

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Rafaela Breda

**MOBILIZAÇÃO DE ZINCO EM *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* EXPOSTA A
LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO *CRYPTOCOCCUS***

Porto Alegre

2019

Rafaela Breda

**MOBILIZAÇÃO DE ZINCO EM *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* EXPOSTA A
LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO *CRYPTOCOCCUS***

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

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats.
Coorientadora: Doutoranda Camila Diehl

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Breda, Rafaela
Mobilização de zinco em *Acanthamoeba castellanii*
exposta a leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus*
/ Rafaela Breda. -- 2019.
60 f.
Orientador: Charley Christian Staats.

Coorientadora: Camila Diehl.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus gattii*.
3. *Acanthamoeba castellanii*. 4. Zinco. I. Staats,
Charley Christian, orient. II. Diehl, Camila,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rafaela Breda

**MOBILIZAÇÃO DE ZINCO EM *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* EXPOSTA A
LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO *CRYPTOCOCCUS***

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

Aprovado em: 3 de Julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Livia Kmetzsch Rosa e Silva - UFRGS

Rafael de Oliveira Schneider - UFRGS

Charley Christian Staats - UFRGS (orientador)

Camila Diehl (coorientadora)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todo o apoio e carinho dado durante toda a graduação e, principalmente, neste semestre. Obrigada por sempre me incentivar.

Ao meu pai, *in memoriam*, por guiar minhas decisões. Obrigada por sempre estar presente em pensamento.

Aos meus amigos, tanto de infância quanto os que conheci na universidade, por me proporcionarem momentos divertidos durante toda a graduação, aliviando a tensão do dia-a-dia.

Ao meu amigo Pedro, por me aturar durante todo o período do TCC e sempre me apoiar. Obrigada por ser essa pessoinha tão especial.

Aos meus colegas e amigos dos laboratórios 219 e 220: Camila, Ane, Uriel e Heryk. Obrigada por tornarem meus dias mais engraçados, trabalhar com vocês foi muito divertido.

À professora Lívia Kmetzsch e ao doutorando Rafael Schneider, por aceitarem participar da banca examinadora deste trabalho de conclusão de curso.

À professora Marilene Vainstein, por me aceitar no laboratório.

À minha coorientadora Camila Diehl, por toda paciência e ensinamento que me transmitiu. Muito obrigada por toda a ajuda dada durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Charley Staats, por me acolher no laboratório, sempre estar disponível para conversar e por ter transmitido tanto conhecimento. Obrigada pela oportunidade, suporte, paciência e por ter acreditado no meu potencial.

Aos demais colegas dos laboratórios 217 e 220 que de alguma maneira contribuíram para este trabalho. Obrigada por proporcionarem um bom convívio entre os grupos de pesquisa.

Às agências de fomento, que tornaram este trabalho possível.

RESUMO

As leveduras encapsuladas *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são os agentes etiológicos da criptococose, doença caracterizada por quadros de meningoencefalite e responsável por 181.000 mortes anuais. A infecção acontece por inalação de esporos ou leveduras disseminadas presentes no ambiente, que se depositam nos alvéolos pulmonares, onde são rapidamente fagocitados por macrófagos alveolares. No ambiente, estas leveduras podem estar associadas a amebas de vida livre, sendo que macrófagos e amebas desenvolvem uma resposta similar ao fungo. Desta forma, é especulado que os determinantes de virulência necessários para infecção em mamíferos tenham surgido a partir de seleção em amebas no solo. Diversos organismos utilizam imunidade nutricional durante infecções, visando restringir o acesso do patógeno a nutrientes. Esta se caracteriza pela modulação dos níveis de metais essenciais. Zinco é importante para a virulência de *C. gattii* e sabe-se que macrófagos modulam a expressão de transportadores de zinco em resposta a *C. neoformans*. Considerando o exposto, este trabalho tem por objetivo analisar a expressão de transportadores de zinco em *Acanthamoeba castellanii* exposta aos agentes da criptococose. A partir de RNA coletado de amebas co-incubadas com células de *C. neoformans* ou *C. gattii*, foi empregado PCR quantitativo em tempo real para avaliar a expressão dos genes *ACA1_260050* e *ACA1_271600*, filogeneticamente próximos de transportadores de zinco da família ZnT associados ao complexo de Golgi em mamíferos. Foi detectado aumento consistente de transcritos de genes codificantes de transportadores de zinco em células de *A. castellanii* em resposta a *C. gattii* e a *C. neoformans*. Adicionalmente, em experimentos de microscopia confocal de fluorescência, foi possível detectar mobilização de zinco nestas mesmas condições, quando comparadas ao controle sem a adição de leveduras. Assim, pode-se concluir que células de ameba ativamente modulam a quantidade de zinco intracelular em resposta à infecção por células de *Cryptococcus spp.*

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. *Acanthamoeba castellanii*. Zinco.

ABSTRACT

The encapsulated yeasts *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* are the etiological agents of cryptococcosis, a disease characterized by meningoencephalitis and responsible for 181.000 deaths annually. The infection occurs by inhalation of spores or disseminated yeasts present in the environment. After deposition in the pulmonary alveoli, yeast cells are readily phagocytized by alveolar macrophages. In the environment, these yeasts can be associated with free-living amoebae, and macrophages and amoebae develop a similar response to the fungus. Thus, it is speculated that the virulence determinants required for infection in mammals have arisen from selection in amoebas in the soil. Several organisms use nutritional immunity during infections to restrict pathogen's access to nutrients. This is characterized by the modulation of essential metals. Zinc is important for *C. gattii*'s virulence and it is known that macrophages modulate the expression of zinc transporters in response to *C. neoformans*. Considering the above, this work aims to analyze the expression of zinc transporters in *Acanthamoeba castellanii* exposed to the agents of cryptococcosis. From RNA collected from amoebas co-incubated with cells of *C. neoformans* or *C. gattii*, real-time quantitative PCR was employed to evaluate the expression of genes *ACA1_260050* and *ACA1_271600*. These genes are phylogenetically close to zinc transporters of the ZnT family associated with the complex of Golgi in mammals. A consistent increase of transcripts of genes encoding zinc transporters in *A. castellanii* cells was detected in response to *C. gattii* and *C. neoformans*. Additionally, employing fluorescence confocal microscopy experiments, zinc mobilization was detected in these same conditions, when compared to the control without the addition of yeasts. Thus, it can be concluded that amoeba cells actively modulate the amount of intracellular zinc in response to infection by *Cryptococcus* spp.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. *Acanthamoeba castellanii*. Zinc.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Modulação da resposta inflamatória por *Cryptococcus spp.*..... 14
- Figura 2 – Possíveis desfechos da interação entre *A. castellanii* e *C. neoformans*..... 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Anti-GM-CSF	Anticorpo anti fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidade formadora de colônia, do inglês <i>Colony Forming Unit</i>
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucoroxilomanana
HAART	Terapia antirretroviral altamente ativa, do inglês <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
IPR	Taxa de proliferação intracelular, do inglês <i>Intracellular Proliferation Rate</i>
IRIS	Síndrome inflamatória da reconstituição imunológica, do inglês <i>Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1, do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 α , do inglês <i>Macrophage Inflammatory Protein 1α</i>

MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex class II</i>
mRNA	RNA mensageiro
NFκB	Fator nuclear κB, do inglês <i>Nuclear Factor κB</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PYG	Peptone/Yeast-extract/Glucose
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real associado a transcrição reversa
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
Th17	Linfócito T auxiliar do tipo 17
Var	Variedade
YPD	Yeast-extract/Peptone/Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CICLO DE INFECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA CRIPTOCOCOSE.....	12
1.2	DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA DE <i>C. NEOFORMANS</i> E <i>C. GATTII</i>	16
1.2.1	Cápsula polissacarídica.....	16
1.2.2	Melanina.....	17
1.2.3	Capacidade de desenvolvimento à temperatura do hospedeiro.....	17
1.2.4	Atividades enzimáticas.....	18
1.3	AMEBAS DE VIDA LIVRE COMO HOSPEDEIROS DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP.</i> NO AMBIENTE.....	18
1.4	IMUNIDADE NUTRICIONAL.....	20
1.5	JUSTIFICATIVA	22
2	OBJETIVO GERAL	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	ARTIGO CIENTÍFICO	24
4	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MICROBES AND INFECTION	56

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* inclui cerca de 30 espécies encontradas no meio ambiente, mas duas se destacam no que diz respeito à saúde humana: *C. gattii* e *C. neoformans*. Tratam-se de leveduras basidiomicéticas encapsuladas (CAMACHO et al., 2018) e são agentes etiológicos da criptococose, uma doença grave que se inicia com um quadro de pneumonia e pode evoluir para meningite ou meningoencefalite, fatais se não tratadas (GIBSON; JOHNSTON, 2015).

C. neoformans foi por muito tempo considerado o único agente etiológico da criptococose. Entretanto, análises moleculares baseadas na determinação de antígenos imunodominantes presentes na cápsula polissacarídica das leveduras permitiram a distinção entre diferentes espécies com distintos sorotipos: *C. neoformans*, o qual possui três sorotipos - A (*C. neoformans* var. *grubii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e o híbrido AD; e *C. gattii*, o qual apresenta os sorotipos B e C (BOVERS et al., 2006). Cerca de 95% dos casos de criptococose são causadas por *C. neoformans* var. *grubii* (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

C. neoformans é comumente associado a infecções em pacientes imunocomprometidos, principalmente indivíduos portadores do vírus HIV, enquanto *C. gattii* infecta também indivíduos imunocompetentes (FENG et al., 2008). Quanto à distribuição geográfica, *C. neoformans* é encontrado globalmente, normalmente associado a excretas de aves, principalmente pombos, enquanto *C. gattii* ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo encontrado em árvores e solo (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008). Um surto de *C. gattii* em Vancouver, Canadá, assim como achados dessa espécie na Itália e na Grécia, sugerem que *C. gattii* pode ser encontrado também em climas temperados (BOVERS et al., 2006). No Brasil, dados epidemiológicos sugerem que *C. neoformans* está distribuído igualmente por todo país, enquanto *C. gattii* se apresenta de forma diferente conforme a região. Na macrorregião norte, que inclui os estados Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia, a espécie ocorre de forma endêmica; na macrorregião sul, composta pelos estados Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, *C. gattii* causa infecções esporádicas (TRILLES et al., 2008).

Por ser uma doença oportunista, a criptococose emergiu juntamente com a epidemia de HIV nos anos 1980 (KRONSTAD et al., 2011). O vírus está associado com 223.100 casos de criptococose por ano, resultando em aproximadamente 181.000 mortes anuais

(BONGOMIN et al., 2017; SHOURIAN; QURESHI, 2019). Dessas, cerca de 70% ocorrem na África Subsaariana (SHOURIAN; QURESHI, 2019). Após o advento da terapia antirretroviral (HAART - *highly active antiretroviral therapy*), a prevalência de criptococose diminuiu significativamente em países desenvolvidos, porém permanece alta em nações subdesenvolvidas, principalmente pela falta de adesão e acesso ao tratamento (MOURAD et al., 2018; WILLIAMSON et al., 2017). Dentro de um ano após a infecção, a mortalidade por meningite criptocócica varia de 10% a 30% na América do Norte, e de 50% a 100% em países pouco desenvolvidos (MOURAD et al., 2018). Na população não infectada pelo HIV, fatores de risco para morte por criptococose incluem doenças hepáticas, diabetes, falência renal, idade avançada, outras imunodeficiências e transplante de órgãos sólidos e medula óssea (CAMACHO et al., 2018).

1.1 CICLO DE INFECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA CRIPTOCOCOSE

A porta de entrada de *Cryptococcus spp* é através da inalação de leveduras desidratadas ou esporos que se encontram no ambiente (ZARAGOZA, 2019). Ao chegarem nos alvéolos pulmonares, as leveduras são fagocitadas por macrófagos (NICOLA et al., 2011). Macrófagos alveolares idealmente eliminam o fungo e iniciam uma resposta imunológica mais ampla, com liberação de citocinas, ativação e recrutamento de outras células de defesa e apresentação de antígeno (GIBSON; JOHNSTON, 2015). As células de *Cryptococcus spp.*, entretanto, são capazes de evadir das células fagocíticas. Diversos determinantes de virulência se combinam para proteger o fungo do ambiente hostil que se encontra dentro dos fagócitos, neutralizando pH e espécies reativas de oxigênio, por exemplo, e assim permitindo a sobrevivência e proliferação fúngica dentro dessas células (MAY et al., 2016). Adicionalmente, foi caracterizado o mecanismo pelo qual *C. neoformans* consegue sair da célula fagocítica por exocitose não lítica, processo conhecido como vomocitose, no qual tanto a célula fúngica quanto a hospedeira permanecem vivas (WATKINS et al., 2018).

