

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

HERYK MOTTA DE SOUZA

Hsp12 INFLUENCIA A FAGOCITOSE E RESPOSTA AO ESTRESSE EM
Cryptococcus gattii

PORTO ALEGRE

2018

HERYK MOTTA DE SOUZA

Hsp12 INFLUENCIA A FAGOCITOSE E RESPOSTA AO ESTRESSE EM
Cryptococcus gattii

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte das exigências para a obtenção do título de Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora:
Profa. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva
Coorientadora:
Ma. Júlia Catarina Vieira Reuwsaat

PORTO ALEGRE

2018

Agradecimentos

Ao meus pais, Denise e Leopoldo, por todo amor e carinho, por me incentivarem a dar o melhor de mim e sempre me apoiarem em minhas decisões. Ao meu irmão, Matheus, por tornar os dias mais descontraídos e leves.

À minha orientadora, Lívia Kmetzsch, por me receber no laboratório, sempre estar disponível e por todo conhecimento. Obrigado pela paciência, pelo apoio e por acreditar no meu potencial.

Ao professor Charley Staats pela disposição a ajudar, aconselhar e resolver as diversas dúvidas que surgiram ao longo do trabalho.

À professora Marilene Vainstein por me aceitar no laboratório.

Aos meus colegas e amigos dos Laboratórios 219 e 220: Ane, Bárbara, Camila, Eamim, Júlia, Natália, Solon e Uriel. Trabalhar com vocês é ótimo, ter vocês como amigos é perfeito. A pesquisa jamais seria tão divertida sem a presença de vocês.

Aos amigos: Angel, Gabriela, Germano, Mari e Natasha por todos os momentos, embora poucos durante a graduação, únicos e felizes.

Ao “puxadinho”: Anna, Carolina Backes, Carolina Masotti, Eduardo e Murilo, por cada final de semana inesquecível e sempre estarem prontos para me socorrer quando necessário.

Às agências de fomento: Capes, CNPq e FAPERGS, que tornaram esse trabalho possível.

Por fim, ao Neko, por todo amor e sentido que trouxe a minha vida.

Apresentação

Este trabalho foi elaborado no formato de artigo científico, seguindo os requisitos técnicos da revista *Microbes and Infection*, apresentados em anexo.

1 **Hsp12 influencia a fagocitose e resposta ao estresse em *Cryptococcus gattii*.**

2 ***Hsp12 influences phagocytosis and stress response in Cryptococcus gattii.***

3 Heryk Motta,^a Julia Catarina Vieira Reuwsaat,^a Ane Wichine Acosta Garcia,^a Natália
4 Kronbauer Oliveira,^a Marilene Henning Vainstein,^{a, b} Lívia Kmetzsch^{a, b, *}

5 ^aLaboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia,
6 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

7 ^bDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande
8 do Sul, Porto Alegre, Brazil

9 Autor Correspondente

10 Lívia Kmetzsch

11 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.

12 Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 220.

13 Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970.

14 Telefone +55 51 3308 6091

15 Fax +55 51 3308 7309

16 Email: liviak@cbiot.ufrgs.br

17

18 **Palavras-chave:** Hsp12; proteína de choque térmico; *Cryptococcus gattii*;

19 **Resumo**

20 *Cryptococcus gattii* é uma das espécies causadoras da criptococose, a qual pode acometer tanto
21 indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes. Devido a relevância clínica dessa
22 doença, estudos para compreensão dos mecanismos de virulência deste patógeno são
23 importantes. Sabe-se que proteínas de choque térmico (Hsp) são fundamentais para homeostase
24 e influenciam fatores de virulência importantes durante a infecção. Contudo, ainda há uma falta
25 de conhecimento quanto a pequenas Hsps (sHsp) em células fúngicas e seu papel durante
26 infecção. Considerando o exposto, esse trabalho propõe-se a caracterizar uma Hsp12 de *C. gattii*
27 através da construção de uma linhagem mutante nula ($\Delta hsp12$). Os níveis de expressão relativa
28 do gene *HSP12* apresentaram um aumento significativo durante condição de choque térmico,
29 enquanto a exposição a concentração subinibitória de fluconazol levou a sua redução. A
30 linhagem $\Delta hsp12$ também apresentou maior sensibilidade ao estresse oxidativo e de membrana,
31 quando comparado com a linhagem selvagem. Além disso, durante ensaio de interação com
32 macrófagos a linhagem $\Delta hsp12$ apresentou uma maior taxa de fagocitose quando comparada
33 com a linhagem selvagem. Dessa forma, Hsp12 possui importante papel durante o estresse
34 oxidativo e de membrana, além de influenciar a taxa de fagocitose de *C. gattii*.

35 1. Introdução

36 A criptococose é uma infecção fúngica que acomete os pulmões podendo, em sua forma
37 mais grave, estar associada a um quadro de meningoencefalite. Os agentes etiológicos desta
38 doença são as leveduras patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A
39 infecção ocorre através da inalação de esporos ou da levedura dessecada, ocorrendo colonização
40 do tecido pulmonar com potencial disseminação para sistema nervoso central (SNC) [1-3].
41 Apenas na América Latina, estima-se que ocorram por ano 5.000 casos de meningite por
42 *Cryptococcus* sp. e destes, cerca de 2.400 pacientes vão a óbito [4]. O sucesso da infecção por
43 *Cryptococcus* sp. deve-se a expressão de determinantes de virulência. Dentre eles destaca-se a
44 produção de uma cápsula polissacarídica, capacidade de melanização, termotolerância,
45 estratégias de parasitar fagócitos do hospedeiro, formação de biofilme e mecanismos para
46 atravessar a barreira hematoencefálica [5-8].

47 A espécie *C. neoformans* acomete, principalmente, indivíduos imunocomprometidos
48 (portadores do vírus HIV, sob quimioterapia e em terapia imunossupressora) e possui
49 distribuição ubíqua, sendo isolada com facilidade na excreta de pombos. Já *C. gattii* tem a
50 capacidade de infectar imunocompetentes, e apresenta distribuição predominante em regiões
51 de clima tropical e subtropical. Entretanto, um surto de criptococose foi recentemente descrito
52 na região de Vancouver, Canadá, o qual se expandiu para regiões do noroeste dos EUA. A
53 linhagem R265 de *C. gattii* foi isolada deste surto e apresenta virulência acentuada em modelos
54 de infecção experimental [9, 10]. *C. gattii*, ao contrario de *C. neoformans*, não é isolado de
55 excreta de pombos e tem como habitat natural cascas de arvores de mais de 50 espécies [11].

