado .....	65
4.2.3.4	Compartimentalização de zinco em macrófagos infectados com <i>C. gattii</i> 68	
4.2.3.5	Níveis de Znt4 não são alterados após 18 horas de interação entre macrófagos e <i>C. gattii</i> .....	69
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	71
6.	CONCLUSÕES.....	79
7.	PERSPECTIVAS.....	80
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
AIDS	Do inglês, <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
BHE	barreira hematoencefálica
CDF	do inglês, <i>cation diffusion facilitator</i>
cDNA	DNA complementar
CPH	complexo de histocompatibilidade
DMEM	do Inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTPA	do inglês, <i>Diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
HIV	do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>
IL	interleucina
IRI	índice de replicação intrafagossomal
mg	miligrama
ml	mililitro
ng	nanograma
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered solution</i>
PMA	do inglês, <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RNA	ácido ribonucleico
SNC	sistema nervoso central

SOD	superóxido dismutase
TPEN	do inglês, <i>N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine</i>
ZIP	<i>Zrt, Irt-like Protein</i>
ZnT	Zn transporter
YNB	do inglês, <i>yeast nitrogen base</i>
YPD	do inglês, <i>yeast peptone dextrose</i>
μg	micrograma
μl	microlitro

## RESUMO

A imunidade nutricional é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro. A mesma é caracterizada pela privação de nutrientes durante interação patógeno e hospedeiro, mostrando-se essencial tanto para eliminar quanto para conter a disseminação de micro-organismos patogênicos. Dentre os nutrientes sequestrados pelo hospedeiro, está o metal zinco, é um micronutriente essencial para o metabolismo de todos os seres vivos. Em contrapartida, micro-organismos patogênicos desenvolveram mecanismos para capturar esse metal. O nosso modelo de estudo, a levedura encapsulada *Cryptococcus gattii*, é um dos principais agentes causadores da criptococose. A doença inicia pela inalação de propágulos fúngicos, os quais irão depositar-se no interior dos alvéolos pulmonares onde irão encontrar células fagocíticas, representando a primeira linha de defesa do hospedeiro e onde possivelmente seja empregada a imunidade nutricional para conter a disseminação desta levedura. No presente trabalho, objetivamos avaliar o papel da biodisponibilidade de zinco na virulência de *C. gattii*. No primeiro capítulo, descrevemos a caracterização da função de dois transportadores de zinco da família ZIP em *C. gattii*. O transportador de zinco Zip1 é o principal envolvido na captação de zinco, já que linhagens mutantes para o seu gene codificador, assim como a linhagem duplo mutante *zip1Δzip2Δ*, apresentaram baixo nível de zinco intracelular, crescimento reduzido quando na condição de privação de zinco e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando cultivados na condição de privação do metal. Tais características não foram observadas na linhagem *zip2Δ*. Ensaio de virulência demonstraram que *zip1Δ* e *zip1Δzip2Δ* são mais susceptíveis à fagocitose por macrófagos, ao passo que ensaios de infecção em modelo murino demonstraram que apenas a linhagem duplo mutante possui virulência atenuada. Tais dados evidenciam que a homeostase de zinco, mais especificamente o transporte, é essencial para a patogenicidade de *C. gattii*. No segundo capítulo do presente trabalho, abordamos homeostase de zinco durante a interação *C. gattii* com macrófagos. Por meio de análises de microscopia, demonstramos que leveduras contidas em fagossomos apresentam eventos de aumento transitório na concentração de zinco, o que parece estar diretamente envolvido com a permeabilização dos fagossomos. Adicionalmente, determinamos que macrófagos infectados com *C. gattii* apresentam uma compartimentalização de zinco, provavelmente no complexo de Golgi, dessa maneira reduzindo a disponibilidade do metal em fagossomos infectados. Concluindo, o presente trabalho demonstrou que o metal zinco é essencial para a patogenicidade de *C. gattii*, e que transportadores do metal estão diretamente envolvidos com a virulência deste patógeno. Além disto, levantamos importantes dados quanto à imunidade nutricional de macrófagos contra *C. gattii*, sugerindo que um processo de privação de zinco é realizado por parte do macrófago.

## ABSTRACT

Nutritional immunity is an important defence mechanism used by host. It is characterised by nutrients deprivation during host-pathogen interaction and has important role in growth hampering and microbe killing. Among the nutrients sequestered by host is the metal zinc, which plays essential role in cell metabolism of all living organisms. However, microorganisms developed diverse mechanisms for zinc acquisition. Our model of study is the intracellular fungal pathogen *Cryptococcus gattii*, one of the main agents of cryptococcal disease. The disease starts with inhalation of fungal propagules, which will deposit inside the lung alveoli and being in contact with phagocytes, representing the first line of host defence. In such host cells, nutritional immunity occur in order to hamper cryptococcal growth. In the present work, we sought to determine the role of zinc availability on the *C. gattii* virulence. In the first chapter, we describe the functional characterization of two of zinc transporters in *C. gattii* of the ZIP family. Zip1 transporter is the pivotal zinc transporter in *C. gattii*, as mutant strains *zip1* $\Delta$  and double mutant strain *zip1* $\Delta$  *zip2* $\Delta$  had lower intracellular content, reduced growth under zinc limitation and higher reactive oxygen species than wild type strain. Such characteristics were not observed in *zip2* $\Delta$  strain. Virulence tests demonstrated that *zip1* $\Delta$  and *zip1* $\Delta$ *zip2* $\Delta$  are more susceptible to macrophage phagocytosis, and murine infection assay showed that only double knockout strain had alterations in virulence. Such data lead us to conclude that zinc, acquired by zinc transporters, is essential for *C. gattii* pathogenicity. In the second chapter, we demonstrated important data about zinc homeostasis during *C. gattii* and macrophage interaction. Microscopy analysis demonstrated that internalised yeasts cells have events of temporary increase on zinc concentration. These events are directly associated with phagosomal permeabilisation. Moreover, *C. gattii* infected macrophages have a zinc content compartmentalisation, most probably in the Golgi apparatus. Thus, we conclude that zinc is essential for *C. gattii* virulence and zinc transporters play an important role on its pathogenicity. In addition, we described important data about zinc nutritional immunity during macrophage and *C. gattii* interaction.



## 1. JUSTIFICATIVA

Patógenos fúngicos humanos são conhecidos por causarem doenças principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Dentre indivíduos acometidos por estas infecções estão pacientes com câncer, AIDS, submetidos a tratamento com medicamentos imunossupressores, entre outros (D'souza *et al.*, 2011; Low e Rotstein, 2011). Dentre estes fungos, pode ser utilizado como exemplo *Cryptococcus neoformans*, considerado um importante patógeno oportunista, bastante associado com pacientes portadores de HIV/AIDS (Park *et al.*, 2009). Entretanto, em 1999 um surto de criptococose em indivíduos imunocompetentes nas Ilhas de Vancouver, parte da Columbia Britânica no Canadá e posterior dispersão no norte dos Estados Unidos expôs o potencial patogênico da espécie *C. gattii*, o qual passou a ser considerado um patógeno primário (Byrnes *et al.*, 2009; Byrnes e Heitman, 2009; Kidd *et al.*, 2004). A infecção inicia-se pela inalação de esporos fúngicos presentes no ambiente, os quais irão depositar-se no interior dos alvéolos pulmonares. Nesse ambiente, estão presentes fagócitos como macrófagos e células dendríticas, essenciais para eliminação do patógeno no estágio inicial da infecção (Guilliams *et al.*, 2013). Entretanto, *Cryptococcus* é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de fagócitos. Dessa maneira, células de defesa contendo leveduras internalizadas poderão atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), liberando o fungo no sistema nervoso central (SNC) e causando o quadro mais grave da infecção, a meningoencefalite (Liu *et al.*, 2012; Voelz *et al.*, 2009).

As respostas imunes inata e adaptativa são essenciais no combate às infecções, iniciam principalmente pela ação de células fagocíticas, as quais irão permitir a

apresentação de antígenos e gerar uma resposta adaptativa principalmente pela produção de anticorpos (Olive e Sasseti, 2016). Além desses mecanismos de defesa, a imunidade nutricional desempenha um importante papel no combate às doenças infecciosas fúngicas, sendo a privação de metais uma das principais linhas de defesa contra esses patógenos (Doherty, 2007; Hood e Skaar, 2012). Dentre os nutrientes envolvidos na imunidade nutricional, metais como ferro, zinco e manganês são essenciais para a manutenção da vida. Nesse contexto, micro-organismos patogênicos necessitam capturar metais do hospedeiro para que possam desenvolver-se, em contrapartida, hospedeiros desenvolveram mecanismos para diminuir a disponibilidade desses micronutrientes durante interação patógeno-hospedeiro (Crawford e Wilson, 2015; Hood e Skaar, 2012). Dentre eles, zinco é considerado um elemento crucial no processo de interação patógeno-hospedeiro. Através da imunidade nutricional, células de defesa de hospedeiros mamíferos utilizam mecanismos de captura desse metal no intuito de diminuir sua disponibilidade para patógenos em geral. Além disso, pelo fato de que a redução na disponibilidade de zinco é capaz de afetar o crescimento de patógenos fúngicos, supõem-se que células de mamíferos utilizam desse mecanismo para dificultar o desenvolvimento desses patógenos (Jung, 2015; Staats *et al.*, 2013).

Nosso grupo demonstrou que zinco representa um papel essencial na virulência de *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2012), tal descoberta abriu um vasto campo de pesquisas envolvendo moléculas que atuam na homeostase desse metal. Mais além, sabendo da pequena diversidade de medicamentos antifúngicos disponíveis atualmente, bem como os casos de resistências aos medicamentos atuais, a homeostase de metais demonstra-se ser um promissor alvo para esse tipo de pesquisa (Prasad *et al.*, 2016; Sanglard, 2016; Simm *et al.*, 2011). O descobrimento de moléculas essenciais para a homeostase de zinco em patógenos fúngicos, bem como a melhor caracterização da homeostase de

zinco durante interação *C. gattii* e macrófagos são de extrema importância para melhor entender o processo evolutivo de patógenos fúngicos, podendo gerar dados para futuros estudos envolvendo o desenvolvimento de terapias alternativas, assim como do reposicionamento de fármacos.

## 2. REVISAO DA LITERATURA

### 2.1 *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

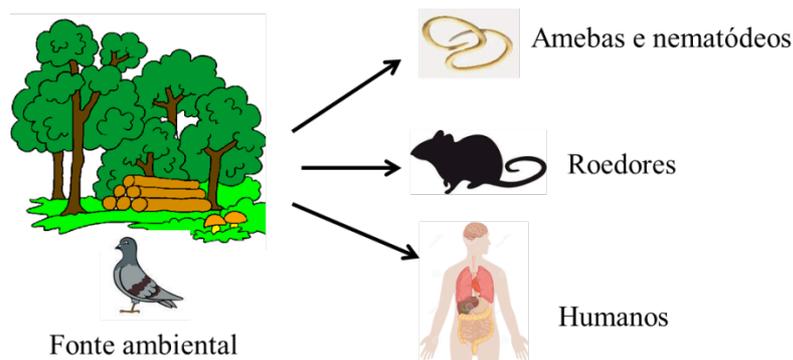
*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são agentes causadores da criptococose, doença que acomete humanos e animais (Kwon-Chung *et al.*, 2014). *C. neoformans* é conhecido por causar doença em indivíduos imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* é considerado um patógeno primário, infectando principalmente indivíduos imunocompetentes (Lin e Heitman, 2006). *C. neoformans* passou a ser considerado um importante patógeno humano oportunista. Tal importância ocorreu devido ao aumento nos números de indivíduos portadores de HIV/AIDS com criptococose causada por *C. neoformans*. Esta espécie é responsável por 1 milhão de casos de meningite criptocócica em pacientes com HIV por ano, ocasionando aproximadamente 650.000 mortes anuais (Park *et al.*, 2009). Devido ao alto número de casos distribuídos pelo mundo *C. neoformans* é considerado a espécie modelo do complexo, sendo amplamente estudada e seus mecanismos de virulência bastante esclarecidos até o momento (Maziarz e Perfect, 2016). Porém, após um surto de criptococose causado pela espécie *C. gattii* na Ilha de Vancouver e Columbia Britânica no Canadá, uma maior atenção passou a ser dada para essa espécie (Kidd *et al.*, 2004). Entretanto, é importante citar que o “título” de patógeno primário de *C. gattii* tem sido

discuto, visto que anticorpos anti Fator Estimulador de Crescimento de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) são detectados em pacientes infectados com *C. gattii*, mas não em amostras de indivíduos saudáveis (Saijo *et al.*, 2014), indicando um quadro de imunodeficiência o qual poderia predispor esses pacientes à criptococose (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012).

Desde a sua descoberta, a criptococose era considerada como uma doença causada apenas pela espécie *C. neoformans*. Posteriormente, estudos moleculares criaram uma nova divisão, *C. neoformans* var. *gattii*, a qual em 2002 foi categorizada como uma nova espécie, *C. gattii* (Kwon-Chung e Varma, 2006). Atualmente as duas espécies são divididas em 4 sorotipos, sendo *C. neoformans* (A e D) e *C. gattii* (B e C) (Aminnejad *et al.*, 2012). Além dos sorotipos, são classificadas em 4 tipos moleculares, sendo *C. neoformans* classificado em VNI, VNII, VNIII e VNIV, e *C. gattii* VGI, VGII, VGIII e VGIV (Byrnes *et al.*, 2011; Byrnes *et al.*, 2010; Kidd *et al.*, 2004; Kwon-Chung *et al.*, 2014). Porém, uma recente pesquisa realizada por Hagen e colaboradores identificou, por meio de estudos genotípicos sete espécies pertencentes ao grupo *C. neoformans/C. gattii*. Curiosamente foi constatada uma grande variabilidade genética entre as espécies (Hagen *et al.*, 2015). Apesar da nova proposta de Hagen e colaboradores, não existe até o momento uma caracterização biológica detalhada de cada uma das sete espécies, por isso o presente trabalho basear-se-á na classificação anterior, na qual *C. gattii* (sorotipo B e C) e *C. neoformans* (sorotipo A e D) são classificados como apenas duas espécies com seus respectivos sorotipos. Além disso, o modelo de estudo do presente trabalho foi *C. gattii* linhagem R265, porém, as informações que seguem abaixo nesta sessão irão abordar as duas espécies, visto que a maioria das características é compartilhada entre elas.

### 2.1.1 ECOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

*C. gattii* e *C. neoformans* estão presentes em uma grande variedade de ambientes. Sabe-se que apesar das duas espécies compartilharem de 80-90% do genoma, características bastante peculiares e distintas quanto à ecologia e patogenicidade são descritas (Chang *et al.*, 2015; Kavanaugh *et al.*, 2006). As duas espécies de leveduras podem ser isoladas de vegetais em decomposição e em bosques de diversas espécies de vegetais. A partir de fontes ambientais, as quais podem conter uma grande quantidade de partículas infectantes, o fungo poderá entrar em contato direto com diversos hospedeiros (Figura 1). Trabalhos publicados a partir de 2007 (Springer *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2007) demonstraram importantes características quanto ao desenvolvimento de *C. gattii* em vegetais. Essa espécie é capaz de completar seu ciclo sexual quando inoculado em *Arabidopsis thaliana*, foi demonstrada a formação de fibras extracelulares em hospedeiros vegetais, as quais possivelmente são importantes para a patogenicidade tanto de plantas quanto de animais. A espécie *C. neoformans* é particularmente abundante em excretas de aves. Sua forte associação com pombos serve como indício para os altos níveis de contaminação em áreas densamente urbanizadas (Chowdhary *et al.*, 2012; Hagen *et al.*, 2015; May *et al.*, 2016; Springer *et al.*, 2014). O mesmo ocorre com *C. gattii*, entretanto essa espécie é incapaz de completar seu ciclo sexual quando em excretas de aves (Nielsen *et al.*, 2007).



**Figura 1. Dispersão de partículas infectantes a partir de fontes ambientais.**

*Cryptococcus* encontra-se em fontes ambientais como bosques, vegetais em decomposição e excretas de aves. A dispersão do fungo se dá a partir do contato direto com hospedeiros (Springer e Chaturvedi, 2010). No caso de humanos, por inalação de partículas fúngicas (Maziarz e Perfect, 2016).

A capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro da célula do hospedeiro é um importante fator de virulência das espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. Analisando de um ponto de vista evolutivo, essa característica provavelmente foi adquirida por meio de adaptações evolutivas, pois sabe-se que essas espécies conseguem sobreviver e multiplicar-se em amebas e nematódeos presentes no solo (Malliaris *et al.*, 2004; Springer *et al.*, 2010). Considera-se que essa associação desenvolva um importante papel na virulência e distribuição geográfica de diversas linhagens pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, pois a permanência da célula fúngica no interior de amebas e nematódeos permitiria uma maior sobrevivência do patógeno frente à variações de temperaturas, baixa umidade, entre outras (Steenbergen *et al.*, 2001; Warpeha *et al.*, 2013).

Em relação à epidemiologia, aproximadamente 95% dos casos de criptococose são causadas pela espécie *C. neoformans* sorotipo A e 4-5% das infecções estão relacionadas com *C. neoformans* sorotipo D ou *C. gattii* sorotipos B/C. *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é encontrado em diversos continentes, enquanto *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) é encontrado mais restrito em países do continente

européu. Quanto à espécie *C. gattii*, historicamente era considerada restrita a regiões com clima tropical e subtropical, como sul da Califórnia, Brasil, Haváí, Austrália e África central (Chen *et al.*, 2014; Phillips *et al.*, 2015). Entretanto,, o surto de criptococose no Canadá e nordeste dos Estados Unidos demonstrou uma mudança na ecologia dessa espécie, podendo ser encontrada atualmente em clima temperado. Tal mudança pode ter sido ocasionada por mudanças climáticas, bem como alterações na umidade relativa do local (Kidd *et al.*, 2004).

### 2.1.2 CRIPTOCOCOSE

A criptococose inicia-se pela inalação de propágulos do fungos (Maziarz e Perfect, 2016; Park *et al.*, 2009), sendo esses considerados as leveduras dessecadas que estão no ambiente, pois é a principal forma infectante. São assim consideradas por possuírem um tamanho bastante reduzido (aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ ) em comparação com o tamanho de leveduras encapsuladas (4 – 10  $\mu\text{m}$ ), o que permite que sejam depositados mais facilmente no interior do alvéolo pulmonar (Velagapudi *et al.*, 2009). Esporos também são considerados importantes formas infectantes de *Cryptococcus*, além de possuírem tamanho reduzido, são mais facilmente dispersados pelo vento. Adicionalmente, por possuírem uma parede celular com maior espessura, são mais resistentes ao ambiente e ao estresse oxidativo. Apesar da produção de esporos nunca ter sido relatada na natureza, e infecção causada por esporos nunca ter sido documentada (Botts *et al.*, 2009; Botts e Hull, 2010), foi demonstrado experimentalmente que *Cryptococcus* é capaz de completar seu ciclo sexual quando inoculado em plantas em experimentos de laboratório (Xue *et al.*, 2007).

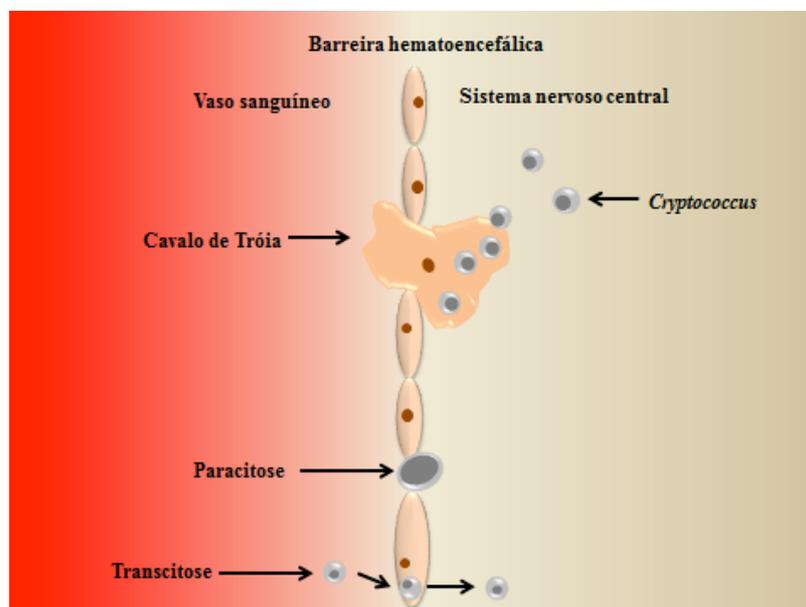
Além da infecção por inalação, já foi relatada infecção devido ferimento traumático em paciente que teve a mão perfurada por ferramenta de trabalho

(Christianson *et al.*, 2003). Entretanto, a principal forma de infecção continua sendo a inalação, na qual os propágulos alojam-se nos alvéolos pulmonares. Nesse ambiente as células fúngicas encontram os macrófagos alveolares, os quais representam a primeira linha de defesa do hospedeiro. O patógeno pode ser fagocitado e destruído bem como sobreviver e multiplicar-se no interior dessas células de defesa, dessa maneira podendo se dispersar a diversos órgãos do corpo (Alvarez e Casadevall, 2006; 2007).

Após infecção pulmonar e disseminação para corrente sanguínea o fungo poderá infectar o sistema nervoso central (SNC) causando meningoencefalite. Entretanto, para que ocorra infecção do SNC, o patógeno necessita atravessar barreiras epiteliais e endoteliais (Casadevall, 2010). Atualmente três mecanismos são descritos (Figura 2) (Liu *et al.*, 2012). O principal deles, denominado “Cavalo de Tróia”, ocorre quando o fungo alcança o SNC por meio de macrófagos, ultrapassando a barreira hematoencefálica (BHE). Uma forte evidência desse mecanismo é que células de *Cryptococcus* encontradas no sistema vascular cerebral normalmente estão em forte associação com células fagocíticas. Somado a isso, experimentos que demonstram que *Cryptococcus* é um patógeno intracelular facultativo e que a dispersão para outros sítios do corpo a partir do pulmão é associada a macrófagos, reforçam essa teoria (Charlier *et al.*, 2009). Em um trabalho publicado por Sorrell e colaboradores (Sorrell *et al.*, 2016), foram levantados dados comparativos quanto ao tropismo de *C. neoformans* e *C. gattii* no SNC. Taxas de extrusão mais elevadas de *C. neoformans* em macrófagos THP-1, após transmigração, sugerem que essa seja uma possível causa da maior incidência de infecção no SNC pela espécie *C. neoformans* em relação à espécie *C. gattii*.

O segundo mecanismo pelo qual o fungo consegue alcançar o SNC é denominado paracitose. Como demonstrado na Figura 2, a célula fúngica é capaz de atravessar a BHE entre as junções celulares, dessa maneira comprometendo a estrutura

das mesmas e alterando a integridade da BHE. Estudos relacionados aos mecanismos de transmigração comprovam a inibição da enzima urease é capaz de prevenir infecção do SNC por *C. neoformans*, demonstrando a participação dessa enzima para o patógeno atravessar capilares cerebrais (Shi *et al.*, 2010). O terceiro e último mecanismo descrito é a transcitose, no qual a travessia para o parênquima cerebral ocorre diretamente por meio das células endoteliais. Observações tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que *Cryptococcus* é internalizado pelas células endoteliais, movendo-se pelo citoplasma e emergindo no outro lado da superfície celular (Chang *et al.*, 2004; Sabiiti e May, 2012a; b; Vu *et al.*, 2014). Em um recente trabalho foi demonstrado que a produção e liberação da metaloprotease Mpr1 por *C. neoformans* é essencial para o remodelamento da membrana celular endotelial e por consequência para o processo de paracitose. Experimentos de infecção de camundongos com linhagens mutantes para Mpr1 demonstraram diminuição nos níveis de unidades formadoras de colônias no cérebro (Vu *et al.*, 2014).



**Figura 2. Mecanismos de infecção do sistema nervoso central.** Três mecanismos pelos quais células de *Cryptococcus* conseguem invadir o SNC são descritos. O mais conhecido é o mecanismo Cavalo de Tróia, onde *Cryptococcus* alcança o SNC por meio

de macrófagos infectados. Paracitose, a célula fúngica atravessa por entre as junções celulares, enquanto transcitose por meio das células endoteliais.

Manifestações clínicas de criptococose possuem uma grande variedade de sintomas. Dentre eles, podem ser citadas dor de cabeça, letargia, irritabilidade, febre, perda de memória, dentre outros sinais e sintomas (Maziarz e Perfect, 2016; Perfect e Casadevall, 2002). Os mesmos normalmente persistem por um período de diversas semanas. Entretanto, em pacientes com severa debilidade do sistema imune, os sintomas podem variar. Nesses pacientes normalmente ocorre uma infecção massiva no SNC, podendo chegar a 1 milhão de células fúngicas por mililitro (ml) de líquido cefalorraquidiano. Devido ao grande número de células fúngicas e por consequência, aumento na concentração de conteúdo polissacarídico no LCR irá ocasionar um aumento na pressão intracraniana, dessa maneira podendo levar a alterações nos sintomas (Maziarz e Perfect, 2016).

### **2.1.3 FATORES E MECANISMOS DE VIRULÊNCIA**

*C. gattii* apresenta o mesmo conjunto de determinantes de virulência que a espécie *C. neoformans*. Entre os mais conhecidos estão: produção de cápsula polissacarídica, produção do pigmento melanina, habilidade de crescimento a 37°C e capacidade de replicação intrafagossomal (Chen *et al.*, 2014). Além disso, um outro fator de virulência não tão estudado é a atividade da enzima urease, linhagens mutantes para proteínas acessórias, as quais são essenciais para ativação e por consequência atividade de urease, não possuem a mesma capacidade de replicação intrafagossomal que linhagem selvagem (Feder *et al.*, 2015). Entretanto, nesta sessão serão abordados e revisados alguns dos principais fatores de virulência *Cryptococcus*.

### 2.1.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA

Uma das características mais marcantes de espécies do gênero *Cryptococcus* é a produção de cápsula polissacarídica. Essa estrutura é composta por dois principais polissacarídeos, aproximadamente 90% de glucuronoxilomanana (GXM) e 10% de galactoxilomanana (GalXM) (Bose *et al.*, 2003; Vaishnav *et al.*, 1998; Zaragoza *et al.*, 2009). Foi demonstrado que GXM possui importantes propriedades imunomodulatórias, atuando diretamente na inibição da fagocitose por parte das células, inibindo a produção de citocinas de monócitos e o recrutamento de leucócitos (Coelho *et al.*, 2014; Ellerbroek *et al.*, 2004). Sabe-se que neutrófilos são ativados quando na presença de componentes estruturais de células de *Cryptococcus*, e que a liberação de citocinas por parte dessas células ocorre de maneira dose dependente na presença da cápsula (Retini *et al.*, 1996). Entretanto é sabido que neutrófilos são recrutados em qualquer sítio de infecção, e que CD18 é uma molécula de adesão diretamente envolvida nessa etapa da resposta imune. Além disso, moléculas presentes na cápsula possuem a capacidade de ligar-se à CD18, dessa maneira levando a uma inibição do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (Dong e Murphy, 1997).