Após se depositar nos alvéolos, três desfechos são possíveis, dependendo da condição imunológica do hospedeiro e da virulência do patógeno inalado: o fungo pode ser eliminado, desenvolver uma infecção latente ou causar infecção aguda, com ou sem disseminação para o sistema nervoso central (PERFECT; CASADEVALL, 2002). Infecções latentes

assintomáticas podem ser consideradas um mecanismo de tolerância desenvolvido pelo hospedeiro, na tentativa de prevenir ou limitar danos pulmonares e encefálicos (SHOURIAN; QURESHI, 2019). Na maioria dos indivíduos imunocompetentes, o fungo permanece restrito aos pulmões e eventualmente é eliminado ou estabelece infecção latente em granulomas pulmonares e linfonodos torácicos (SHOURIAN; QURESHI, 2019). Em imunossuprimidos, o patógeno tende a se disseminar pelo sistema sanguíneo e alcançar outros órgãos, principalmente o encéfalo (ZARAGOZA, 2019).

Ao passar para a corrente sanguínea, as células fúngicas alcançam o sistema nervoso central, atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o líquido cefalorraquidiano, evento que pode ocorrer por três diferentes processos: paracitose, definida como migração transendotelial entre as *tight junctions*, processo dependente da secreção de proteases; transcitose, quando ocorre ligação de moléculas de ácido hialurônico, presentes na cápsula fúngica, com moléculas CD44 presentes no endotélio microvascular, com engolfamento da levedura; e através do mecanismo de Cavalo de Tróia, no qual *Cryptococcus spp.* atravessa a barreira hematoencefálica escondido em fagócitos (MAY et al., 2016). A meningoencefalite pode ocorrer após infecção primária ou por reativação e disseminação de infecção pulmonar latente, que pode ocorrer anos ou até décadas após o primeiro contato com o patógeno, em consequência de uma imunossupressão (SHOURIAN; QURESHI, 2019).

A proteção contra *Cryptococcus spp.* está associada principalmente com secreção de citocinas pró-inflamatórias, geração de uma resposta Th1/Th17 efetiva e ativação de macrófagos (SHOURIAN; QURESHI, 2019). Linfócitos T CD4⁺ são as principais células responsáveis pela defesa imunológica contra *Cryptococcus spp.*, que consiste numa resposta Th1, com infiltração de leucócitos no pulmão e produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ (UICKER et al., 2005). Quimiocinas, como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α), atuam no recrutamento de monócitos/macrófagos (UICKER et al., 2005). Sabe-se que *Cryptococcus spp.* consegue repolarizar parcialmente a resposta imunológica em modelo murino, mudando uma forte resposta Th1 para uma fraca resposta Th1 ou até mesmo uma resposta Th2, dificultando a eliminação fúngica (Fig. 1) (MAY et al., 2016). A levedura é capaz de assumir a forma de células titãs, maiores que as usuais; essas células são reconhecidas por células dendríticas através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são componentes da cápsula polissacarídica ou da parede celular (MAY et al., 2016). As células dendríticas ativadas recrutam linfócitos T CD4⁺, secretam citocinas e ativam uma resposta

Th1 efetiva; entretanto, alguns PAMPs podem modular a ativação de células dendríticas, através da modulação da sinalização de moléculas como o complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) ou o fator nuclear κ B (NF- κ B), ativando então uma resposta anti-inflamatória Th2 que permite a sobrevivência fúngica (MAY et al., 2016).

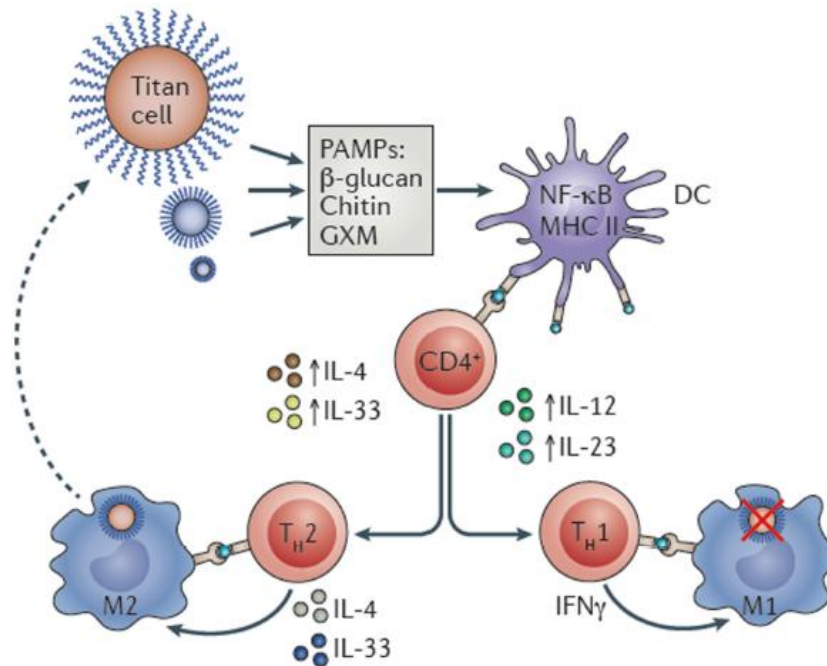


Figura 1: Modulação da resposta inflamatória por *Cryptococcus spp.* *Cryptococcus spp.* assume a forma de célula titã e consegue mudar a ativação de células dendríticas, direcionando uma resposta Th1 em Th2, anti-inflamatória e que permite sobrevivência fúngica. Fonte: May et. al., 2016.

C. gattii, quando comparado com *C. neoformans*, gera menor infiltrado de neutrófilos, resultando em menor produção de resposta Th1, e isso poderia explicar a capacidade de *C. gattii* de infectar indivíduos imunocompetentes (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009). Adicionalmente, pode ocorrer infecção por *C. gattii* em indivíduos que apresentem doença autoimune com níveis elevados de anticorpo anti-GM-CSF (APPLEN CLANCEY et al., 2019; CRUM-CIANFLONE et al., 2017; KWON-CHUNG; SAIJO, 2015; SAIJO et al., 2014).

C. neoformans e *C. gattii* tendem a causar manifestações clínicas nos pulmões e SNC, mas outros órgãos, como próstata, olhos, pele e ossos, também podem ser infectados, principalmente em paciente imunocomprometidos (MAZIARZ; PERFECT, 2016). A criptococose pulmonar pode se desenvolver desde uma colonização assintomática, principalmente em imunocompetentes, até falência respiratória (SETIANINGRUM;

RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019). Os casos assintomáticos são descobertos por achados radiológicos anormais, que incluem nódulos bem delimitados e não calcificados, infiltrado pulmonar, efusão pleural e cavitações (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Quando presentes, os sintomas são inespecíficos, caracterizados por tosse, expectoração e apertos no peito, e frequentemente a condição é confundida com tuberculose ou câncer de pulmão (DENG et al., 2018).

Ao atingir o SNC, ambas espécies têm o potencial de causar meningite criptocócica. A maioria dos pacientes apresenta sintomas de meningite subaguda ou meningoencefalite (PERFECT; CASADEVALL, 2002). Os sintomas incluem dor de cabeça, que pode estar associada com vômito, rigidez no pescoço, comprometimento ou perda de visão e audição, fraqueza, confusão mental, mudanças de personalidade e coma (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). A pressão intracraniana frequentemente está aumentada, podendo levar a paralisia dos nervos cranianos e convulsão (SLOAN; PARRIS, 2014). Sem intervenção terapêutica rápida, há o surgimento de criptocomas no parênquima encefálico, onde as células fúngicas podem se desenvolver e replicar (VU; GARCIA; GELLI, 2019). Tais massas podem causar sequelas como hidrocefalia e cegueira, devido ao comprometimento de áreas cruciais do SNC (SLOAN; PARRIS, 2014).

Cerca de 25% dos pacientes com meningite criptocócica desenvolvem síndrome inflamatória da reconstituição imunológica (IRIS), uma deterioração neurológica que resulta em dores de cabeça, convulsões e confusão mental (VLASOVA-ST. LOUIS et al., 2018). É caracterizada por uma inflamação excessiva e acontece após uma rápida recuperação do sistema imunológico em pacientes com HIV, ocorrendo normalmente nos seis meses iniciais de terapia antirretroviral (CHANG; FRENCH, 2016; MUKAREMERA; NIELSEN, 2017). Existem dois tipos de IRIS: paradoxal e desmascarada. A primeira é caracterizada por uma piora no quadro de criptococose ou por recorrência da doença após tratamento antifúngico efetivo; na segunda, a síndrome inflamatória ocorre como uma ativação de criptococose assintomática/latente após a iniciação da terapia antirretroviral (MUKAREMERA; NIELSEN, 2017). A síndrome parece estar associada com a carga fúngica no momento do diagnóstico (CHASTAIN; HENAO-MARTÍNEZ; FRANCO-PAREDES, 2017).

1.2 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA DE *C. NEOFORMANS* E *C. GATTII*

Cryptococcus spp. possui diversos determinantes de virulência, com papéis fundamentais para que ocorra infecção. Há diversas teorias sugerindo que esses fenótipos tenham sido selecionados evolutivamente para proteger a levedura contra ameaças ambientais e que a capacidade de infectar humanos seria uma consequência acidental dessa seleção (SHOURIAN; QURESHI, 2019).

1.2.1 Cápsula polissacarídica

Tanto *C. gattii* quanto *C. neoformans* apresentam uma cápsula polissacarídica altamente hidrofílica, essencial para a virulência das espécies e com papel importante durante a infecção. Linhagens acapsulares dessas espécies não apresentam capacidade patogênica (CAMACHO et al., 2018; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). Essa cápsula é composta principalmente por glucuronoxilomanana (GXM), que representa 90% dos componentes capsulares, por galactoxilomanana (GalXM, 9-10%) e uma pequena porção de manoproteínas altamente imunogênicas. Esses polissacarídeos são constantemente secretados para o meio extracelular e podem ser detectados no soro de pacientes infectados pelo fungo (CAMACHO et al., 2018). Ácido hialurônico é outro componente presente na cápsula e mutantes nulos para o gene que o codifica reduz a capacidade de associação de *C. neoformans* com as células endoteliais da microcirculação encefálica, reduzindo o aporte de células fúngicas ao sistema nervoso central (VU; GARCIA; GELLI, 2019). Observa-se aumento no tamanho da cápsula poucas horas após infecção de camundongos por *Cryptococcus spp* (WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

A cápsula, além de proteger a levedura contra fagocitose, libera polissacarídeos citotóxicos dentro dos fagócitos, reduz a função de células apresentadoras de antígenos, confere proteção contra radicais livres, induz a expressão de FasL (molécula relacionada à apoptose) nas células hospedeiras e desregula a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, resultando em uma resposta imunológica menos efetiva (PREVIATO et al., 2019; VECCHIARELLI et al., 2013). Ainda, tem importância fundamental no meio clínico, visto que a identificação de leveduras encapsuladas em material histopatológico é suficiente para o diagnóstico rápido de criptococose (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). No meio ambiente, a

cápsula é responsável por proteger o fungo contra desidratação e outros tipos de estresse mecânico (WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

1.2.2 Melanina

Cryptococcus spp. produz o pigmento melanina na presença de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e outros compostos fenólicos (KWON-CHUNG et al., 2014). A melanina se deposita da parede celular do fungo e torna as células mais resistentes à fagocitose e menos suscetíveis à morte por radicais livres e peptídeos microbicidas produzidos pelo hospedeiro (BRILHANTE et al., 2017; THAMMASIT et al., 2018). Leveduras melanizadas também têm maior proteção contra radiação ultravioleta e agentes antifúngicos, como anfotericina B, caspofungina e azóis (KWON-CHUNG et al., 2014).