56 A resposta ao estresse durante o processo de interação com o hospedeiro também é um
57 fator importante para garantir o sucesso da infecção. Diversas proteínas atuam nesta resposta
58 para garantir a sobrevivência de células fúngicas em situações de estresse. Neste contexto,

59 destaca-se a função das proteínas de choque térmico (Hsp, *heat shock protein*) [12]. Condições
60 de estresse de temperatura, oxidativo, osmótico, de pH ou mesmo estresse causado durante a
61 exposição a terapia antifúngica já foram descritos como fortes indutores de expressão de
62 proteínas Hsp, as quais desempenham papel fundamental na homeostase celular [13, 14].
63 Genericamente, as proteínas Hsp são classificadas de acordo com sua massa molecular. As
64 proteínas Hsp de massa molecular inferior a 43 kDa são denominadas pequenas Hsp (sHsp,
65 *small Hsp*) [15].

66 Dentre a grande maioria das sHsp descritas, sabe-se que a principal função consiste na
67 ligação a proteínas desnaturadas, o que impede a formação de agregados e precipitação, fatores
68 relacionados ao processo apoptose [16]. Porém diversas atividades pouco estudadas também
69 são atribuídas a este grupo. Algumas sHsp foram descritas atuando diretamente na manutenção
70 da fluidez da membrana plasmática. Também há a descrição de um grupo específico que atua
71 na ubiquitinação, associando-se a proteínas com dobramento incorreto para consequente
72 degradação pelo proteassoma [16].

73 O papel fundamental de proteínas Hsp durante a infecção por fungos patogênicos como
74 *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Paracoccidioides sp.* e *Cryptococcus sp* relaciona-se com a
75 resistência a terapia antifúngica, virulência, e formação de biofilme. Além disto, sabe-se que a
76 atividade destas proteínas pode influenciar a taxa de fagocitose e resposta imunológica do
77 hospedeiro [17-20].

78 Considerando a falta de conhecimento presente quanto a função de proteínas sHsp, além
79 de sua relação com fungos patogênicos humanos e a possibilidade de utilização como alvos na
80 terapia antifúngica, estudos relacionando estes assuntos são de suma importância. Este estudo,
81 então, propõe a caracterização de uma Hsp12 em *C. gattii*, a qual desempenha potencial papel
82 na resposta ao estresse e durante a interação entre *C. gattii* e células de defesa do hospedeiro.

83 2. Materiais e métodos

84 2.1. Linhagens e condições de cultivo

85 A linhagem de *C. gattii* R265 (WT, *wild-type*) foi o objeto de estudo deste trabalho. O
86 meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% dextrose) foi usualmente empregado para
87 o cultivo das linhagens utilizadas e 1,5% de ágar foi acrescido quando meio sólido foi utilizado.
88 Placas de YPD contendo nourseotricina (100 µg/ml) ou higromicina B (200 µg/ml) foram
89 utilizadas para selecionar as linhagens nocaute $\Delta hsp12$ e a linhagem complementada
90 $\Delta hsp12::HSP12$, respectivamente. Os ensaios fenotípicos foram realizados no meio YNB
91 completo (Yeast Nitrogen Base) + 0,5 % de dextrose, acrescido do estressor testado.

92 2.2 Análise in silico de CNBG_2441

93 Para análise do produto gênico de CNBG_2441 realizou-se busca por genes ortólogos
94 já caracterizados no banco de dados FungiDB. Também foi realizada busca por domínios
95 conservados através do serviço *NCBI Conserved Domain Search*, utilizando a sequência de
96 aminoácidos de Hsp12.

97 2.3. Análise de RT-qPCR

98 Para avaliar os níveis de expressão relativa de *HSP12* em condição de choque térmico,
99 células da linhagem WT foram cultivadas em YPD por 18 horas a 30 °C e 200 rpm, e lavadas
100 três vezes com tampão fosfato salino (PBS). Posteriormente, as células foram inoculadas em
101 triplicatas em DMEM, na concentração de 1×10^7 cel/ml, e mantidas por 2 h a 30 °C e 200 rpm.
102 As condições controle foram mantidas a 30 °C enquanto as condições teste foram transferidas
103 para cultivo sob 39 °C mantidas durante 10, 20 e 40 min.

104 Para a análise da expressão de *HSP12* na presença de concentração subinibitória de
105 fluconazol, células da linhagem WT foram cultivadas como descrito anteriormente e inoculadas

106 em YNB completo suplementado com 7 µg/ml de fluconazol. A extração de RNA foi realizada
107 através da lise das células liofilizadas por maceração em gral e pistilo, seguida do
108 processamento com o reagente TRIzol (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. O RNA
109 extraído foi quantificado e tratado com DNase (Promega), e procedeu-se a síntese de cDNA
110 por transcrição reversa utilizando a enzima ImProm-II (Promega), de acordo com
111 recomendação do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado no equipamento StepOne Real-
112 Time PCR System (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram as seguintes: 50 °C
113 por 5 min, 95 °C por 10 min seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por
114 1 min. Por fim, foi realizada curva de dissociação. A expressão relativa foi determinada pelo
115 cálculo $2^{-\Delta Ct}$ e normalizadas pela expressão do gene que codifica actina de *C. gattii* [21]. A lista
116 de *primers* utilizados nesse trabalho encontram-se no arquivo suplementar, Tabela S1.

117 2.4. Construção da linhagem nula e complementado

118 A construção do vetor para deleção do gene que codifica *HSP12* (número de acesso no
119 banco de dados FungiDB CNBG_2441) foi realizada através da metodologia DelsGate [22].
120 Fragmentos das regiões *upstream* e *downstream* da região codificadora (992 pb para ambos)
121 foram amplificados por PCR, e purificados a partir de gel de agarose. Os fragmentos foram,
122 então, clonados em vetor pDONR-NAT, o qual contém um cassete com marca de resistência a
123 nourseotricina, através da reação de *Gateway BP Clonase*. O vetor foi linearizado com a enzima
124 de restrição I-SceI e células de *C. gattii* da linhagem R265 foram transformadas através da
125 técnica de biobalística [23].

126 O *screening* das células transformantes foi realizado por PCR. Colônias que não
127 apresentaram amplificação da região interna do gene *HSP12* foram selecionadas e cultivadas
128 para extração de RNA como descrito anteriormente. As linhagens nulas (*Δhsp12*) foram, então,
129 confirmadas por RT-PCR e RT-qPCR.

130 Para a complementação de *HSP12* na linhagem mutante $\Delta hsp12$, foi realizada
131 amplificação da região codificante do gene, acrescida de 992 pb das regiões *upstream* e
132 *downstream*, visando a preservação das regiões regulatórias de sua expressão. O fragmento
133 obtido por PCR foi clonado no vetor de complementação pJAF15, o qual contém cassete com
134 marca de resistência à higromicina B. O vetor foi linearizado utilizando a enzima de restrição
135 NotI, e células da linhagem nula $\Delta hsp12$ foram transformadas através da técnica de biobalística
136 [23].