Em um trabalho publicado em 2001 por Almeida e colaboradores, foi demonstrado que proteínas presentes na estrutura capsular de *Cryptococcus* induzem a uma resposta imune Th2 (Almeida *et al.*, 2001). Com esse perfil de resposta imune, ocorrerá uma inibição da ativação de células CD4+ e por consequência a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, sugere-se que GXM atue inibindo a proliferação de células T, enquanto GalXM induz apoptose nessas células (Gibson e Johnston, 2015; Pericolini *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi descoberto que a cápsula de *C. gattii* é capaz de inibir a maturação de células dendríticas por meio do bloqueio de receptores extracelulares (Huston *et al.*, 2016).

Portanto, fica claro que a cápsula polissacarídica desempenha importante papel na patogenicidade de *Cryptococcus*, criando um ambiente favorável para o crescimento das células fúngicas.

### **2.1.3.2 PRODUÇÃO DO PIGMENTO MELANINA**

Melanina é um pigmento hidrofóbico produzido por uma grande variedade de fungos. Encontra-se normalmente na parede celular desempenhando importante papel na proteção contra metais pesados, variações de temperatura e predadores naturais como as amebas, sendo esse fator de virulência de extrema importância para a patogenicidade desses micro-organismos (Malliaris *et al.*, 2004; Nosanchuk e Casadevall, 2006). Foi demonstrado que a deleção de genes envolvidos na melanização de *Cryptococcus* causa uma drástica redução na letalidade (Salas *et al.*, 1996) e disseminação no hospedeiro (Noverr *et al.*, 2004). Mais além, a inibição da melanização por meio de tratamentos com anticorpos e compostos químicos resultam em uma maior sobrevivência de camundongos infectados com *C. neoformans* (Nosanchuk e Casadevall, 2003; Nosanchuk *et al.*, 2001; Nosanchuk *et al.*, 2015).

Espécies do gênero *Cryptococcus* sintetizam melanina apenas na presença de substratos como L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e outros componentes polifenólicos (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Polacheck *et al.*, 1982). Tais substratos são metabolizados pela enzima lacase e depositados na parede celular na forma de melanina (Waterman *et al.*, 2007). O genoma de *C. neoformans* possui dois genes codificadores para lacase, *LAC1* e *LAC2*, sendo o primeiro o principal envolvido na produção do pigmento (Pukkila-Worley *et al.*, 2005). Sabe-se que o cérebro humano possui uma grande variedade de compostos fenólicos, tais como dopamina, norepinefrina e serotonina, entre outros. Todos esses compostos fenólicos podem servir de substrato

para enzima lacase na síntese de melanina. Tal característica pode explicar o forte tropismo de *Cryptococcus* pelo tecido cerebral, e a capacidade de síntese de melanina durante a infecção em roedores e humanos (Nosanchuk *et al.*, 2000; Nosanchuk *et al.*, 1999). Em relação à secreção do pigmento, estudos demonstram que vesículas associadas à parede celular apresentam atividade da enzima lacase, sugerindo uma possível participação dessas estruturas na síntese e secreção de melanina (Eisenman *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2008).

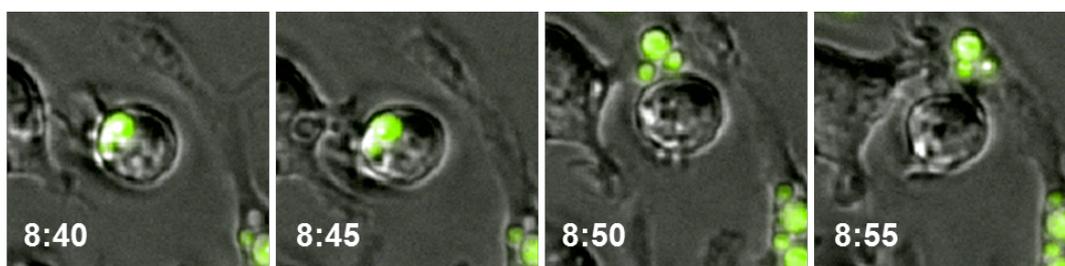
### **2.1.3.3 DESENVOLVIMENTO À 37 °C**

Em fungos patogênicos, a capacidade de crescimento à 37°C é uma característica essencial (Kraus *et al.*, 2004).. Diversos estudos genotípicos têm sido realizados para comprovar a importância da termotolerância na patogenicidade de *C. gattii*. Foi demonstrado que o dissacarídeo trealose é um importante antioxidante que atua na proteção contra estresses ambientais, o qual é produzido por meio da enzima trealose-6-fosfato sintase, codificada pelos genes *TPS1* e *TPS2*. Tais genes são essenciais para a patogenicidade dessa espécie, provavelmente devido a sua atuação na termotolerância, produção de cápsula e síntese de melanina (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009). Entretanto, em *C. neoformans*, genes homólogos codificadores para essa enzima também atuam na termotolerância e virulência dessa espécie, porém sua deleção não interfere na produção de cápsula nem na síntese de melanina (Petzold *et al.*, 2006). Em um estudo publicado em 2013 por Chen e colaboradores, foi demonstrada a importância do gene codificador para calcineurina *Cna1* na virulência e termotolerância de *C. gattii*, sendo o mecanismo pelo qual calcineurina promove a termotolerância conservado entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* (Chen *et al.*, 2013). Além disso, estudos de

expressão gênica demonstraram uma série de genes cuja regulação transcricional é alterada durante o aumento da temperatura. O gene codificador para enzima envolvida na biossíntese de ácidos graxos Mga2 atua no crescimento de *C. neoformans* em altas temperaturas, sugerindo assim, que o remodelamento da membrana celular é um importante fator de adaptação a 37°C (Kraus *et al.*, 2004).

#### 2.1.3.4 REPLICAÇÃO INTRAFAGOSSOMAL

Patógenos intracelulares possuem uma vasta gama de mecanismos para sobrepujar o sistema imune do hospedeiro. Micobactéria e *Salmonella*, por exemplo, possuem a habilidade de inibir a fusão de lisossomos com o vacúolo contendo patógeno (Xu *et al.*, 1994). Após a fagocitose, *Cryptococcus* é capaz de sobreviver e proliferar-se no interior de fagossomos (Voelz *et al.*, 2009), sugerindo que o ambiente intracelular possa servir como forma de proteção contra o sistema imune do hospedeiro. Também é comprovado que *C. neoformans* é capaz de realizar extrusão não lítica do interior de macrófagos, permitindo dessa maneira que tanto a célula fagocíticas quanto as células fúngicas permaneçam viáveis (Figura 3) (Alvarez e Casadevall, 2006). Por meio destes mecanismos, as células fúngicas podem ser liberadas no SNC pelo mecanismo Cavallo de Tróia (Charlier *et al.*, 2009).



**Figura 3. Evento de vomocitose.** Microscopia “Time-lapse” demonstrando a extrusão não lítica de uma linhagem de *C. neoformans* expressando proteína verde fluorescente

“Green fluorescent protein” (GFP). Pode-se observar que o macrófago permanece íntegro após o evento de vomocitose. Figura adaptada de Seoane, Schneider e May, 2016.

Quando internalizado, *Cryptococcus* é exposto a um ambiente não favorável para sua multiplicação e sobrevivência. O fagossomo é caracterizado por um baixo pH, presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Curiosamente, foi demonstrado que *C. neoformans* apresenta uma maior capacidade de replicação em ambientes ácidos ao invés de alcalino (Levitz *et al.*, 1999). Entretanto, Smith e colaboradores demonstraram que *C. neoformans* é capaz de inibir a acidificação, atividades de proteases e efluxo de cálcio no ambiente intrafagossomal, facilitando dessa maneira a sobrevivência no ambiente intracelular (Smith *et al.*, 2014). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo demonstrou que *C. gattii* linhagem R265 é capaz de induzir a alterar a morfologia de suas mitocôndrias para um fenótipo tubular quando no ambiente intrafagossomal. Tal mecanismo foi denominado como “divisão de trabalho”, onde uma célula internalizada realiza a indução da tubularização tornando-se resistente e não proliferativa, permitindo assim o desenvolvimento das outras células que também encontram-se internalizadas no macrófago. Devido ao fato de que a indução da tubularização inibe o desenvolvimento da célula, o ambiente intrafagossomal torna-se não favorável para a permanência da célula fúngica, dessa maneira, aumentando a patogenicidade do fungo (Voelz *et al.*, 2014).

## **2.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA *Cryptococcus***

Durante muitos anos pesquisas relacionadas à interação patógeno-hospedeiro eram voltadas para os fatores de virulência do patógeno. Acreditava-se que a linha de frente dessa interação era desenvolvida por parte do patógeno, o qual era considerado o agressor primário. Entretanto, diversas questões permaneciam não resolvidas, como: (i)

Por qual motivo não ocorre o desenvolvimento de uma doença no hospedeiro mesmo na presença do micro-organismo? (ii) Porque somente em certos tipos de hospedeiros desenvolvem a doença? (Casadevall e Pirofski, 1999; 2000). Atualmente, o processo de interação patógeno-hospedeiro é caracterizado como uma constante competição entre micro-organismos patogênicos e o sistema imune. Essa interação se dá quando o patógeno expressa fatores de virulência enquanto que o hospedeiro produz uma resposta de defesa. Além disso, a presença de micro-organismos patogênicos é rapidamente detectada pelo sistema imune inato, graças à presença de componentes estruturais altamente conservados que compõe o micro-organismo (Olive e Sasseti, 2016).

Durante o estabelecimento da infecção criptocócica uma série de respostas imunes inatas atuam para impedir a progressão da doença. Além das barreiras físicas como pele e mucosa, o sistema complemento e células fagocíticas são as principais defesas inespecíficas apresentadas pelo hospedeiro em resposta a *Cryptococcus* (Baum e Artis, 1961; 1963; Harrison, 2000; Voelz e May, 2010). O sistema complemento é uma cascata de proteínas séricas que atuam de diversas maneiras para inibir a progressão da infecção, onde a principal função desse sistema é o recrutamento de células fagocíticas e consequentemente aumento na fagocitose. Estudos realizados em modelos animais comprovaram que o sistema complemento é de extrema importância na resposta contra criptococose, pois animais tratados com bloqueadores do sistema demonstraram uma drástica redução no período de sobrevivência frente à infecção criptocócica (Diamond *et al.*, 1974; Rhodes, 1985). A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra *C. gattii* presente na corrente sanguínea, podendo-se considerar que opsonização e fagocitose “permitem” o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa no organismo (Mershon *et al.*, 2009). Células dendríticas apresentam papel crucial na resposta imune contra *Cryptococcus*, são consideradas a primeira rota de apresentação

de antígenos e estimulação de células T (Mansour *et al.*, 2006). Após a fagocitose, a ruptura da parede celular de *Cryptococcus* ocorre por meio de lise osmótica, onde o conteúdo da degradação é levado ao complexo principal de histocompatibilidade (CPH) classe II, apresentados aos linfócitos T e ocorrendo ativação da resposta imune adaptativa (Hole *et al.*, 2012; Wozniak *et al.*, 2006). Interessante citar que, aparentemente a resposta imune contra *C. gattii* demonstra peculiaridades que a diferem da resposta empregada contra *C. neoformans*. Adicionalmente, a inibição da resposta imune por parte de *C. gattii*, com a redução no recrutamento de leucócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias, podem explicar a capacidade de infecção de *C. gattii* em pacientes imunocompetentes (Cheng *et al.*, 2009; Leopold Wager *et al.*, 2016)

O desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa é essencial para a cura de indivíduos com criptococose. Um dos mecanismos ocorre por meio de anticorpos (Casadevall e Pirofski, 2005). Apesar de *Cryptococcus* ser um patógeno intracelular facultativo e normalmente encontrar-se protegido no interior de células fagocíticas, é descrito que a administração de anticorpos anti-capsulares prolonga a sobrevivência de camundongos infectados, bem como a redução na dispersão do patógeno no organismo (Fleuridor *et al.*, 1998). Após opsonização da célula de *Cryptococcus*, o reconhecimento pelas células fagocíticas e fagocitose ocorre via receptores Fc e por ativação do sistema complemento (Netski e Kozel, 2002). Outro mecanismo de resposta imune adaptativa ocorre por meio das células de defesa, contribuindo para a morte de células de *Cryptococcus* via efeitos citotóxicos de células natural killer (NK) e linfócitos T. Células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NK apresentam direta atividade antimicrobiana contra *C. neoformans* (Levitz *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2007). Além disso, a secreção de proteínas como granulolisinas e perforinas causam a permeabilização e a lise da célula fúngica (Voskoboinik *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008).

## **2.2.1 IMUNIDADE NUTRICIONAL DE MICRONUTRIENTES**

Diversos nutrientes são essenciais tanto para o hospedeiro humano quanto para o micro-organismo invasor (Prentice *et al.*, 2007). Além das respostas imunes clássicas impostas pelo hospedeiro, a capacidade de privação de nutrientes é um importante mecanismo de defesa durante a invasão de micro-organismos patogênicos (Doherty, 2007). Foi demonstrado que tanto fagócitos quanto células epiteliais possuem a capacidade de restringir a disponibilidade de nutrientes no âmbito de diminuir a proliferação de micro-organismos patogênicos (Hood e Skaar, 2012; Proud e Leigh, 2011). Dentre os nutrientes restringidos durante um processo infeccioso, destacam-se micronutrientes. Devido ao fato de que micronutrientes metálicos como o ferro, zinco, cobre e manganês são essenciais e participam de uma grande variedade de processos bioquímicos, tanto as células de hospedeiros mamíferos quanto patógenos desenvolveram mecanismos de aquisição desses metais (Kehl-Fie e Skaar, 2010; Weinberg, 2009; Zhao *et al.*, 1998). Tais mecanismos geram uma constante disputa por nutrientes durante a interação patógeno-hospedeiro. Nesta sessão serão revisadas as principais características da interação patógeno-hospedeiro relacionadas a ferro, cobre e zinco, bem como a homeostase desses metais em fungos.

### **2.2.1.1 FERRO**

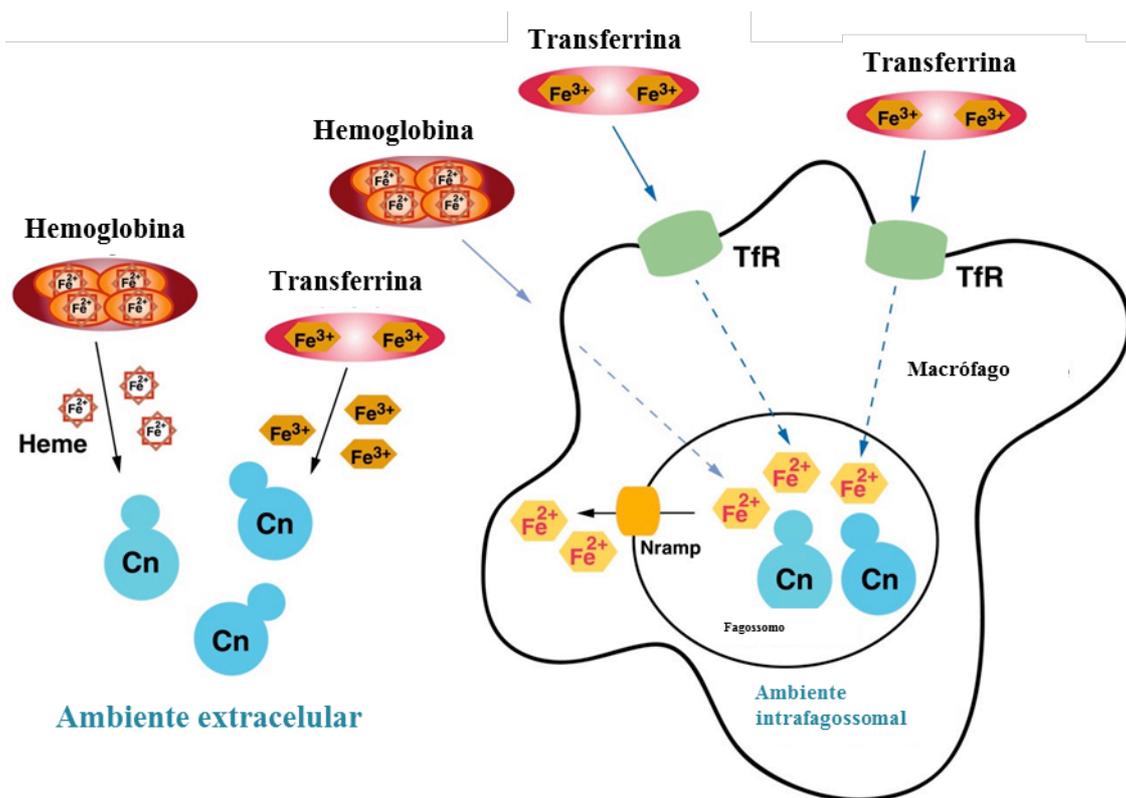
Dentre os micronutrientes envolvidos no processo de interação patógeno-hospedeiro o ferro é um dos mais estudados e caracterizados até o momento. A disponibilidade desse metal no corpo humano é bastante baixa, onde aproximadamente 70% do ferro está ligado a proteínas como hemoglobina e transferrinas (Hentze *et al.*,

2004). Durante o processo infeccioso, variações na disponibilidade ferro podem levar ao desencadeamento de uma forma mais agressiva da doença e por consequência a morte do indivíduo (Doherty, 2007). O excesso de ferro no organismo causa um quadro mais grave de meningoencefalite durante a infecção por *C. neoformans* em camundongos (Barluzzi *et al.*, 2002). Estudos de proteômica demonstraram que a privação de ferro em *C. gattii* induz o aumento na expressão de genes codificadores para proteínas envolvidas na formação capsular e melanização, importantes fatores de virulência, entre elas UDP-glicose desidrogenase e GMC-oxiredutase (Crestani *et al.*, 2012). Além disso, a patogenicidade de *C. neoformans* está diretamente relacionada com o metal ferro. Baixas concentrações desse metal induzem a um aumento na cápsula polissacarídica, diminuição na síntese de melanina devido à repressão da enzima lacase, além de alterações na capacidade de desenvolvimento a 37°C (Walton *et al.*, 2005).

Patógenos fúngicos desenvolveram uma série de mecanismos para aquisição de ferro, esse elemento pode ser adquirido a partir de grupamento heme, sideróforos entre outras proteínas quelantes de ferro (Weissman e Kornitzer, 2004). Alguns fungos patogênicos conseguem utilizar o ferro complexado em hemoglobinas e transferrinas a partir da produção de proteínas quelantes de alta afinidade, os sideróforos (Schaible e Kaufmann, 2004). Tais proteínas apresentam diferentes estruturas, porém, todas possuem capacidade de se ligar e solubilizar ferro com alta afinidade. Utilizando como exemplo o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, o sideróforo secretado por essa espécie é capaz de sequestrar ferro ligado à transferrinas (Hissen *et al.*, 2004). O mesmo não ocorre no fungo patogênico *Candida albicans*, a qual não possui maquinaria enzimática para a produção de tais moléculas. Entretanto, possui mecanismos para atração e lise de eritrócitos para a utilização de ferro presente na hemoglobina dessas células (Hu *et al.*, 2002; Manns *et al.*, 1994; Moors *et al.*, 1992). A aquisição de ferro

ligado a sideróforos em *C. albicans* ocorre por meio de redutases presentes na membrana plasmática. Tais proteínas causam a redução do íon férrico  $\text{Fe}^{3+}$  a ferroso  $\text{Fe}^{2+}$ , que pode ser absorvido pela célula do patógeno (Knight *et al.*, 2005).

Em relação aos mecanismos de captura de ferro em *Cryptococcus*, é descrito que *C. neoformans* realiza esse processo a partir da redução de  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  por meio da redutase Fre, a qual encontra-se na superfície celular. Após redução, o transporte é realizado por meio do complexo formado pela permease Cft1 e ferroxidase Cfo1, também localizado na membrana plasmática. Esse mecanismo é utilizado por células de *C. neoformans* as quais se encontram no ambiente extracelular (Figura 4) (Jung e Kronstad, 2008).



**Figura 4. Captura de ferro por *C. neoformans* no meio extra e intracelular.** *C. neoformans* é utiliza ferro proveniente de grupamento heme e transferrinas. Quando no ambiente intrafagossomal, sob pH ácido, o íon ferroso é a principal fonte de ferro obtida a partir de hemoglobinas, ferritinas e transferrinas. No meio extracelular, o fungo é

capaz de reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  e realizar o transporte do metal via Cft1/Cfo1 (Jung e Kronstad, 2008). Figura adaptada de (Jung e Do, 2013).

Sabe-se que o conteúdo de íon ferroso livre presente no fagossomo celular é proveniente de ferritinas e transferrinas produzidas pelo hospedeiro. Em contrapartida, a privação do conteúdo de ferro e manganês no fagossomo é realizada principalmente por transportadores do tipo NRAMP, os quais exportam os metais para fora dessas estruturas, dessa maneira privando o acesso à metais (Figura 4) (Hood e Skaar, 2012). Entretanto, não se sabe ao certo quais são os mecanismos utilizados por *C. neoformans* para captura de  $\text{Fe}^{2+}$  enquanto no ambiente intrafagossomal. Tal dúvida deve-se ao fato que o sistema composto por Cft1 e Cfo1 atua somente quando *C. neoformans* encontra-se em pH neutro, visto que o ambiente intrafagossomal de macrófagos é caracterizado por um pH ácido (Jung e Kronstad, 2008). Foi demonstrado por Jung e colaboradores que a privação de ferro em pH ácido não interfere no crescimento de *C. neoformans* mutante para os genes *CFT1* e *CFO1*, adicionalmente, a deleção gênica de *CFT1* e *CFO1* ocasiona atenuação na virulência do patógeno (Han *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2009). Portanto, fica claro que outros mecanismos de transportes estariam atuando em *C. neoformans* durante o ambiente intrafagossomal.

### **2.2.1.2 COBRE**

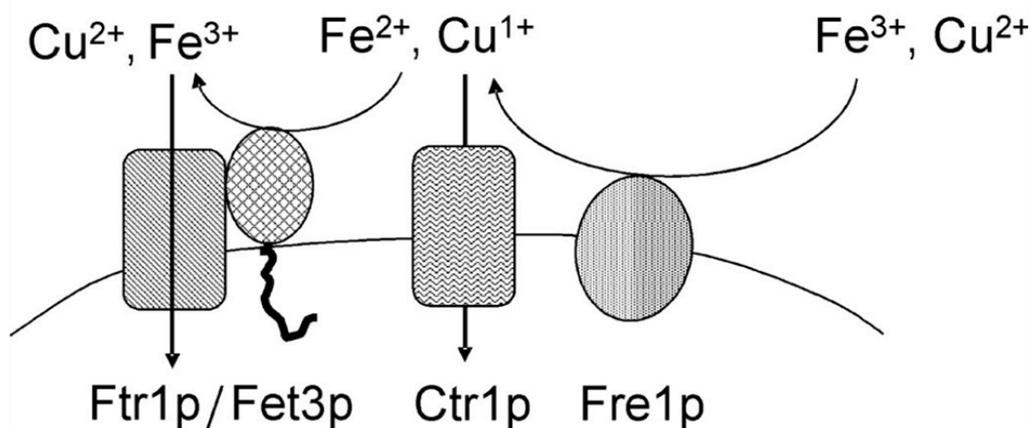
Cobre é um metal essencial para todos os seres vivos, servindo de cofator para diversos processos biológicos, como resistência ao estresse oxidativo, produção de energia, produção de melanina e transdução de sinais (Samanovic *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014). O metal cobre está presente na estrutura de uma grande diversidade de metaloenzimas, as quais desempenham funções essenciais no metabolismo das células, reações de redução do metal durante processos enzimáticos são indispensáveis para o

funcionamento de enzimas antioxidantes (Linder e Hazegh-Azam, 1996). Em contrapartida, o excesso de cobre no organismo poderá gerar um ambiente tóxico, levando a um aumento na produção de radicais livres, causando danos na membrana celular, ácidos nucleicos e proteínas (Linder e Hazegh-Azam, 1996; Raja *et al.*, 2013). Conseqüentemente, as células necessitam acumular uma quantidade mínima do metal para o devido funcionamento de metaloproteínas e de processos biológicos (Labbé e Thiele, 1999). Diferentemente de ferro, o hospedeiro utiliza-se do aumento nos níveis de cobre para conter a disseminação de patógenos durante processos infecciosos (Samanovic *et al.*, 2012).

Pesquisas relacionadas ao metabolismo de cobre em *S. cerevisiae* permitiram um melhor entendimento da homeostase desse metal em modelos de fungos patogênicos (Nevitt *et al.*, 2012). Muitas proteínas ligadoras de cobre influenciam diretamente na virulência, entre elas podemos citar superóxido dismutase (SOD), citocromo oxidase e lacase (Ding *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2008a; Samanovic *et al.*, 2012). O metabolismo desse metal está diretamente relacionado com o metabolismo de ferro, em *S. cerevisiae* a redução de  $\text{Cu}^{2+}$  ocorre por meio das redutases de ferro/cobre, Fre1 e Fre2. Após redução, o transporte é realizado através de transportadores de alta afinidade Ctr1, Ctr2 e Ctr3, sendo Ctr1 e Ctr3 localizados na membrana plasmática (Figura 5), enquanto Ctr2 está localizado na membrana vacuolar (Rees e Thiele, 2004; 2007). Em relação aos mecanismos de aquisição de cobre em fungos patogênicos, é sabido que são essenciais para o processo infeccioso. Em *C. albicans*, por exemplo, linhagens mutantes para Ctr1 apresentam alterações na morfologia celular, bem como alterações no crescimento filamentosos (Marvin *et al.*, 2003).

O genoma de *C. neoformans* contém diversos genes codificadores para transportadores de cobre. Dentre eles, *CTR1* e *CTR4* são regulados pela disponibilidade

do metal, estão envolvidos em mecanismos de captura e apresentam funções redundantes. Entretanto, sugere-se que *CTR4* desempenhe papel direto na virulência do patógeno, visto que durante a infecção pulmonar, *Cryptococcus* depara-se com elevadas concentrações de cobre e mesmo nesse ambiente a expressão de *CTR4* se mantém constante (Ding *et al.*, 2011). Além de *CTR1* e *CTR4*, foram caracterizadas proteínas envolvidas em processos de detoxificação de cobre, as metalotioneínas codificadas por *CMT1* e *CMT2*. Tais proteínas desempenham papel essencial durante infecção pulmonar, visto que linhagens mutantes para esses transportadores apresentam virulência atenuada, além de uma menor capacidade de proliferação em pulmões de camundongos. Importante citar que a regulação desses genes é realizada pelo fator de transcrição Cuf1, o qual se liga à região promotora de *CTR1/CTR4* em condições de privação de cobre, enquanto que em *CMT1/CMT2* em condições de excesso do metal (Ding *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2011).