1.2.3 Capacidade de desenvolvimento à temperatura do hospedeiro

Entre as mais de 70 espécies de *Cryptococcus*, apenas *C. gatti* e *C. neoformans* são capazes de infectar mamíferos. Isso se deve, parcialmente, à capacidade de se desenvolver em temperatura corporal de seus hospedeiros. As demais espécies, mesmo produzindo cápsula e/ou melanina, não possuem a capacidade de se desenvolver plenamente a 37 °C e, conseqüentemente, não conseguem sobreviver no corpo humano (KWON-CHUNG et al., 2014). A sobrevivência da levedura à temperatura corporal depende da produção da enzima superóxido dismutase, produto do gene *SOD2*. Mutantes nulos para o gene que codifica essa proteína se mostraram não virulentos e perderam a capacidade de crescer a 37 °C (SETIANINGRUM; RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019). Existem ainda inúmeras outras proteínas necessárias para o desenvolvimento à temperatura corpórea (PERFECT, 2006). Ser capaz de sobreviver a 37 °C é uma condição necessária, porém não suficiente, para o estabelecimento de infecção.

1.2.4 Atividades enzimáticas

Enzimas de degradação são produzidas por *Cryptococcus spp.* e algumas delas são consideradas importantes para a virulência do patógeno, como urease e fosfolipase B (KWON-CHUNG et al., 2014). A enzima urease desempenha um papel importante na disseminação de células fúngicas para o cérebro (THAMMASIT et al., 2018), e também é responsável por estimular no hospedeiro uma resposta anti-inflamatória com perfil Th2 (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). Linhagens incapazes de produzir urease se mostraram menos virulentas em ensaios com modelo de camundongos, com menor disseminação para o cérebro e menores taxas de mortalidade (THAMMASIT et al., 2018). Fosfolipase B, por sua vez, é capaz de desestabilizar e destruir membranas e surfactante pulmonar, causar lise celular, aumentar a adesão de *Cryptococcus spp.* a células do epitélio pulmonar e ajudar na sobrevivência e proliferação do patógeno dentro de macrófagos, além de ser necessária para o escape dos mesmos (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

1.3 AMEBAS DE VIDA LIVRE COMO HOSPEDEIROS DE *CRYPTOCOCCUS SPP.* NO AMBIENTE

O gênero *Acanthamoeba* é representado por amebas de vida livre, encontradas de forma ubíqua pelo ambiente. Amebas são células eucarióticas que apresentam tipicamente duas fases distintas: uma fase ativa, vegetativa, na forma de trofozoíto, e uma fase dormente, na forma de cisto (KHUNKITTI et al., 1998). Algumas espécies de *Acanthamoeba* são importantes patógenos oculares, que podem causar ceratite, uma infecção crônica da córnea associada ao uso de lentes de contato ou trauma ocular (MATHERS et al., 1987).

A espécie *Acanthamoeba castellanii* é um dos organismos predominantes no solo, onde desempenha um papel de predadora, servindo como reservatório para bactérias, fungos e vírus, além de ser importante para o desenvolvimento de plantas (CLARKE et al., 2013). Pode ser encontrada em diversos ambientes, já tendo sido isolada de diversas fontes, como água do mar, piscinas, vegetais, ar, solo, hospitais e até mesmo em água engarrafada (ANWAR et al., 2019; LLOYD, 2014).

O ciclo de vida de *Acanthamoeba spp.* consiste em dois estágios: trofozoíto e cisto (ANWAR et al., 2019). A formação de cisto ocorre quando o protozoário é exposto a condições desfavoráveis, como falta de nutrientes, estresse físico, hipóxia, temperatura inadequada, exposição a compostos químicos e dessecação (LLOYD, 2014). Sob condições favoráveis, o processo de excistamento ocorre, com um trofozoíto emergindo do cisto.

Não há indícios de que *Cryptococcus spp.* sejam transmitidos entre humanos ou volte para o ambiente a partir de hospedeiros infectados, sendo improvável que os determinantes de virulência implicados na infecção humana tenham evoluído a partir de seleção animal (DESJARDINS et al., 2017). *Cryptococcus spp.* é capaz de interagir com amebas no ambiente e essa interação pode explicar a razão pela qual a levedura consegue persistir dentro de células do hospedeiro e evadir a resposta imunológica (SPRINGER et al., 2012). Semelhanças no mecanismo de replicação de *C. neoformans* em macrófagos e *A. castellanii* levaram à hipótese de que a virulência observada na infecção humana surgiu acidentalmente por seleção em amebas presentes no solo (CASADEVALL et al., 2019). A interação de cepas não virulentas de *C. neoformans* com amebas restaurou a virulência fúngica, corroborando ainda mais a hipótese (FU; CASADEVALL, 2018). A interação entre amebas e *Cryptococcus spp.* é evidenciada pelo fato de que a prevalência de *C. neoformans* em solos é reduzida de maneira proporcional em relação à presença de amebas (FU; CASADEVALL, 2018). Ainda, devido às similaridades entre aquisição de alimentos por células fagocíticas, como amebas, e fagocitose de patógenos por células de defesa do hospedeiro, também foi proposto que o sistema digestivo e imunológico dos metazoários compartilham uma origem evolutiva comum (CASADEVALL et al., 2019).

O processo de internalização de *C. neoformans* em *A. castellanii* e macrófagos é similar: a levedura é fagocitada e internalizada em vacúolos, que interagem com outras organelas e promovem a liberação de enzimas lisossômicas (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). O resultado da interação entre *A. castellanii* e *C. neoformans* é muito variado, dependendo dos mais diversos fatores, com três desfechos possíveis: morte de ambos os microorganismos; replicação fúngica dentro da ameba, com posterior morte da mesma e consequente liberação de *C. neoformans* viáveis; e vomocitose, na qual ambas as células sobrevivem (CASADEVALL et al., 2019). Em meio adequado, *A. castellanii* consegue eliminar as células fúngicas, com posterior digestão das mesmas ou exocitose dos restos celulares (Fig. 2) (CASADEVALL et al., 2019).

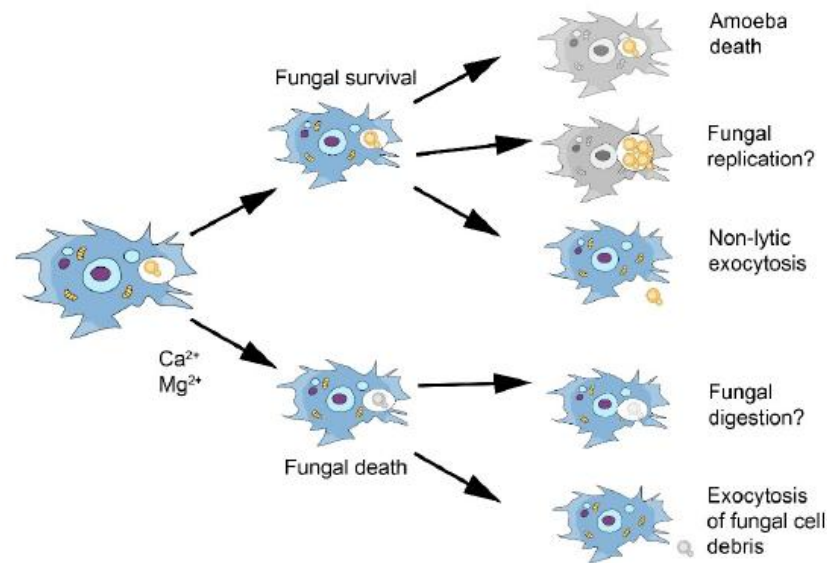


Figura 2: Possíveis desfechos da interação entre *A. castellanii* e *C. neoformans*. O resultado da infecção depende de diversos fatores, como os íons presentes no meio. Fonte: Casadevall et. al (2019).

Os fatores de virulência necessários para a infecção de macrófagos também desempenham papéis importantes na interação com *A. castellanii*; isso sugere que as estratégias de sobrevivência de *C. neoformans* em macrófagos podem ter evoluído de estratégias de escape no protozoário (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Enquanto *C. neoformans* pode ser fagocitado por *A. castellanii*, Malliaris *et. al.* sugerem que a fagocitose de *C. gattii* é um fenômeno raro (MALLIARIS; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2004).

1.4 IMUNIDADE NUTRICIONAL

Metais de transição desempenham papel estrutural em proteínas e atuam como cofator enzimático, sendo indispensáveis à vida (ANDREINI et al., 2008). Aproximadamente 30% de todas as proteínas conhecidas interagem com metais, o que os torna indispensáveis para o correto funcionamento do sistema imunológico de hospedeiros vertebrados, assim como para a patogênese de microrganismos (KEHL-FIE et al., 2010).

Vertebrados possuem a capacidade de alterar a disponibilidade/concentração de metais de transição quando infectados por patógenos, processo conhecido como imunidade nutricional. Esse mecanismo pode atuar tanto diminuindo a biodisponibilidade do metal, para privar o invasor de nutrientes, quanto aumentando-a, tornando o ambiente tóxico para o microrganismo (HOOD; SKAAR, 2012). A maior parte dos estudos de imunidade nutricional é focada no íon ferro, metal de transição mais abundante nos organismos, utilizando bactérias como modelo de patógeno. Em processos de infecção, ocorre o sequestro de ferro na tentativa de privar as bactérias do nutriente, essencial para replicação e transcrição gênica das mesmas (HOOD; SKAAR, 2012). Em *Cryptococcus*, privação de ferro aumenta a formação da cápsula polissacarídica, enquanto a sobrecarga do metal agrava o quadro de meningoencefalite (JUNG *et al.*, 2006).

Zinco é o segundo metal de transição mais abundante em seres vivos e desempenha papéis catalíticos e estruturais. Estima-se que 10% do proteoma humano corresponda a possíveis proteínas ligadoras de zinco (ANDREINI *et al.*, 2006). O metal tem papel importante na imunidade do hospedeiro, visto que a sua deficiência resulta em defeito nas imunidades inata e adaptativa (KEHL-FIE *et al.*, 2010).

Durante um processo infeccioso, tanto as células do hospedeiro quanto as células do patógeno são capazes de alterar os níveis de expressão gênica a fim de obter o sucesso esperado. Há duas principais famílias de transportadores de zinco em mamíferos: *ZnT* e *ZIP*. A família *ZIP*, composta por 14 transportadores em humanos, é responsável pelo transporte de zinco para o citoplasma, ou por influxo do metal do meio extracelular ou por efluxo de zinco estocado em organelas intracelulares (JEONG; EIDE, 2013). A família *ZnT*, por sua vez, é composta por 10 membros em humanos, e é responsável por diminuir a concentração do metal no citoplasma, por efluxo de zinco através da membrana plasmática ou por influxo para dentro de compartimentos intracelulares (HUANG; TEPAAMORNDECH, 2013). Ainda, proteínas citoplasmáticas, como metalotioneínas, são responsáveis por quelar zinco, a fim de evitar efeitos tóxicos para a célula (WINTERS *et al.*, 2010).

Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostram a importância da homeostase de zinco na patogênese de *Cryptococcus spp.* Macrófagos infectados por *C. neoformans* reduzem a expressão de dois importadores de zinco (*ZIP2* e *ZIP14*) e aumentam a expressão de *ZnT2* após 24 h de interação, para reduzir a disponibilidade do metal ao patógeno (DOS SANTOS *et al.*, 2017). Entretanto, para manter a concentração citosólica de

zinco adequada para o funcionamento celular, há uma diminuição da transcrição dos exportadores *ZnT1* e *ZnT7* e de metalotioneínas (DOS SANTOS et al., 2017). Outro trabalho do grupo, utilizando *A. castellanii* como fagócito, mostrou que ortólogos da família *ZnT* em amebas tiveram seus níveis de transcritos aumentados após infecção com *C. gattii* (RIBEIRO et al., 2017).

Em *C. gattii*, a ausência de *ZAPI*, um regulador transcricional sensível a zinco que é responsável pela homeostase desse metal, afeta a virulência de *C. gattii*. *Zap1* regula a expressão de transportadores de zinco e de várias proteínas de ligação de zinco, propiciando o adequado aporte de zinco nas células e evitando, indiretamente, o aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (SCHNEIDER et al. 2015). Outro exemplo da importância da regulação correta da homeostase de zinco diz respeito ao gene *ZIP1* que codifica uma proteína transportadora de zinco. Nosso grupo demonstrou que mutantes nulos para esse gene perdem a capacidade de se desenvolver em meios sem disponibilidade de zinco e acumulam maiores níveis de espécies reativas. Adicionalmente, este gene participa na virulência de *C. gattii* (SCHNEIDER et al. 2015).