137 O *screening* das células transformantes foi realizado através da análise da reversão do
138 fenótipo apresentada pela linhagem nula. Os *primers* utilizados neste experimento estão
139 descritos na Tabela S1. Os mapas dos vetores de deleção e complementação são apresentados
140 nas Figuras S1 e S2, respectivamente.

141 2.5. Ensaio de fagocitose

142 Foram cultivados macrófagos da linhagem J774.A1 em DMEM (*Dulbecco's Modified*
143 *Eagle Medium*) suplementado com 10 % soro fetal bovino, à 37 °C e 5% de CO₂, em placas de
144 12 poços até densidade de 10⁶ células/poço. Vinte e quatro horas antes da interação com as
145 linhagens de *C. gattii*, os macrófagos foram ativados utilizando 100 U de interferon gama (INF-
146 γ) e 0,5 μ g/ml de lipopolissacarídeo (LPS). Paralelamente, células da linhagem WT e $\Delta hsp12$
147 foram cultivadas em YPD durante 18 h, lavadas com PBS. Após, foi realizada a opsonização
148 com o anticorpo monoclonal anti-GXM 18B7 (10 μ g/ml) por 1 h. Posteriormente, as células
149 foram marcadas com 250 μ g de FITC (isotiocianato de fluoresceína) solubilizado em PBS
150 durante 10 min à 37 °C com agitação. A interação entre as células fúngicas e os macrófagos foi
151 realizada em triplicata, com multiplicidade de 10:1. Após os tempos de interação de 2 e 24 h,
152 os poços foram lavados duas vezes com PBS para remoção das células de *C. gattii* não
153 internalizadas, e foi realizada a adição de 1 ml de *trypan blue* 0,02% a cada poço, para excluir

154 a fluorescência das células de leveduras aderidas a membrana externa dos macrófagos. Os
155 macrófagos foram coletados utilizando *cell scraper*, e os níveis de fagocitose foram avaliados
156 por citometria de fluxo (citômetro Guava EasyCyte – Millipore) [24, 25].

157 2.6. Ensaios Fenotípicos

158 Para os ensaios fenotípicos, células das linhagens WT e $\Delta hsp12$ foram cultivadas
159 conforme descrito anteriormente, e lavadas três vezes com PBS. A densidade ótica em 600 nm
160 (OD_{600}) foi determinada, e foram realizadas diluições seriadas de OD_{600} 1, 0,1, 0,01, 0,001 e
161 0,0001. Às placas de YNB sólido contendo os agentes estressores testados (Tab. 1), foram
162 dispensados 3 μ L das diluições de células das linhagens testadas.

163 3. Resultados

164 O gene CNBG_2441 codifica Hsp12 em *C. gattii*

165 Através da busca de genes ortólogos no banco de dados *FungiDB* foram encontrados
166 ortólogos já caracterizados em duas espécies: *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*,
167 ambos codificando uma Hsp12 [26, 27].

168 A busca de domínios conservados na sequência de aminoácidos de Hsp12 de *C. gattii*
169 revelou a presença do domínio HSP9/12, corroborando com os dados obtidos na busca por
170 ortólogos [26].

171 A expressão de *HSP12* é regulada em condições de choque térmico em *C. gattii*

172 Proteínas do grupo de Hsp em fungos classicamente atuam em resposta ao choque
173 térmico [28]. No intuito de verificar se o ortólogo de *HSP12* exerce tal função em *C. gattii*,
174 células da linhagem R265 foram submetidas a condições de estresse térmico a 39 °C. Nos
175 tempos iniciais de exposição (10 e 20 min) não foram observadas alterações significativas nos
176 níveis de expressão (Fig 1A e 1B). No entanto, após 40 min de exposição a esta temperatura,
177 foi detectado um aumento da expressão de *HSP12* em relação a condição controle (Fig. 1C).
178 Ao analisar apenas a expressão de *HSP12* ao longo dos três períodos avaliados a 39 °C, o tempo
179 de 40 min apresentou maior expressão comparada com os demais tempos testados (Fig. 1D).

180 Adicionalmente, avaliamos a expressão de *HSP12* em *C. gattii* na presença de
181 fluconazol, antifúngico amplamente utilizado no tratamento da criptococose. Após a exposição
182 à uma concentração subinibitória do fármaco por 24 h observamos uma redução da expressão
183 de *HSP12* em relação à condição controle (Fig. 2).

184 **Hsp12 é importante em resposta a condições de estresse a membrana plasmática e**
185 **oxidativo.**

186 A exposição das linhagens WT e *Δhsp12* a distintos estressores foi realizada, avaliando,
187 assim, possíveis diferenças fenotípicas que possam para indicar o papel de Hsp12 em *C. gattii*.
188 A sensibilidade a dois estressores clássicos de parede celular, Congo red e Calcofluor white,
189 foram inicialmente avaliados e não se identificou diferença de crescimento entre as linhagens
190 testadas. Adicionalmente, a sensibilidade ao estresse salino foi testada com o emprego de
191 concentrações elevadas de NaCl, entretanto diferenças de crescimento não foram observadas
192 (Fig. 3).

193 Foram ainda avaliados a exposição das células das linhagens WT e *Δhsp12* a
194 antifúngicos de diferentes classes, entre eles anfotericina, flucitocina, caspofungina e
195 fluconazol, no entanto não foram observadas diferenças de crescimento. Na presença de SDS,
196 agente estressor de membrana plasmática, foi possível verificar claramente uma maior
197 sensibilidade da linhagem *Δhsp12* quando comparada com a linhagem WT. Constatou-se,
198 também, uma maior sensibilidade da linhagem nula na presença de H₂O₂, clássico agente
199 indutor de estresse oxidativo (Fig. 3).

200 **A interação entre *C. gattii* e macrófagos é influenciada por Hsp12.**

201 A influência da deleção de Hsp12 na suscetibilidade de fagocitose foi avaliada através
202 da co-incubação de células das linhagens WT e *Δhsp12* com macrófagos murinos da linhagem
203 J774.A1 por 2 e 24 h. A taxa de fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo e os resultados
204 obtidos demonstram que a linhagem nula *Δhsp12*, em ambos os tempos, apresenta uma maior
205 taxa de fagocitose em comparação a linhagem selvagem (Fig. 4A e B).