**Figura 5. Mecanismo de redução e transporte de cobre/ferro em *S. cerevisiae*.** A redução de  $\text{Cu}^{2+}$  em  $\text{Cu}^{1+}$  e de  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  é realizada pela redutase de Fre1, com subsequente transporte por meio de Ctr1. Enquanto que a oxidação e transporte por meio do complexo Fet3/Ftr1. Adaptado de (Shi *et al.*, 2003).

### 2.2.1.3 ZINCO

Zinco é um micronutriente que participa das funções catalíticas de diversas enzimas (Cerasi *et al.*, 2013). Estima-se que aproximadamente 3% do proteoma de *S. cerevisiae* requeira zinco para seu funcionamento (Eide, 1998). Dentre as proteínas encontram-se Cobre-Zinco superóxido dismutase, álcool desidrogenase e fosfatase alcalina (Andreini e Bertini, 2012). Também em *S. cerevisiae*, foi demonstrada relação entre o metabolismo de fosfolípídeo e a homeostase de zinco, onde tanto a atividade quanto a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de fosfolípídeos são alteradas de acordo com os níveis de zinco na célula (Carman, 2005; Carman e Han, 2007). Em humanos, a deficiência do metal pode afetar funções cognitivas, desenvolvimento embrionário, integridade epitelial e imunidade (Rajakumar *et al.*, 2016). Entretanto, o excesso de zinco pode ser tóxico para a célula, ligando-se em sítios proteicos inapropriados interferindo diretamente na função de diversas proteínas. Como por exemplo, a ligação inapropriada na enzima aconitato hidratase levando a alterações nas funções mitocondriais durante o processo de respiração celular (Costello *et al.*, 1997; Jung, 2015). Portanto, células necessitam manter níveis suficientes do metal para seu devido funcionamento, sem que ocorram ligações inespecíficas em proteínas (Cerasi *et al.*, 2013; Colvin *et al.*, 2010).

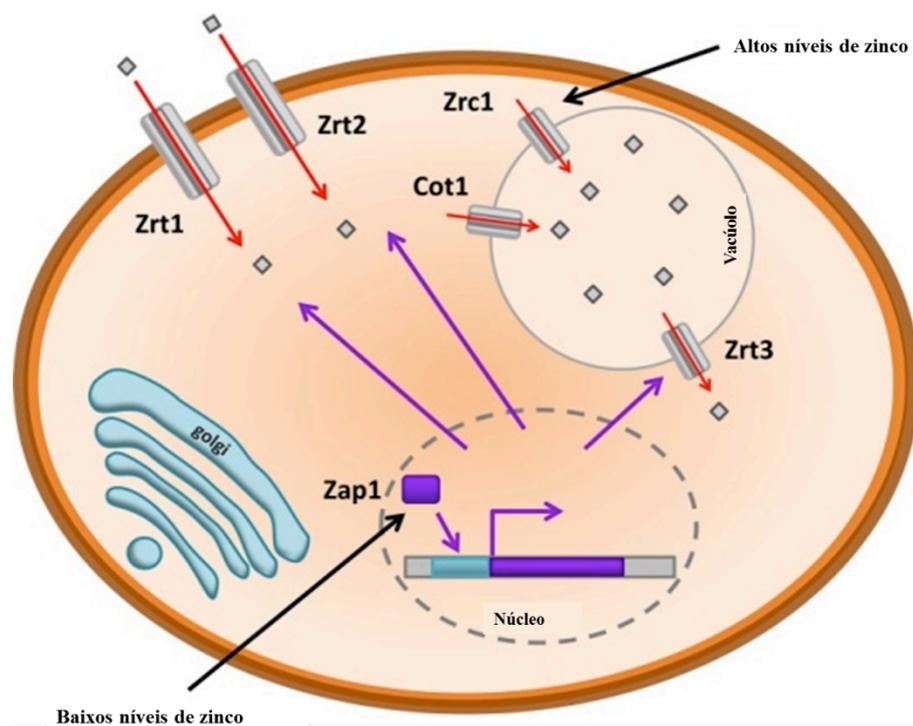
Sabe-se que em mucosas e superfícies epiteliais ocorre a liberação de proteínas com atividade antimicrobianas. Tais proteínas, pertencentes à família de proteínas S100, são secretadas por queratinócitos e outras células, inibindo o crescimento microbiano por meio do sequestro de metais. Entre elas, a proteína S100A7 inibe o crescimento microbiano por meio do sequestro de  $Zn^{2+}$  (Hood e Skaar, 2012). Porém, não somente em epitélios e mucosas ocorre esse tipo de defesa. Neutrófilos, são as células produtoras

dos complexos calprotectinas, os quais são heterodímeros que podem ser formados pela proteína S100A8 (calgranulina A) ou S100A9 (calgranulina B). Tais complexos compõem aproximadamente 50% do conteúdo proteico dessas células, e estão envolvidos em processos de defesa contra *C. albicans* por meio do sequestro de  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ . (Corbin *et al.*, 2008; Urban *et al.*, 2009).

Em leveduras, genes envolvidos no transporte/homeostase de zinco são regulados a nível transcricional em resposta a variações na disponibilidade do metal. Tal característica é o que permite uma refinada caracterização da homeostase do metal nesses organismos modelos, os quais mantem os níveis de zinco no citoplasma através de mecanismos de influxo e efluxo (Wilson e Bird, 2016). Em *S. cerevisiae*, o metabolismo de zinco é bastante estudado. Através de caracterizações gênicas, Eide e colaboradores levantaram importantes dados relacionados às moléculas envolvidas na homeostase desse metal. Entre as moléculas, o fator de transcrição Zap1 apresentou-se como o principal regulador desse processo metabólico (Zhao e Eide, 1997). Diversos trabalhos, os quais envolvem experimentos de transcriptoma, demonstraram que Zap1 regula a expressão de aproximadamente 80 genes em resposta a disponibilidade de zinco, sendo a grande maioria essenciais para a sobrevivência e adaptação da célula em condições de privação do metal (Lyons *et al.*, 2000a).

O genoma de *S. cerevisiae* possui diversos genes codificadores para transportadores de zinco. Dentre eles, os transportadores de zinco da família ZIP destacam-se pelo seu papel essencial na homeostase do metal. Até o momento, três transportadores pertencentes a essa família são caracterizados nessa espécie, o de alta afinidade *ZRT1* (Zhao e Eide, 1996a) e os de baixa afinidade *ZRT2* e *ZRT3* (Macdiarmid *et al.*, 2000; Zhao e Eide, 1996b). Experimentos de deleção gênica demonstram que mutantes nulos para *Zrt1* apresentam um menor crescimento quando submetidos à

privação de zinco (Zhao e Eide, 1996a). O mesmo fenótipo não foi observado para mutantes nulos *Zrt2*, porém um menor conteúdo intracelular de zinco é observado nessas linhagens (Zhao e Eide, 1996b). Além disso, outros transportadores não pertencentes à família *ZIP* também são caracterizados, dentre eles, o transportador multimetal *Fet4* atua tanto na homeostase de ferro quanto de zinco (Dix *et al.*, 1997; Jensen e Culotta, 2002). A proteína *Zrc1* está localizada na membrana vacuolar, possui 6 domínios transmembrana e atua no transporte de ferro e zinco (Miyabe *et al.*, 2001). Assim como *Cot1*, também localizada em membranas de vacúolos, é capaz de realizar transporte tanto de cobalto quanto de zinco (Conklin *et al.*, 1992; Crawford e Wilson, 2015) (Figura 6)



**Figura 6. Metabolismo de zinco em *S. cerevisiae*.** Transportadores de alta (*Zrt1*) e baixa (*Zrt2*) afinidade realizam o transporte do metal para o citoplasma celular, enquanto que *Zrt3*, *Zrc1* e *Co1* atuam nos vacúolos celulares. A regulação da expressão

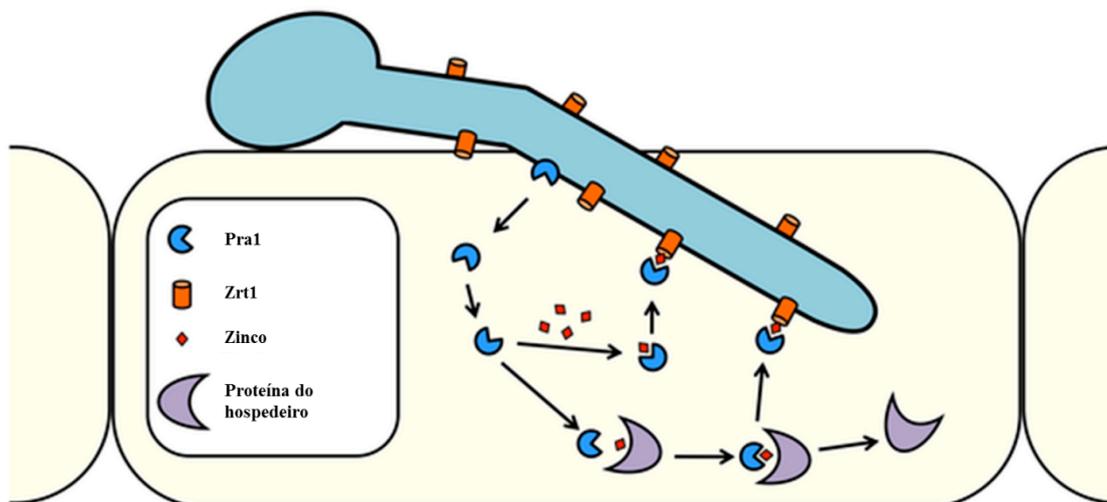
dos genes codificadores para os transportadores de zinco da família ZIP é realizada pelo fator de transcrição Zap1, o qual também tem sua expressão regulada pela disponibilidade de zinco. Figura adaptada Crawford e Wilson, 2015.

## 2.3 HOMEOSTASE DE ZINCO E FUNGOS PATOGÊNICOS

Uma grande diversidade de mecanismos de transporte zinco ocorre em fungos patogênicos. Entretanto, os mecanismos de regulação transcricional de genes codificadores para tais transportadores apresentam-se altamente conservados entre as espécies. O regulador transcricional Zap1, é caracterizado em três diferentes espécies de fungos patogênicos: *A. fumigatus* (Moreno *et al.*, 2007), *C. albicans* (Nobile *et al.*, 2009) e *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2012). Importante notar que a deleção do gene codificador para os homólogos de Zap1 causa atenuação na virulência nas três espécies, tal fato demonstra que um período evolutivo de aproximadamente 500 milhões de anos comprova a necessidade de uma regulação na homeostase de zinco em fungos patogênicos (Wilson, 2015). Além da regulação, patógenos fúngicos desenvolveram refinados mecanismos de captura de zinco para o estabelecimento de infecções. Em *A. fumigatus*, são descritos oito genes codificadores para transportadores de zinco da família ZIP (Zrf), os quais são os principais transportadores de zinco nessa espécie, além de oito genes codificadores para transportadores do tipo facilitadores de difusão de cátions, *cation diffusion facilitator* (CDF) (Amich e Calera, 2014). Similarmente à regulação gênica desempenhada por Zap1 em *S. cerevisiae*, *A. fumigatus* possui o regulador transcricional ZafA, que quando em ambiente ácido e com limitação de zinco liga-se às regiões promotoras de *zrfA* e *zfrB* induzindo a expressão dos mesmos. Além disso, mutantes nulos para o regulador transcricional apresentam fenótipo avirulento,

devido à redução no conteúdo de zinco o que inibe o crescimento de tubos germinativos (Moreno *et al.*, 2007; Vicentefranqueira *et al.*, 2005).

Em *C. albicans*, diversos estudos demonstram o papel da homeostase de zinco na morfologia, formação de biofilme e virulência. A grande maioria dos estudos é baseada no papel desempenhado pelo homólogo de Zap1 de *S. cerevisiae*, que em *C. albicans* é denominado Csr1. Foi demonstrado que mutantes nulos para Csr1 apresentam atenuação na virulência, deficiência de crescimento na condição de privação de zinco, má formação de biofilme, incapacidade de formação de tubos germinativos e hifas (Kim *et al.*, 2008b; Wilson e Bird, 2016). Em um trabalho publicado por Citiulo e colaboradores, foi descrito o mecanismo utilizado para captura de zinco por *C. albicans* durante invasão endotelial. Nesse modelo, o zincóforo Pra1 é secretado pelo fungo ligando-se a zinco livre presente no citoplasma celular do hospedeiro. Por meio de uma região complementar a Zrt1 de *C. albicans*, a proteína carregada com o metal liga-se ao transportador, o qual realiza o importe do metal para o interior da célula fúngica (Figura 7). Além disso, foi demonstrado que a deleção de *PRA1* reduz a formação de hifas na condição de limitação de zinco, mesmo fenótipo observado em linhagens mutantes para *ZRT1* (Citiulo *et al.*, 2012).



**Figura 7. Mecanismo de captura de zinco por *C. albicans* durante invasão endotelial.** Pra1 é secretada e liga-se tanto ao zinco livre quanto ao zinco complexado em proteínas do hospedeiro. Reassociação e transporte de zinco na superfície do hospedeiro ocorre via interação Pra1-Zrt1. Figura adaptada de Citiulo e colaboradores, 2012.

Em um trabalho publicado pelo nosso grupo, descrevemos o papel desempenhado por Zap1 em *C. gattii*. Nesse modelo, o fator de transcrição, o qual é homólogo de Zap1 de *S. cerevisiae*, demonstrou-se ser o principal regulador da homeostase de zinco. A linhagem mutante para Zap1 apresentou baixos níveis de zinco intracelular, redução do crescimento na condição de privação de zinco, bem como um aumento nos níveis de ERO intracelular. Tais características geram fenótipo avirulento da linhagem *zap1Δ*, a qual apresentou maior susceptibilidade à fagocitose por macrófagos RAW264.7, bem como uma menor virulência em modelo de infecção murino. No mesmo estudo, uma análise de transcriptoma da linhagem *zap1Δ* foi realizada. Diversos genes apresentaram-se diferencialmente expressos na linhagem mutante, entre eles estão os transportadores de zinco da família ZIP e proteínas envolvidas no metabolismo de EROs (Schneider *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que Zap1 apresenta uma conservação em seu *regulon*, mediando a modulação positivamente a expressão de transportadores de zinco da família Zip e negativamente a expressão de proteínas ligadoras de zinco, o que disponibilizaria zinco para processos biológicos mais importantes durante a privação de zinco, como a resposta antioxidativa mediada por Cu/Zn SOD. Considerando os três organismos em que foi constatada esta conservação do *regulon* (*S. cerevisiae*, *C. gattii* e *C. albicans*), pode-se constatar que o estabelecimento da capacidade infectiva em organismos fúngicos conservou a regulação da homeostase de zinco como estratégia

para adaptação no hospedeiro (Kim *et al.*, 2008b; Schneider *et al.*, 2012; Staats *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 1998).

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o metabolismo de zinco em *C. gattii*, com ênfase na caracterização dos mecanismos de transporte desse metal, e sua relação no processo de interação *C. gattii*-hospedeiro.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de linhagens mutantes nulos e mutantes nulos complementados de *C. gattii* R265 para os genes *ZIP1* (CNBG\_6066) e *ZIP2* (CNBG\_2209);
- Análise de expressão de genes codificadores para transportadores da família ZIP na linhagem selvagem e linhagens mutantes;
- Avaliação da capacidade de expressão dos principais fatores de virulência de *C. gattii* nos mutantes gerados;
- Quantificação dos níveis de EROs intracelular nos mutantes gerados;
- Quantificação dos níveis de zinco intracelular nos mutantes gerados;
- Testes de virulência em modelos *ex vivo* e *in vivo*;- Avaliação da atividade antifúngica de macrófagos em resposta à disponibilidade de zinco;
- Análise dos níveis zinco em macrófagos infectados com *C. gattii*;
- Análise de expressão de *Znt4* em macrófagos infectados ou não com *C. gattii*;

## 4. RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão distribuídos em dois capítulos. O primeiro capítulo (item 4.1) trata da caracterização funcional dos genes *ZIP1* e *ZIP2* de *C. gattii*. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na forma de um artigo científico no periódico *Scientific Reports* (Schneider *et al.*, 2015) Já os resultados apresentados no segundo capítulo (item 4.2), referem-se à caracterização de mecanismos utilizados por macrófagos para realizar a privação de zinco, quando infectados por *C. gattii*.

#### **4.1 CAPÍTULO I: *Effects of zinc transportes on Cryptococcus gattii virulence.***

Artigo publicado na revista *Scientific Report* em 30 de Março de 2015 (Schneider *et al.*, 2015).

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence

Rafael de Oliveira Schneider<sup>1</sup>, Camila Diehl<sup>1</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>1</sup>,  
 Alícia Corbellini Piffer<sup>1</sup>, Ane Wichine Acosta Garcia<sup>1</sup>, Marcos Iuri Roos Kulmann<sup>1</sup>,  
 Augusto Schrank<sup>1,2</sup>, Lívia Kmetzsch<sup>1,2</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>1,2</sup> & Charley C. Staats<sup>1,2</sup>

Received: 06 January 2015

Accepted: 30 March 2015

Published: 07 May 2015

Zinc is an essential nutrient for all living organisms because it is a co-factor of several important proteins. Furthermore, zinc may play an essential role in the infectiousness of microorganisms. Previously, we determined that functional zinc metabolism is associated with *Cryptococcus gattii* virulence. Here, we characterized the ZIP zinc transporters in this human pathogen. Transcriptional profiling revealed that zinc levels regulated the expression of the *ZIP1*, *ZIP2* and *ZIP3* genes, although only the *C. gattii* zinc transporter *Zip1* was required for yeast growth under zinc-limiting conditions. To associate zinc uptake defects with virulence, the most studied cryptococcal virulence factors (i.e., capsule, melanin and growth at 37 °C) were assessed in *ZIP* mutant strains; however, no differences were detected in these classical virulence-associated traits among the mutant and WT strains. Interestingly, higher levels of reactive oxygen species were detected in the *zip1Δ* and in the *zip1Δ zip2Δ* double mutants. In line with these phenotypic alterations, the *zip1Δ zip2Δ* double mutant displayed attenuated virulence in a murine model of cryptococcosis. Together, these results indicate that adequate zinc uptake is necessary for cryptococcal fitness and virulence.

The basidiomycete yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the etiological agents of cryptococcosis, a life-threatening disease that is generally characterized by meningoencephalitis. Cryptococcal infections are responsible for approximately 1 million cases of meningoencephalitis annually, resulting in approximately 625,000 deaths, principally in HIV-infected individuals<sup>1</sup>. Although *C. neoformans* infects mainly immunocompromised patients, *C. gattii* can cause disease in immunocompetent patients<sup>2,3</sup>. Recently, *C. gattii* has gained attention due to an outbreak that occurred in Canada and spread into the United States<sup>4</sup>.

A wide range of strategies is used by the immune system to control the proliferation of infectious agents. For example, macrophages and other phagocytes produce a harsh intracellular environment that is unfavorable for microbial development. This cellular compartment is characterized by extremely low pH and the presence of reactive nitrogen and oxygen species (ROS), enzymes and antimicrobial peptides<sup>5</sup>. Additionally, the host immune system can restrict the availability of essential metals in a process called nutritional immunity. One example is the restriction of iron availability, which is a well-characterized defense mechanism against infections<sup>6</sup>. However, nutritional immunity is not limited to iron withholding<sup>7</sup>. Zinc is an essential element for all organisms and is required for the functions of many proteins with catalytic and structural roles<sup>8</sup>. Recently, we demonstrated that the proper regulation of zinc metabolism is important for the virulence of the human pathogen *C. gattii* because the absence of the master zinc metabolism regulator *Zap1* impaired the virulence of this pathogen<sup>9</sup>. Furthermore, an association between the regulation of zinc metabolism and virulence in pathogenic fungi was observed in *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*, where the inactivation of *Zap1* orthologs impaired the infection process<sup>10,11</sup>.

Fungal zinc homeostasis has been best characterized in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*<sup>12,13</sup>, in which proteins of the ZIP family of zinc transporters take up this metal. ZIP zinc transporters

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia. and <sup>2</sup>Departamento 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. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.C.S. (email: staats@cbiot.ufrgs.br)

are found in all life domains and were named based on the first identified members (Zrt1p from *S. cerevisiae* and IRT-like protein from *Arabidopsis thaliana*). While Zrt1p was characterized as a zinc transporter, IRT were able to transport iron<sup>14</sup>. Zinc metabolism is a potential target for the development of antifungal drugs because some fungal pathogens demonstrate greater sensitivity to deprivation of zinc than iron<sup>15</sup>. Moreover, recent work demonstrated that some drugs led to alterations in the expression of zinc homeostasis-related genes in *S. cerevisiae*<sup>16</sup>. Despite the importance of *C. gattii* as a pathogen, zinc metabolism is still poorly characterized in this fungus. Here, we describe the functional characterization of ZIP zinc transporters in *C. gattii* R265, their role in zinc metabolism and the effects of gene deletion on cryptococcal virulence.

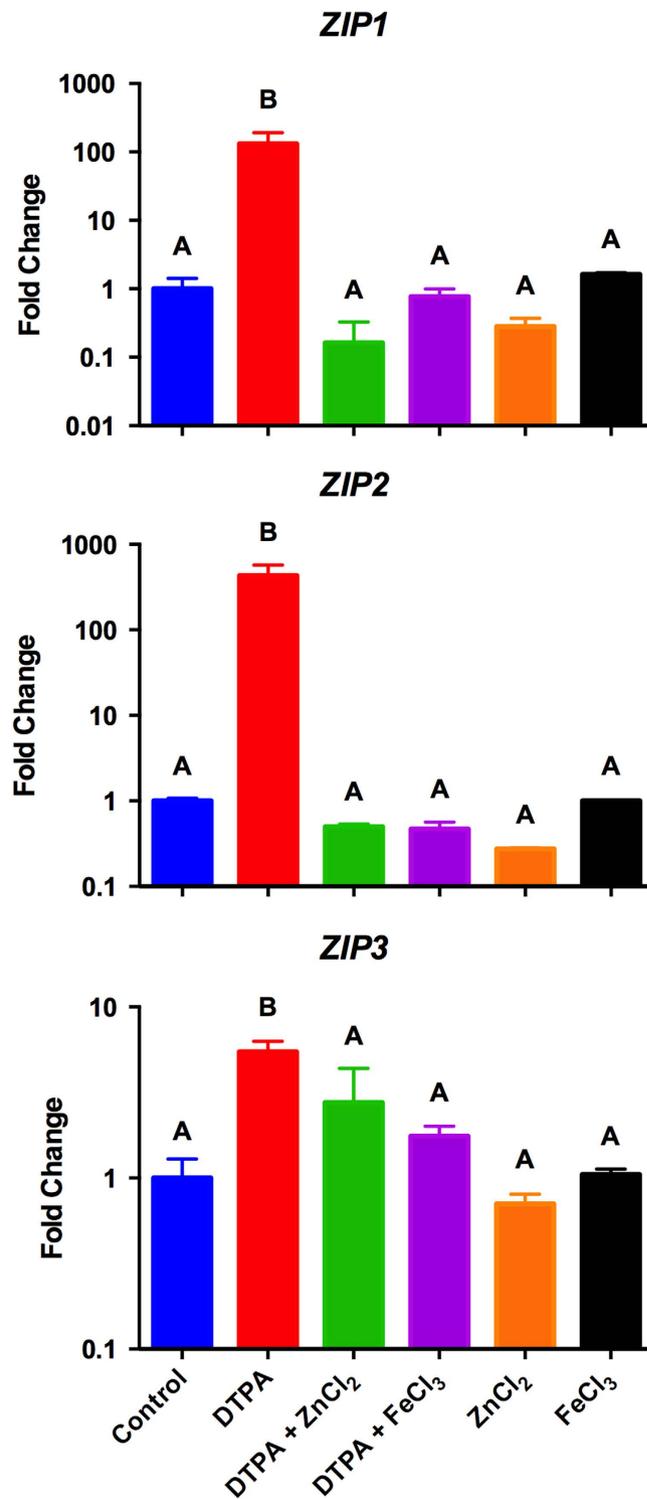
## Results

**Identification of ZIP transporters in *C. gattii*.** Analysis of the *C. gattii* predicted proteome<sup>17</sup> for a PFAM domain ZIP zinc transporter (PF02535) revealed the presence of 4 four different genes. Previously, we showed that intracellular zinc levels altered the transcript levels of three genes (CNAG\_6066 – *ZIP1*, CNBG\_2209 – *ZIP2*, and CNBG\_5361 – *ZIP3*)<sup>9</sup>. The fourth gene (CNBG\_3633 (*ZIP4*)) is a direct ortholog of *S. cerevisiae* *YKE4*, whose product is a bidirectional zinc transporter located in the endoplasmic reticulum<sup>18</sup>. The number of predicted transmembrane domains in the *C. gattii* Zip proteins ranges from 5 to 9 (Figure S1A). We predicted that these proteins would be localized to the membranes of different subcellular compartments. In agreement with this prediction, analysis using the WoLF PSORT<sup>19</sup> and SherLoc2<sup>20</sup> servers predicted that all *C. gattii* Zip proteins were located at the plasma membrane. Phylogenetic analysis employing characterized fungal zinc transporters from the ZIP family as well as the *A. thaliana* Irt1 iron transporter revealed that *C. gattii* Zip1 and Zip2 clustered with the high and low affinity zinc transporters *S. cerevisiae* Zrt1 and Zrt2, respectively (Figure S1B). *C. gattii* Zip4 was located in an independent cluster characterized by the presence of *S. cerevisiae* Yke4 while *C. gattii* Zip3 was not phylogenetically related to the ZIP transporters here analysed (Figure S1B).