1.5 JUSTIFICATIVA

Similaridades na resposta de macrófagos e amebas a *Cryptococcus spp.* levam à hipótese de que os determinantes de virulência necessários para a infecção humana teriam surgido a partir de seleção em amebas no solo. Visto que zinco é importante para a virulência da levedura e que macrófagos modulam a expressão de transportadores de zinco em resposta a ela, resolvemos avaliar se *A. castellanii* também modula a expressão de genes envolvidos no transporte de zinco quando exposta a *C. gattii* e *C. neoformans* em um modo temporal.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar se *A. castellanii* modula a expressão de transportadores da família *ZnT* frente ao estímulo por *C. neoformans* e *C. gattii*, similarmente aos mecanismos de imunidade nutricional observados em macrófagos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão dos genes *ACA1_260050* e *ACA1_271600* em *A. castellanii* exposta a *C. gattii* ou *C. neoformans* após distintos períodos de co-incubação;
- Analisar a mobilização de zinco em *A. castellanii* após 24h de interação com *C. neoformans* ou *C. gattii*;
- Averiguar se há diferença no índice de fagocitose de *C. gattii* e *C. neoformans* por *A. castellanii*;
- Averiguar se há diferença na taxa de proliferação intracelular entre *C. gattii* e *C. neoformans* fagocitados por *A. castellanii*.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Análise da expressão de transportadores de zinco da família ZnT em *Acanthamoeba Castellanii* exposta a *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *Microbes and Infection*.

1 **Análise da expressão de transportadores de zinco da família ZnT em *Acanthamoeba***
2 ***Castellanii* exposta a *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***

3 Rafaela Breda ^a, Camila Diehl ^{a,c}, Charley Christian Staats ^{a,b,c*}.

4 ^a Centro de Biotecnologia e ^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto
5 de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500,
6 Porto Alegre, RS, Brasil.

7 ^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio
8 Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

9 (*) Correspondência: Charley Christian Staats. Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
10 Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421,
11 Laboratório 220. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Telefone +55 51
12 3308 6091; Fax +55 51 3308 7309. E-mail: staats@ufrgs.br

13 **Resumo**

14 As leveduras encapsuladas *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são os agentes
15 etiológicos da criptococose, doença caracterizada por quadros de meningoencefalite e
16 responsável por 181.000 mortes anuais. A infecção acontece por inalação de esporos ou
17 leveduras dissecadas presentes no ambiente, que se depositam nos alvéolos pulmonares, onde
18 são rapidamente fagocitados por macrófagos alveolares. No ambiente, estas leveduras podem
19 estas associadas a amebas de vida livre, sendo que macrófagos e amebas desenvolvem uma
20 resposta similar ao fungo. Desta forma, é especulado que os determinantes de virulência
21 necessários para infecção em mamíferos tenham surgido a partir de seleção em amebas no
22 solo. Diversos organismos utilizam imunidade nutricional durante infecções, visando
23 restringir o acesso do patógeno a nutrientes. Esta se caracteriza pela modulação dos níveis de
24 metais essenciais. Zinco é importante para a virulência de *C. gattii* e sabe-se que macrófagos
25 modulam a expressão de transportadores de zinco em resposta a *C. neoformans*. Considerando
26 o exposto, este trabalho tem por objetivo analisar a expressão de transportadores de zinco em
27 *Acanthamoeba castellanii* exposta aos agentes da criptococose. A partir de RNA coletado de
28 amebas co-incubadas com células de *C. neoformans* ou *C. gattii*, foi empregado PCR
29 quantitativo em tempo real para avaliar a expressão dos genes *ACA1_260050* e
30 *ACA1_271600*, filogeneticamente próximos de transportadores de zinco da família ZnT
31 associados ao complexo de Golgi em mamíferos. Foi detectado aumento consistente de
32 transcritos de genes codificantes de transportadores de zinco em células de *A. castellanii*
33 resposta a *C. gattii* e a *C. neoformans*. Adicionalmente, em experimentos de microscopia
34 confocal de fluorescência, foi possível detectar mobilização de zinco nestas mesmas
35 condições, quando comparadas ao controle sem a adição de leveduras. Assim, pode-se
36 concluir que células de ameba ativamente modulam a quantidade de zinco intracelular em
37 resposta à infecção por células de *Cryptococcus spp.*

38 **Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; *Acanthamoeba*
39 *castellani*; imunidade nutricional; zinco.

40 **Abstract**

41 The encapsulated yeasts *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* are the etiological
42 agents of cryptococcosis, a disease characterized by meningoencephalitis and responsible for
43 181.000 deaths annually. The infection occurs by inhalation of spores or dissected yeasts
44 present in the environment. After deposition in the pulmonary alveoli, yeast cells are readily
45 phagocytized by alveolar macrophages. In the environment, these yeasts can be associated
46 with free-living amoebae, and macrophages and amoebae develop a similar response to the
47 fungus. Thus, it is speculated that the virulence determinants required for infection in
48 mammals have arisen from selection in amoebas in the soil. Several organisms use nutritional
49 immunity during infections to restrict pathogen's access to nutrients. This is characterized by
50 the modulation of essential metals. Zinc is important for *C. gattii*'s virulence and it is known
51 that macrophages modulate the expression of zinc transporters in response to *C. neoformans*.
52 Considering the above, this work aims to analyze the expression of zinc transporters in
53 *Acanthamoeba castellanii* exposed to the agents of cryptococcosis. From RNA collected from
54 amoebas co-incubated with cells of *C. neoformans* or *C. gattii*, real-time quantitative PCR
55 was employed to evaluate the expression of genes *ACA1_260050* and *ACA1_271600*. These
56 genes are phylogenetically close to zinc transporters of the ZnT family associated with the
57 complex of Golgi in mammals. A consistent increase of transcripts of genes encoding zinc
58 transporters in *A. castellanii* cells was detected in response to *C. gattii* and *C. neoformans*.
59 Additionally, employing fluorescence confocal microscopy experiments, zinc mobilization was
60 detected in these same conditions, when compared to the control without the addition of
61 yeasts. Thus, it can be concluded that amoeba cells actively modulate the amount of
62 intracellular zinc in response to infection by *Cryptococcus* spp

63 **Keywords:** *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; *Acanthamoeba castellanii*;
64 *nutritional immunity*; *zinc*.

1. Introdução

65

66 Criptococose é uma doença oportunista que afeta 223.100 pessoas anualmente, resultando
67 em 181.000 mortes [1]. Dentre as mais de 30 espécies do gênero *Cryptococcus*, apenas as
68 leveduras encapsuladas *C. gattii* e *C. neoformans* são agentes etiológicos da criptococose [2].
69 A infecção ocorre por inalação de esporos ou leveduras desidratadas presentes no ambiente, e
70 o quadro clínico pode variar desde infecção assintomática, pneumonia e evolução para
71 meningoencefalite, fatal se não tratada [2]. Na África Subsaariana, onde a infecção tem a
72 maior prevalência, meningite criptocócica é responsável por até 44 % das mortes relacionadas
73 ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) [3].

74

75 *C. neoformans* normalmente infecta indivíduos imunocomprometidos, principalmente
76 pacientes infectados com o vírus HIV, enquanto *C. gattii* geralmente infecta
77 imunocompetentes [4]. *C. neoformans* é observado principalmente na Europa e está associado
78 com excreta de aves, principalmente pombos, enquanto *C. gattii* é encontrado sobretudo em
79 climas tropicais e subtropicais e está relacionado com árvores, principalmente eucaliptos [5].
80 *C. gattii*, entretanto, foi isolado de amostras de surtos de criptococose na América do Norte,
81 como o ocorrido em Vancouver, Canadá, sugerindo que essa espécie tem também como
82 habitat climas temperados [6]. Dados epidemiológicos brasileiros sugerem que *C. neoformans*
83 está distribuído igualmente por todo país, enquanto *C. gattii* é endêmico na macrorregião
norte e causa casos esporádicos na macrorregião sul [7].

84

85 *Cryptococcus spp.* expressa diversos determinantes de virulência, necessários para o
86 sucesso da infecção. Dentre eles, pode-se destacar presença de uma cápsula polissacarídica,
87 produção do pigmento melanina, produção da enzima urease e capacidade de
88 desenvolvimento a 37 °C. Esses determinantes são responsáveis por proteger as células
fúngicas da resposta imunológica do hospedeiro e permitir sua sobrevivência e disseminação

89 [8,9]. Visto que *Cryptococcus spp.* não é transmitido entre humanos e não necessita de um
90 hospedeiro animal para sobreviver, hipotetiza-se que os determinantes de virulência
91 observados nessas espécies evoluíram a partir de interações com predadores no solo,
92 principalmente amebas [10]. O processo de interação entre *C. neoformans* e a ameba de vida
93 livre *Acanthamoeba castellanii* é muito similar à infecção em macrófagos; os determinantes
94 de virulência apresentam papéis semelhantes em ambos os modelos, corroborando a hipótese
95 evolutiva [11]. Ainda, cepas avirulentas de *C. neoformans* restauraram sua virulência,
96 avaliadas em modelos murinos, após interação *in vitro* com amebas [12], fortalecendo essa
97 teoria.

98 Mamíferos restringem a disponibilidade de metais essenciais a patógenos, mecanismo
99 conhecido como imunidade nutricional, a fim de evitar infecções [13]. Zinco é o segundo
100 metal de transição mais abundante em organismos, sendo indispensável tanto para humanos
101 quanto para microrganismos, e vem sendo amplamente estudado no contexto de imunidade
102 nutricional [14,15]. Em mamíferos, duas principais famílias gênicas de transportadores de
103 zinco regulam a concentração intracelular desse metal: *ZnT* e *ZIP* [16]. A família *ZnT* codifica
104 transportadores responsáveis por diminuir a concentração citosólica de zinco, enquanto a
105 família *ZIP* é encarregada de aumentar a concentração do íon no meio intracelular [17,18].
106 Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que macrófagos expostos a *C.*
107 *neoformans* têm seus níveis de zinco intracelular diminuídos e sofrem modulação da
108 expressão de membros da família *ZnT* [19]. Resultados de outro estudo na nossa linha de
109 pesquisa sugerem uma maior expressão de alguns genes da família *ZnT* em amebas expostas a
110 *C. gattii* [20]. Estes genes apresentam-se filogeneticamente próximos ao gene *ZnT4* de
111 mamíferos, cujo produto é responsável pela mobilização de zinco para o complexo de Golgi
112 [16, 20].

113 Este trabalho tem como objetivo analisar a expressão dos genes *ACA1_260050* e
114 *ACA_271600* em *A. castellanii* infectada por *C. neoformans* e *C. gattii* em diferentes tempos
115 de interação, além de avaliar a mobilização de zinco em amebas infectadas. O gene
116 *ACA1_271600* é filogeneticamente próximo dos genes que codificam os transportadores
117 ZnT2, ZnT3, ZnT8 e principalmente ZnT4 em células mamíferas, enquanto *ACA1_260050* é
118 evolutivamente mais basal, estando relacionado com diversos transportadores de zinco [20].
119 Os resultados aqui obtidos revelam que ocorre intenso aumento de expressão destes genes de
120 maneira temporal em resposta à incubação com as leveduras patogênicas. Adicionalmente,
121 houve aumento da fluorescência potencialmente associada a Golgi. Esses resultados
122 contribuem para o entendimento sobre o mecanismo de imunidade nutricional de *A.*
123 *castellanii* contra *Cryptococcus spp* e sua similaridade com os mecanismos vistos em
124 macrófagos.

