

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

Carolina Leobora Anton

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *SMF1* DE *CRYPTOCOCCUS GATTII*

Porto Alegre

2021

Carolina Leobora Anton

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *SMF1* DE *CRYPTOCOCCUS GATTII*

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.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: B.Sc. Camila Diehl

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Anton, Carolina
Caracterização funcional do gene SMF1 de
Cryptococcus gattii / Carolina Anton. -- 2021.
45 f.
Orientador: Charley Staats.

Coorientador: 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, 2021.

1. Cryptococcus gattii. 2. Homeostase de manganês.
3. Homeostase de ROS. 4. Smf1. 5. Manganês. I. Staats,
Charley, orient. II. Diehl, Camila, coorient. III.
Título.

Carolina Leobora Anton

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *SMF1* DE *CRYPTOCOCCUS GATTII*

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: 15 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Ane Wichine Acosta Garcia - UFCSPA

Julia Catarina Reuwsaat – UFRGS

Charley Christian Staats – UFRGS

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por sempre me apoiar e acreditar em mim independente de qualquer coisa. Obrigada por todo carinho e compreensão, e por sempre me contagiar com tua alegria.

Ao meu pai, por todo o apoio nos estudos, desde que eu era criança. Sei que sempre tentou fazer o melhor em prol do meu aprendizado.

Ao meu companheiro, Rodolfo, por todo amor e paciência.

Às minhas gatas, Desi e Alex, e ao meu cachorro Lenin, pelo amor incondicional e por alegrarem até os piores dias.

Às minhas amigas Joice, Clara e Alessandra, pelos rolês infinitos, pelas risadas incessantes, loucuradas, bebedeiras e comilanças. Bah, aham.

Ao Uriel e à Camila, pela grande ajuda em todo este trabalho.

À Ane e ao Rodrigo, e novamente à Camila e ao Uriel, pelos ensinamentos nas referatas que foram de grande importância.

Ao Charley, por ter me aceitado no laboratório e me delegado este trabalho que contribuiu imensamente para minha formação como biomédica e pesquisadora. Agradeço por todo o conhecimento passado e por toda a disposição em me ajudar e me ensinar.

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são agentes causadores da criptococose, que afetam tanto humanos quanto animais. A transmissão se dá por via respiratória, estabelecendo a infecção primariamente nos pulmões, podendo haver disseminação para o cérebro levando à meningoencefalite. No pulmão, a primeira linha de defesa contra a infecção é a fagocitose por macrófagos alveolares. Após fagocitado, *Cryptococcus spp.* são privados de nutrientes, como metais, como maneira de defesa da célula hospedeira, caracterizando a imunidade nutricional. Em um ambiente restrito de nutrientes, como o manganês, aumenta-se a expressão de genes codificadores de proteínas transportadoras de metais, como o Smf1p. Smf1p encontra-se na superfície de membranas celulares e tem como função o transporte de manganês para o lúmen celular. Foi observado desbalanço na homeostase de manganês em mutantes nulos para o gene *SMF1*, apresentando também aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo. Superóxidos dismutase complexadas com cobre-zinco e manganês, SOD1 e SOD2, respectivamente, são expressas em situações de estresse oxidativo para contornar o dano oxidativo e restabelecer a homeostase de ROS. Visto que os mutantes nulos para o gene *SMF1* de *C. gattii* apresentam decréscimo em seu desenvolvimento quando exposto ao (i) agente quelante de metais EDTA e (ii) ao agente gerador de espécies reativas de oxigênio paraquat, hipotetizamos que o transportador Smf1 participa da homeostase de ROS e da virulência em *C. gattii*. Para avaliar a participação de Smf1 no transporte e homeostase de manganês, construímos um mutante complementado *smf1::SMF1* para confirmar a associação dos fenótipos observados na linhagem nula *smf1*. Utilizamos tratamento com agente quelante EDTA para privar as células de metais, a fim de avaliar o comportamento das cepas. Avaliamos a expressão relativa dos genes associados à homeostase de ROS, ou seja, *SOD1*, *SOD2*, *CAT1*, *CAT2*, *GPX1* e *GPX2* através de RT-qPCR. Os resultados em conjunto sugerem que a complementação do mutante nulo *smf1* com o gene selvagem *SMF1* leva à reconstituição dos fenótipos da linhagem selvagem. Além disso, há modificação da expressão na linhagem mutante de alguns genes cujos produtos estão relacionados à homeostase de ROS, como *SOD2* e *GPX2*.