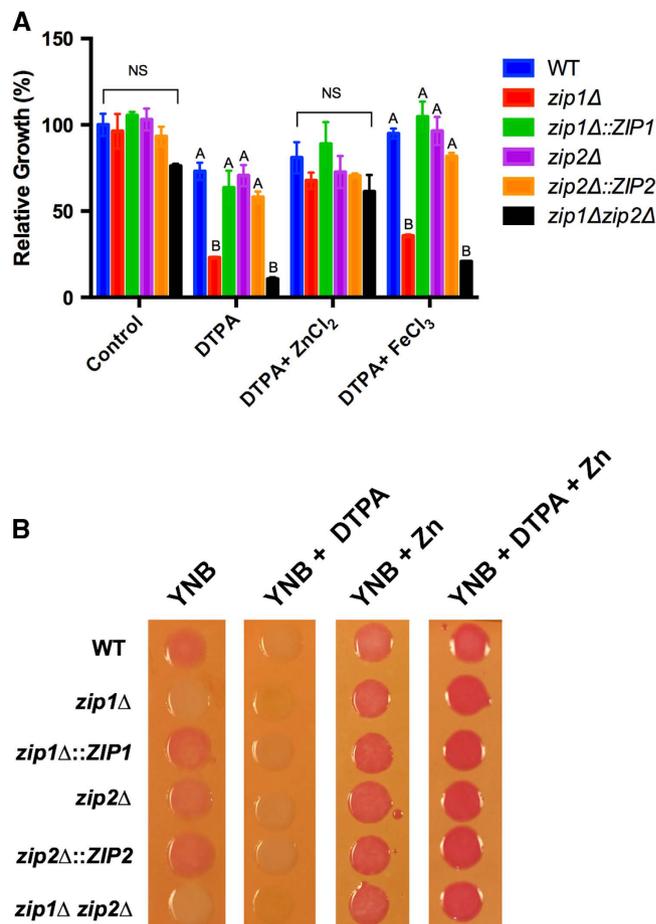
Transcriptional profiling of the *C. gattii* *ZIP1*, *ZIP2* and *ZIP3* genes was conducted to evaluate the effects of extracellular zinc levels on ZIP family gene expression. Fungal cells were cultured under control conditions in the presence of an extracellular metal chelating agent (diethylene triamine pentaacetic acid - DTPA), under the Zn condition (DTPA supplemented with ZnCl<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub> without DTPA), and under the Fe condition (DTPA supplemented with FeCl<sub>3</sub> or FeCl<sub>3</sub> without DTPA). A significant increase in the transcript levels of all ZIP genes was detected when cells were cultured in the presence of DTPA (Fig. 1). In contrast, when zinc or iron was added to the culture medium, the transcript levels of all genes were not statistically distinct from those observed in the control condition (Fig. 1). Therefore, zinc and iron availability regulate the expression of the *ZIP1*, *ZIP2* and *ZIP3* genes.

***C. gattii* Zip1 is important for growth under zinc-limiting conditions.** Functional analyses were conducted for the *ZIP1* and *ZIP2* genes because these genes are targets of the Zap1 transcriptional factor<sup>9</sup> and are highly regulated by zinc levels. To evaluate the function of Zip1 and Zip2 in *C. gattii*, we constructed null mutants, complemented strains, and a double *zip1Δ zip2Δ* mutant strain. Knockout and complementation were confirmed by both Southern blotting and RT-PCR analysis (Figure S2). To evaluate the role of *C. gattii* Zip1 and Zip2 in zinc homeostasis, the sensitivity of the constructed strains to zinc-limiting conditions was evaluated (YNB containing DTPA). Metal deprivation resulted in decreased growth of the *zip1Δ* null mutant and the *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains (Fig. 2A). This growth reduction in the *zip1Δ* and in the *zip1Δ zip2Δ* mutants was recovered when a zinc source was added to the medium containing DTPA (Fig. 2A) or, in the case of *zip1Δ* null mutant, by reintroducing the WT locus into the mutant strain. As DTPA is a broad metal chelator, assays employing iron supplementation were conducted to evaluate if the reversal of *zip1Δ* and the *zip1Δ zip2Δ* double mutants growth defect was limited to zinc. Only a partial growth recovery of the *zip1Δ* and of the *zip1Δ zip2Δ* mutants was observed when iron was added to DTPA media. Similar results were found for copper and manganese (data not shown). As predicted from the bioinformatic analysis, these results indicate that Zip1 plays an important role in zinc uptake.

To further confirm the hypothesis that Zip1 participates in zinc uptake, we evaluated zinc concentrations in cryptococcal cells. The utilization of the intracellular zinc indicator dithizone generates an intense reddish stain in colonies in the presence of zinc when appropriate intracellular zinc levels are obtained<sup>21</sup>. All strains were incubated on YNB agar plates in the presence of DTPA, DTPA plus zinc or zinc alone. After 18h of incubation, colonies were transferred to agar plates containing dithizone. The colonies from all strains grown in YNB stained red, with exception of those from the *zip1Δ* mutant and the *zip1Δ zip2Δ* double mutant (Fig. 2B). As expected, colonies from all strains grown in the presence of DTPA did not stain with dithizone, and growth in the presence of zinc (with or without DTPA) led to dithizone red staining (Fig. 2B). Requirements for growth during zinc deprivation were also assessed at alkaline pH because the phylogenetic analysis revealed that *C. gattii* Zip2 clustered with *A. fumigatus* ZrfC, which is required for zinc uptake at alkaline pH<sup>22</sup>. As a control, the same analysis was evaluated at pH 5. All of the strains analyzed grew equally well in YNB media, YNB buffered to pH 5 and YNB buffered to pH 8. However, in the presence of the zinc chelator DTPA, only the *zip1Δ* mutant displayed reduced growth (Figure S3). Altogether, these results confirm that Zip1 plays an important role in cryptococcal zinc uptake.



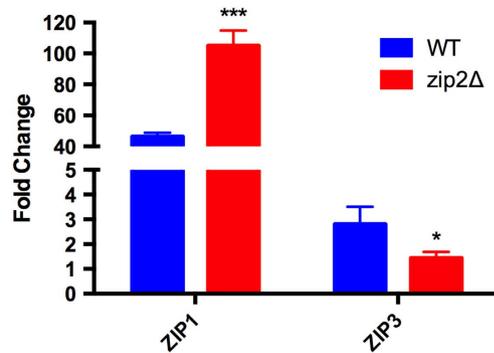
**Figure 1. ZIP transcript levels are regulated by metal levels.** Quantitative real time RT-PCR of ZIP gene transcripts after growth of *C. gattii* in YNB, YNB supplemented with DTPA (100  $\mu$ M), DTPA (100  $\mu$ M) added of ZnCl<sub>2</sub> (400  $\mu$ M), DTPA (100  $\mu$ M) added of FeCl<sub>3</sub> (400  $\mu$ M), ZnCl<sub>2</sub> (400  $\mu$ M) or and FeCl<sub>3</sub> (400  $\mu$ M). The measured quantity of the mRNA in each sample was normalized using the Ct values obtained for the ACT1 gene. Data is shown as the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates of three biological replicates. Means with the same letter are not significantly different, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multicomparison test.



**Figure 2.** The *C. gattii zip1Δ* and *zip1Δ zip2Δ* double mutants are deficient in zinc uptake. **A** Growth measurement of the WT, *zip1Δ*, *zip1Δ::ZIP1*, *zip2Δ*, *zip2Δ::ZIP2* and *zip1Δ zip2Δ* strains after 48 h of incubation in YNB and YNB supplemented with 100  $\mu$ M DTPA with and without 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (left panel) or YNB supplemented with 100  $\mu$ M DTPA with and without 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> (right panel). Data is shown as the mean  $\pm$  SD from three biological replicates. For each group, means with the same letter are not significantly different, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multicomparison test. **B** Dithizone spot plate assay of *C. gattii* strains grown on YNB with or without 400  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> or YNB supplemented with 100  $\mu$ M DTPA with or without 400  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>.

**Compensatory effects on zinc metabolism in the functional mutant ZIP2.** Despite a possible role for ZIP2 in zinc uptake due to its predicted plasma membrane location, the *zip2Δ* mutant displayed normal growth under zinc-limiting conditions, and its intracellular zinc levels were comparable to the WT strain (Figs. 2A,B). Although ZIP2 showed the highest expression fold change among the ZIP genes in the presence of DTPA (Fig. 1C), its transcript levels under zinc-deprivation conditions were lower than those of ZIP1 (FPKM values of 10,930.9 for ZIP1 and 737.7 for ZIP2 as assessed from transcriptome analysis of the WT strain grown for 2 h in YNB supplemented with the zinc chelator TPEN<sup>9</sup>). These data suggest that Zip1 is the more abundant canonical zinc transporter in *C. gattii* under such conditions. To evaluate whether the lack of ZIP2 caused a compensatory effect resulting in the upregulation of ZIP1, qRT-PCR analysis was performed to compare the transcript levels of the ZIP1 gene in WT and *zip2Δ* mutant strains grown in control (YNB) or in metal limiting conditions (YNB + DTPA). For both strains, an increase in transcript levels of the ZIP1 gene was observed in the presence of DTPA, but the relative increase was higher for the *zip2Δ* mutant (nearly 100-fold) when compared to the fold change in WT cells (nearly 50-fold - Fig. 3A). In contrast, an increase in the transcript levels of the ZIP3 gene was only detected in WT cells (Fig. 3B). These data imply a compensatory effect due to the overexpression of ZIP1 in the absence of ZIP2.

**An imbalance in zinc homeostasis causes an increase in levels of reactive oxygen species.** We hypothesized that the *zip1Δ* and *zip1Δ zip2Δ* mutant strains could induce the accumulation of intracellular ROS levels because such cells displayed reduced intracellular zinc levels. To test this hypothesis, the WT, *zip1Δ* mutant, *zip2Δ* mutant, and *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains were incubated for 2 h



**Figure 3. ZIP1 is overexpressed when ZIP2 is not functional.** Quantitative real-time RT-PCR of *ZIP1* and *ZIP3* gene transcripts after growth of WT or *zip2Δ* mutant cells under control (YNB) and low metal conditions (100  $\mu$ M DTPA). The measured quantity of the mRNA in each sample was normalized using the Ct values obtained for the *ACT1* gene. Data are shown as the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates of three biological replicates. The asterisks denote statistically significant differences compared to the WT levels (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

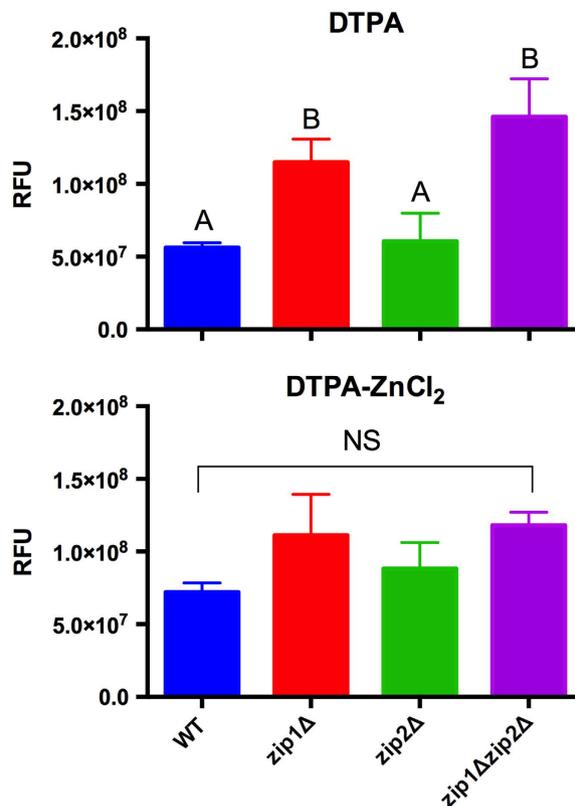
in medium containing DTPA and DTPA added of  $ZnCl_2$  and treated with the intracellular ROS probe H2DCFDA, followed by fluorometric analysis. We did not detect differences in ROS levels in cells lacking the *ZIP2* gene compared to WT from DTPA cultures. However, an important increase in ROS levels was detected in the *zip1Δ* and in *zip1Δ zip2Δ* mutant strains (Fig. 4). This increase of ROS in cells lacking *ZIP1* or in cells lacking both *ZIP1* and *ZIP2* is somewhat relieved when zinc was added to the culture (Fig. 4). These results suggest that zinc uptake by at least Zip1 is necessary to provide zinc to cells to maintain proper ROS homeostasis, however the function of Zip2 in zinc uptake could also be considered.

It is noteworthy that none of the strains analyzed herein showed hypersensitivity to the ROS generating agent hydrogen peroxide or to the glutathione-depleting compound diethyl malate (data not shown). Zinc deficiency generates an increase in oxidative stress in *S. cerevisiae* cells; in these cells, the adaptive response necessary to overcome the damage caused by ROS is mediated by the Zap1p transcription regulator<sup>23</sup>. Our experimental data in *C. gattii* also showed that the acquisition of zinc from the extracellular milieu was important for ROS homeostasis.

**Zip1 and Zip2 are necessary for cryptococcal virulence.** To evaluate whether zinc transport plays a role in *C. gattii* virulence, we evaluated the levels of the most studied cryptococcal virulence factors in all strains<sup>24</sup>. However, we did not detect any differences in fungal growth at 37 °C, melanization or capsule formation (data not shown). The first step in the pathology of *Cryptococcus* is the interaction between the yeast cells and macrophages<sup>25</sup>. Therefore, it is important to evaluate whether cryptococcal strains lacking the zinc transporter react differently with macrophages. Interaction assays using the generated mutants were performed employing the J774.1 cell line. *C. gattii* cells were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC), and the phagocytosis index was assessed by flow cytometry analysis after 2 h of interaction. We employed an assay in which the index of fluorescence for each macrophage detected with flow cytometry was proportional to the uptake of yeast cells. A higher number of the *zip1Δ* and *zip1Δ zip2Δ* mutant strains were internalized by macrophages compared to the WT strain (Fig. 5A). In addition, the capability of *C. gattii* to survive and replicate inside macrophages was affected in the *zip2Δ* and *zip1Δ zip2Δ* mutant strains (Fig. 5B) based on the recovery of a lower number of CFUs from the infected macrophages. It is noteworthy that uptake of the *zip2Δ* mutant strain from macrophages was statistically comparable to WT levels, despite a tendency for higher fungal loads in macrophages (Fig. 5A). Considering that the *zip2Δ* mutant exhibited hypersensitivity to macrophages, we propose that Zip2 plays an important role in cryptococcal survival inside macrophages. To further validate the role of the Zip proteins in cryptococcal virulence, we used an intranasal murine model of cryptococcosis. We found enhanced survival only in mice infected with the *zip1Δ zip2Δ* strain compared to mice infected with the WT strain (Fig. 5C), despite the hypersensitivity of *C. gattii* strains lacking *ZIP2* to macrophages. Together, these results confirm the importance of proper zinc uptake to cryptococcal virulence.

## Discussion

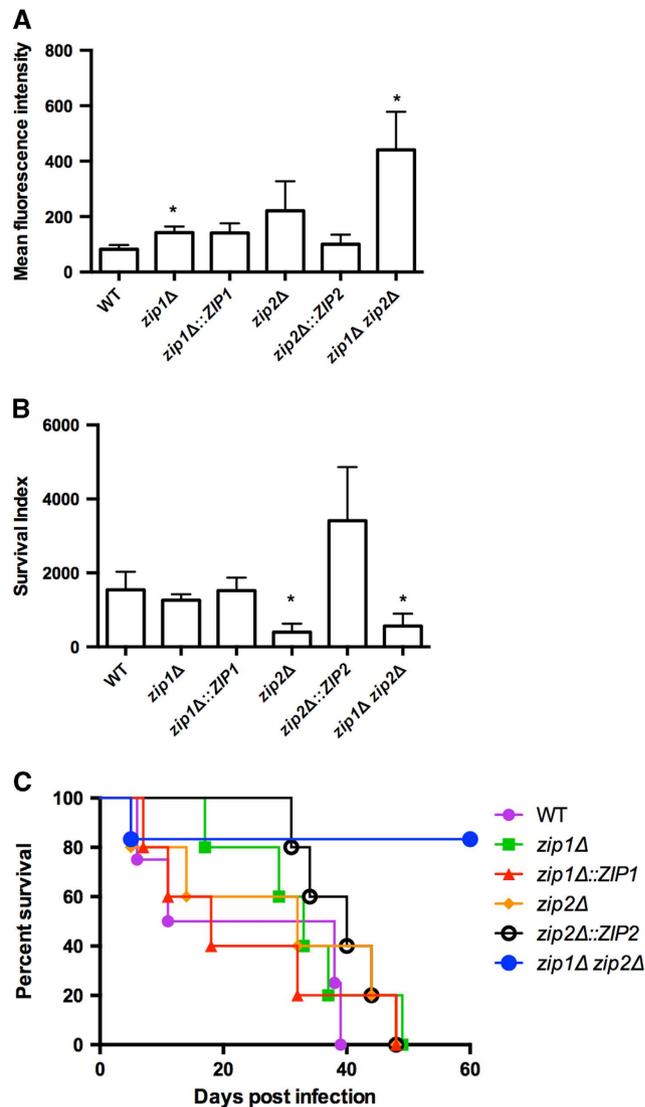
Transition metals are required for all living organisms. However, the catalytic activity mediated by transition metals can produce a toxic environment, and the levels of these micronutrients must be tightly controlled<sup>26,27</sup>. Among transition metals, zinc is used as a cofactor by a large number of proteins<sup>8,28</sup>. The complex regulatory mechanism used to acquire and distribute zinc inside fungal cells has been characterized<sup>23</sup>. This system relies on the activity of a group of proteins responsible for zinc transport and redistribution inside the cells, being the best characterized the ZIP and the ZnT family of metal ion transporters<sup>29</sup>. Here, we describe four genes in the *C. gattii* genome that encode the ZIP family of zinc



**Figure 4. Lack of both ZIP1 and ZIP2 cause an imbalance in ROS metabolism.** Determination of intracellular ROS levels using the probe CM-H2DCFDA. ROS levels were determined based on fluorometry analyses of green fluorescence. WT, *zip1Δ* mutant, *zip2Δ* mutant and *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains were cultured for 2 h in YNB with DTPA (100 μM) added or not of ZnCl<sub>2</sub> (400 μM). The bars represent the cell count normalized fluorescence intensity of three independent biological replicates. Data is shown as the mean ± SD from three biological replicates. Means with the same letter are not significantly different, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multicomparison test.

transporters (ZIP1, ZIP2, ZIP3 and ZIP4), two of which we functionally characterized. The number of zinc transporters from the ZIP family in fungal species ranges from 4 in *S. cerevisiae*<sup>29</sup> to 8 in *A. fumigatus*<sup>30</sup>. These proteins show different predicted localization and biochemical properties, as exemplified by the high and low specificity of the Zrt1p and Zrt2p proteins from *S. cerevisiae*, respectively<sup>31,32</sup>. Here, we further expanded the knowledge of the role of the ZIP genes in *Cryptococcus*. Four lines of evidence presented here support that Zip1 is the main zinc transporter in *C. gattii*: (i) its close phylogenetic relationship with *S. cerevisiae* Zrt1p; (ii) the corresponding ZIP1 transcript levels are highly modulated by zinc availability; (iii) *C. gattii* null mutants of the ZIP1 gene are hypersensitive to zinc deprivation; and (iv) the deletion of ZIP1 led to reduced intracellular zinc levels. These same phenotypes and characteristics were not associated with cryptococcal protein Zip2, suggesting that Zip1 is the main ZIP family member responsible for zinc acquisition in *C. gattii* cells. *S. cerevisiae* Zrt1p is a high affinity zinc uptake system; *zrt1* mutation eliminated the high affinity activity and led to poor growth under zinc-limiting conditions<sup>31</sup>. Additionally, *S. cerevisiae* Zrt2p is a non-essential gene required for the low affinity zinc uptake system. Notably, the *zrt1 zrt2* double mutant strain is viable<sup>33</sup>. Although *C. gattii* Zip1 was found to be fundamental for zinc uptake, Zip2 appears to play a marginal role. Phylogenetic analysis revealed that *C. gattii* Zip2 clustered with *A. fumigatus* ZrfC, a ZIP family transporter involved in zinc uptake in alkaline environments<sup>22</sup>. Zip2 in both fungi was predicted to be localized to the plasma membrane<sup>22,31</sup>. Even in the absence of ZIP2, cryptococcal cells were able to grow under zinc deprivation. This may be a consequence of a compensatory effect due to the upregulation of Zip1 in the *zip2Δ* mutant. In accordance, we previously showed that both ZIP1 and ZIP2 are under the regulation of the transcription factor Zap1<sup>9</sup>. Nevertheless, this compensatory mechanism is not conserved because the lack of the low affinity transporter Zrt2 did not influence the expression of ZRT1 in *S. cerevisiae*<sup>32</sup>. These results suggest that *C. gattii* has evolved redundant mechanisms to obtain zinc from the extracellular space.

Cryptococcal virulence is dependent on the proper regulation of zinc homeostasis. Previously, we showed that inactivation of the transcription factor ZAP1 led to reduced virulence in murine models of cryptococcosis. Null mutants of the ZAP1 gene expressed levels of melanin and capsule comparable to the WT strain, suggesting that disturbed zinc homeostasis does not interfere with the most common



**Figure 5. Inactivation of zinc uptake impairs cryptococcal virulence.** **A** Flow cytometry analysis of J774.A1 macrophage infection after 2 h of interaction with FITC-labeled *C. gattii* cells. **B** Survival index estimated using the ratio between the CFU following 24 h of interaction and the fluorescence units obtained by flow cytometry following 2 h of interaction. **C** A virulence assay of WT, *zip* mutants, complemented strains and the *zip1Δ zip2Δ* double mutant strain in a murine intranasal inhalation infection model.

virulence factors. Therefore, the lack of proper zinc uptake is the main cause of the reduced virulence of the *C. gattii zip1* null mutants<sup>9</sup>. The abrogation of zinc uptake led to a drastic reduction in virulence in *C. gattii*, nearly abolishing the mortality rates of mice infected with strains bearing simultaneously inactivated *ZIP1* and *ZIP2* genes. No differences were found in the virulence of strains containing inactivated individual *ZIP1* or *ZIP2* genes, suggesting that *C. gattii* zinc acquisition in the infection milieu relies on the possible functional redundancy of Zip1 and Zip2. The *C. albicans* ortholog of *C. gattii* Zip2 (Zrt1p) is involved in virulence, and its null mutants present reduced growth and development in endothelial cells in a zinc-dependent manner<sup>34</sup>. Similar to *S. cerevisiae*, *C. albicans* also possesses four ZIP protein-coding genes. This demonstrates that some fungal ZIP proteins are individually associated with virulence, but this is not the case for *C. gattii*. A reasonable assumption can be made that *C. albicans* encodes a specialized zinc acquisition system consisting of the secretion of a zinc chelating protein (zincophore) that delivers zinc into Zrt1p for transport<sup>34</sup>. Bioinformatic analysis based on the *C. gattii* genome did not identify an ortholog of the *C. albicans* zincophore coding gene (data not shown).

Zinc has the ability to preclude the redox activity of transition metals, such as copper and iron<sup>35</sup>, and an increase in ROS levels has been observed in zinc-deficient cultured mammalian<sup>12</sup> and *S. cerevisiae* cells<sup>36</sup>. Herein, we demonstrated that the *zip1Δ* and *zip1Δ zip2Δ* mutant strains had low intracellular zinc contents. In accordance, the *zip1Δ* mutant and the *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains displayed higher intracellular ROS levels. One of the major strategies used by phagocytes to inactivate microbes is

the production of toxic ROS<sup>37</sup>. For example, to cope with pathogen invasion, macrophages activate an antifungal response that culminates with the sequestration of exchangeable zinc away from the intracellular pathogens, thereby increasing ROS production<sup>38</sup>. Indeed, the *C. gattii zip1Δ zip2Δ* mutant strain was phagocytosed with greater efficiency by macrophages in culture. It is noteworthy that Zip2 alone is important for cryptococcal survival inside macrophages. As iron levels could regulate the expression of this transporter, it is reasonable to infer that it may also participate in iron transport. It is well documented that iron acquisition is a fundamental virulence determinant for *C. neoformans*<sup>39</sup> and that iron depletion is used as an antifungal activity by macrophages<sup>40</sup>. Therefore, we postulate that the reduced survival of *C. gattii* lacking ZIP2 could be associated with defects in the acquisition of other metals. However, additional biochemical characterizations of Zip2 are necessary to validate this hypothesis.

In conclusion, this report described the identification and characterization of members of the ZIP family of zinc transporters in *C. gattii*. Two key events were responsible for the observed reduced virulence of the *C. gattii zip1Δ zip2Δ* double null mutant in the intranasal murine model of infection: the reduced zinc load in cells and the corresponding increase in intracellular ROS.

**Experimental procedures.** *Ethics statement.* The animals were cared for according to the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONSEA) and Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines. Mice were housed in groups of six in filtered top ventilated cages, maintained in a 12 h dark/light cycle and provided with food and water ad libitum. All efforts to minimize animal suffering were made. Before mortality analysis, mice were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine. Mice were analyzed twice daily for any signs of suffering, defined by weight loss, weakness or the inability to eat or drink. Mice were sacrificed following the first signs of suffering. The Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethics Committee for Use of Animals (CEUA - protocol number 19801) approved the use of animals in the present work.

*Strains and culture conditions.* Fungal strains were routinely cultured in YPD media (2% glucose, 2% peptone and 1% yeast extract) incubated at 37 °C in a constant rotation platform. Agar was added at a final concentration of 1.5% when solid media was used, and hygromycin or G418 was added at a final concentration of 100 µg/ml or 200 µg/ml, respectively, for the selection of transformants. The *C. gattii zip1Δ* and *zip2Δ* mutant strains were selected using hygromycin, and the *zip1Δ::ZIP1* and *zip2Δ::ZIP2* complemented strains and the *zip1Δ zip2Δ* double mutant strain were selected using G418. The medium used for phenotypic assays was yeast nitrogen base (YNB) without amino acids; asparagine was added at a final concentration of 40 mM. J774.A1 macrophage lineage cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) supplemented with 1 mM l-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 1% nonessential amino acids (SIGMA) and incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

*Bioinformatic analysis.* The gene sequences of the four identified ZIP zinc transporters were retrieved from the Broad Institute *C. gattii* R265 genome database<sup>17</sup>. Prediction of transmembrane helices was conducted by employing the TMHMM tool<sup>41</sup>. Phylogenetic analyses were conducted with the ClustalW alignment in Mega 6<sup>42</sup> by applying the neighbor-joining method; the tree architecture was inferred from 1,000 bootstraps.

*Gene knockout and complementation.* The sources of the hygromycin and G418 resistance cassettes were plasmids pJAF15<sup>43</sup> and pJAF1<sup>43</sup>, respectively. The 5' and 3' flanking regions of ZIP1 and ZIP2 were PCR amplified and gel purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) and the hygromycin resistance cassette. Each fragment was mixed with SmaI-cleaved pUC18 using the In-Fusion® HD EcoDry™ cloning kit following the manufacturer's protocol. The reactions were transformed in *Escherichia coli* TG2 cells for blue/white screening selection. For double mutant strain construction, the same protocol was employed with the 5' and 3' flanking regions of ZIP2 and the G418 selection marker cloned into the SmaI site of pUC18 after confirmation that the vector was transformed into the *zip1Δ* mutant strain. For complementation, amplicons encompassing WT ZIP1 or ZIP2 flanked by 1 kb on each side were cloned into the EcoRV site of pJAF1. The resulting plasmids were used for transformation of the *zip1Δ* and *zip2Δ* mutant strains. The vectors were transformed into *C. gattii* by biolistic transformation<sup>44</sup>, screening was performed using colony PCR, and the deletion was confirmed by southern blot analysis and semi-quantitative RT-PCR. Primers used in these constructions are listed in Table S1.