125 2. Materiais e métodos

126 2.1 Linhagens celulares

127 As linhagens H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii* foram cultivadas em meio YPD
128 (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e, quando necessário, 1,5% ágar) a 30 °C. A
129 linhagem Neff de *A. castellanii* foi cultivada em meio PYG (2% peptona, 1,8% glicose, 0,2%
130 extrato de levedura, 0,1% citrato de sódio, 0,098% MgSO₄, 0,035% Na₂HPO₄, 0,034%
131 KH₂PO₄, 0,002% Fe(NH₄)₂(SO₄)₂) com antibiótico (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de
132 estreptomicina) a 30 °C e foi cedida pela Prof. Marilise B. Rott, do Instituto de Ciências
133 Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

134 2.2 Ensaios de interação e extração de RNA

135 Um total de 1×10^6 células de *A. castellanii*, em 1 ml de meio PYG, foram adicionadas em
136 placas de 12 poços e incubadas por um período de 2 h em estufa a 30 °C, para possibilitar

137 adesão. Após esse período, 1×10^7 células de *C. neoformans* ou *C. gattii* (MOI 1:10),
138 previamente inoculadas em meio YPD líquido por 16 h a 30 °C, foram adicionadas aos poços.
139 Amostras foram coletadas imediatamente após a adição das células fúngicas, assim como após
140 2, 4 e 24 h. Após os períodos de incubação, inclusive para o controle, o meio foi retirado e
141 adicionou-se 600 µl de Trizol (Invitrogen) por poço, para permitir a lise das amebas. O
142 conteúdo foi recuperado dos poços e armazenado em tubo *ependorf*, para extração de RNA
143 total conforme recomendações do fabricante. A verificação da integridade das amostras de
144 RNA foi realizada em gel (0,8 % agarose). O RNA foi quantificado utilizando
145 espectrofotometria.

146 2.3 Síntese de cDNA

147 RNA total livre de DNA, obtido a partir de tratamento das amostras com DNase
148 (Promega), foi utilizado para síntese de cDNA com a enzima ImPROM-II RT (Promega).
149 Para tanto, cerca de 1 µg de RNA foi utilizado em conjunto com oligo d(t), conforme
150 recomendações do fabricante. O cDNA foi então diluído 5 vezes com água DEPC para
151 análises posteriores.

152 2.4 RT-PCR quantitativo (*qRT-PCR*)

153 A análise de RT-PCR quantitativo foi realizada em placa de 48 poços, utilizado o
154 equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reação foi
155 realizada conforme protocolo previamente padronizado [19, 20] utilizando a enzima
156 PlatinumTM Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher) e SYBR Green (Thermo Fisher),
157 conforme recomendações do fabricante. A concentração de cDNA utilizada foi de 33 ng/ul. O
158 ensaio foi realizado em triplicata técnica e triplicata biológica. As condições de ciclagem
159 foram as seguintes: fase inicial de 50 °C por 5 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguida de 40

160 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos e 72 °C por 1 minuto. Ao final, *melting*
161 *curve* foi realizada. Os *primers* utilizados e suas sequências estão listados na Tabela 1.

162 2.5 Índice de fagocitose e taxa de proliferação intracelular

163 De modo similar à co-incubação para extração de RNA, a determinação da taxa de
164 fagocitose e da proliferação intracelular foram realizadas pela incubação de 1×10^6 células de
165 *A. castellanii* com 1×10^7 células de *C. neoformans* ou *C. gattii* por 2 e 24 h.

166 Após co-incubação de 2 h, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Em
167 um conjunto de poços, PBS (1 ml) foi adicionado, seguido de incubação em gelo por 10
168 minutos para que as células aderidas se soltassem. O conteúdo dos poços foi coletado para
169 posterior realização de citometria de fluxo. Alternativamente, uma fração deste conteúdo (25
170 μ l) foi diluída em PBS, dos quais uma alíquota de 25 μ l foi semeada em meio YPD sólido
171 com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após incubação por 48 h, o número de unidades
172 formadoras de colônia foi determinado. Em outro conjunto de poços, foi adicionado 1 ml de
173 meio PYG e foi realizada incubação por 24 h adicionais. Após este período adicional, o meio
174 foi retirado, e as células foram lavadas com PBS. PBS (1 ml) foi adicionado, seguido de
175 incubação em gelo por 10 minutos para que as células aderidas se soltassem. Estas foram
176 então diluídas e precedeu-se com a determinação de CFU. O número de CFU normalizado
177 pelo número de células de amebas foi um dos métodos para determinação da taxa de
178 fagocitose. A razão entre a carga fúngica obtida em 24 h pela taxa de fagocitose representa a
179 taxa de proliferação intracelular.

180 Alternativamente, utilizou-se citometria de fluxo para determinação da taxa de fagocitose,
181 conforme previamente descrito [21]. Para tanto, os ensaios foram realizados com células de
182 *Cryptococcus* sp. previamente incubadas com isoticianato de fluoresceína (FITC), na

183 concentração de 10 µg/ml por 10 min. A análise de citometria de fluxo foi realizado na
184 presença do reagente azul de Trypan, que bloqueia a emissão de fluorescência verde.
185 Controles de *A. castellanii* sem interação, *C. neoformans* e *C. gattii* não marcados, *C.*
186 *neoformans* e *C. gattii* marcados e interação de *A. castellanii* com *C. neoformans* e *C. gattii* e
187 não marcados foram utilizados.

188 2.6 Microscopia confocal

189 Células de *A. castellanii* (1×10^6) foram incubadas em placa de 12 poços contendo
190 lamínula no fundo, com 1×10^7 células de *C. neoformans* ou *C. gattii* por 24 h. Após o período
191 de interação, 10 µM do fluoróforo Zinpyr-1 foram adicionados, permitindo 10 minutos de
192 incubação. Em seguida o meio foi retirado e o conteúdo foi fixado com paraformaldeído (3,7
193 %). As lamínulas foram retiradas dos poços e colocadas sobre lâminas de microscopia, que
194 foram analisadas em microscópio confocal de fluorescência junto às instalações do Centro de
195 Microscopia e Microanálise da UFRGS. As imagens obtidas foram processadas pelo
196 programa *ImageJ* com o intuito de quantificar a fluorescência de cada célula associada ao
197 fluoróforo Zinpyr.

198 3. Resultados

199 Para analisar a expressão de transportadores de zinco em *A. castellanii* co-incubada por *C.*
200 *neoformans* e *C. gattii*, qRT-PCR foi realizado utilizando *primers* para os genes
201 *ACA1_260050* e *ACA1_271600*, potencialmente envolvidos no transporte de zinco para o
202 Complexo de Golgi. O resultado foi normalizado de acordo com a expressão do gene que
203 codifica actina, e foi comparado com a expressão do grupo controle. A análise dos resultados
204 evidencia que a expressão do gene *ACA1_260050* em *A. castellanii* aumenta
205 significativamente após 2 h, 4 h e 24 h de exposição a *C. neoformans* (Fig. 1A). Essa

206 modulação gênica não é vista em resposta a *C. gattii*. Ao analisarmos o gene *ACAI_271600*,
207 observamos o aumento da expressão em *A. castellanii* após 2 h de interação, tanto com *C.*
208 *neoformans* quanto com *C. gattii*, sem diferença na expressão entre as duas espécies (Fig.
209 1B). Esse aumento continua significativo em 4 h e 24 h de interação apenas com *C.*
210 *neoformans* (Fig. 1B). O grupo controle não apresenta modulação na expressão dos genes
211 analisados em decorrência do tempo.

212 Com o intuito de avaliar se esta diferença observada no perfil transcricional dos genes
213 codificantes de proteínas da família ZnT em amebas era decorrente de alterações na
214 internalização de células leveduriformes, foi realizada a determinação da taxa de fagocitose de
215 *C. neoformans* e *C. gattii* por *A. castellanii*, a partir de ensaio de interação entre as linhagens
216 com posterior avaliação por CFU e citometria de fluxo. A análise dos resultados da contagem
217 de CFU indica que não há diferença no índice de fagocitose por *A. castellanii* entre as
218 espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (Fig. 2A). Esse resultado é corroborado pelo ensaio de
219 citometria de fluxo, no qual não houve diferença significativa entre os eventos de interação de
220 *A. castellanii* com ambas espécies de *Cryptococcus* (Fig. 2C).

221 Assim, foi hipotetizado que esta diferença poderia ser oriunda de capacidades inerentes
222 das duas linhagens em replicar-se de modo distinto no interior das células de ameba. Para
223 analisar se há diferença na sobrevivência e proliferação no interior de *A. castellanii* entre as
224 duas espécies de *Cryptococcus*, ensaio para avaliar a taxa de proliferação intracelular (IPR)
225 foi realizado. Os resultados sugerem que *C. neoformans* e *C. gattii* não diferem quanto à
226 capacidade de proliferação no interior de *A. castellanii* (Fig. 2B). Desta forma, a modulação
227 diferencial deve estar associada a diferenças características das duas linhagens.

228 Para corroborar os dados obtidos de expressão, foram realizadas análises de microscopia
229 confocal de fluorescência, a fim de evidenciar a mobilização de zinco. Para tanto, as células

230 de amebas, incubadas ou não com células de levedura, foram incubadas com o fluoróforo
231 Zinpyr, capaz de marcar zinco presente dentro do Golgi e outras organelas, como mitocôndria
232 e retículo endoplasmático, visto que é permeável a membranas [22]. Análise densitométrica
233 das imagens obtidas em microscópio confocal indica que *A. castellanii* mobiliza zinco em
234 resposta a *C. neoformans* e *C. gattii* após 24 h de interação (Fig. 3B). Entretanto, não foi
235 possível detectar diferença significativa na modulação dos níveis de zinco quando se
236 comparam as duas espécies fúngicas.

237 4. Discussão

238 Neutrófilos e macrófagos utilizam privação de zinco em resposta a *C. neoformans*,
239 empregando proteínas quelantes e modulação da expressão de transportadores de zinco,
240 respectivamente [19, 23]. Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que zinco é importante
241 para a virulência de *C. gattii*, visto que mutantes nulos para *ZAPI*, gene que codifica um fator
242 de transcrição que regula a expressão de importadores de zinco, tiveram sua virulência
243 reduzida [24]. Juntando com a hipótese de evolução dos fatores de virulência em amebas no
244 solo, decidimos analisar a expressão de moléculas envolvidas no transporte de zinco em *A.*
245 *castellanii* exposta a *C. gattii* e *C. neoformans*, a fim de avaliar se mecanismos similares à
246 imunidade nutricional observada em macrófagos que também ocorrem em amebas. A escolha
247 dos genes analisados foi devida a uma proximidade filogenética com genes possivelmente
248 envolvidos em imunidade nutricional em mamíferos. Análises filogenéticas mostram que a
249 proteína ACA1_271600 é evolutivamente próxima dos transportadores ZnT8, ZnT3, ZnT2 e,
250 principalmente, ZnT4, envolvido no influxo de zinco para o complexo de Golgi [20].
251 ACA1_260050, por sua vez, é evolutivamente mais antigo, sendo relacionado a diversos
252 transportadores da família ZnT [20].

253 Nossos resultados sugerem que *A. castellanii* responde a *C. neoformans* com aumento da
254 expressão gênica dos dois genes analisados durante todo o processo de interação, enquanto a
255 resposta a *C. gattii* é focada na fase inicial de co-incubação, com aumento significativo da
256 expressão de apenas um dos genes. As primeiras horas de interação parecem ser as mais
257 importantes no quesito de imunidade nutricional contra ambas as espécies, com aumento
258 expressivo da expressão por parte do protozoário numa possível tentativa de privar
259 *Cryptococcus spp.* de zinco e prejudicar sua sobrevivência. Visto que ambas as espécies são
260 igualmente fagocitadas, a diferença de expressão gênica pode ser em decorrência de outros
261 fatores. *C. gattii* e *C. neoformans* surgiram de um ancestral comum há milhões de anos [25].
262 Considerando o tempo desde a especiação e a distribuição geográfica das espécies, que
263 possibilita diferentes interações entre ameba, fungo e ambiente, pode-se pensar que o
264 protozoário desenvolveu diferentes estratégias de imunidade nutricional para as espécies.

265 Em contraste com os resultados obtidos, Malliaris *et al.* (2004) indicam que fagocitose de
266 *C. gattii* por *A. castellanii* é um fenômeno raro se comparado a *C. neoformans* [26]. Uma
267 possível explicação para a discrepância entre esses dois resultados é o fato de diferentes
268 linhagens terem sido utilizadas nos estudos, tanto das leveduras quanto da ameba. Em ensaios
269 com leveduras opsonizadas por proteínas do sistema complemento, *C. neoformans* é mais
270 fagocitado do que *C. gattii* por macrófagos [27]. Esta diferença na resposta entre *A. castellanii*
271 e macrófagos pode ser devida à opsonização que ocorre no hospedeiro, visto que esse
272 mecanismo não acontece no solo.