Palavras - chave: Manganês; Smf1; transportadores; *Cryptococcus*

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are the main etiological agents of cryptococcosis, a disease that affect both humans and animals. Transmission occurs by the respiratory route, establishing the infection primarily in the lungs, which may spread to the brain, ultimately leading to meningoencephalitis. In the lung, the first line of defense against infection is phagocytosis by alveolar macrophages. After phagocytosis, *Cryptococcus spp.* may be actively deprived of nutrients, such as metals, as a way of host defense mechanism – the nutritional immunity. In a nutrient-restricted environment, such as manganese, the expression of genes encoding metal transport proteins in pathogen cells, such as Smf1p, is increased. Smf1p is found on the surface of cell membranes and has the function of transporting manganese to the cell lumen. An imbalance in manganese homeostasis was observed in null mutants for the *SMF1* gene, also showing increased susceptibility to oxidative stress. Superoxide dismutase complexed with copper-zinc and manganese, *SOD1* and *SOD2*, respectively, are expressed in situations of oxidative stress to bypass oxidative damage and restore ROS homeostasis. Since the null mutants for the *C. gattii SMF1* gene show a decrease in their development when exposed to (i) the metal chelating agent EDTA and (ii) the reactive oxygen species generating agent paraquat, we hypothesize that the Smf1 transporter participates in ROS homeostasis and virulence in *C. gattii*. To assess the participation of Smf1 in manganese transport and homeostasis, we constructed a *smf1::SMF1* complemented strain to confirm the association of the observed phenotypes in the *smf1* null strain. We used EDTA chelating agent treatment to deprive the cells of metals in order to assess the phenotypic alterations in the strains. We evaluated the relative expression of genes associated with ROS homeostasis, i.e., *SOD2*, *CAT1*, *CAT2*, *GPX1* and *GPX2* using RT-qPCR. The results together suggest that the complementation of the null mutant *smf1* with the wild type *SMF1* gene leads to the reconstitution of wild lineage phenotypes. Furthermore, there is a modification of the expression in the mutant strain of some genes whose products are related to ROS homeostasis. Keywords: Manganese; Smf1; transportes; *Cryptococcus*

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Incidência anual de infecção criptocócica por país	9
Figura 2. Infecção – Via de meningoencefalite criptocócica	11
Figura 3. Ilustração esquemática da localização dos transportadores Smf1, Smf2 e Smf3 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Figura 4. Esquema da atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationala peroxidase	21

SUMÁRIO

1.	Introdução geral.....	8
1.1.	Criptococose e seus agentes etiológicos.....	8
1.2.	Via de infecção.....	10
1.3.	Determinantes de virulência em <i>Cryptococcus spp.</i>.....	11
1.4.	Imunidade nutricional e mecanismos adaptativos de patógenos.....	13
1.5.	Manganês e transportadores Nramp e Smf.....	15
1.6.	Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e enzimas de detoxificação.....	17
1.6.1.	Superóxido dismutases.....	18
1.6.2.	Catalases.....	20
1.6.3.	Glutathione peroxidases (Gpx).....	20
2.	Justificativa.....	21
3.	Objetivos.....	22
3.1.	Objetivos específicos.....	22
4.	Artigo científico.....	22
5.	Conclusões e perspectivas.....	38
	Referências bibliográficas.....	39
	Anexo A – Normas de publicação do periódico “Fungal Biology”.....	46