*Zinc deprivation sensitivity test.* The zinc sensitivity test was performed following pre-culturing of fungal strains in YPD media overnight at 30 °C. Cells were washed three times with PBS, and the cell density was determined in a Neubauer chamber. A total of 50,000 cells was suspended in 100 µL of YNB (control), YNB supplemented with DTPA (100 µM) in the absence or presence of ZnCl<sub>2</sub> (100 µM) or FeCl<sub>3</sub> (100 µM) and distributed into 96 well plates. After 48 h of incubation at 30 °C, OD<sub>600</sub> was determined in a microplate reader. The relative growth was measured based on WT cell growth in YNB. Statistical

analyses were conducted via a two-tailed Student's t-test or by one-way ANOVA test followed by Tukey multicomparison.

**Dithizone assay.** The intracellular zinc concentration was estimated using the dithizone assay. Dithizone stock solutions and agar plates were prepared as described elsewhere<sup>21</sup>. A sterile nitrocellulose membrane was placed on a YNB agar plate in the presence or absence of DTPA (100  $\mu$ M) or ZnCl<sub>2</sub> (400  $\mu$ M). An aliquot of 5  $\mu$ l from a standardized cell suspension (OD<sub>600</sub> = 1) was spot-inoculated onto the nitrocellulose membrane and incubated for 18 h at 30 °C. After incubation, nitrocellulose membranes containing colonies were transferred onto dithizone agar plates, incubated for 1 h in the dark and photographed.

**Real time RT-PCR analyses.** RNA was isolated using Trizol (Invitrogen) after cellular lysis with liquid nitrogen using a mortar and pestle. RNA integrity and concentration were assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel and by fluorometry analysis using a Qubit fluorometer and the Quant-iT RNA assay kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). cDNAs were prepared from DNase (Promega)-treated total RNA samples (200 ng) with ImProm-II Reverse transcriptase (Promega) using oligo-dT. qRT-PCR was performed on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with thermal cycling conditions set with an initial step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 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 1  $\mu$ l of the cDNA template for a final volume of 20  $\mu$ l. All experiments were performed using three independent cultures, and each cDNA sample was analyzed in triplicate for each primer pair. A melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm the presence of a single PCR product. Data were normalized to actin cDNAs amplified in each set of PCR experiments. Relative expression was determined by the 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> method<sup>45</sup>. Statistical analyses were conducted via a two-tailed Student's t-test or by one-way ANOVA test followed by Tukey multicomparison. The primers used in these analyses are listed in Table S1.

**ROS measurements.** For ROS measurements, cells were cultured overnight in YNB medium at 30 °C in a constant rotation platform. Cells were washed 3 times using phosphate buffer and counted in a Neubauer chamber. An inoculum of 1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/ml was suspended in YNB medium containing DTPA (100  $\mu$ M) or DPTA added of ZnCl<sub>2</sub> (400  $\mu$ M). After incubation for 2 hours at 30 °C in a constant rotation platform, 1 ml of the inoculum was collected, and H2DCFDA (Invitrogen) was added to a final concentration of 10  $\mu$ M. Cells were incubated in the dark for 2 h, washed with PBS and analyzed by fluorometry using a SpectraMax I3 plate reader fluorometer (Molecular Devices) with the emission and excitation wavelengths set at 488 and 520 nm, respectively. Fluorescence values were normalized to cell count, based on the OD<sub>600</sub> determination. Statistical analyses were conducted with ANOVA followed by Tukey multicomparison test.

**Macrophage assays.** Phagocytosis assays were conducted to evaluate the susceptibility of the mutant strains to macrophage phagocytosis activity and the resistance of the strains to the antifungal action of phagocytes. One day before the phagocytosis test, an aliquot of 10<sup>6</sup> J774.A1 cells in DMEM supplemented with 10% FBS was seeded into 12-well culture plates and activated with 100 U/ml INF- $\gamma$  (Sigma) and 500 ng/mL LPS (Sigma) for 18 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The *C. gattii* strains were inoculated into YPD and allowed to grow at 30 °C for 18 h. The next day, the *C. gattii* cells were washed 3 times with PBS and opsonized with anti-GXM antibody 18B7 (final concentration of 1  $\mu$ g/ml) and incubated for 1 h at 37 °C. After opsonization, *Cryptococcus* cells were centrifuged, and the pellet was resuspended in 500  $\mu$ l of a FITC solution (500  $\mu$ g/ml) and incubated for 10 min at room temperature. The cells were washed several times with PBS and counted in a Neubauer Chamber. A volume of 1 ml of 1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/ml was added to the wells containing macrophage cells and incubated for 2 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After the incubation period, the wells were washed 3 times with PBS and treated with Trypan Blue (Sigma) to reduce FITC fluorescence from non-internalized cryptococci. The cells were collected by scraping and analyzed with a Guava easyCyte Flow Cytometer (Merck Millipore) by measuring the green fluorescence of 5000 events<sup>46</sup>. A second plate under identical conditions was incubated for 24 h to evaluate antifungal activity. After incubation, the wells were washed 3 times with PBS, the cells were lysed with sterile ice-cold water and subsequently plated on YPD plates for CFU determination. The survival index was obtained by normalizing the CFU counts after 24 h of interaction to the fluorescence units obtained in the flow cytometric analysis following 2 h of interaction<sup>47</sup>. All assays were performed in triplicate for each strain. A Student's t-test was used to determine the statistical significance of the observed differences in fungal survival.

**Survival assays.** The survival assay was performed as previously described<sup>48</sup>. Briefly, the strains were cultured overnight in YPD medium at 30 °C with shaking, then washed three times and re-suspended in PBS. Groups of six female BALB/c mice (4 weeks old) were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine and infected intranasally with 1  $\times$  10<sup>5</sup> cells in a volume of 50  $\mu$ l. The mice were monitored twice daily for signals of suffering. The median survival values were calculated

using a Kaplan–Meier survival analysis in GraphPad Prism software. Animal studies were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee.

## References

- Park, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **23**, 525–30 (2009).
- Chaturvedi, V. & Chaturvedi, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends Microbiol.* **19**, 564–71 (2011).
- Pagano, L., Fianchi, L. & Leone, G. Fungal pneumonia due to molds in patients with hematological malignancies. *J. Chemother* **18**, 339–52 (2006).
- Engelthaler, D. M. *et al.* *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. *Mbio.* **5**, e01464-14 (2014).
- Pluddemann, A., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol. Rev.* **240**, 11–24 (2011).
- Becker, K. W. & Skaar, E. P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1235–49 (2014).
- Kehl-Fie, T. E. & Skaar, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 218–24 (2010).
- Staats, C. C., Kmetzsch, L., Schrank, A. & Vainstein, M. H. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 65 (2013).
- Schneider Rde, O. *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* **7**, e43773 (2012).
- Nobile, C. J. *et al.* Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol.* **7**, e1000133 (2009).
- Moreno, M. A. *et al.* The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol. Microbiol.* **64**, 1182–97 (2007).
- Eide, D. J. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics* **3**, 1124–9 (2011).
- Eide, D. J. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 18565–9 (2009).
- Guerinot, M. L. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* **1465**, 190–8 (2000).
- Lulloff, S. J., Hahn, B. L. & Sohnle, P. G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. *J. Lab. Clin. Med.* **144**, 208–14 (2004).
- Simm, C., Luan, C. H., Weiss, E. & O'Halloran, T. High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. *PLoS One* **6**, e25136 (2011).
- Antinori, S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS* **2013**, 471363 (2013).
- Kumanovics, A., Poruk, K. E., Osborn, K. A., Ward, D. M. & Kaplan, J. YKE4 (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 22566–74 (2006).
- Horton, P. *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic. Acids Res.* **35**, W585–7 (2007).
- Briesemeister, S. *et al.* SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins. *J. Proteome. Res.* **8**, 5363–6 (2009).
- Yuan, D. S. Dithizone staining of intracellular zinc: an unexpected and versatile counterscreen for auxotrophic marker genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **6**, e25830 (2011).
- Amich, J., Vicentefranqueira, R., Leal, F. & Calera, J.A. *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC* and *aspf2* genes. *Eukaryot Cell* **9**, 424–37 (2010).
- Eide, D. J. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 18565–9 (2009).
- Ma, H. & May, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**, 131–90 (2009).
- Kronstad, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 193–203 (2011).
- Weinberg, E. D. Iron availability and infection. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**, 600–5 (2009).
- Hood, M. I. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 525–37 (2012).
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome. Res.* **5**, 196–201 (2006).
- Gaither, L. A. & Eide, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biomaterials* **14**, 251–70 (2001).
- Amich, J. & Calera, J. A. Zinc Acquisition: A Key Aspect in *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Mycopathologia* **178**, 379–85 (2014).
- Zhao, H. & Eide, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2454–8 (1996).
- Zhao, H. & Eide, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 23203–10 (1996).
- Zhao, H. & Eide, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 23203–10 (1996).
- Citiulo, F. *et al.* *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog.* **8**, e1002777 (2012).
- Powell, S. R. The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* **130**, 1447S–54S (2000).
- Wu, C. Y., Bird, A. J., Winge, D. R. & Eide, D. J. Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. *J. Biol. Chem.* **282**, 2184–95 (2007).
- Assef, L. *et al.* Salmonella detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst. *Mol. Microbiol.* **80**, 628–40 (2011).
- Subramanian Vignesh, K., Landero Figueroa, J. A., Porollo, A., Caruso, J. A. & Deepe, G. S., Jr. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity* **39**, 697–710 (2013).
- Kronstad, J. W., Hu, G. & Jung, W. H. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Trends. Microbiol.* **21**, 457–65 (2013).
- Winters, M. S., Chan, Q., Caruso, J. A. & Deepe, G. S., Jr. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *J. Infect. Dis.* **202**, 1136–45 (2010).
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–80 (2001).
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–9 (2013).

43. Fraser, J. A., Subaran, R. L., Nichols, C. B. & Heitman, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryot Cell* **2**, 1036–45 (2003).
44. Toffaletti, D. L., Rude, T. H., Johnston, S. A., Durack, D. T. & Perfect, J. R. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J. Bacteriol.* **175**, 1405–11 (1993).
45. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
46. Barbosa, F. M. *et al.* Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect* **8**, 493–502 (2006).
47. Kmetzsch, L. *et al.* Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Mol. Microbiol.* **81**, 206–18 (2011).
48. Kmetzsch, L. *et al.* The vacuolar Ca<sup>2+</sup>(+) exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca<sup>2+</sup>(+) tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **9**, 1798–805 (2010).

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). We thank Joseph Heitman and Alex Idnurm for providing the pJAF15, pAI4, and pLKB25 plasmids, and Arturo Casadevall for providing monoclonal antibody anti-GXM (18B7).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: R.O.S., L.K., A.S., M.H.V., and C.C.S. Performed the experiments: R.O.S., C.D., F.M.S., M.I.R.K., A.C.P., A.A.W.G., L.K., and C.C.S. Analyzed the data: R.O.S., C.D., L.K., and C.C.S. Contributed reagents and materials: L.K., A.S., M.H.V., and C.C.S. Wrote the paper: R.O.S. and C.C.S.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Accession codes:** Sequences used for tree construction were derived from *S. cerevisiae* (SGD accession codes Zrt1p, Zrt2p, Zrt3p and Yke4), *A. fumigatus* (NCBI accession codes AAT11930.1 – ZrfA; AAT11931.1 – ZrfB; and EDP50333.1 – ZrfC), and *Arabidopsis thaliana* (NCBI accession code NP\_567590.3)

**How to cite this article:** Schneider, R. O. *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Sci. Rep.* **5**, 10104; doi: 10.1038/srep10104 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

1 **Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence**

2 Rafael de Oliveira Schneider<sup>1</sup>, Camila Diehl<sup>1</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>1</sup>,

3 Alcía Corbellini Piffer<sup>1</sup>, Ane Acosta Wichine Garcia<sup>1</sup>, Marcos Iuri Ross

4 Kulmann<sup>1</sup>, Augusto Schrank<sup>1,2</sup>, Lívia Kmetzsch<sup>1,2</sup>, Marilene Henning

5 Vainstein<sup>1,2</sup>, Charley C. Staats<sup>1,2,\*</sup>.

6

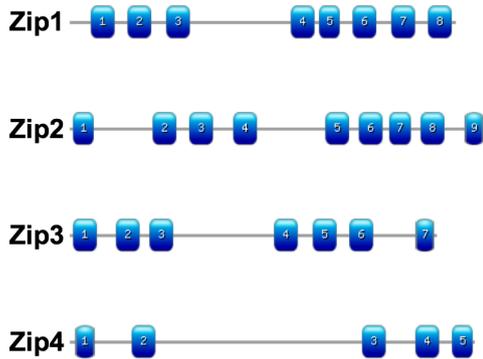
7 **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

8

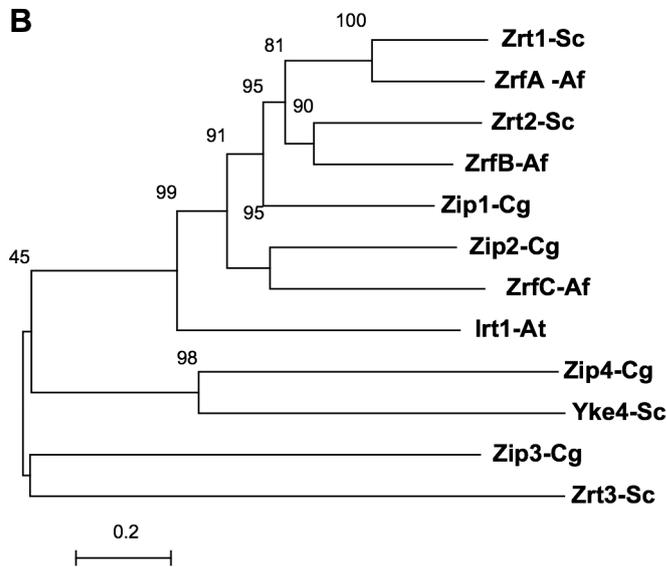
9

10 Supplementary Figure 1

**A**



**B**



11

12

13

14

15

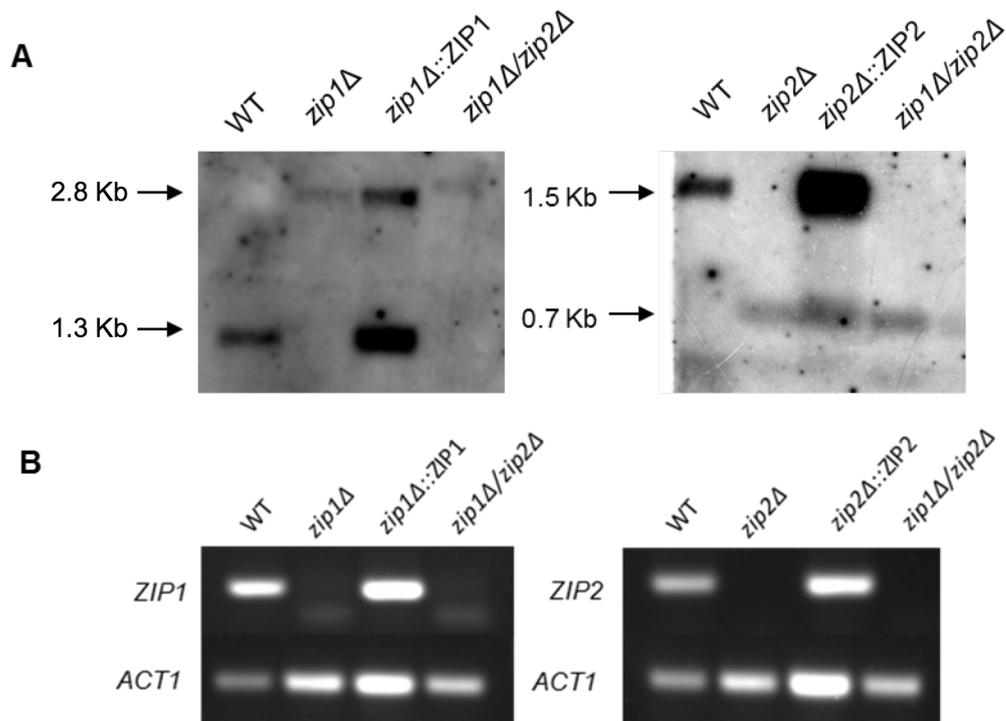
16

17

18

**Figure S1. Some characteristics of *C. gattii* zinc transporters of the ZIP family.** **A** Predicted transmembrane helices of the four Zip proteins encoded by the *C. gattii* genome were evaluated with the TMHMM tool and are illustrated as numbered blue boxes. **B** Phylogenetic analysis applying the neighbor-joining method and including Zip zinc transporters sequences from related fungi (Sc – *S. cerevisiae*; Af – *A. fumigatus*; Cg – *C. gattii*) and Irt1 from *A. thaliana*.

19 Supplementary Figure 2.



20

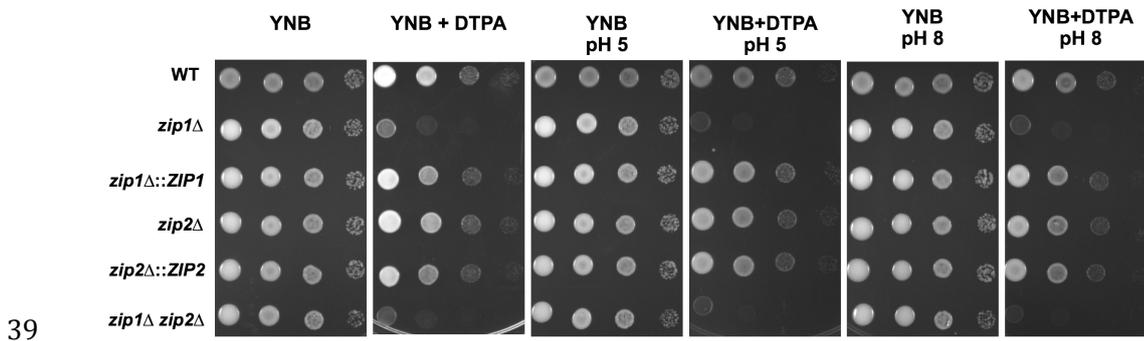
21 **Figure S2. Construction of knockout and complemented strains. A**

22 Confirmatory Southern blot. Genomic DNA (10 μg) from the WT, *zip1Δ*  
 23 mutant, *zip1Δ::ZIP1* complemented and *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains  
 24 were digested with EcoRV. The 5' gene flanking region was used as a probe  
 25 for Southern hybridization. DNA (10 μg) from the WT, *zip2Δ* mutant,  
 26 *zip2Δ::ZIP2* complemented and *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains were  
 27 digested with the PstI restriction enzyme. In this experiment, the 3' gene  
 28 flanking region was used as a probe for Southern hybridization. Numbers at  
 29 the left indicate the hybridization signal sizes based on the position of the  
 30 molecular size marker. **B** Semi-quantitative RT-PCR using cDNA from the  
 31 WT, *zip1Δ* mutant, *zip1Δ::ZIP1* complemented and *zip1Δ zip2Δ* double mutant  
 32 strains (left panel). RNA samples from the WT, *zip2Δ* mutant, *zip2Δ::ZIP2*  
 33 complemented and *zip1Δ zip2Δ* double mutant strains (right panel) were used

34 as templates for a reaction employing reverse transcriptase. The upper panel  
35 shows the *ZIP* amplicons, and the lower panel shows the *ACT1* amplicons  
36 used as loading controls.

37

38 Supplementary Figure 3



40 **Figure S3. *C. gattii* ZIP2 is not required for cryptococcal growth at**  
41 **different pHs** Growth of the WT, *zip1*Δ, *zip1*Δ::ZIP1, *zip2*Δ, *zip2*Δ::ZIP2 and  
42 *zip1*Δ *zip2*Δ strains in YNB, YNB supplemented with 100 μM DTPA with or  
43 without 400 μM ZnCl<sub>2</sub> at alkaline pH (8) or a control pH (5) obtained using 20  
44 mM phosphate buffer.

45

46

47

48

49

50 **Supplementary Table 1: List of primers used in this work**

<b>Primer name</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Purpose</b>
<b>ZIP1-5F</b>	AAAATAGGGATAACAGGGTAAT	5'-flanking amplicon of <i>ZIP1</i>
	GGAAAATGTGGATTGGATGG	knockout construct
<b>ZIP1-5R</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA	5'-flanking amplicon of <i>ZIP1</i>
	GCAGGCTATGAAATGACTGACG	knockout construct
	GGTCGTT	
<b>ZIP1-3F</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA	3'-flanking amplicon of <i>ZIP1</i>
	GCTGGGTACATTGTAGAAAATC	knockout construct
	CGTGAGAAG	
<b>ZIP1-3R</b>	AAAAATTACCCTGTTATCCCTAC	3'-flanking amplicon of <i>ZIP1</i>
	GACAGGCTCTCAACGAGAC	knockout construct
<b>ZIP2-5F</b>	AAAATAGGGATAACAGGGTAAT	5'-flanking amplicon of <i>ZIP2</i>
	AGCAAGATAGGGGCTTACCC	knockout construct
<b>ZIP2-5R</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA	5'-flanking amplicon of <i>ZIP2</i>
	GCAGGCTATCATGCATCAGCGT	knockout construct
	GAGGA	
<b>ZIP2-3F</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA	3'-flanking amplicon of <i>ZIP2</i>
	GCTGGGTAAAAAAGGGGGAAG	knockout construct
	AGTTTGG	

---

<b>ZIP2-3R</b>	AAAATTACCCTGTTATCCCTAT GAGTGGGAGCATGGAAC	3'-flanking amplicon of <i>ZIP2</i> knockout construct
<b>ZIP1compF</b>	AGGGCGAATTCTGCAGATGCAA GAGACTAAGTCAGAGACTAAGT CAGAATCCA	<i>ZIP1</i> amplicon for complementation
<b>ZIP1compR</b>	CGGCCGCCAGTGTGATGGATCT CTTCGACAGGCTCTCAAC	<i>ZIP1</i> amplicon for complementation
<b>ZIP2compF</b>	AGGGCGAATTCTGCAGATTTAC CCGCAGAGGCTCTTT	<i>ZIP2</i> amplicon for complementation
<b>ZIP2compR</b>	CGGCCGCCAGTGTGATGGATCT GGAGGACGACGATGAAGAA	<i>ZIP2</i> amplicon for complementation
<b>CGACTF</b>	CGGTATCGTCACAAACTGG	Amplification of <i>ACT1</i> for RT- PCR/qRT-PCR
<b>CGACTR</b>	GGAGCCTCGGTAAGAAGAAC	Amplification of <i>ACT1</i> for RT- PCR/qRT-PCR
<b>CNBG5361F</b>	GTGTAGCCCTTCTTTTCTCC	Amplification of <i>ZIP3</i> for qRT- PCR
<b>CNBG5361R</b>	CAATCCTGTCCGTTGGTAC	Amplification of <i>ZIP3</i> for qRT- PCR
<b>CNBG6066F</b>	GCTGAAGTCGCCGCTTATC	Amplification of <i>ZIP1</i> for qRT-

---

---

		PCR
<b>CNBG6066R</b>	GGGAGGGATGGATGTGATG	Amplification of <i>ZIP1</i> for qRT-PCR
<b>CNBG2209F</b>	GTCATATTGGGCAAACACTGG	Amplification of <i>ZIP2</i> for qRT-PCR
<b>CNBG2209R</b>	AGGGGCAACAGACTCATAG	Amplification of <i>ZIP2</i> for qRT-PCR

---

## 4.2 CAPÍTULO II – Metabolismo de zinco durante interação de macrófagos e *Cryptococcus gattii*

### 4.2.1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de interação patógeno-hospedeiro células de defesa utilizam diversos mecanismos para conter a disseminação do patógeno. Fagócitos no geral poderão manter a célula microbiana no interior de um ambiente denominado fagossomo, o qual é criado a partir de dobramentos da membrana plasmática da célula hospedeira (Flannagan *et al.*, 2012). Para que a estrutura fagossomal se torne um ambiente inóspito para o patógeno fagocitado, é necessário que ocorra uma série de eventos de maturação dessa estrutura. Tais eventos são realizados a partir da fusão de lisossomos e endossomos (Kinchen *et al.*, 2008; Smith e May, 2013). Após maturação da estrutura fagossomal, o mesmo é caracterizado por um baixo pH, presença de EROs e ERNs, assim como a presença de enzimas e peptídeos antimicrobianos (Plüddemann *et al.*, 2011; Smith e May, 2013). Entretanto, micro-organismos patogênicos desenvolveram mecanismos para sobrepujar a atividade antimicrobiana do ambiente intrafagossomal. Por exemplo, o patógeno intracelular *C. neoformans* é capaz de inibir a maturação de fagossomos, por meio da manipulação do pH e dos níveis de cálcio no interior dessas vesículas (Smith *et al.*, 2014).

O processo de interação entre *Cryptococcus* e macrófagos representa uma etapa crucial para a progressão ou eliminação da doença (Shao *et al.*, 2005). Apesar das células fagocíticas serem de extrema importância na eliminação da doença, tem sido demonstrado que macrófagos podem causar uma exacerbação da infecção, aumentando a disseminação da levedura (Kechichian *et al.*, 2007; Santangelo *et al.*, 2004).

Entretanto, além das respostas imunes clássicas, a imunidade nutricional desempenha papel essencial no combate às infecções, inibindo o desenvolvimento de patógenos por meio de privação de diversos nutrientes. Dentre os nutrientes, ferro, zinco e manganês são altamente sequestrados pelas nossas células de defesa, tornando sua disponibilidade limitada para os patógenos (Neyrolles *et al.*, 2013). Em contraste, estudos de metalobiologia de cobre e zinco durante a interação de *Mycobacterium tuberculosis* e hospedeiro, demonstram que fagócitos utilizam da intoxicação por esses metais para conter a disseminação bacteriana (Mergeay *et al.*, 2003; Neyrolles *et al.*, 2013). Em resposta, sabe-se que *M. tuberculosis* é capaz de expressar uma vasta gama de transportadores de metais, os quais possivelmente atuam na detoxificação de cobre e zinco durante o período no qual a bactéria encontra-se no fagossomo (Nies, 2003).

Em relação a patógenos fúngicos, não se sabe ao certo qual o tipo de resposta é utilizada pelos fagócitos humanos. Pressupõe-se que ocorra privação de zinco no ambiente intrafagossomal, visto que, tanto células de *C. albicans* como *C. neoformans* apresentam aumento na expressão de genes codificadores para o transportadores de zinco no ambiente intrafagossomal (Derengowski *et al.*, 2013; Lorenz *et al.*, 2004). Além disso, macrófagos primários infectados com o fungo patogênico *H. capsulatum* e estimulados com fator de crescimento de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), apresentam um aumento nos níveis de transcritos de genes codificadores para transportadores de zinco presentes no Golgi. Tais transportadores, Znt4 e Znt7, atuam no deslocamento do metal para essa organela, tornando-o escasso no fagossomo infectado pelo fungo (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013). Com o objetivo de elucidar mecanismos de imunidade nutricional de zinco durante o processo de interação de macrófagos com *C. gattii*, o presente capítulo descreve experimentos voltados para a análise do conteúdo de  $Zn^{2+}$  durante o processo de interação. Demonstramos aqui, dados

inéditos quanto ao deslocamento do conteúdo de zinco em macrófagos infectados, bem como eventos de biologia celular que permitem com que *C. gattii* tenha acesso ao zinco presente no hospedeiro.