206 4. Discussão

207 Para o sucesso da infecção, patógenos em geral necessitam da capacidade de adaptação
208 ao ambiente de privação nutricional, e à hostil resposta imunológica encontradas no hospedeiro.
209 Ao invadir o sistema respiratório, *Cryptococcus* sp. encontra-se em um ambiente de estresse,
210 uma vez que o tecido pulmonar apresenta uma altamente especializada resposta imunológica
211 [1, 29-31]. Uma vez exposto ao ambiente de estresse descrito anteriormente, mecanismos
212 necessários para garantir a homeostase celular são ativados. Dentre elas, destaca-se o aumento
213 na expressão de proteínas de choque térmico. Proteínas Hsp e sHsp, além de atuarem na
214 resposta ao estresse, influenciam na patobiologia do processo de infecção [16, 32, 33]. Dados
215 do nosso grupo de pesquisa indicam que *C. gattii* apresenta um aumento na expressão de *HSP12*
216 durante a condição de infecção em camundongos [34].

217 O perfil de expressão de Hsp12 ortólogas à encontrada em *C. gattii* já foi parcialmente
218 elucidado em outras espécies como *S. cerevisiae* e *C. albicans*, por exemplo. Considerando a
219 grande importância da genômica comparativa, podemos lançar mão dos dados encontrados
220 nestes organismos como guia para compreensão da Hsp12 estudada em *C. gattii* até a completa
221 elucidação de seu perfil específico [35]. Nossos resultados sugerem uma redução na expressão
222 de *HSP12* quando *C. gattii* é exposto a concentração subinibitória de fluconazol durante
223 exposição por 24 h. Este dado é compatível com os descritos para *C. albicans*, visto que a
224 *HSP12* desse organismo possui sua expressão modulada pela presença de antifúngicos azóis.
225 Tem-se descrito que o fator de transcrição Tac1, promotor da expressão dos transportadores
226 ABC Cdr1 e Cdr2, envolvido com o efluxo de drogas, promove também, um aumento na
227 expressão de *HSP12* quando analisado após 20 minutos de exposição ao fármaco [36]. Porém,
228 outros estudos demonstram uma redução da expressão de *HSP12* após exposição à cetoconazol
229 em tempos mais elevados [37]. Dessa forma, se faz necessária a análise dos níveis de expressão
230 relativa em um curto tempo de exposição ao azol testado. Quanto ao aumento observado na

231 expressão de *HSP12* de *C. gattii* durante a condição de choque térmico, a diferença é coerente
232 com o comportamento clássico de indução da expressão de proteínas Hsp. O aumento
233 observado nesta condição também está de acordo com os visualizados em *S. cerevisiae*, *C.*
234 *albicans* e *S. pombe* [27, 38-40].

235 Para delinear as potenciais funções de Hsp12 em *C. gattii*, avaliou-se a sensibilidade de
236 crescimento da linhagem $\Delta hsp12$ na presença de diferentes estressores. Dentre as situações de
237 estresse testadas, a análise de estresse oxidativo causado por H₂O₂ e estresse de membrana
238 causado por SDS definiram a participação de Hsp12 na resposta a estas situações. Nessas
239 mesmas condições, já foi observado um aumento na expressão do gene *HSP12* dos ortólogo
240 dessa proteína em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, dando suporte aos resultados obtidos no presente
241 estudo [26, 27, 39]. Desta forma, a indução de expressão e, possivelmente, a resposta por Hsp12
242 é potencialmente conservada entre as espécies analisadas.

243 O papel da proteína ortóloga de *S. cerevisiae* (*ScHsp12*) já foi vastamente descrito e é
244 de grande auxílio na compreensão dos fenótipos encontrados em *C. gattii*. *ScHsp12* possui sua
245 estrutura já caracterizada por ressonância magnética nuclear (NMR) e uma linhagem nula para
246 o gene codificador desta proteína também foi construída e caracterizada. A estrutura da proteína
247 *ScHsp12* encontra-se solúvel e desdobrada no citoplasma. Sua estrutura secundária e atividade
248 apenas se inicia ao interagir com a fração lipídica que compões as membranas, assim exibindo
249 a formação de uma α -hélice [26, 41, 42]. Considerando os diversos mecanismos envolvidos na
250 atuação, deve-se destacar que as funções de proteínas sHsp não se limitam a atividades de
251 chaperona, mas também atuam em nível de membrana celular [43]. A atividade de *ScHsp12*
252 envolve, justamente, a modulação das membranas, influenciando na regulação de aspectos
253 como fluidez, e consequentemente garantindo a integridade dessa importante estrutura em
254 condições de estresse. Como citado anteriormente, a linhagem nula apresentou um perfil de

255 sensibilidade a estressores similar ao de *C. gattii*, o que nos leva a compreender que a função
256 dessas proteínas é de grande similaridade [39, 44].

257 Além disso, demonstramos também que a ausência dessa proteína possui efeito direto
258 durante a interação com macrófagos murinos, levando a um aumento da taxa de fagocitose.
259 Uma vez que a ação da Hsp12 estudada relaciona-se potencialmente com a integridade de
260 membrana, e leva a alterações morfológicas em *S. cerevisiae*, é possível associar este aumento
261 da taxa de fagocitose ao fenótipo de sensibilidade observado. Sabe-se que a membrana celular
262 de *Cryptococcus* sp possui alta importância e influência direta durante interação com o
263 hospedeiro e na resistência a terapêutica antifúngica [39, 45, 46]. Pode-se especular que o
264 transporte de componentes pela membrana, como os polissacarídeos responsáveis pela
265 formação da cápsula, seja afetado pela deleção de *HSP12* em *C. gattii*. Alterações desse tipo
266 podem provocar mudanças nos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e,
267 conseqüentemente, um aumento ou redução na resposta imunológica [47-50]. O aumento
268 encontrado, portanto, pode se relacionar com um reconhecimento facilitado das células de
269 defesa do hospedeiro. Para melhor compreensão dos impactos da ausência dessa proteína na
270 virulência de *C. gattii* durante a infecção, experimentos em modelo animal são necessários.

271 Este estudo conclui que a Hsp12 de *C. gattii* atua em resposta a condições de estresse
272 térmico, oxidativo e de membrana plasmática. Potencialmente, sua ausência leva a alterações
273 importantes na fagocitose. Uma vez que se observou um aumento da sensibilidade a SDS, e a
274 proteína ortóloga em *S. cerevisiae* relaciona-se intimamente com integridade da membrana,
275 levanta-se a hipótese da conservação de função em *C. gattii*.