273 Apesar do aumento na expressão dos dois genes em *C. neoformans* e apenas de um em *C.*
274 *gattii*, não há diferença na proliferação intracelular entre as espécies, sugerindo que a maior
275 modulação gênica vista para *C. neoformans* não é suficiente para gerar morte fúngica, ou que
276 *C. neoformans* é mais adaptado à privação de zinco. Diferentemente do que é visto em *A.*

277 *castellanii*, a linhagem R265 possui maior capacidade de proliferação intracelular em
278 macrófagos quando comparada com a linhagem H99 [28]. Apesar das similaridades
279 observadas no mecanismo de fagocitose entre amebas e macrófagos, nosso resultado sugere
280 que existem diferenças no conteúdo do fagolisossomo de ambas células fagocíticas.

281 A despeito do aumento na expressão de exportadores de zinco, *A. castellanii* infectada
282 tanto por *C. gattii* quanto por *C. neoformans* eleva os níveis de zinco intracelular. Visto que
283 os genes analisados apresentam proximidade filogenética com ZnTs responsáveis pelo influxo
284 de zinco para o complexo de Golgi, essa elevação poderia ser explicada por um aumento no
285 influxo do metal para essa organela. Ainda, como acontece em macrófagos [19], outros genes
286 envolvidos no exporte de zinco podem estar sob *downregulation*, o que leva a um aumento na
287 concentração intracelular do metal, a fim de manter níveis ideais para o funcionamento
288 celular. Macrófagos expostos a células mortas de *C. neoformans* aumentam a expressão de
289 importadores de zinco [19]. Visto que a microscopia foi realizada após 24h de interação, o
290 aumento na concentração de zinco pode ser em decorrência de uma resposta a células
291 fúngicas que foram mortas pelo protozoário.

292 A partir deste estudo, conclui-se que *A. castellanii* modula a expressão gênica
293 similarmente ao mecanismo de imunidade nutricional observado em mamíferos contra os
294 agentes da criptococose. Para um melhor entendimento do mecanismo, análise da expressão
295 de outros transportadores de zinco no protozoário, assim como avaliação da expressão de
296 genes envolvidos no metabolismo do metal em *Cryptococcus spp*, são perspectivas futuras.

297 **5. Referências bibliográficas**

298 [1] Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et
299 al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated

- 300 analysis. Lancet Infect Dis 2017;17:873–81. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
- 301 [2] Camacho E, Casadevall A, Camacho E, Casadevall A. Cryptococcal Traits
302 Mediating Adherence to Biotic and Abiotic Surfaces. J Fungi 2018;4:88.
303 doi:10.3390/jof4030088.
- 304 [3] Spec A, Powderly WG. Cryptococcal meningitis in AIDS, 2018, p. 139–50.
305 doi:10.1016/B978-0-444-63849-6.00011-6.
- 306 [4] Shourian M, Qureshi ST. Resistance and Tolerance to Cryptococcal Infection:
307 An Intricate Balance That Controls the Development of Disease. Front Immunol
308 2019;10:66. doi:10.3389/fimmu.2019.00066.
- 309 [5] Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am
310 2016;30:179. doi:10.1016/J.IDC.2015.10.006.
- 311 [6] Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare
312 genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver
313 Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:17258.
314 doi:10.1073/PNAS.0402981101.
- 315 [7] Trilles L, Dos M, Lazéra S, Wanke B, Oliveira RV, Gonçalves Barbosa G, et
316 al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and
317 *Cryptococcus gattii* in Brazil. vol. 103. 2008.
- 318 [8] Thammasit P, Iadnut A, Mamoon K, Khacha-ananda S, Chupradit K,
319 Tayapiwatana C, et al. A potential of propolis on major virulence factors of
320 *Cryptococcus neoformans*. Microb Pathog 2018;123:296–303.
321 doi:10.1016/j.micpath.2018.07.028.
- 322 [9] Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a
323 dangerous trip from the environment to the brain. Mem Inst Oswaldo Cruz
324 2018;113:e180057. doi:10.1590/0074-02760180057.

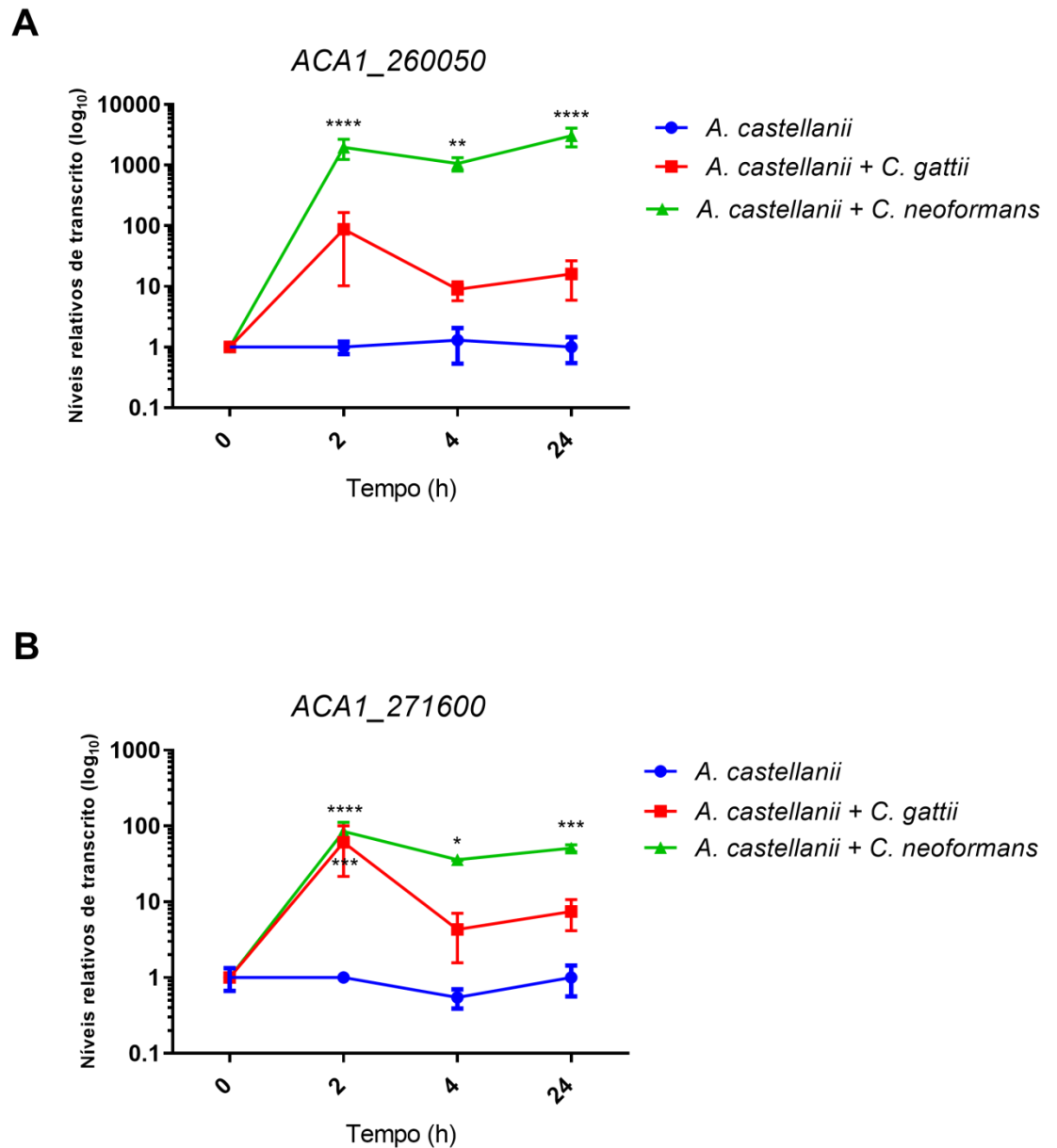
- 325 [10] Casadevall A, Fu M, Guimaraes A, Albuquerque P, Casadevall A, Fu MS, et
326 al. The ‘Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence’ Hypothesis. *J Fungi*
327 2019;5:10. doi:10.3390/jof5010010.
- 328 [11] Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans*
329 interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular
330 pathogenic strategy in macrophages. 2001.
- 331 [12] Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. *Cryptococcus*
332 *neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host
333 *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 2003;71:4862–72.
334 doi:10.1128/iai.71.9.4862-4872.2003.
- 335 [13] Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–
336 host interface. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:525–37. doi:10.1038/nrmicro2836.
- 337 [14] Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the Zinc-Proteins Encoded
338 in the Human Genome 2006. doi:10.1021/pr050361j.
- 339 [15] Rahman MT, Karim MM. Metallothionein: a Potential Link in the Regulation
340 of Zinc in Nutritional Immunity. *Biol Trace Elem Res* 2018;182:1–13.
341 doi:10.1007/s12011-017-1061-8.
- 342 [16] Huang L, Tepasamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters - A review
343 of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects*
344 *Med* 2013;34:548–60. doi:10.1016/j.mam.2012.05.008.
- 345 [17] Eide DJ. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch Eur J*
346 *Physiol* 2004;447:796–800. doi:10.1007/s00424-003-1074-3.
- 347 [18] Palmiter RD, Huang L. Efflux and compartmentalization of zinc by members
348 of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2004;447:744–51.
349 doi:10.1007/s00424-003-1070-7.

- 350 [19] Dos Santos FM, Piffer AC, Schneider R de O, Ribeiro NS, Garcia AWA,
351 Schrank A, et al. Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus*
352 *neoformans* in a murine macrophage cell line. *Future Microbiol* 2017;12:491–504.
353 doi:10.2217/fmb-2016-0160.
- 354 [20] Ribeiro NS, dos Santos FM, Garcia AWA, Ferrareze PAG, Fabres LF, Schrank
355 A, et al. Modulation of Zinc Homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a Possible
356 Antifungal Strategy against *Cryptococcus gattii*. *Front Microbiol* 2017;8.
357 doi:10.3389/fmicb.2017.01626.
- 358 [21] Araujo GdS, Fonseca FL, Pontes B, Torres A, Cordero RJB, et al. Capsules from
359 Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. Manifest Significant Differences
360 in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. *PLOS ONE* 2012; 7:
361 e29561. doi: 10.1371/journal.pone.0029561
- 362 [22] Lu Q, Haragopal H, Slepchenko KG, Stork C, Li Y V. Intracellular zinc
363 distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *Int J Physiol Pathophysiol*
364 *Pharmacol* 2016;8:35–43.
- 365 [23] Mambula SS, Simons ER, Haste R, Selsted ME, Levitz SM. Human
366 neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus*
367 *neoformans*. *Infect Immun* 2000;68:6257–64. doi:10.1128/iai.68.11.6257-6264.2000.
- 368 [24] Schneider R de O, Diehl C, dos Santos FM, Piffer AC, Garcia AWA, Kulmann
369 MIR, et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Sci Rep*
370 2015;5:10104. doi:10.1038/srep10104.
- 371 [25] Casadevall A, Freij JB, Hann-Soden C, Taylor J. Continental Drift and
372 Speciation of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species
373 Complexes. *MSphere* 2017;2. doi:10.1128/mSphere.00103-17.
- 374 [26] Malliaris SD, Steenbergen JN, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var.

- 375 *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med Mycol* 2004;42:149–58.
376 doi:10.1080/13693786310001616500.
- 377 [27] Freij JB, Fu MS, De Leon Rodriguez CM, Dziedzic A, Jedlicka AE,
378 Dragotakes Q, et al. Conservation of Intracellular Pathogenic Strategy among
379 Distantly Related Cryptococcal Species. *Infect Immun* 2018;86.
380 doi:10.1128/IAI.00946-17.
- 381 [28] Ma H, Hagen F, Stekel DJ, Johnston SA, Sionov E, Falk R, et al. The fatal
382 fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular
383 parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*
384 2009;106:12980–5. doi:10.1073/pnas.0902963106.