## **4.2.2 METODOLOGIA**

### **4.2.2.1 LINHAGENS CELULARES E ENSAIOS DE INTERAÇÃO**

Macrófagos murinos da linhagem J774A.1 foram utilizados para os experimentos de interação. As células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM (Sigma) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 100 µg/ml de streptomicina e 100 U/ml de penicilina (Sigma) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foi utilizada uma variação do protocolo utilizado por Smith e colaboradores (Smith *et al.*, 2014). Os macrófagos foram cultivados até atingir confluência em frascos contendo 15 ml de DMEM. No dia anterior aos experimentos de interação, as células foram removidas das garrafas e 1 ml de uma solução de DMEM contendo 10<sup>5</sup> células/ml era adicionado em cada poço de uma placa de poliestireno. Previamente ao experimento de interação, os macrófagos foram ativados com Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) (Sigma) em uma concentração de 150 ng/ml em DMEM sem SFB, seguido de um período de incubação de 1 hora. *C. gattii* linhagem R265 foi cultivada rotineiramente em meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) (Sigma-Aldrich). Antes de cada experimento, um novo inóculo foi realizado para a obtenção de células fúngicas viáveis, sendo que 1 ml do inóculo era lavado 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e a concentração de células determinada utilizando câmara de Neubauer. As células fúngicas foram opsonizadas com anticorpo anti componentes da cápsula polissacarídica 18B7, em um volume de 100 µl contendo 10<sup>6</sup>

células. Após opsonização a solução foi adicionada ao poço contendo macrófagos ativados em uma multiplicidade de infecção de 5 células fúngicas para 1 célula de macrófago (Smith *et al.*, 2014). Os ensaios de interação, tanto para análise de atividade antifúngica, quanto para microscopia *time-lapse*, foram realizadas em 4 diferentes condições: (i) condição controle, (ii) adição de cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) (Sigma) em uma concentração de 5  $\mu M$ , (iii) presença do agente quelante extracelular diatilenotriaminopenta-acetato pentapotássico (DTPA) (Sigma) em uma concentração de 10 $\mu M$  e (iv) adição do agente quelante de zinco intracelular ácido bis-(2-aminoetil)etilenoglicol NNN'N'-tetracético (TPEN) (Sigma) em uma concentração de 5  $\mu M$ .

#### 4.2.2.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Experimentos de interação para analisar a atividade antifúngica de macrófagos foram realizados como descrito no item anterior, utilizando as concentrações de  $ZnCl_2$ , DTPA e TPEN citadas anteriormente. As análises quantitativas de células fúngicas internalizadas ou aderidas aos macrófagos foram realizadas após 2 e 18 horas. Após 2 horas de interação, todos os poços contendo macrófagos e *C. gattii* foram lavados 3 vezes com PBS estéril para remoção das células fúngicas não aderidas/internalizadas. Para o experimento de unidades formadoras de colônias (UFC) os macrófagos foram lisados com água destilada gelada, seguido de uma diluição seriada com PBS. As suspensões foram plaqueadas em meio de cultivo YPD acrescido de 1,5% de ágar e incubadas por 48 horas à 25 °C para contagem de UFC. Os poços correspondentes ao período de 18 horas foram novamente incubados com DMEM acrescido ou não dos devidos agentes quelantes ou  $ZnCl_2$  e submetidos ao mesmo procedimento após 16 horas adicionais de incubação.

### 4.2.2.3 ANÁLISES POR MICROSCOPIAS

Análises por microscopia confocal e *time-lapse* foram realizadas para analisar os níveis de zinco durante a interação *C. gattii*-macrófago. Para as análises de *time-lapse*, ensaios de interação foram realizados exatamente como descrito anteriormente, no momento em que as células fúngicas foram adicionadas aos macrófagos, a sonda fluorescente indicadora de  $Zn^{2+}$  FluoZin-3-AM (Molecular Probes) foi acrescentada em uma concentração final de 1  $\mu$ M. Também foi adicionado nos devidos poços  $ZnCl_2$ , DTPA e TPEN. A placa foi levada imediatamente ao equipamento de microscopia *time-lapse* (microscópio do modelo Nikon Eclipse Ti com câmara umidificada Okolabs com 5%  $CO_2$  a 37°C). As imagens, adquiridas a cada 5 minutos por um período de 18 horas em 4 diferentes campos de cada poço, foram capturadas pela câmera digital *Sight DS-Qimaging* (Nikon) por meio da objetiva *Plan Apo Ph1 60x* (Nikon). Para análise da compartimentalização de zinco em macrófagos durante infecção por *C. gattii*, os macrófagos foram previamente cultivados em poços contendo uma lamínula de vidro estéril. Duas condições foram utilizadas para tal experimento, com e sem células fúngicas. A sonda fluorescente Zinpyr-1 (Sigma) foi utilizada em uma concentração final de 5  $\mu$ M e adicionada no mesmo momento em que as células fúngicas foram adicionadas aos poços contendo macrófagos. Após duas horas de interação, os poços foram lavados com PBS e fixados com paraformaldeído 4%. As lamínulas foram cuidadosamente removidas dos poços e lâminas foram montadas utilizando uma gota do reagente *antifade* (Thermofisher). Um poço controle, sem a adição de células fúngicas, foi feito para fins comparativos. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio Zeiss Axiovert 135 TV por meio da objetiva de 100x Plan-Neofluar com óleo de imersão. A câmera utilizada foi QIcam Fast 1394 por meio do software QCapture Pro51, versão 5.1.1. Todas as imagens foram analisadas pelo software ImageJ Fiji.

#### 4.2.2.4 ANÁLISE DE EVENTOS DE VOMOCITOSE

Para facilitar a visualização de eventos de vomocitose, foram realizados ensaios de interação utilizando linhagem de *C. gattii* expressando a proteína verde fluorescente GFP, a qual foi previamente construída no laboratório de professor Dr. Robin May (Voelz *et al.*, 2010). Experimentos de interação foram realizados como citado no item anterior, utilizando o microscópio do modelo Nikon Eclipse Ti com câmara umidificada (Okolabs) com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. As imagens, selecionadas a cada 5 minutos por um período de 18 horas em 3 diferentes campos de cada poço, foram capturadas pela câmera digital *Sight DS-Qimaging* (Nikon) por meio da objetiva *Plan Apo Ph1 60x* (Nikon). Os vídeos obtidos a partir da microscopia foram divididos em dois campos e em cada um deles foi estimada a porcentagem de células internalizadas que apresentaram eventos de extrusão não lítica.

#### 4.2.2.5 ENSAIO DE PERMEABILIZAÇÃO DE FAGOSSOMO

Ensaio para visualizar a permeabilização de fagossomos, juntamente com o aumento na concentração de Zn<sup>2+</sup> em células fúngicas internalizadas, foram realizados como descrito anteriormente, porém os macrófagos foram previamente tratados com o reagente indicador de permeabilização de fagossomos Isotiocianato de tetrametilrodamina – dextran (TRITC-dextran) (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 1 mg/ml. As células foram lavadas 3 vezes com PBS. DMEM livre de SFB, contendo ou não células fúngicas em uma proporção de 5:1 foi adicionado juntamente com o reagente FluoZin-3-AM. A placa foi levada ao microscópio Zeiss Axiovert 135 TV, incubada em câmara umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Okolabs). As imagens foram capturadas por meio da câmera digital *Sight DS-Qimaging* (Nikon) utilizando

objetiva Plan Apo Ph120x (Nikon), por um período de 18 horas a cada 5 minutos. As imagens foram analisadas utilizando software ImageJ Fiji.

#### 4.2.2.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ZNT4

Experimentos de *western blot* foram realizados para análise de expressão de Znt4 após 18 horas de interação. As interações foram realizadas nos mesmos padrões dos outros experimentos, entretanto somente na condição controle (sem células fúngicas) e condição de interação contendo células fúngicas. Após duas horas de interação, os poços foram lavados e novamente incubados por 16 horas adicionais, totalizando um período de 18 horas de interação. A extração de proteínas de macrófagos foi realizada utilizando tampão RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 1% Triton X-100; 10% Glicerol) contendo inibidor de protease (Roche). Um volume de 400 µl de tampão gelado foi adicionado aos poços, os macrófagos foram raspados vigorosamente com ponteira estéril. O lisado celular foi coletado e centrifugado à 16.000 g por 20 minutos a 4 °C, o *pellet* foi descartado e extrato foi mantido à -20 °C até o momento do uso. A concentração de proteínas no extrato foi mensurada utilizando reagente fluorimétrico Qubit<sup>®</sup> Protein assay kit (ThermoFisher). Um volume de aproximadamente 15 µl contendo 20µg de proteína foi carregado em gel SDS-PAGE e submetido a eletroforese. A marcação da banda correspondente à Znt4 foi realizada utilizando anticorpo policlonal anti-Znt4 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) seguido de uma marcação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology). A marcação da banda correspondente à β-Actina foi realizada com anticorpo primário de cabra anti-β-Actina (Santa Cruz Biotechnology) e secundário anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase. A revelação das bandas marcadas com anticorpos foi realizada

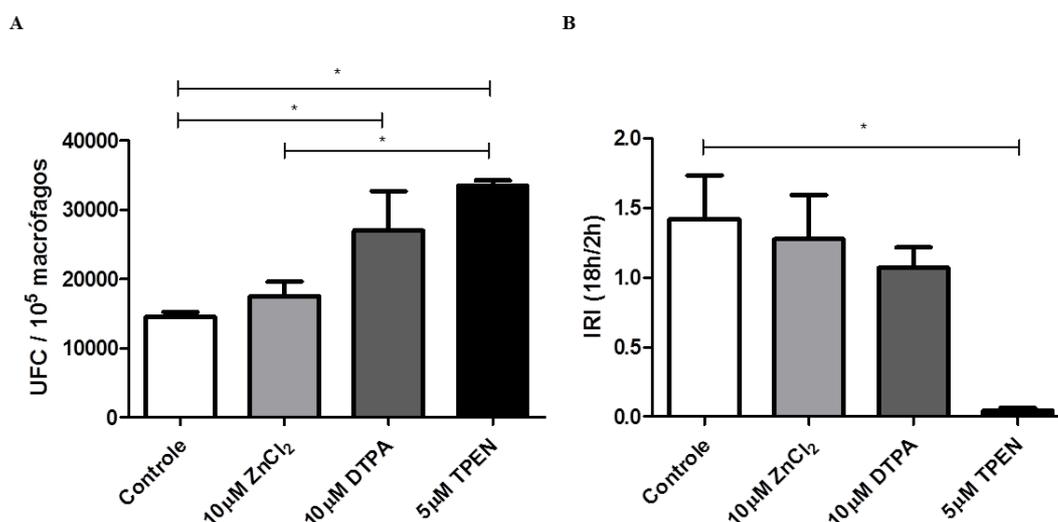
utilizando o substrato de detecção Clarity™ ECR Blotting, seguindo o protocolo do fabricante (BioRad). Após incubação com reagente de detecção, a revelação foi realizada no equipamento ChemiDoc XRS (BIORAD) através do software Image Lab. A intensidade relativa da banda foi estimada realizando a razão entre as intensidades das bandas correspondes a  $\beta$ -Actina com as bandas correspondentes de Znt4.

## **4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.2.3.1 Baixos níveis de zinco durante o processo de interação causam efeitos na fagocitose**

Em trabalhos anteriores, demonstramos que *C. gattii* com deficiência na homeostase de zinco apresentam uma maior susceptibilidade à fagocitose (Schneider *et al.*, 2012), bem como uma menor taxa de replicação intrafagossomal (Schneider *et al.*, 2015). Nesse contexto, analisamos os níveis de fagocitose e o índice de replicação intrafagossomal em condições de privação ou disponibilidade de zinco. E ensaios de interação entre *C. gattii* e macrófagos foram conduzidos na presença de agentes quelantes ou  $ZnCl_2$ . Foram observados aumentos nas taxas de fagocitose após duas horas de interação na presença dos agentes quelantes DTPA e TPEN, quando comparadas com condição controle e na presença de  $ZnCl_2$  (Figura 8A). Após 18 horas de interação, os níveis de UFC não demonstraram variações em relação à condição controle, bem como o índice de replicação intrafagossomal calculado a partir da divisão dos níveis de UFC em 18 horas pelos níveis de duas horas (Figura 8B). Importante citar que o baixo índice de replicação intrafagossomal observado na presença do quelante intracelular TPEN deve-se a morte dos macrófagos ocasionada pelo próprio reagente

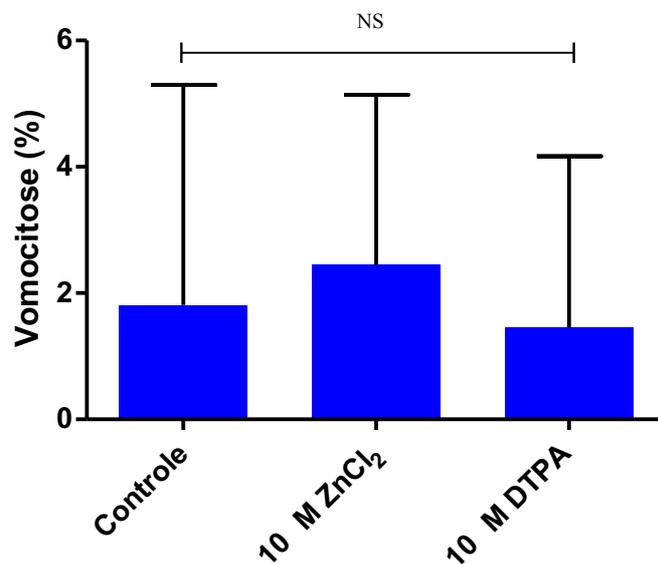
(dados não mostrados). Tal evento foi comprovado por microscopia nos experimentos seguintes.



**Figura 8. Aumento nos níveis fagocitose na presença de agentes quelantes.** Níveis de UFC/10<sup>5</sup> macrófagos após 2 horas de interação (A) e índice de replicação intrafagossomal (IRI) comparando os níveis de células internalizadas entre 18 e duas horas (B). O experimento foi realizado 3 vezes de maneira independente e seguindo exatamente o mesmo protocolo. Desvio padrão dos valores obtidos a partir das triplicatas biológicas. \*, P < 0.05 de acordo com o teste estatístico ANOVA.

Os dados levantados em relação à replicação intrafagossomal demonstraram que os níveis de zinco não estão influenciando diretamente na capacidade proliferativa de *C. gattii* internalizado por macrófagos. Além disso, não foram observadas variações nos níveis de eventos de vomocitose entre as diferentes condições testadas (Figura 9), demonstrando que a extrusão não lítica de *C. gattii* também não está sendo influenciada pelos níveis de zinco durante o processo de interação. Entretanto, o aumento nos níveis de células internalizadas/aderidas após duas horas de interação, na presença dos agentes quelantes, demonstra uma maior capacidade fagocítica dos macrófagos em condições de privação do metal. Alternativamente, os elevados níveis de células internalizadas podem ser explicados por uma maior concentração de zinco presente no interior dos macrófagos, quando comparado com o meio de cultura contendo os agentes quelantes.

Dessa maneira, sugere-se que *C. gattii* possa ter um maior acesso ao metal a partir de proteínas quelantes do hospedeiro, tornando o fagossomo um ambiente mais “vantajoso” para as células fúngicas. Tal quadro poderia diminuir a necessidade de extrusão lítica de células fúngicas durante a interação, portanto, mais células permaneceriam internalizadas nos macrófagos.

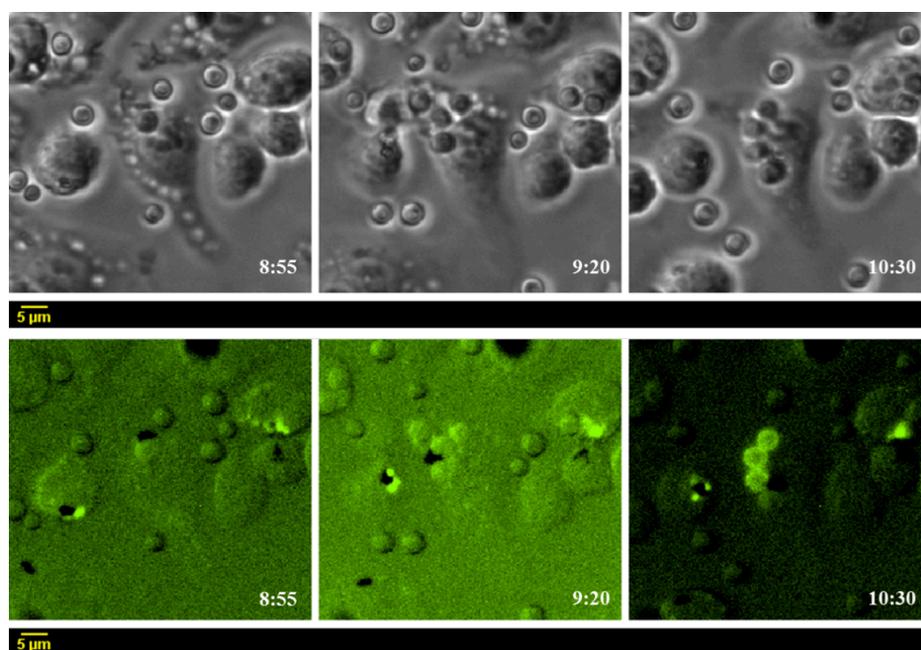


**Figura 9. Eventos de extrusão não lítica de *C. gattii* expressando GFP não são influenciados pela disponibilidade de zinco.** As médias de porcentagem foram calculadas a partir do número de células internalizadas que realizaram eventos de vomocitose em 3 diferentes campos do poço contendo a devida condição. Análise estatística realizada utilizando teste ANOVA, NS, não significativa.

#### **4.2.3.2 Aumento nos níveis de zinco em células de *C. gattii* internalizadas por macrófagos**

Com as variações observadas nos níveis de fagocitose na presença de agentes quelantes, optamos por realizar uma análise com microscopia *time-lapse* quanto à

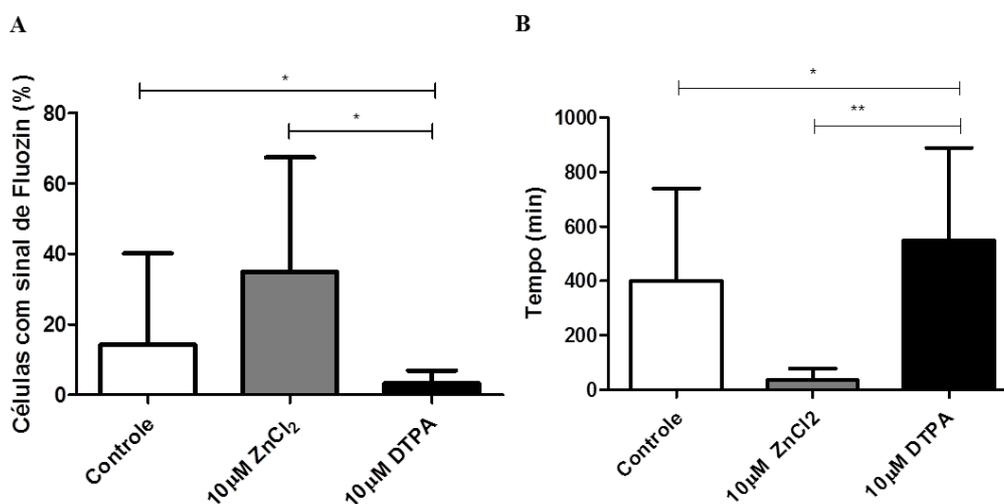
presença de variações nas concentrações de zinco em células de *C. gattii* internalizadas. Para tal, empregamos as mesmas condições dos ensaios de interação. Porém, devido à morte dos macrófagos, excluímos a condição na presença do agente quelante intracelular TPEN. A adição da sonda fluorescente FluoZin-3-AM, no exato momento da adição das células fúngicas aos macrófagos, permitiu uma análise dos níveis intracelulares de  $Zn^{2+}$ . Curiosamente, *flashes* de fluorescência foram observados em células de *C. gattii* somente quando as mesmas encontravam-se internalizadas, indicando que o metal está sendo adquirido no interior de fagossomo (Figura 10).



**Figura 10. Captura de zinco por *C. gattii* no interior de fagossomos.** Microscopia *Time-lapse* foi utilizada para visualizar os níveis de zinco em *C. gattii* enquanto no interior de fagossomos. Podemos observar o aumento na fluorescência das células após internalização. Os valores na parte inferior da figura representam o tempo em horas após o início da microscopia. As imagens foram capturadas a cada 5 minutos por um período de 18 horas.

A análise das microscopias demonstrou um padrão diferenciado nos eventos de fluorescência em células internalizadas. Uma maior percentagem de células fagocitadas apresentaram eventos de fluorescência quando  $ZnCl_2$  era adicionado à interação. Em contrapartida, a adição de DTPA ao sistema causa um decréscimo na percentagem de

células positivas para esses eventos (Figura 11A). A diminuição na porcentagem de eventos de fluorescência na presença do agente quelante deve-se provavelmente à redução na disponibilidade do metal para os macrófagos, conseqüentemente reduzindo a disponibilidade para células internalizadas, tornando-se assim mais difícil a aquisição de  $Zn^{2+}$ . Em oposição, a adição de uma fonte de zinco ao sistema aumenta drasticamente a disponibilidade do metal para macrófagos, e conseqüentemente para as células internalizadas. Não somente a frequência de eventos apresentou variações entre as condições: os eventos de fluorescência na presença de  $ZnCl_2$  apresentaram períodos de duração mais curtos que nas condições controle e com DTPA (Figura 11B). Uma possível explicação, é que as células não necessitam adquirir uma grande quantidade do metal, visto que sua disponibilidade encontra-se aumentada quando  $ZnCl_2$  é adicionado à interação. Entretanto, na presença de DTPA, os eventos de fluorescência apresentaram períodos de duração mais longos, indicando que *C. gattii* estaria realizando um maior “esforço” para adquirir o metal, o qual se encontra com disponibilidade limitada, tanto no meio de cultura quanto no interior de macrófagos.



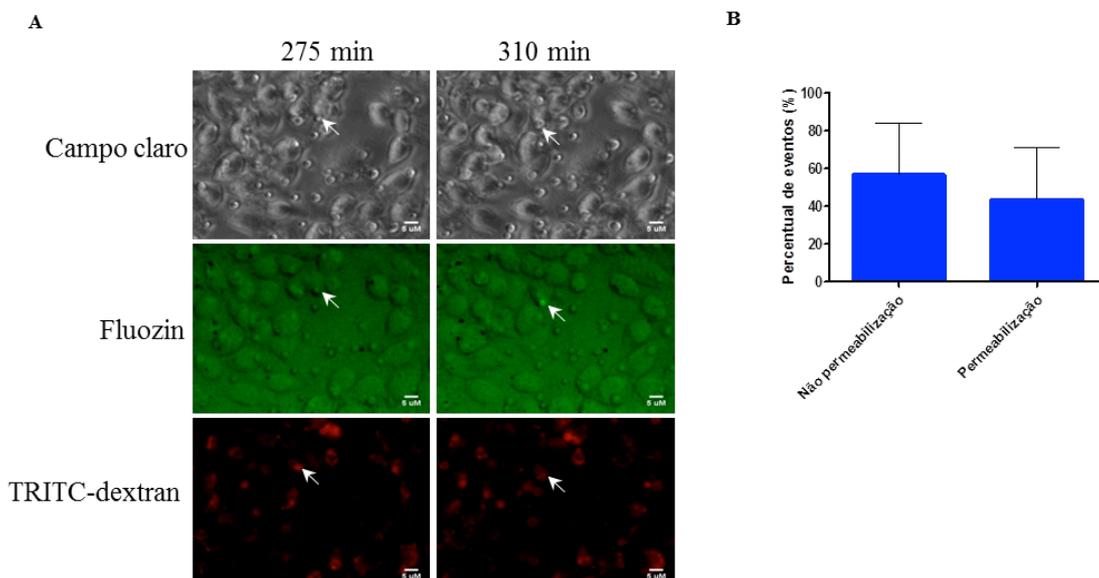
**Figura 11. Adição de ZnCl<sub>2</sub> e DTPA na interação causam alterações no perfil de captura de zinco por *C. gattii* internalizado.** (A) Porcentagem de células internalizadas que apresentaram fluorescência durante o período de 18 h de interação. As barras representam a média das porcentagens obtidas nos 4 campos analisados nas diferentes condições, bem como o desvio padrão. \*, p<0.005. (B) Média da duração dos eventos de fluorescência em células internalizadas. Desvio padrão obtido a partir da média de todos os eventos de fluorescência. \*, p<0.05; \*\*, p<0.001. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA.

#### **4.2.3.3 Permeabilização do fagossomo está relacionado com eventos de aumento na concentração de Zn<sup>2+</sup> em *C. gattii* internalizado**

A ocorrência de eventos de fluorescência geraram dúvidas quanto aos mecanismos que permitem essa aquisição de zinco por parte das células fúngicas internalizadas. Utilizando como base o trabalho desenvolvido por Vignesh e colaboradores, no qual sugere que privação de zinco é um mecanismo utilizado por macrófagos para inibição do desenvolvimento de *H. capsulatum* internalizado (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013), partimos do pressuposto que as células fúngicas estão em constante condição de privação do metal no interior de fagossomos. Além disso, como descrito no capítulo anterior, linhagens de *C. gattii* deficientes na aquisição de zinco apresentam uma menor taxa de replicação intrafagossomal (Schneider *et al.*, 2015), o que reforça essa teoria. Dessa maneira, os eventos de fluorescência representam os momentos nos quais *Cryptococcus* teria acesso a uma fonte do metal. Uma provável hipótese, é que a permeabilização dos fagossomos permite *C. gattii* ter acesso ao conteúdo citoplasmático ou um possível evento de lise celular permitindo acesso ao meio de cultivo.