276 5. Referências

- 277 [1] Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous
278 trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e180057.
- 279 [2] Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery
280 of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):515-48.
- 281 [3] Chang CC, Sorrell TC, Chen SC. Pulmonary Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*.
282 2015;36(5):681-91.
- 283 [4] Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragoz MT, Castañeda E, Group LACS. The status of
284 cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e170554.
- 285 [5] Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus*
286 *neoformans*. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3(4):354-8.
- 287 [6] Casadevall A, Coelho C, Cordero RJB, Dragotakes Q, Jung E, Vij R, et al. The Capsule of
288 *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*. 2018:0.
- 289 [7] Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*.
290 *Adv Appl Microbiol*. 2014;87:1-41.
- 291 [8] Agostinho DP, Miller LC, Li LX, Doering TL. Peeling the onion: the outer layers of
292 *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e180040.
- 293 [9] Kwon-Chung KJ, Bennett JE. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in
294 tropical and subtropical regions. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1984;257(2):213-8.
- 295 [10] Chen M, Xu Y, Hong N, Yang Y, Lei W, Du L, et al. Epidemiology of fungal infections
296 in China. *Front Med*. 2018;12(1):58-75.

- 297 [11] Chaturvedi V, Chaturvedi S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends*
298 *Microbiol.* 2011;19(11):564-71.
- 299 [12] Schlesinger MJ. Heat shock proteins: the search for functions. *J Cell Biol.*
300 1986;103(2):321-5.
- 301 [13] Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and
302 acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(5):2177-86.
- 303 [14] Haslbeck M, Vierling E. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their
304 function in protein homeostasis. *J Mol Biol.* 2015;427(7):1537-48.
- 305 [15] Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil.*
306 2016;12(4):255-9.
- 307 [16] Tiwari S, Thakur R, Shankar J. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in
308 the Biology of Fungi. *Biotechnol Res Int.* 2015;2015:132635.
- 309 [17] Silveira CP, Piffer AC, Kmetzsch L, Fonseca FL, Soares DA, Staats CC, et al. The heat
310 shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface
311 and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal Genet Biol.* 2013;60:53-63.
- 312 [18] Xie JL, Polvi EJ, Shekhar-Guturja T, Cowen LE. Elucidating drug resistance in human
313 fungal pathogens. *Future Microbiol.* 2014;9(4):523-42.
- 314 [19] Robbins N, Uppuluri P, Nett J, Rajendran R, Ramage G, Lopez-Ribot JL, et al. Hsp90
315 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002257.
- 316 [20] Cowen LE, Lindquist S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance
317 in diverse fungi. *Science.* 2005;309(5744):2185-9.

- 318 [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
319 quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- 320 [22] García-Pedrajas MD, Nadal M, Kapa LB, Perlin MH, Andrews DL, Gold SE. DelsGate, a
321 robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(4):379-88.
- 322 [23] Toffaletti DL, Rude TH, Johnston SA, Durack DT, Perfect JR. Gene transfer in
323 *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol*. 1993;175(5):1405-
324 11.[24] Evans RJ, Voelz K, Johnston SA, May RC. Using Flow Cytometry to Analyze
325 *Cryptococcus* Infection of Macrophages. *Methods Mol Biol*. 2017;1519:349-57.
- 326 [25] Squizani ED, Oliveira NK, Reuwsaat JCV, Marques BM, Lopes W, Gerber AL, et al.
327 *Cryptococcal* dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium
328 transporter Pmc1. *Cell Microbiol*. 2018;20(2).
- 329 [26] Praekelt UM, Meacock PA. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces*
330 *cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet*. 1990;223(1):97-106.
- 331 [27] Fu MS, De Sordi L, Mühlshlegel FA. Functional characterization of the small heat shock
332 protein Hsp12p from *Candida albicans*. *PLoS One*. 2012;7(8):e42894.
- 333 [28] Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631-77.
- 334 [29] Ene IV, Brunke S, Brown AJ, Hube B. Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring*
335 *Harb Perspect Med*. 2014;4(12):a019695.
- 336 [30] Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary
337 infection. *Microbes Infect*. 2012;14(1):17-25.
- 338 [31] Brown SM, Campbell LT, Lodge JK. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress.
339 *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(4):320-5.

- 340 [32] Mahmood T, Safdar W, Abbasi BH, Naqvi SMS. An overview on the small heat shock
341 proteins. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(7): 927-39.
- 342 [33] Cleare LG, Zamith-Miranda D, Nosanchuk JD. Heat Shock Proteins in *Histoplasma* and
343 *Paracoccidioides*. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(11).
- 344 [34] Ferrareze PAG, Streit RSA, Santos PRD, Santos FMD, Almeida RMC, Schrank A, et al.
345 Transcriptional Analysis Allows Genome Reannotation and Reveals that *Cryptococcus gattii*
346 VGII Undergoes Nutrient Restriction during Infection. *Microorganisms*. 2017;5(3).
- 347 [35] Hardison RC. Comparative genomics. *PLoS Biol*. 2003;1(2):E58.
- 348 [36] Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. TAC1, transcriptional activator of
349 CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC
350 transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell*. 2004;3(6):1639-52.
- 351 [37] Liu TT, Lee RE, Barker KS, Wei L, Homayouni R, Rogers PD. Genome-wide expression
352 profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in
353 *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2226-36.
- 354 [38] Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress
355 response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:243-82.
- 356 [39] Welker S, Rudolph B, Frenzel E, Hagn F, Liebisch G, Schmitz G, et al. Hsp12 is an
357 intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates
358 membrane function. *Mol Cell*. 2010;39(4):507-20.
- 359 [40] Ahn J, Won M, Choi JH, Kyun ML, Cho HS, Park HM, et al. Small heat-shock protein
360 Hsp9 has dual functions in stress adaptation and stress-induced G2-M checkpoint regulation
361 via Cdc25 inactivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun*.
362 2012;417(1):613-8.

- 363 [41] Singarapu KK, Tonelli M, Chow DC, Frederick RO, Westler WM, Markley JL. Structural
364 characterization of Hsp12, the heat shock protein from *Saccharomyces cerevisiae*, in aqueous
365 solution where it is intrinsically disordered and in detergent micelles where it is locally a-
366 helical. *J Biol Chem*. 2011;286(50):43447-53.
- 367 [42] Herbert AP, Riesen M, Bloxam L, Kosmidou E, Wareing BM, Johnson JR, et al. NMR
368 structure of Hsp12, a protein induced by and required for dietary restriction-induced lifespan
369 extension in yeast. *PLoS One*. 2012;7(7):e41975.
- 370 [43] Nakamoto H, Vigh L. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci*.
371 2007;64(3):294-306
- 372 [44] Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G. The LEA-like protein HSP 12 in
373 *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against
374 desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1463(2):267-78.
- 375 [45] Singh A, Wang H, Silva LC, Na C, Prieto M, Futerman AH, et al. Methylation of
376 glycosylated sphingolipid modulates membrane lipid topography and pathogenicity of
377 *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol*. 2012;14(4):500-16.
- 378 [46] Shor E, Wang Y, Perlin DS, Xue C. flips its lid - membrane phospholipid asymmetry
379 modulates antifungal drug resistance and virulence. *Microb Cell*. 2016;3(8):358-60.
- 380 [47] O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield.
381 *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(3):387-408.
- 382 [48] Erwig LP, Gow NA. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*.
383 2016;14(3):163-76.
- 384 [49] Heung LJ. Innate Immune Responses to. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(3).