385

6. Figuras



386

387

388

389

390

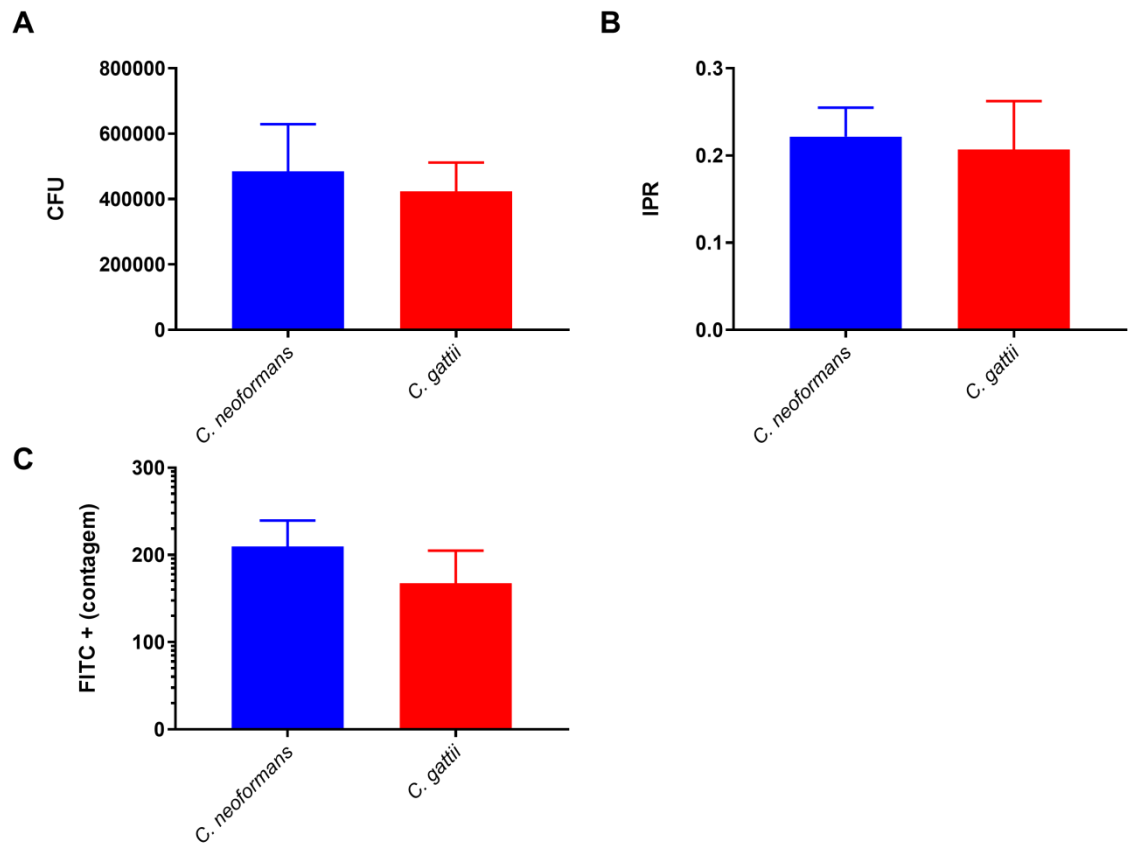
391

392

393

394

Figura 1: *A. castellanii* altera a expressão de transportadores de zinco na presença de *C. neoformans* ou *C. gattii*. Células de *A. castellanii* (1×10^6 células/ml) foram incubadas em meio PYG com *C. gattii* ou *C. neoformans* (1×10^7 células/ml) em placas de 12 poços, por 2 h, 4 h e 24 h. As células foram lavadas com PBS e o RNA foi extraído, com posterior síntese de cDNA. A expressão dos genes *ACA1_260050* (A) e *ACA1_271600* (B) foi normalizada utilizando o *threshold* obtido para o gene *Actina*. Os dados são representados como a média \pm desvio padrão, obtidos a partir de triplicatas biológicas e triplicatas técnicas. Análise estatística foi realizada no programa *GraphPad*, utilizando ANOVA de duas vias (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



395
396

Figura 2. *A. castellanii* fagocita igualmente *C. neoformans* e *C. gattii*, e as duas linhagens não

397

diferem quanto a proliferação intracelular. 1×10^6 células/ml de *A. castellanii* foram incubadas com

398

1×10^7 células/ml de *C. gattii* ou *C. neoformans* por 2 h e 24 h em placas de 12 poços, com adição de

399

tampão de lise ao final do período. O conteúdo foi diluído em PBS, plaqueado em YPD sólido e a

400

contagem de CFU foi realizada. Índice da fagocitose (A) é representado por contagem de CFU após 2 h

401

de interação, enquanto taxa de proliferação intracelular (B) é representada pela diferença do CFU

402

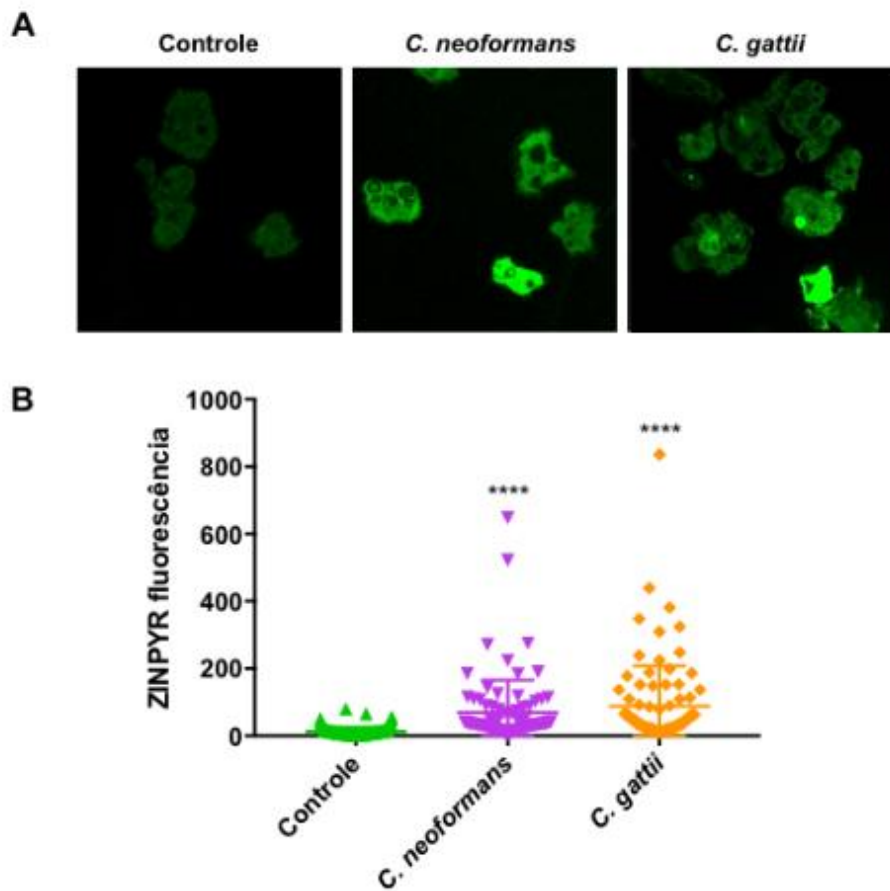
recuperado em 24 h e 2 h de interação. Citometria de fluxo (C) foi realizada com alíquotas da interação

403

de 2 h, incubadas com o fluoróforo FITC. Análise estatística foi realizada pelo programa *GraphPad*,

404

utilizando teste t. Não houve diferença significativa entre as linhagens em nenhum dos ensaios.



405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413

Figura 3: *A. castellanii* aumenta o nível de zinco intracelular quando exposta à *C. neoformans* ou *C. gattii*. 1×10^6 células de *A. castellanii* foram incubadas com 1×10^7 células de *C. neoformans* ou *C. gattii* durante 24 h em placas de 12 poços contendo lamínula ao fundo do poço. Ao final do período, 10 μ M do fluoróforo Zinpyr-1 foram adicionados, permitindo 10 minutos de incubação. O conteúdo foi fixado às lamínulas com paraformaldeído e visualizado por microscopia confocal (A). As imagens obtidas foram analisadas pelo programa *ImageJ*, a partir do nível de fluorescência (B). Análise estatística foi realizada pelo programa *GraphPad*, utilizando ANOVA de uma via (**** $p < 0.0001$). Não houve diferença significativa ao se comparar as linhagens H99 e R265.

414 **7. Material suplementar**415 **Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados.**

<i>Primer</i>	Sequência	NCBI Gene ID
ACTIN-F	5'-AGGTCATCACCATCGGTAACG-3'	14922056
ACTIN-R	5'-TCGCACTTCATGATCGAGTTG-3'	
ACA1_260050-F	5'-ACGAAGAGAGCCACTACCA-3'	14912155
ACA1_260050-R	5'-CATCGAGATCCCACACCTTTAC-3'	
ACA1_271600-F	5'-CGCTTGTGGCTATGGGTATC-3'	14915201
ACA1_271600-R	5'-GTACTTGATGTCCGCGATGAG-3'	

416

4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho, conclui-se que *A. castellanii* utiliza mecanismos similares à imunidade nutricional, vista em macrófagos, como resposta antifúngica contra *C. neoformans* e *C. gattii*, aumentando a expressão de transportadores de zinco, que diminuem o nível do metal no meio intracelular. Entretanto, análises microscópicas revelaram que a concentração de zinco intracelular aumenta após 24 h de co-incubação entre ameba e levedura. Também foi possível concluir que não há diferença na taxa de fagocitose por *A. castellanii* entre as espécies fúngicas, e que ambas possuem a mesma capacidade de proliferação no interior do protozoário.

Perspectivas futuras:

- Avaliação da mobilização de zinco para o Complexo de Golgi em *A. castellanii* co-incubada com *C. neoformans* e *C. gattii*, por meio de análises em microscopia confocal de fluorescência, utilizando sonda específica para a organela;
- Análise da expressão de outros transportadores da família ZnT em *A. castellanii* co-incubada com *C. neoformans* e *C. gattii*.;
- Análise da expressão gênica, em *C. neoformans* e *C. gattii*, de genes codificantes de transportadores de zinco;
- Análise da expressão de genes filogeneticamente próximos a *ACA1_260050* e *ACA1_271600* em macrófagos.

REFERÊNCIAS

ANDREINI, C. et al. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1205–1218, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00775-008-0404-5>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

ANWAR, A. et al. Oleic acid–conjugated silver nanoparticles as efficient antiamebic agent against *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, [s. l.], p. 1–10, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-019-06329-3>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

APPLEN CLANCEY, S. et al. *Cryptococcus deuterogattii* VGIIa Infection Associated with Travel to the Pacific Northwest Outbreak Region in an Anti-Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibody-Positive Patient in the United States. **mBio**, United States, v. 10, n. 1, 2019.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371573>>. Acesso em: 12 maio. 2019.

BOVERS, M. et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 599–607, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2006.00082.x>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversidad del complejo de especies *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii*. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. S4–S12, 2008. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1130140608700196?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

BRILHANTE, R. S. N. et al. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato*. **Mycoses**, [s. l.], v. 60, n. 10, p. 697–702, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12650>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

CAMACHO, E. et al. Cryptococcal Traits Mediating Adherence to Biotic and Abiotic Surfaces. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 88, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/4/3/88>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

CASADEVALL, A. et al. Continental Drift and Speciation of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes. **mSphere**, [s. l.], v. 2, n. 2, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28435888>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

CASADEVALL, A. et al. The ‘Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence’ Hypothesis. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 10, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/5/1/10>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

CHANG, C. C.; FRENCH, M. A. Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Invasive Fungal Infections: What We Know and What We Need to Know? **Current Clinical Microbiology Reports**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 63–70, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40588-016-0033-7>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

CHASTAIN, D. B.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; FRANCO-PAREDES, C. Opportunistic Invasive Mycoses in AIDS: Cryptococcosis, Histoplasmosis, Coccidioidomycosis, and Talaromycosis. **Current Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 36, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11908-017-0592-7>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

CHEN, S. C.-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278580>>. Acesso em: 17 maio. 2019.

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*. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 77, n. 10, p. 4284–94, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

CLARKE, M. et al. Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. **Genome Biology**. [s.l:] 2013. Disponível em: <<http://genomebiology.com/content/14/2/R11>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

ANDREINI, C. et al. Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. [s. l.], 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr050361j>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

CRUM-CIANFLONE, N. F. et al. Autoantibodies to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Associated With Severe and Unusual Manifestations of *Cryptococcus*

gattii Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, United States, v. 4, n. 4, p. ofx211, 2017.

DENG, H. et al. Clinical features and radiological characteristics of pulmonary cryptococcosis. **The Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 2687, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29848126>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

DESJARDINS, C. A. et al. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genome research**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 1207–1219, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28611159>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

DOS SANTOS, F. M. et al. Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 491–504, 2017. b. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2016-0160>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. e180057, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29668825>>. Acesso em: 27 maio. 2019.