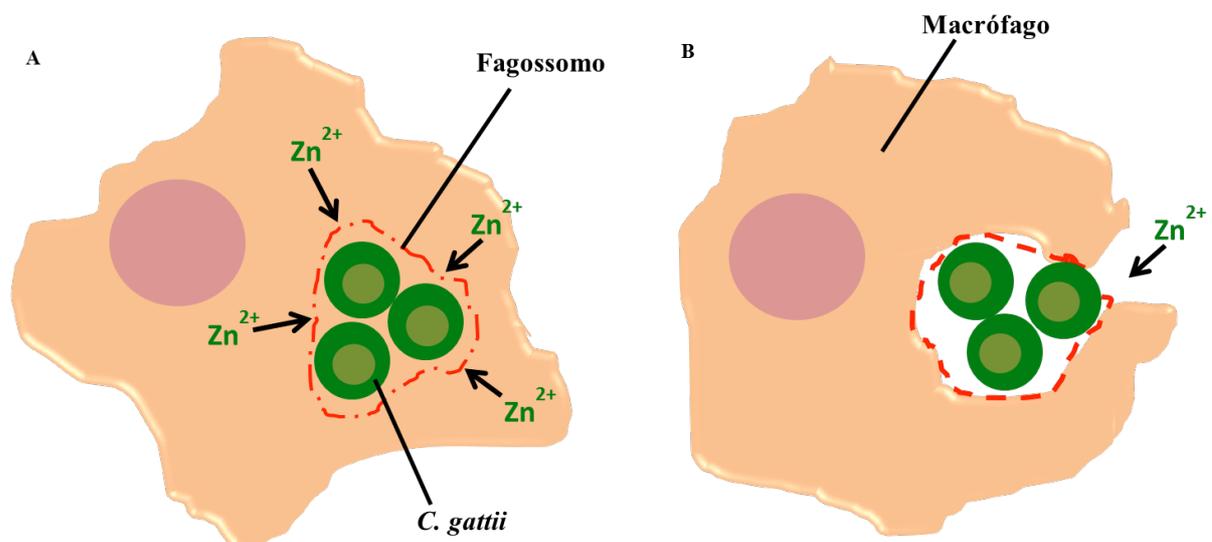
Para testar tal hipótese, foram realizados ensaios de interação juntamente com o indicador de permeabilização de fagossomos TRITC-dextran. A perda ou diminuição do sinal fluorescente vermelho do reagente TRITC nos fagossomos representa

permeabilização da estrutura, podendo essa ser tanto com o meio citoplasmático quanto com o meio extracelular. Foi realizada uma análise comparativa de 3 diferentes campos da interação, onde todas as células fúngicas internalizadas que apresentaram aumento na concentração de zinco, foram avaliadas se havia ou não a diminuição/perda de sinal vermelho concomitantemente. Dessa maneira, foi possível analisar a correlação dos *flashes* de FluoZin com a perda de sinal de TRITC-dextran. As análises de microscopia *time-lapse* demonstraram que de fato existe uma correlação. Como observado na Figura 12A, onde as flechas indicam uma célula de *C. gattii* internalizada, podemos observar que no momento que ocorre a permeabilização no fagossomo, indicado pela diminuição do sinal vermelho no tempo de 310 minutos (TRITC-dextran), é possível visualizar fluorescência verde (FluoZin). Constatou-se que, em 44% dos eventos de fluorescência verde (FluoZin) ocorre diminuição/perda do sinal de TRITC, ou seja, há eventos de permeabilização juntamente com o aumento da concentração de zinco das células localizadas no fagossomo. Entretanto, em 56% dos casos não apresentaram correlação com permeabilização (Figura 12B), o que indica outros a existência de outros eventos de aquisição e/ou mobilização de zinco para o fagossomo.



**Figura 12. Permeabilização do fagossomo está relacionado com o aumento das concentrações de  $Zn^{2+}$  em *C. gattii* internalizado.** Microscopia *time-lapse* de ensaio de interação. Experimento foi realizado com o reagente indicador de permeabilização de fagossomo TRITC-dextran e com a sonda fluorescente indicadora de  $Zn^{2+}$  FluoZin-3-AM (A). Percentual de eventos em que o aumento no sinal de fluorescência verde está ou não correlacionado com a diminuição/perda do sinal fluorescente vermelho (B). Foram analisados todos os eventos que apresentaram aumento na fluorescência verde em 3 diferentes campos da interação.

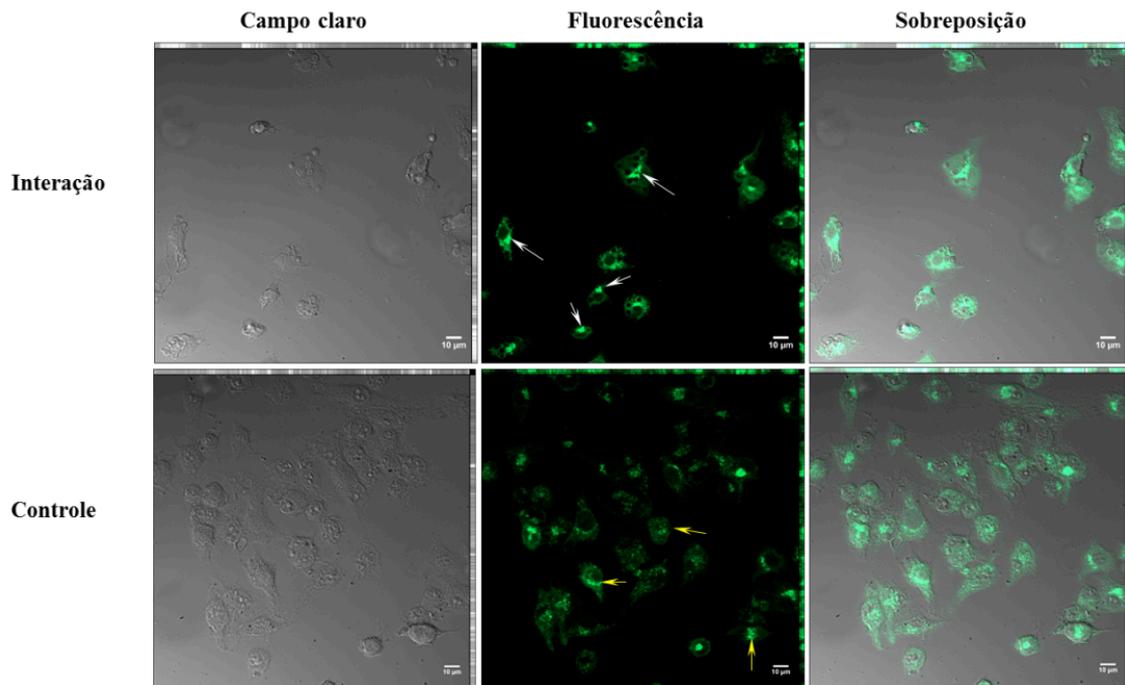
Tal resultado demonstra que, os aumentos na concentração de zinco em células de *C. gattii* internalizadas estão diretamente relacionados com eventos de permeabilização da estrutura fagossomal na qual as células fúngicas estão situadas. Além disso, não foram observados casos de permeabilização de fagossomos, contendo células internalizadas, sem que houvesse fluorescência verde simultaneamente, reforçando tal hipótese. Com isso, sugerimos que o fungo é capaz de adquirir o metal a partir de proteínas ligadoras de zinco,  $Zn^{2+}$  livre presentes no conteúdo citoplasmático (Figura 6A) ou  $Zn^{2+}$  presente no meio de cultivo (Figura 13B). Entretanto, é provável que mecanismos moleculares também estejam envolvidos nos aumentos das concentrações de  $Zn^{2+}$  em células fúngicas internalizadas, visto que a permeabilização da estrutura fagossomal não ocorre em 100% dos casos.



**Figura 13. Permeabilização de fagossomos contendo *C. gattii*.** Esquemática do processo de permeabilização de fagossomos (A) ou de lise celular (B), permitindo ao patógeno ter acesso a fontes de zinco.

#### **4.2.3.4 Compartimentalização de zinco em macrófagos infectados com *C. gattii***

Para testar a hipótese que macrófagos utilizam da privação de zinco para conter a multiplicação de *C. gattii* internalizado, foi realizado um experimento de interação utilizando a sonda fluorescente de zinco Zinpyr-1. Microscopias demonstraram que macrófagos infectados com *C. gattii* possuem uma compartimentalização do zinco intracelular, como observado na Figura 14, as setas brancas indicam claramente uma maior intensidade de fluorescência em pontos específicos no interior das células, os quais não estão co-localizados com o fagossomo. Tal perfil de fluorescência é diferentemente observado na condição controle sem células fúngicas internalizadas, as setas amarelas demonstram um padrão de fluorescência mais difuso quando comparado com a interação (Figura 14). Sabendo que Zinpyr-1 possui uma maior afinidade por zinco presente no complexo de Golgi e vesículas derivadas dessa organela, podemos hipotetizar que o metal está sendo removido do fagossomo e estocado no complexo de Golgi. Além disso, nossa hipótese é reforçada por descrições da literatura em que macrófagos primários infectados com *H. capsulatum* realizam uma mobilização de zinco para essa organela, removendo o conteúdo metálico do fagossomo e privando-o das células fúngicas internalizadas (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013). Entretanto, uma análise quantitativa deve ser realizada para fins comparativos entre condição controle e condição de interação.

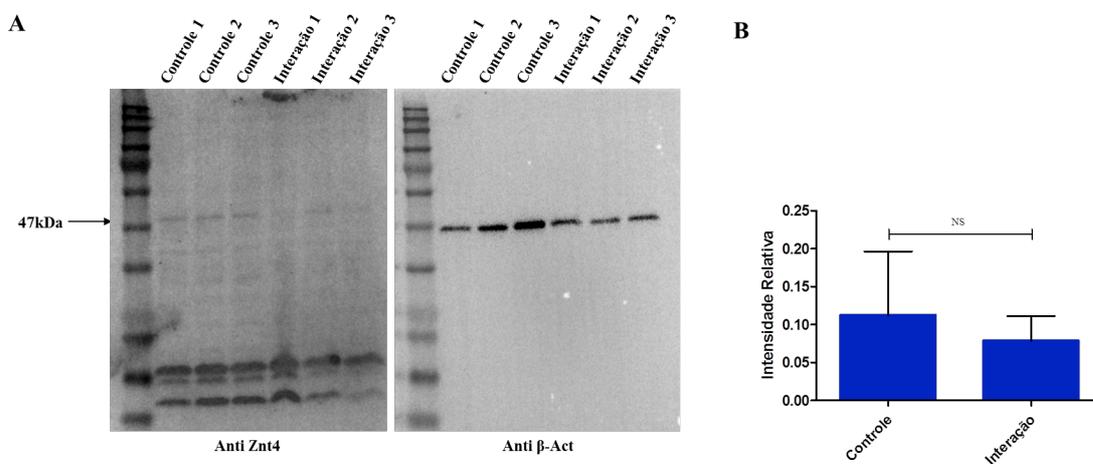


**Figura 14. Compartimentalização do  $Zn^{2+}$  em macrófagos infectados com *C. gattii*.** Microscopia confocal de ensaio de interação fixado em lâminas de vidro. É possível perceber o padrão de fluorescência em macrófagos infectados ou não com *C. gattii*, como indicado pelas flechas brancas e amarelas respectivamente. As lâminas foram montadas a partir de macrófagos incubados em DMEM sem SFB, contendo ou não células fúngicas, por um período de 2 horas.

#### 4.2.3.5 Níveis de Znt4 não são alterados após 18 horas de interação entre macrófagos e *C. gattii*

A microscopia realizada com a sonda fluorescente Zinpyr-1 demonstrou que macrófagos infectados apresentam uma maior concentração de zinco em pontos específicos da célula, sugerindo que o metal está sendo compartimentalizado no complexo de Golgi. Sabendo que, o transporte de metais no interior da célula envolve uma vasta gama de transportadores, e que os genes Slc30a4 e Slc30a7, codificadores

das proteínas ZnT4 e ZnT7 respectivamente, são regulados positivamente em macrófagos estimulados com GM-CSF e infectados com *H. capsulatum* (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013), resolvemos analisar os níveis de Znt4 em macrófagos infectados com *C. gattii*. Para isso, foi realizado experimento de *western blot* onde os níveis da proteína foram analisados após 18 horas em macrófagos infectados ou não com células fúngicas. Como indicado na (Figura 15A) podemos visualizar a presença da banda correspondente à Znt4 na membrana. Aparentemente, uma maior intensidade de banda é observada nas linhas correspondentes à condição controle, entretanto, a intensidade relativa, calculada com o normalizador  $\beta$ -Actina, demonstrou que não há diferença nos níveis de Znt4 em macrófagos infectados ou não (Figura 15B).



**Figura 15. Expressão de Znt4 em macrófagos infectados com *C. gattii*.** *Western blot* de Znt4 e  $\beta$ -Actina em macrófagos (controle) e macrófagos infectados (interação) com *C. gattii* (A). Média dos valores da intensidade relativa das bandas de Znt4 em relação a  $\beta$ -Actina (B). Análise estatística realizada utilizando o teste t, NS, não significativo.

Transportadores de metais do tipo ZnT estão envolvidos em transporte de zinco do citosol para organelas celulares. Em células epiteliais e nervosas, ZnT4 e ZnT7 estão envolvidos no transporte de zinco no complexo de Golgi (Gao *et al.*, 2009; McCormick

e Kelleher, 2012). O resultado observado a partir do experimento de *western blot*, surpreendentemente demonstrou que a proteína ZnT4 não encontra-se em maior concentração após um período de 18 horas de interação entre macrófagos e *C. gattii*. Porém, não se pode afirmar que o transportador não está envolvido em um suposto processo de privação do metal em fagossomos contendo *C. gattii*. Para tal afirmação, mais experimentos devem ser realizados.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Micronutrientes como ferro, zinco e manganês são essenciais para a manutenção da vida. Hospedeiros mamíferos necessitam adquirir esses micronutrientes através da dieta, enquanto micro-organismos patogênicos desenvolveram mecanismos para capturar metais de seus hospedeiros (Crawford e Wilson, 2015). Dentre os micronutrientes, o metal zinco desempenha um papel essencial para as funções celulares. É o segundo metal de transição mais abundante no corpo humano, sua homeostase é realizada por mecanismos regulatórios homeostáticos, os quais mantêm níveis adequados para que não se torne escasso, bem como tóxico para as células (Lyons *et al.*, 2000b). Nesse contexto, a imunidade nutricional é um importante aliado na eliminação e/ou contenção de patógenos, sendo caracterizada principalmente pela diminuição na disponibilidade de micronutrientes metálicos, dificultando a disseminação de micro-organismos patogênicos (Hood e Skaar, 2012). Mecanismos de privação de zinco extracelular são bastante elucidados até o momento, um dos mecanismos é realizado por meio de complexos calprotectinas, os quais são produzidos por neutrófilos e possuem forte atividade antifúngica (Corbin *et al.*, 2008). Entretanto, pouco se sabe sobre o metabolismo de zinco durante interação de patógenos fúngicos intracelulares com fagócitos humanos, quais os mecanismos de defesa desenvolvidos

pelas células fagocíticas, bem como os mecanismos de transporte desse metal que permitem o desenvolvimento do patógeno no ambiente intrafagossomal.

Em pesquisas anteriores, nosso grupo demonstrou que o fator de transcrição *ZAP1* é a principal molécula reguladora da homeostase de zinco em *C. gattii*. Por meio da análise do transcriptoma da linhagem mutante para esse fator de transcrição, descrevemos um conjunto de genes cuja expressão é regulada por essa molécula. Dentre os genes, os transportadores de zinco da família ZIP apresentaram baixos níveis de transcritos na ausência de Zap1. Além disso, camundongos infectados com a linhagem *zap1Δ* apresentaram uma maior sobrevida. Tal dado demonstra que a homeostase de zinco está diretamente relacionada com a virulência desse patógeno, com fortes evidências que transportadores de zinco desempenham importante papel na patogenicidade de *C. gattii*. Devido a isso, decidimos dar prosseguimento às pesquisas envolvendo a caracterização de transportadores de zinco nesse patógeno fúngico, bem como a homeostase do metal durante sua interação com hospedeiros. Nesse contexto, o presente trabalho reforçou, através de diferentes técnicas, a teoria que o metal zinco é essencial para a virulência de *C. gattii* (Schneider *et al.*, 2012).

Inicialmente, demonstramos no capítulo 1 que três genes codificadores para transportadores de zinco possuem sua expressão regulada pela disponibilidade do metal. Entretanto, *ZIP1* e *ZIP2* apresentaram um aumento de expressão mais significativo do que *ZIP3*. Por esse motivo, decidimos gerar mutantes nulos e complementados para os genes *ZIP1* e *ZIP2*, bem como uma linhagem duplo mutante. Inicialmente, postulamos que, tanto *zip1Δ* como *zip2Δ* apresentariam crescimento reduzido na condição de privação de zinco. Surpreendentemente, somente *zip1Δ* e *zip1Δzip2Δ* apresentaram redução no crescimento, além disso, as mesmas linhagens apresentaram um menor conteúdo de zinco intracelular. Utilizando como exemplo a levedura modelo *S.*

*cerevisiae*, onde apenas o transportador de zinco *Zrt1* é considerado de alta afinidade (Zhao e Eide, 1996a), sugerimos que o gene *ZIP1* de *C. gattii* codifica para um homólogo de *S. cerevisiae* de alta afinidade.

Estudos de metalobiologia demonstram que a ausência de zinco está relacionada com aumento nos níveis de EROs. Tal fato deve-se principalmente a duas razões: (I) a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, como a enzima Cu/Zn superóxido dismutase, a qual possui atividade dependente da disponibilidade do metal, e (II) genes codificadores para metalotioneínas (Mts), as quais apresentam atividades antioxidantes, possuem expressão regulada pela disponibilidade de zinco (Eide, 2011; Maret, 2003; 2008). Utilizando como base tais estudos, demonstramos que *zip1Δ* e *zip1Δzip2Δ* apresentam maiores níveis de EROs intracelular. Devido ao fato de que *zip2Δ* não apresentou redução de crescimento na condição de privação de zinco, seus níveis de zinco permaneceram iguais à linhagem selvagem e que não foi observado aumento nos níveis de EROs, sugerimos um possível efeito compensatório de outros transportadores na ausência de *ZIP2*. Como esperado, uma superexpressão do gene *ZIP1* foi observado nessa linhagem (Figura 3), o que justifica a ausência de tais fenótipos.

Interação com macrófagos J774A.1 demonstrou que *zip1Δ* e *zip1Δzip2Δ* possuem uma maior predisposição à fagocitose. Porém, a análise do índice de replicação intrafagossomal demonstrou que *zip2Δ* e *zip1Δzip2Δ* apresentam uma menor taxa de replicação no interior de células fagocíticas. Adicionalmente, ensaio de infecção em modelo murino demonstrou atenuação da virulência apenas na linhagem *zip1Δzip2*. Tais dados reforçam a ideia de um efeito compensatório, ou seja, na ausência de um dos transportadores uma ou mais proteínas atuam para manter o adequado metabolismo da célula, dessa maneira não interferindo na patogenicidade do fungo. Tal fato pode estar

relacionado com adaptação e evolução de *C. gattii*, por ser uma espécie altamente virulenta não seria vantajoso atribuir todo o mecanismo de transporte de zinco para apenas uma proteína. Pelo fato de que tecidos humanos apresentam níveis de  $Zn^{2+}$  que podem variar drasticamente (Lech e Sadlik, 2011; Staats *et al.*, 2013), um possível evento de mutação no genoma da célula fúngica poderia comprometer a capacidade de infecção no hospedeiro. Além disso, como observado em *A. fumigatus*, diversos transportadores de zinco da família ZIP são codificados pelo genoma desse patógeno, sendo que a mutação de apenas um deles não surte efeito na virulência dessa espécie (Amich e Calera, 2014).

No segundo capítulo do presente trabalho, foram descritos experimentos relacionados à homeostase de zinco durante interação de *C. gattii* com macrófagos. Experimentos de microscopia *time-lapse* permitiram uma análise visual das variações nas concentrações de em células de *C. gattii* internalizadas. Os eventos de fluorescência observados nas células fúngicas fagocitadas abriram uma vasta gama de possibilidades a serem investigadas. Inicialmente, partimos do pressuposto que macrófagos estariam utilizando da intoxicação por zinco como atividade antifúngica, onde os eventos de fluorescência representariam um *overload* do metal no fagossomo. De fato, é descrito que fagócitos utilizam da intoxicação por zinco e cobre como atividade antimicrobiana contra *M. tuberculosis* (Neyrolles *et al.*, 2013; Nies, 2003). Entretanto, a fluorescência emitida pelo reagente FluoZin 3-AM limita-se somente às células fúngicas internalizadas, não sendo observada em toda estrutura do fagossomo. Além disso, não foi observada correlação dos eventos de fluorescência com morte da célula fúngica internalizada (dados não mostrados). Tais dados nos levam a hipotetizar que os aumentos na concentração de zinco são eventos realizados pela própria célula fúngica, ou seja, transportadores de zinco de *C. gattii* estariam captando o metal a partir de

fontes externas de  $Zn^{2+}$ . No modelo de estudo *C. neoformans*, sabe-se que ocorre um aumento nos níveis do gene codificador para transportador de zinco *ZIP1* no ambiente intrafagossomal (Derengowski *et al.*, 2013).

A teoria de que *C. gattii* internalizado realiza captação de  $Zn^{2+}$  através de fontes externas levantou questões quanto aos mecanismos envolvidos nesses eventos. Primeiro, quais seriam as fontes externas de  $Zn^{2+}$ ? E segundo, de que maneira as células fúngicas teriam acesso a esse conteúdo? Em *H. capsulatum*, uma privação do metal ocorre no ambiente intrafagossomal (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013), o que também poderia ocorrer em *C. gattii*. Para responder tais questões, realizamos uma análise por microscopia. Quando os experimentos de interação foram realizados na presença do agente quelante DTPA, foi observada uma diminuição nos eventos de *flashes* de FluoZin. Devido ao fato de que o agente quelante DTPA atua quelando somente zinco presente no meio extracelular, sugerimos que uma das fontes do metal captada por *C. gattii* é o meio de cultivo. Além disso, apesar de não ser estatisticamente significativa, observamos uma tendência de aumento nos eventos de fluorescência quando  $ZnCl_2$  é adicionado na interação. Tais dados reforçam a ideia de que o meio extracelular é uma possível fonte do metal para células internalizadas, pois a ausência ou presença de  $Zn^{2+}$ , no meio de cultivo, é capaz de alterar a porcentagem de células que apresentam aumento na concentração do metal. Analisamos também o período de tempo dos eventos de fluorescência. A adição de  $ZnCl_2$  no sistema resultou em eventos mais curtos (Figura 10B), o que poderia ser explicado pelo fato de que, na disponibilidade de  $Zn^{2+}$ , não se faz necessário a constante captação do metal por parte do patógeno internalizado, entretanto, não podemos concluir que essa é a principal razão para o resultado observado.

Utilizando como base pesquisas realizadas por parte da equipe do Professor Robin May, as quais descreveram eventos de permeabilização de fagossomos contendo células de *C. neoformans* internalizadas (Johnston e May, 2010), decidimos testar uma possível correlação entre eventos de permeabilização e eventos de aumento na concentração de  $Zn^{2+}$  nas células fúngicas internalizadas. A perda do sinal de dextran marcado com o reagente fluorescente TRITC demonstrou que a permeabilização de fagossomos está relacionada com aproximadamente 44% dos eventos de *flashes* de FluoZin 3-AM (Figura 12B). Trabalhos anteriores descrevem que a replicação intrafagossomal de *C. neoformans* está relacionada com a permeabilização dessa estrutura, permitindo a sobrevivência no fungo e resultando no acúmulo de vesículas contendo polissacarídeo no citoplasma do macrófago (Tucker e Casadevall, 2002). Nesse caso, o rompimento da estrutura fagossomal permite que *C. gattii* tenha acesso tanto ao conteúdo citoplasmático do macrófago quanto ao meio de cultivo. Em contrapartida, aproximadamente 56% dos *flashes* de FluoZin 3-AM não ocorrem simultaneamente com a perda do sinal de TRITC-dextran, demonstrando que outros mecanismos, provavelmente de origem molecular, estão envolvidos na captura do metal. Como citado anteriormente, *C. albicans* apresenta um aumento nos níveis de transcritos do gene codificador para o transportador de zinco *ZRT2*, quando no ambiente intrafagossomal (Lorenz *et al.*, 2004). Nesse contexto, um possível aumento nos níveis de proteínas transportadoras de zinco de *C. gattii* internalizado pode estar envolvido com os eventos de aumento nos níveis de zinco. Mecanismos que governam a imunidade nutricional de zinco durante interação de patógenos fúngicos e hospedeiro ainda não foram elucidados. Entretanto, podemos aqui afirmar que realmente há uma participação direta da homeostase desse metal durante interação de fagócitos com micro-organismos. Mecanismos de intoxicação por zinco são utilizados por macrófagos para conter a

disseminação de patógenos bacterianos, em oposição, alguns patógenos desenvolveram mecanismo de detoxificação de zinco, o qual é realizado por meio de transportadores de metais (Becker e Skaar, 2014; Nies, 2003). Durante o decorrer do trabalho, diversas evidências nos levaram a partir do pressuposto de que macrófagos utilizam da privação de zinco para conter a proliferação de *C. gattii*. Como citado anteriormente, evidências sugerem que macrófagos primários utilizam da privação de zinco como atividade antifúngica contra *H. capsulatum*, através do deslocamento do conteúdo de zinco para o complexo de Golgi (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013). Resolvemos testar a mesma hipótese durante interação *C. gattii* e macrófagos. Macrófagos contendo células de *C. gattii* internalizadas apresentam um diferente padrão de coloração do conteúdo de zinco, curiosamente, não havendo co-localização com a estrutura fagossomal (Figura 13). Devido ao fato de que Zinpyr-1 apresenta uma maior afinidade por zinco presente no complexo de Golgi e em vesículas derivadas, pressupomos que um aumento na contração desse metal ocorre nessas estruturas de macrófagos quando infectado por *C. gattii*.

Os mecanismos pelos quais macrófagos realizam deslocamento do conteúdo de zinco durante infecção por *C. gattii* ainda permanecem desconhecidos. Sugerimos que a ação de transportadores de zinco presentes em organelas das células fagocítica seja um desses mecanismos. Supreendentemente, as análises de western blot demonstraram que a proteína transportadora de zinco ZnT4 não encontra-se em concentração aumentada em macrófagos após 18 horas de interação (Figura 14B). Entretanto, não podemos afirmar que essa proteína não está envolvida no deslocamento do conteúdo de zinco para o complexo de Golgi, visto que o teste foi realizado com extrato proteico apenas de macrófagos com 18 horas de interação. Além disso, a ativação das células com PMA pode estar alterando a expressão gênica dessas células, pois sabemos que em

macrófagos primários, o aumento da expressão dos genes ZNT4 e ZNT7 ocorre quando os mesmos são ativados com GM-CSF (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013).