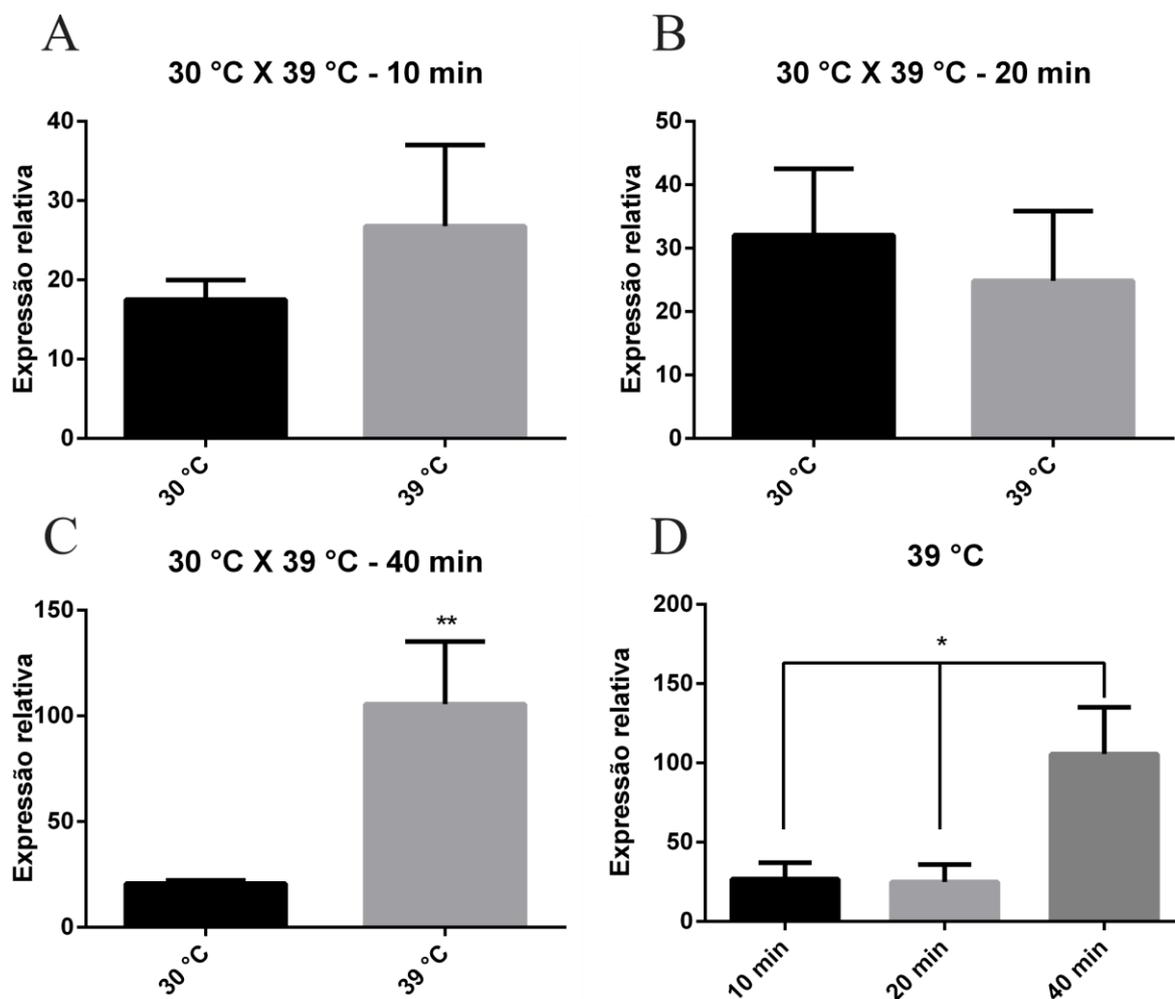
385 [50] Taghavi M, Khosravi A, Mortaz E, Nikaein D, Athari SS. Role of pathogen-associated
386 molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. *Eur J Pharmacol.*
387 2017;808:8-13.

388 **6. Tabelas e figuras**

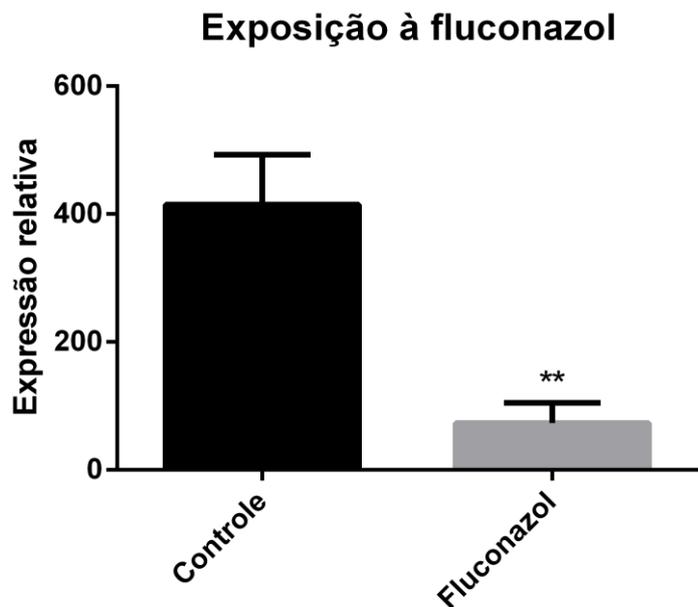
389 **Tabela 1. Estressores ou antifúngicos avaliados, concentrações e condição de cultivo**
 390 **empregados.**

Estressor/antifúngico	Concentração	Meio	Temperatura
30 °C	-	YNB	30 °C
37 °C	-	YNB	30 °C
Congo Red	5 mg/ml	YPD	30 °C
Calcofluor white	300 µg/ml	YNB	30 °C
NaCl	1,5 M	YNB	30 °C
Anfotericina	1 µg/ml	YNB	30 °C
Flucitosina	5 µg/ml	YNB	30 °C
Caspofungina	20 µg/ml	YNB	30 °C
Fluconazol	5 µg/ml	YNB	30 °C
SDS	0,01 %	YNB	30 °C
H ₂ O ₂	2,5 mM	YNB	37 °C