FENG, X. et al. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. [s. l.], 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-abstract/8/6/930/568520>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

FREIJ, J. B. et al. Conservation of Intracellular Pathogenic Strategy among Distantly Related Cryptococcal Species. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 86, n. 7, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29712729>>. Acesso em: 5 jun. 2019.

FU, M. S.; CASADEVALL, A. Divalent Metal Cations Potentiate the Predatory Capacity of *Amoeba* for *Cryptococcus neoformans*. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 84, n. 3, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29150507>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

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

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 525–537, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro2836>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

HUANG, L.; TEPAAMORNDECH, S. The SLC30 family of zinc transporters - A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 34, p. 548–560, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.008>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

JEONG, J.; EIDE, D. J. The SLC39 family of zinc transporters. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 34, v. 2013/03/20, n. 2–3, p. 612–619, 2013. ,

JUNG, W. H. et al. Iron Regulation of the Major Virulence Factors in the AIDS-Associated Pathogen *Cryptococcus neoformans*. [s. l.], v. 4, 2006. Disponível em: <www.plosbiology.org>. Acesso em: 25 abr. 2019.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 56, n. 2, 2009. Disponível em: <<https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/2452>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

KEHL-FIE, T. E. et al. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc - This review comes from a themed issue on Bioinorganic chemistry Edited. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 14, p. 218–224, 2010. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 25 abr. 2019.

KHUNKITTI, W. et al. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 43–48, 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445398930547>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 49, p. 17258, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC535360/>>. Acesso em: 27 maio. 2019.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 193–203, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro2522>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. a019760, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

KWON-CHUNG, K.; SAIJO, T. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? **Journal of Fungi**, Switzerland, v. 1, n. 2, p. 154–167, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084617/>>. Acesso em: 18 abr. 2019

LLOYD, D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 145, p. S20–S27, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489414000770?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 106, n. 31, p. 12980–5, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651610>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

MALLIARIS, S. D.; STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 149–158, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693786310001616500>>. Acesso em: 3 maio. 2019.

MAMBULA, S. S. et al. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 68, n. 11, p. 6257–64, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035733>>. Acesso em: 9 jun. 2019.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum** [s. l.], 2015. Disponível em: <www.asmscience.org>. Acesso em: 15 abr. 2019.

MATHERS, W. et al. Immunopathology and Electron Microscopy of *Acanthamoeba* Keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 626–635, 1987. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939414743211>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature**

Reviews Microbiology, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2015.6>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 179, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5808417/>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MOURAD, A. et al. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 7, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000700202&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 21 maio. 2019.

MUKAREMERA, L.; NIELSEN, K. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 64, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29333430>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **mBio**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828219>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763631>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

PALMITER, R. D.; HUANG, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 447, n. 5, p. 744–751, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00424-003-1070-7>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* : the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x>>. Acesso em: 19 jun. 2019.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 837–874, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552002000363>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

PREVIATO, J. O. et al. Characterization of the 6-O-acetylated lipoglucuronomannogalactan a

novel *Cryptococcus neoformans* cell wall polysaccharide. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 475, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30742969>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

RAHMAN, M. T.; KARIM, M. M. Metallothionein: a Potential Link in the Regulation of Zinc in Nutritional Immunity. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 182, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-017-1061-8>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309917302438?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

RIBEIRO, N. S. et al. Modulation of Zinc Homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a Possible Antifungal Strategy against *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01626/full>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

SAIJO, T. 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**, United States, v. 5, n. 2, p. e00912-14, 2014.

SCHNEIDER, R. de O. et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 10104, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep10104>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 133–150, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/57/2/133/5133472>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

SHOURIAN, M.; QURESHI, S. T. Resistance and Tolerance to Cryptococcal Infection: An Intricate Balance That Controls the Development of Disease. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, p. 66, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00066/full>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical epidemiology**, [s. l.], v. 6, p. 169–82, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872723>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen? **Current fungal infection reports** [s.l.], v. 6, p. 245-256, 2012. Disponível em: <[http://mlst.mycologylab.org/.](http://mlst.mycologylab.org/)>. Acesso em: 20 nov. 2018.

STEENBERGEN, J. N. et al. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 71, n. 9, p. 4862–72, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933827>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

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. **National Institutes of Health**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.261418798>. Acesso em: 3 maio. 2019.

THAMMASIT, P. et al. A potential of propolis on major virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 123, p. 296–303, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30041002>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. [s.l.], v. 103., 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v103n5/313.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

UICKER, W. C. et al. Cytokine and chemokine expression in the central nervous system associated with protective cell-mediated immunity against *Cryptococcus neoformans*. [s. l.], [s.d.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/43/1/27/1180457>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

VECCHIARELLI, A. et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1107–1116, 2013. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.13.84>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

VLASOVA-ST. LOUIS, I. et al. Transcriptomic Predictors of Paradoxical Cryptococcosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. **Open Forum Infectious**

Diseases, [s. l.], v. 5, n. 7, p. ofy157, 2018. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30038928>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

VU, K.; GARCIA, J. A.; GELLI, A. Cryptococcal Meningitis and Anti-virulence Therapeutic Strategies. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 353, 2019. Disponível em:
<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00353/full>>. Acesso em: 12 maio. 2019.

WATKINS, R. A. et al. *Cryptococcus neoformans* Escape From *Dictyostelium* Amoeba by Both WASH-Mediated Constitutive Exocytosis and Vomocytosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 108, 2018. Disponível em:
<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00108/full>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

WATKINS, R. A.; KING, J. S.; JOHNSTON, S. A. Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic *Cryptococcus* Species. **Microorganisms**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28974017>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13–24, 2017. Disponível em:
<<http://www.nature.com/articles/nrneurol.2016.167>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

WINTERS, M. S. et al. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 202, n. 7, p. 1136–45, 2010. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731582>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019. Disponível em:
<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2019.1614383>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MICROBES AND INFECTION

Microbes and Infection – Guide for authors.

FORMAT

General information

Limit the abstract to 200 words or less; limit the text to 5000 words or less. A maximum of 50 references is allowed; and a maximum of 6 figures and tables (total) is allowed. Papers not respecting these rules will not be sent to the reviewers

Double-space throughout (including references, figure legends and table footnotes).

Use 2.5-cm (1 inch) margins on all four sides.

Use a font size of at least 12 points.

Number each page top right (title page is 1).

Number each chapter heading, starting with Introduction (see below)

Number lines continuously.

In general, do not use capital letters (except for first letter) for titles, authors names, section headings, etc.

When referring to figures in the main text, "figure" is abbreviated to Fig. (e.g., Fig. 1). When referring to tables, use Arabic numerals (e.g., Table 2).

Differentiate between zero and the letter O, and between the number one and the letter "l".

CONVENTIONS

1. Microorganisms

Follow guidelines of the International Nomenclature Committee. Genus and species are written in full the first time the name appears in text; subsequently, only use the first letter of the genus, followed by the species (e.g., *Escherichia coli*, then *E. coli*). Note the space between the genus abbreviation and the species.

2. Units of measurement

Follow the Système International (SI). Always respect the space between the number and the unit (e.g., 100 °C, 25 mg). Do not use commas for decimals. Use small "l" for liter.

3. Use of italic/roman type

Genetic loci are italicized; protein products of the loci are not italicized. Latin words in current use, such as *in vitro/vivo/situ*, *via*, *et al.*, *a posteriori*, etc., are not italicized (note the use of abbreviative points for expressions such as *cf.*, *e.g.*, *i.e.*, *et al.*, etc., which appear in roman type).

4. When using Greek letters, use the “font” command and not “insert”.

ORGANIZATION OF RESEARCH PAPERS AND SHORT COMMUNICATIONS

1. Title page

Title: avoid using uppercase letters other than the first word. Do not use nonstandard acronyms or abbreviations.

Authors' names: full first name followed by family name of each author. Superscript letters (a, b, etc.), not numbers, link the author's name to his/her affiliation. The name of the author responsible for correspondence and proof correction is indicated by an asterisk (*) after the superscript letter. Use commas to separate names; do not use 'and' before the last author's name.

Affiliations: The complete address (department and/or laboratory, college, university, and full postal address) for each author, preceded by the superscript letter (a, b, etc.) should follow the list of names.

Each address is in a separate paragraph.

Up-to-date telephone and fax numbers, e-mail address, and present, complete postal address of the corresponding author appear separately on the title page.

2. Abstract and keywords

Abstract: a maximum of 200 words, summarizing the objective, and major conclusions. Do not use references, footnotes or abbreviations in the abstract.

Keywords: below the abstract, provide a list of at least 3 keywords (max 6 keywords) which exist in the MeSH® thesaurus. They are in lowercase letters, separated by semi-colons. They are used for indexing your paper and express the precise content.

3. Abbreviations

Used as an aid to the reader (therefore, sparingly), for words used at least 3 times, they are defined in the text the first time they appear, followed by the abbreviation in parentheses. Use this abbreviation thereafter.

4. Main text of original reports

Each chapter is numbered according to international standard (1. - 1.1. - 1.1.1., etc.). (See model below). For chapter headings, avoid using uppercase letters other than the first word, and do not use punctuation at the end.

The length of the main text should not exceed 5000 words.

Model for numbering of chapters

1. Introduction

2. Materials and methods

2.1. Infection models

2.1.1. Mouse model

Titles in bold and subtitles in italic not bold

1. Introduction: it should not summarize the results.
2. Materials and methods: avoid the use of commercial names.
3. Results: present the observations, with minimal reference to earlier literature and to interpretations.
4. Discussion: Avoid repeating parts of the Results.

Acknowledgments: personal acknowledgments precede those of agencies and institutions.

Conflict of interest: All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. If you have no conflict of interest, please state it.

5. References

References are limited to 50

In main text

Numbered references appear in the main text between square brackets ([1], [2, 3], [4–7], etc.), in the order of appearance in the text, from 1 to n.

In reference list

Numbering corresponds to the references in the text; the list is not in alphabetical order. Journal titles are abbreviated according to Index Medicus and Biosis. Only published work and manuscripts in press (indicate the journal which has accepted them, "ahead of print" and DOI number) appear in the list. Manuscripts in the submitted stage, or in preparation, and personal communications are designated "unpublished" in the text but are not numbered and do not appear in the list at the end.

Please use the order/style given in the following examples, as well as the exact punctuation. Use square brackets for the numbering.

If there are more than 6 authors, the first 6 authors names should be listed followed by *et al.*

Periodicals

[1] Wu XB, Tian LH, Zou HJ, Wang CY, Yu ZQ, Tang CH, *et al.* Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli** is required for resistance to phagocytosis. *Res Microbiol* 2014;164:848-55.

*Genus and species names in italics

Books

An entire volume:

[2] Melchiorre C, Giannella M. Highlights in receptor chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1984.

A chapter in a book:

[3] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors: ligands and signalling, in Kaufmann SHE, Medzhitov R, Gordon S (Eds), *The innate immune response to infection*, ASM Press, Washington, DC, 2004, pp 257-70.

To obtain the updated EndNote style of our journal, please visit:
<http://endnote.com/downloads/style/microbes-and-infection>

6. Legends of figures

Place all legends (including title for each) together on one page. Figures are consecutively numbered with Arabic numerals (Fig. 1, 2, etc.), according to the order of appearance in the main text.

7. Figures

a maximum of 6 figures and tables (total) is allowed.

Magnification is indicated by a scale bar.

In the text, indicate where figures should appear: these call-outs are written as "Fig.1, Fig.2", etc.

Upload each figure separately.

Help us reproduce your artwork with the highest possible standards — in both paper and digital format, by consulting: "How to prepare your graphics files" at the e-submission site for instructions, <http://ees.elsevier.com/micinf>

8. Tables

In the text, indicate where tables should appear: these call-outs for tables are written as "Table 1, Table 2, " etc.

Tables are consecutively numbered with Arabic numerals (Table 1, 2, etc.), according to the order of appearance in the main text. Each table carries a short title describing its contents in relation to the main text. Except for the heading and bottom of the table, avoid horizontal dividing lines; vertical lines are completely omitted from any table. Instead, the first column is left-aligned, and other columns are generally centered. (When making tables, use “insert” command and not “tabulation”).

Only the first letter of each heading is capitalized, and any units appear in parentheses after or under the corresponding heading in roman characters. Footnotes are collected under a table and referred to in the table by superscript letters (a, b, etc.). References in tables are numbered between square brackets, e.g., [5].

Upload each table separately.