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho gerou importantes dados quanto à imunidade nutricional de zinco durante o processo de interação *C. gattii* e hospedeiro. Demonstramos que leveduras defeituosas em mecanismos de captação do metal apresentam maiores níveis de EROs intracelular, uma menor taxa de replicação intrafagossomal e por consequência atenuação na virulência. Demonstramos também que, a mutação de apenas um dos genes codificadores para transportadores de zinco da família ZIP não é o suficiente para causar efeitos na virulência do patógeno, sugerindo que uma provável adaptação evolutiva atribuiu o transporte de zinco para mais de uma proteína. Além disso, observamos que *C. gattii* internalizado por macrófagos apresentam eventos de aumento na concentração de zinco, e que tais eventos estão relacionados com permeabilização da estrutura fagossomal. Analisando em conjunto, (I) linhagens de *C. gattii* defeituosas na captação de zinco apresentam menores índices de replicação intrafagossomal e atenuação na virulência, (II) células de *C. gattii* internalizadas apresentam eventos esparsos de aumento na concentração de zinco, e (III) macrófagos apresentam um deslocamento no conteúdo de zinco para organelas as quais não se sobrepõe com fagossomo infectado, podemos sugerir que a privação de zinco é um importante mecanismo utilizado por macrófagos para conter a disseminação de *C. gattii*.

## 7. PERSPECTIVAS

O presente trabalho levantou importantes dados em relação a homeostase de zinco durante interação de *C. gattii* e hospedeiros. Nossos dados sugerem que macrófagos utilizam da privação de zinco para conter a disseminação de *C. gattii* internalizado, e que tal mecanismo provavelmente é realizado através da ação de transportadores de zinco de macrófagos. Entretanto, não temos a total certeza de que tal mecanismo está ocorrendo. Para provar a existência de tal mecanismo, uma série de experimentos deve ser realizada, dentre eles:

- Realizar microscopia *time-lapse* de macrófagos infectados com linhagens de *C. gattii* mutantes para transportadores de zinco da família ZIP, utilizando a sonda fluorescente FluoZin 3-AM;

- Analisar a expressão gênica de genes codificadores para os transportadores de zinco de macrófagos ZnT4 e ZnT7 durante diferentes períodos de interação;

- Construção de linhagens de macrófagos knockout/knockdown para ZnT4;

- Avaliação da distribuição do conteúdo de zinco, por meio de microscopia *time-lapse*, em macrófagos knockout/knockdown para ZnT4 e infectados com *C. gattii*;

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. M.; ANDRADE, R. M.; BENTO, C. A. The capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* activate normal CD4(+) T cells in a dominant Th2 pattern. **J Immunol**, v. 167, n. 10, p. 5845-51, Nov 2001.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2161-5, Nov 2006.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunol**, v. 8, p. 16, 2007.

AMICH, J.; CALERA, J. A. Zinc acquisition: a key aspect in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 379-85, Dec 2014.

AMINNEJAD, M.; DIAZ, M.; ARABATZIS, M.; CASTAÑEDA, E.; LAZERA, M.; VELEGRAKI, A.; MARRIOTT, D.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 337-46, Jun 2012.

ANDREINI, C.; BERTINI, I. A bioinformatics view of zinc enzymes. **J Inorg Biochem**, v. 111, p. 150-6, Jun 2012.

BARLUZZI, R.; SALEPPICO, S.; NOCENTINI, A.; BOELAERT, J. R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BLASI, E. Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. **J Neuroimmunol**, v. 132, n. 1-2, p. 140-6, Nov 2002.

BAUM, G. L.; ARTIS, D. Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cell free human serum. **Am J Med Sci**, v. 241, p. 613-6, May 1961.

BAUM, G. L.; ARTIS, D. CHARACTERIZATION OF THE GROWTH INHIBITION FACTOR FOR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* (GIFC) IN HUMAN SERUM. **Am J Med Sci**, v. 246, p. 53-7, Jul 1963.

BECKER, K. W.; SKAAR, E. P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. **FEMS Microbiol Rev**, v. 38, n. 6, p. 1235-49, Nov 2014.

BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON, G.; DOERING, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-63, Aug 2003.

BOTTS, M. R.; GILES, S. S.; GATES, M. A.; KOZEL, T. R.; HULL, C. M. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 4, p. 595-605, Apr 2009.

BOTTS, M. R.; HULL, C. M. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 437-42, Aug 2010.

BYRNES, E. J.; BARTLETT, K. H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011.

BYRNES, E. J.; BILDFELL, R. J.; FRANK, S. A.; MITCHELL, T. G.; MARR, K. A.; HEITMAN, J. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 1081-6, Apr 2009.

BYRNES, E. J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. **F1000 Biol Rep**, v. 1, 2009.

BYRNES, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y. *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010.

CARMAN, G. M. Regulation of phospholipid synthesis in yeast by zinc. **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 5, p. 1150-3, Nov 2005.

CARMAN, G. M.; HAN, G. S. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, n. 3, p. 322-30, Mar 2007.

CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1389-92, May 2010.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. **Curr Mol Med**, v. 5, n. 4, p. 421-33, Jun 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3703-13, Aug 1999.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. **Infect Immun**, v. 68, n. 12, p. 6511-8, Dec 2000.

CERASI, M.; AMMENDOLA, S.; BATTISTONI, A. Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 108, 2013.

CHANG, Y. C.; KHANAL LAMICHHANE, A.; BRADLEY, J.; RODGERS, L.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; KWON-CHUNG, K. J. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131865, 2015.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J. *et al.* Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 4985-95, Sep 2004.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014.

CHEN, Y. L.; LEHMAN, V. N.; LEWIT, Y.; AVERETTE, A. F.; HEITMAN, J. Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. **G3 (Bethesda)**, v. 3, n. 3, p. 527-39, Mar 2013.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009.

CHOWDHARY, A.; RHANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Crit Rev Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 1-16, Feb 2012.

CHRISTIANSON, J. C.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 177-88, Jun 2003.

CITIULO, F.; JACOBSEN, I. D.; MIRAMÓN, P.; SCHILD, L.; BRUNKE, S.; ZIPFEL, P.; BROCK, M.; HUBE, B.; WILSON, D. Candida albicans Scavenges Host Zinc via Pra1 during Endothelial Invasion. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 6, p. e1002777, Jun 2012.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. Chapter One - The Tools for Virulence of Cryptococcus neoformans. In: SIMA SARIASLANI AND GEOFFREY, M. G. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v. Volume 87, 2014. p.1-41. ISBN 0065-2164.

COLVIN, R. A.; HOLMES, W. R.; FONTAINE, C. P.; MARET, W. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. **Metallomics**, v. 2, n. 5, p. 306-17, May 2010.

CONKLIN, D. S.; MCMASTER, J. A.; CULBERTSON, M. R.; KUNG, C. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in Saccharomyces cerevisiae. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 3678-88, Sep 1992.

CORBIN, B. D.; SEELEY, E. H.; RAAB, A. *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 962-5, Feb 2008.

COSTELLO, L. C.; LIU, Y.; FRANKLIN, R. B.; KENNEDY, M. C. Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 272, n. 46, p. 28875-81, Nov 1997.

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

CRESTANI, J.; CARVALHO, P. C.; HAN, X. *et al.* Proteomic profiling of the influence of iron availability on Cryptococcus gattii. **J Proteome Res**, v. 11, n. 1, p. 189-205, Jan 2012.

D'SOUZA, C. A.; KRONSTAD, J. W.; TAYLOR, G. *et al.* Genome variation in Cryptococcus gattii, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **MBio**, v. 2, n. 1, p. e00342-10, 2011.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of Cryptococcus neoformans. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004.

DERENGOWSKI, L. A. S.; PAES, H. C.; ALBUQUERQUE, P.; TAVARES, A. H.; FERNANDES, L.; SILVA-PEREIRA, I.; CASADEVALL, A. 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**, v. 12, n. 5, p. 761-74, May 2013.

DIAMOND, R. D.; MAY, J. E.; KANE, M. A.; FRANK, M. M.; BENNETT, J. E. The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. **J Immunol**, v. 112, n. 6, p. 2260-70, Jun 1974.

DING, C.; FESTA, R. A.; CHEN, Y. L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 3, p. 265-76, Mar 2013.

DING, C.; FESTA, R. A.; SUN, T. S.; WANG, Z. Y. Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens. **Mol Microbiol**, v. 93, n. 1, p. 10-23, Jul 2014.

DING, C.; YIN, J.; TOVAR, E. M.; FITZPATRICK, D. A.; HIGGINS, D. G.; THIELE, D. J. The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99. **Mol Microbiol**, v. 81, n. 6, p. 1560-76, Sep 2011.

DIX, D.; BRIDGHAM, J.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. **J Biol Chem**, v. 272, n. 18, p. 11770-7, May 1997.

DOHERTY, C. P. Host-pathogen interactions: the role of iron. **J Nutr**, v. 137, n. 5, p. 1341-4, May 2007.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 557-63, Feb 1997.

EIDE, D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu Rev Nutr**, v. 18, p. 441-69, 1998.

EIDE, D. J. The oxidative stress of zinc deficiency. **Metallomics**, v. 3, n. 11, p. 1124-9, Nov 2011.

EISENMAN, H. C.; FRASES, S.; NICOLA, A. M.; RODRIGUES, M. L.; CASADEVALL, A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 12, p. 3860-7, Dec 2009.

ELLERBROEK, P. M.; WALENKAMP, A. M.; HOEPELMAN, A. I.; COENJAERTS, F. E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 253-66, Jan 2004.

FEDER, V.; KMETZSCH, L.; STAATS, C. C.; VIDAL-FIGUEIREDO, N.; LIGABUE-BRAUN, R.; CARLINI, C. R.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS J**, v. 282, n. 8, p. 1406-18, Apr 2015.

FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLE, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annu Rev Pathol**, v. 7, p. 61-98, 2012.

FLEURIDOR, R.; ZHONG, Z.; PIROFSKI, L. A human IgM monoclonal antibody prolongs survival of mice with lethal cryptococcosis. **J Infect Dis**, v. 178, n. 4, p. 1213-6, Oct 1998.

GAO, H. L.; FENG, W. Y.; LI, X. L.; XU, H.; HUANG, L.; WANG, Z. Y. Golgi apparatus localization of ZNT7 in the mouse cerebellum. **Histol Histopathol**, v. 24, n. 5, p. 567-72, May 2009.

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

GUILLIAMS, M.; LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 3, p. 464-73, May 2013.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 16-48, May 2015.

HAN, K.; DO, E.; JUNG, W. H. A human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* expresses three distinct iron permease homologs. **J Microbiol Biotechnol**, v. 22, n. 12, p. 1644-52, Dec 2012.

HARRISON, T. S. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. **J Infect**, v. 41, n. 1, p. 12-7, Jul 2000.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-97, Apr 2004.

HISSEN, A. H.; CHOW, J. M.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1402-8, Mar 2004.

HOLE, C. R.; BUI, H.; WORMLEY, F. L.; WOZNIAK, K. L. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Sci Rep**, v. 2, p. 739, 2012.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 525-37, Aug 2012.

HU, C. J.; BAI, C.; ZHENG, X. D.; WANG, Y. M.; WANG, Y. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 30598-605, Aug 2002.

HUSTON, S. M.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; XIANG, R. F. *et al.* *Cryptococcus gattii* Capsule Blocks Surface Recognition Required for Dendritic Cell Maturation Independent of Internalization and Antigen Processing. **J Immunol**, v. 196, n. 3, p. 1259-71, Feb 2016.

JENSEN, L. T.; CULOTTA, V. C. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. **J Mol Biol**, v. 318, n. 2, p. 251-60, Apr 2002.

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 Pathog**, v. 6, n. 8, p. e1001041, 2010.

JUNG, W. H. The Zinc Transport Systems and Their Regulation in Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 179-83, Sep 2015.

JUNG, W. H.; DO, E. Iron acquisition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 686-91, Dec 2013.

JUNG, W. H.; HU, G.; KUO, W.; KRONSTAD, J. W. Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 10, p. 1511-20, Oct 2009.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 277-84, Feb 2008.

KAVANAUGH, L. A.; FRASER, J. A.; DIETRICH, F. S. Recent evolution of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* by intervarietal transfer of a 14-gene fragment. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 10, p. 1879-90, Oct 2006.

KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 4792-8, Oct 2007.

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Curr Opin Chem Biol**, v. 14, n. 2, p. 218-24, Apr 2010.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004.

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nat Chem Biol**, v. 4, n. 3, p. 176-85, Mar 2008a.

KIM, M. J.; KIL, M.; JUNG, J. H.; KIM, J. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 242-7, Feb 2008b.

KINCHEN, J. M.; DOUKOUMETZIDIS, K.; ALMENDINGER, J.; STERGIU, L.; TOSELLO-TRAMPONT, A.; SIFRI, C. D.; HENGARTNER, M. O.; RAVICHANDRAN, K. S. A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 556-66, May 2008.

KNIGHT, S. A.; VILAIRE, G.; LESUISSE, E.; DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 5482-92, Sep 2005.

KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; GILES, S. S.; STAJICH, J. E.; ALLEN, A.; COX, G. M.; DIETRICH, F. S.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-60, Oct 2004.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006.

LABBÉ, S.; THIELE, D. J. Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. **Trends Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 500-5, Dec 1999.

LECH, T.; SADLIK, J. K. Zinc in postmortem body tissues and fluids. **Biol Trace Elem Res**, v. 142, n. 1, p. 11-7, Jul 2011.

LEOPOLD WAGER, C. M.; HOLE, C. R.; WOZNIAK, K. L.; WORMLEY, F. L. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 105, 2016.

LEVITZ, S. M.; DUPONT, M. P.; SMAIL, E. H. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 194-202, Jan 1994.

LEVITZ, S. M.; NONG, S. H.; SEETOO, K. F.; HARRISON, T. S.; SPEIZER, R. A.; SIMONS, E. R. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infect Immun**, v. 67, n. 2, p. 885-90, Feb 1999.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **Am J Clin Nutr**, v. 63, n. 5, p. 797S-811S, May 1996.

LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 173-81, 2012 Mar-Apr 2012.

LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076-87, Oct 2004.

LOW, C. Y.; ROTSTEIN, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. **F1000 Med Rep**, v. 3, p. 14, 2011.

LYONS, T. J.; GASCH, A. P.; GAITHER, L. A.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; EIDE, D. J. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 14, p. 7957-62, Jul 2000a.

LYONS, T. J.; NERISSIAN, A.; HUANG, H.; YEOM, H.; NISHIDA, C. R.; GRADEN, J. A.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. The metal binding properties of the zinc site of yeast copper-zinc superoxide dismutase: implications for amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Inorg Chem**, v. 5, n. 2, p. 189-203, Apr 2000b.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 19, n. 12, p. 2845-55, Jun 2000.

MALLIARIS, S. D.; STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. **Med Mycol**, v. 42, n. 2, p. 149-58, Apr 2004.

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5154-6, Nov 1994.

MANSOUR, M. K.; LATZ, E.; LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. **J Immunol**, v. 176, n. 5, p. 3053-61, Mar 2006.

MARET, W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. **J Nutr**, v. 133, n. 5 Suppl 1, p. 1460S-2S, May 2003.

MARET, W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. **Exp Gerontol**, v. 43, n. 5, p. 363-9, May 2008.

MARVIN, M. E.; WILLIAMS, P. H.; CASHMORE, A. M. The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 6, p. 1461-74, Jun 2003.

MAY, R. C.; STONE, N. R.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, Feb 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016.

MCCORMICK, N. H.; KELLEHER, S. L. ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the trans-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 303, n. 3, p. C291-7, Aug 2012.

MERGEAY, M.; MONCHY, S.; VALLAEYS, T. *et al.* *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 2-3, p. 385-410, Jun 2003.

MERSHON, K. L.; VASUTHASAWAT, A.; LAWSON, G. W.; MORRISON, S. L.; BEENHOUWER, D. O. Role of complement in protection against *Cryptococcus gattii* infection. **Infect Immun**, v. 77, n. 3, p. 1061-70, Mar 2009.

MIYABE, S.; IZAWA, S.; INOUE, Y. The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 282, n. 1, p. 79-83, Mar 2001.

MOORS, M. A.; STULL, T. L.; BLANK, K. J.; BUCKLEY, H. R.; MOSSER, D. M. A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. **J Exp Med**, v. 175, n. 6, p. 1643-51, Jun 1992.

MORENO, M. A.; IBRAHIM-GRANET, O.; VICENTEFRANQUEIRA, R.; AMICH, J.; AVE, P.; LEAL, F.; LATGÉ, J. P.; CALERA, J. A. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 5, p. 1182-97, Jun 2007.

NETSKI, D.; KOZEL, T. R. Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity. **Infect Immun**, v. 70, n. 6, p. 2812-9, Jun 2002.

NEVITT, T.; OHRVIK, H.; THIELE, D. J. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1580-93, Sep 2012.

NEYROLLES, O.; MINTZ, E.; CATTY, P. Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 89, 2013.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.; SIONOV, E.; KWON-CHUNG, K. J. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; HIMMELREICH, U.; BREGER, J. A. *et al.* The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4584-96, Oct 2009.

NIELSEN, K.; DE OBALDIA, A. L.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 6, p. 949-59, Jun 2007.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 2-3, p. 313-39, Jun 2003.

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; HERNDAY, A. D.; HOMANN, O. R.; DENEALU, J. S.; NANTEL, A.; ANDES, D. R.; JOHNSON, A. D.; MITCHELL, A. P. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS Biol**, v. 7, n. 6, p. e1000133, Jun 2009.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 203-23, Apr 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3519-28, Nov 2006.

NOSANCHUK, J. D.; OVALLE, R.; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **J Infect Dis**, v. 183, n. 7, p. 1093-9, Apr 2001.

NOSANCHUK, J. D.; ROSAS, A. L.; LEE, S. C.; CASADEVALL, A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **Lancet**, v. 355, n. 9220, p. 2049-50, Jun 2000.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Front Microbiol**, v. 6, p. 1463, 2015.

NOSANCHUK, J. D.; VALADON, P.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 745-50, Jan 1999.

NOVERR, M. C.; WILLIAMSON, P. R.; FAJARDO, R. S.; HUFFNAGLE, G. B. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1693-9, Mar 2004.

OLIVE, A. J.; SASSETTI, C. M. Metabolic crosstalk between host and pathogen: sensing, adapting and competing. **Nat Rev Microbiol**, Mar 2016.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-8, Jun 2006.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 837-74, v-vi, Dec 2002.

PERICOLINI, E.; CENCI, E.; MONARI, C.; DE JESUS, M.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; VECCHIARELLI, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 267-75, Feb 2006.

PETZOLD, E. W.; HIMMELREICH, U.; MYLONAKIS, E.; RUDE, T.; TOFFALETTI, D.; COX, G. M.; MILLER, J. L.; PERFECT, J. R. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5877-87, Oct 2006.

PHILLIPS, P.; GALANIS, E.; MACDOUGALL, L. *et al.* Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 9, p. 1368-76, May 2015.

PLÜDDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 11-24, Mar 2011.

POLACHECK, I.; HEARING, V. J.; KWON-CHUNG, K. J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 150, n. 3, p. 1212-20, Jun 1982.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. **Adv Exp Med Biol**, v. 892, p. 327-49, 2016.

PRENTICE, A. M.; GHATTAS, H.; COX, S. E. Host-pathogen interactions: can micronutrients tip the balance? **J Nutr**, v. 137, n. 5, p. 1334-7, May 2007.

PROUD, D.; LEIGH, R. Epithelial cells and airway diseases. **Immunol Rev**, v. 242, n. 1, p. 186-204, Jul 2011.

PUKKILA-WORLEY, R.; GERRALD, Q. D.; KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; DAVIS, M. J.; GILES, S. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J.; ALSPAUGH, J. A. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 190-201, Jan 2005.

RAJA, M. R.; WATERMAN, S. R.; QIU, J.; BLEHER, R.; WILLIAMSON, P. R.; O'HALLORAN, T. V. A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Metalomics**, v. 5, n. 4, p. 363-71, Apr 2013.

RAJAKUMAR, S.; RAVI, C.; NACHIAPPAN, V. Defect of zinc transporter ZRT1 ameliorates cadmium induced lipid accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metalomics**, Mar 2016.

REES, E. M.; THIELE, D. J. From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 175-84, Apr 2004.

REES, E. M.; THIELE, D. J. Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. **J Biol Chem**, v. 282, n. 30, p. 21629-38, Jul 2007.

RETINI, C.; VECCHIARELLI, A.; MONARI, C.; TASCINI, C.; BISTONI, F.; KOZEL, T. R. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. **Infect Immun**, v. 64, n. 8, p. 2897-903, Aug 1996.

RHODES, J. C. Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of experimental murine cryptococcosis. **Sabouraudia**, v. 23, n. 3, p. 225-34, Jun 1985.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35455, 2012a.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012b.

SAIJO, T.; CHEN, J.; CHEN, S. C. *et al.* Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, 2014.

SALAS, S. D.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; WILLIAMSON, P. R. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 377-86, Aug 1996.

SAMANOVIC, M. I.; DING, C.; THIELE, D. J.; DARWIN, K. H. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 2, p. 106-15, Feb 2012.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Front Med (Lausanne)**, v. 3, p. 11, 2016.

SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T.; WILSON, C.; DONALD, C.; DJORDJEVIC, J.; SHOUNAN, Y.; WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2229-39, Apr 2004.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 12, p. 946-53, Dec 2004.

SCHNEIDER, R. E. O.; DIEHL, C.; DOS SANTOS, F. M. *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Sci Rep**, v. 5, p. 10104, 2015.

SCHNEIDER, R. E. O.; FOGAÇA, N. E. S.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; STAATS, C. C. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43773, 2012.

SHAO, X.; MEDNICK, A.; ALVAREZ, M.; VAN ROOIJEN, N.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **J Immunol**, v. 175, n. 5, p. 3244-51, Sep 2005.

SHI, M.; LI, S. S.; ZHENG, C.; JONES, G. J.; KIM, K. S.; ZHOU, H.; KUBES, P.; MODY, C. H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1683-93, May 2010.

SHI, X.; STOJ, C.; ROMEO, A.; KOSMAN, D. J.; ZHU, Z. Fre1p Cu<sup>2+</sup> reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 278, n. 50, p. 50309-15, Dec 2003.

SIMM, C.; LUAN, C. H.; WEISS, E.; O'HALLORAN, T. High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25136, 2011.

SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cell Microbiol**, Nov 2014.

SMITH, L. M.; MAY, R. C. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. **Biochem Soc Trans**, v. 41, n. 2, p. 475-90, Apr 2013.

SORRELL, T. C.; JUILLARD, P. G.; DJORDJEVIC, J. T.; KAUFMAN-FRANCIS, K.; DIETMANN, A.; MILONIG, A.; COMBES, V.; GRAU, G. E. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infect**, v. 18, n. 1, p. 57-67, Jan 2016.

SPRINGER, D. J.; BILLMYRE, R. B.; FILLER, E. E. *et al.* *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. e1004285, Aug 2014.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 14-20, Jan 2010.

SPRINGER, D. J.; REN, P.; RAINA, R. *et al.* Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10978, 2010.

STAATS, C. C.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 65, 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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001.

SUBRAMANIAN VIGNESH, K.; LANDERO FIGUEROA, J. A.; POROLLO, A.; CARUSO, J. A.; DEEPE, G. S. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 697-710, Oct 2013.

SUN, T. S.; JU, X.; GAO, H. L.; WANG, T.; THIELE, D. J.; LI, J. Y.; WANG, Z. Y.; DING, C. Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. **Nat Commun**, v. 5, p. 5550, 2014.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3165-70, Mar 2002.

URBAN, C. F.; ERMERT, D.; SCHMID, M.; ABU-ABED, U.; GOOSMANN, C.; NACKEN, W.; BRINKMANN, V.; JUNGBLUT, P. R.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000639, Oct 2009.

VAISHNAV, V. V.; BACON, B. E.; O'NEILL, M.; CHERNIAK, R. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. **Carbohydr Res**, v. 306, n. 1-2, p. 315-30, Jan 1998.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y. P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4345-55, Oct 2009.

VICENTEFRANQUEIRA, R.; MORENO, M. A.; LEAL, F.; CALERA, J. A. The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 5, p. 837-48, May 2005.

VOELZ, K.; JOHNSTON, S. A.; RUTHERFORD, J. C.; MAY, R. C. Automated analysis of cryptococcal macrophage parasitism using GFP-tagged cryptococci. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15968, 2010.

VOELZ, K.; JOHNSTON, S. A.; SMITH, L. M.; HALL, R. A.; IDNURM, A.; MAY, R. C. 'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nat Commun**, v. 5, p. 5194, 2014.

VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3450-7, Aug 2009.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-46, Jun 2010.

VOSKOBOINIK, I.; SMYTH, M. J.; TRAPANI, J. A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 940-52, Dec 2006.

VU, K.; THAM, R.; UHRIG, J. P.; THOMPSON, G. R.; NA POMBEJRA, S.; JAMKLANG, M.; BAUTOS, J. M.; GELLI, A. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01101-14, 2014.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1381-96, Sep 2005.

WARPEHA, K. M.; PARK, Y. D.; WILLIAMSON, P. R. Susceptibility of intact germinating *Arabidopsis thaliana* to human fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 9, p. 2979-88, May 2013.

WATERMAN, S. R.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; WILLIAMSON, P. R. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 2, p. 714-22, Feb 2007.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-5, Jul 2009.

WEISSMAN, Z.; KORNITZER, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 4, p. 1209-20, Aug 2004.

WILSON, D. An evolutionary perspective on zinc uptake by human fungal pathogens. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 979-85, Jun 2015.

WILSON, S.; BIRD, A. J. Zinc sensing and regulation in yeast model systems. **Arch Biochem Biophys**, Mar 2016.

WOZNIAK, K. L.; VYAS, J. M.; LEVITZ, S. M. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 3817-24, Jul 2006.

XU, S.; COOPER, A.; STURGILL-KOSZYCKI, S.; VAN HEYNINGEN, T.; CHATTERJEE, D.; ORME, I.; ALLEN, P.; RUSSELL, D. G. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. **J Immunol**, v. 153, n. 6, p. 2568-78, Sep 1994.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMAN, J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 4, p. 263-73, Jun 2007.

YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus capsular polysaccharide glucuronoxylomannan*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 11, p. e120, Nov 2006.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHAO, H.; BUTLER, E.; RODGERS, J.; SPIZZO, T.; DUESTERHOEFT, S.; EIDE, D. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. **J Biol Chem**, v. 273, n. 44, p. 28713-20, Oct 1998.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2454-8, Mar 1996a.

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 38, p. 23203-10, Sep 1996b.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 9, p. 5044-52, Sep 1997.

ZHENG, C. F.; JONES, G. J.; SHI, M. *et al.* Late expression of granulysin by microbicidal CD4<sup>+</sup> T cells requires PI3K- and STAT5-dependent expression of IL-2Rbeta that is defective in HIV-infected patients. **J Immunol**, v. 180, n. 11, p. 7221-9, Jun 2008.

ZHENG, C. F.; MA, L. L.; JONES, G. J.; GILL, M. J.; KRENSKY, A. M.; KUBES, P.; MODY, C. H. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2049-57, Mar 2007.