391

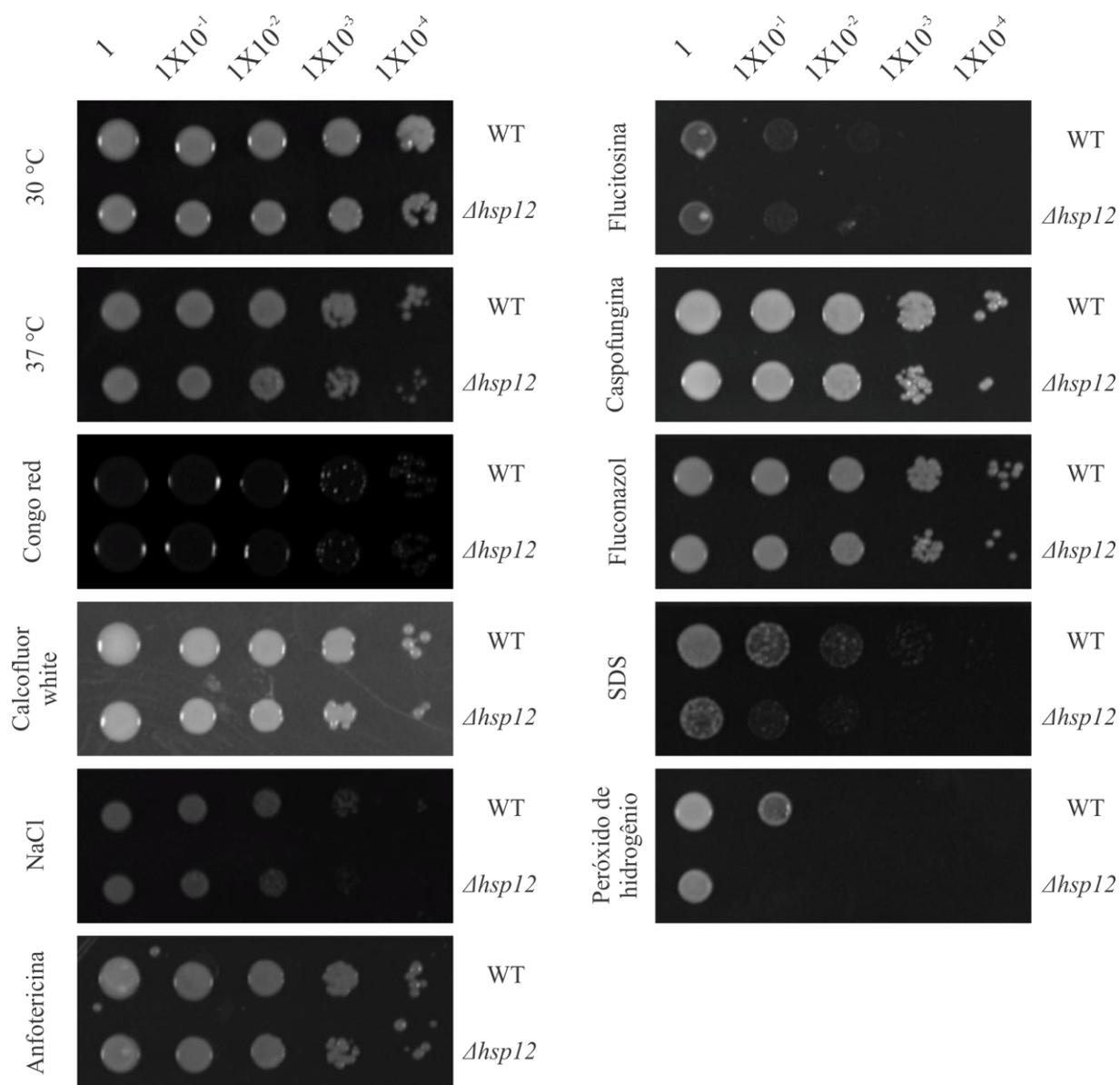


392 **Figura 1. Expressão relativa do gene codificante de Hsp12 de *C. gattii* em condição de**
 393 **choque térmico a 39°C. (A, B e C) Expressão relativa de *HSP12* durante choque térmico de**
 394 **10, 20 e 40 minutos respectivamente. Teste t, $P < 0,05$. (D) *HSP12* apresenta aumento de sua**
 395 **expressão após 40 minutos de choque térmico quando comparado com os tempos de 10 e 20**
 396 **minutos. Teste t, $P < 0,05$.**



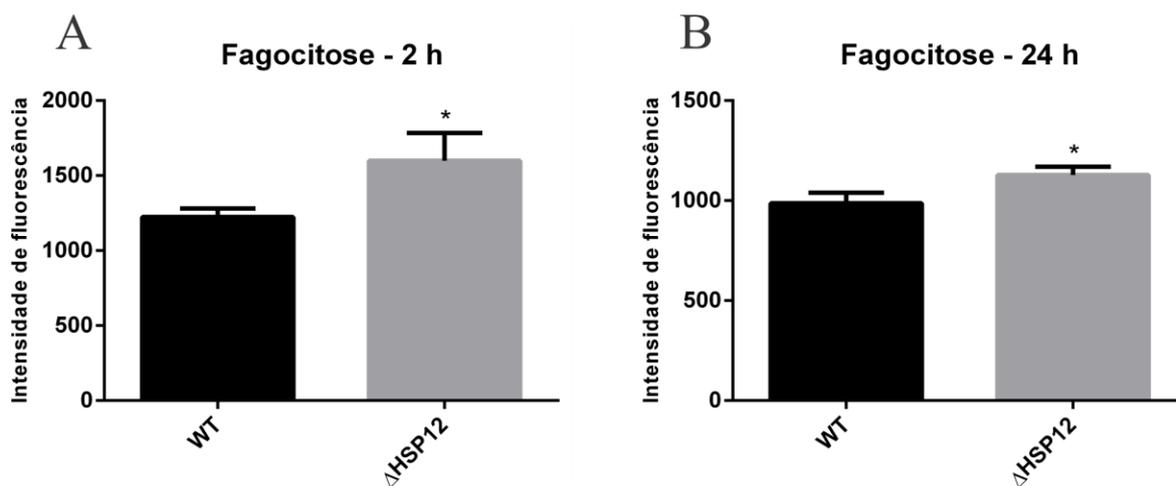
397

398 **Figura 2. Expressão relativa da *HSP12* cultivada sob concentração subinibitória de**
399 **Fluconazol.** A expressão relativa do gene codificante de *HSP12* é significativamente menor na
400 presença de concentração subinibitória comparado com o controle após 24 h de cultivo. Teste
401 t, $P < 0,05$.



402

403 **Figura 3. Ensaio de sensibilidade das linhagens WT e $\Delta hsp12$ na presença de diferentes**
 404 **estressores.** Diluições seriadas de células das linhagens WT e $\Delta hsp12$ foram inoculadas na
 405 presença de estressores de parede celular (Calcofluor white, Congo red), membrana plasmática
 406 (SDS), osmótico (NaCl), oxidativo (peróxido de hidrogênio), e antifúngicos.



407

408 **Figura 4. Ensaio de fagocitose por macrófagos murinos da linhagem J774.A1.** Células das
409 linhagens WT e Δ *hsp12* foram inoculadas em interação com macrófagos por 2 h (A) e 24 h
410 (B). Em ambos os tempos analisados há um aumento da taxa de fagocitose da linhagem Δ *hsp12*
411 comparada a linhagem WT. Teste t, $P < 0,05$.

7. Material suplementar

Tabela S1. Sequencias de primers utilizados.

Primer	Sequência	Uso
ActF	5'-CGGTATCGTCACAAACTGG-3'	qRT-PCR actina
ActR	5'-GGAGCCTCGGTAAGAAGAAC-3'	qRT-PCR actina
CNBG_2441F	5'-GACTGACTCTGCTGCTTCTAC-3'	qRT-PCR <i>HSP12</i>
CNBG_2441R	5'-GACTCCTGGTTGTCGTTCTT-3'	qRT-PCR <i>HSP12</i>
CNBG_2441_5'F	5'-AAAATAGGGATAACAGGGTAATGACCAAGGTTGGGATGCTTA-3'	Fragmento de deleção DEL 5 e Fragmento de complementação
CNBG_2441_5'R	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTGTTTGTGCTGTGGTTTGG-3'	fragmento de deleção DEL 5
CNBG_2441_3'F	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCAGTTATCGCAACCATTGA-3'	Fragmento de deleção DEL 3
CNBG_2441_3'R	5'-AAAAATTACCCTGTTATCCCTAAAAGCGGATCTGTCGCCTAT-3'	Fragmento de deleção DEL 3 e fragmento de complementação

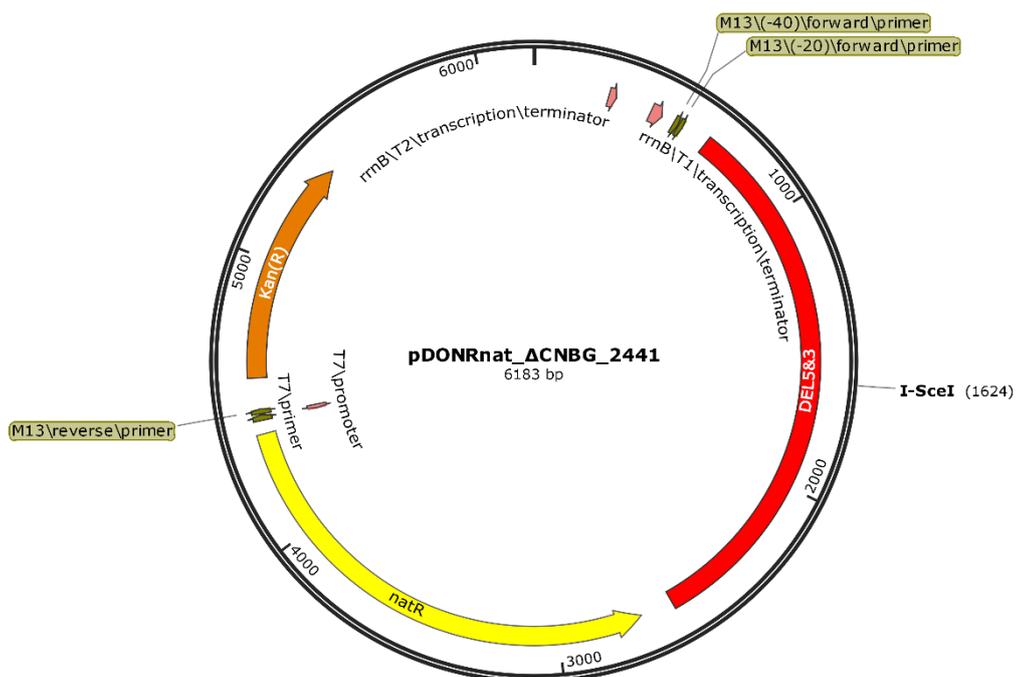


Figura S1. Vetor de deleção pDONRnat_ΔCNBG_2441. Vetor de deleção contendo os fragmentos DEL 5 e DEL 3 (DEL5&3), além do cassete contendo marca de resistência a nourseotricina (natR).

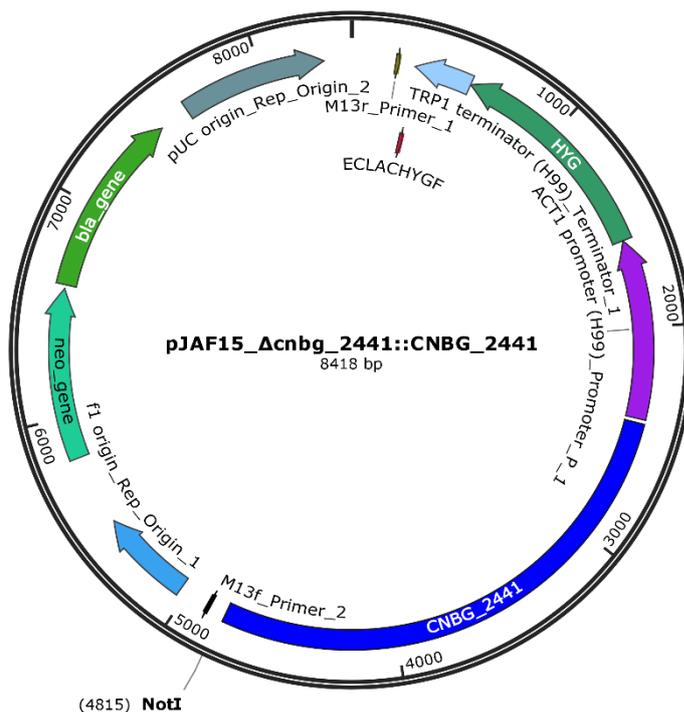


Figura S2. Vetor de complementação pJAF15_Δcnbg_2441::CNBG_2441. Vetor de complementação contendo o fragmento com região codificante de CNBG_2441, acrescido de fragmentos *upstream* e *downstream* contendo 992 pb cada (CNBG_2441). Cassete contendo marca de resistência a higromicina B (HYG).

Anexo

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.