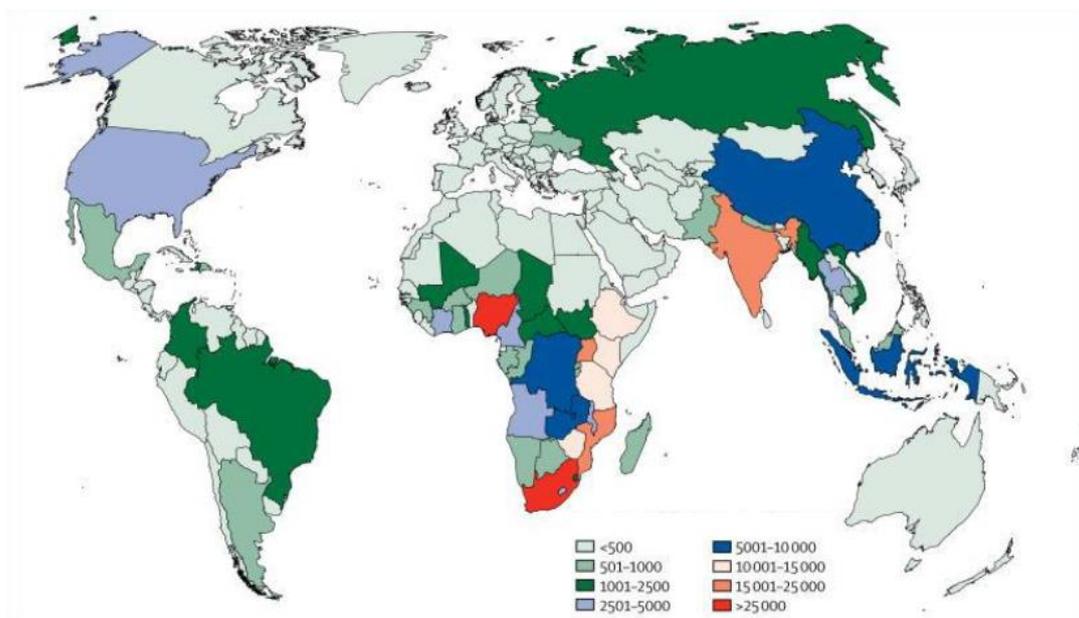
1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. CRIPTOCOCOSE E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS

A criptococose é uma doença causada pelas leveduras basidiomicéticas pertencentes ao complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (SETIANINGRUM; RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019). *C. gattii* é uma levedura ambiental que se desenvolve principalmente como uma levedura assexuada em seus hospedeiros humanos e animais, ganhando destaque na década de 1990, quando se estabeleceu na Colúmbia Britânica, Canadá e, posteriormente, no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos, e sendo reconhecido como um patógeno endêmico na Austrália (BILLMYRE et al., 2014; SOUTO et al., 2016). *C. neoformans* e *C. gattii* divergiram filogeneticamente há mais de 34 milhões de anos, produzindo espécies com importantes diferenças ecológicas e patológicas. *C. neoformans* acomete geralmente pacientes imunocomprometidos. Em contrapartida, *C. gattii* é capaz de infectar também indivíduos imunocompetentes em regiões endêmicas (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014b). Ambas as leveduras compartilham os principais determinantes de virulência essenciais para o sucesso da infecção em hospedeiros mamíferos (BIELSKA; MAY, 2016; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011b; LIN; HEITMAN, 2006; MA; MAY, 2009; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014a)

A meningite criptocócica, especialmente a causada por é a micose mais comum associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em pacientes, com morbidade e mortalidade significativas, especialmente na África Subsaariana, Ásia e América Latina (HERKERT et al., 2017). Estima-se que, a cada ano, surjam cerca de 225.000 novos casos de meningite criptocócica globalmente, sendo que aproximadamente 73% ocorrem na região da África Subsaariana (RAJASINGHAM et al., 2017). A criptococose pulmonar pode se disseminar e levar a complicações fatais, especialmente em quadros de meningite criptocócica. Cerca de 67% dos casos de criptococose pulmonar em pacientes imunocompetentes dissemina para o sistema nervoso central, causando meningite criptocócica, o que demonstra o forte potencial de agravamento da doença (SETIANINGRUM; RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019).

Figura 1. Incidência anual de infecção criptocócica por país.



Estima-se que ocorram anualmente cerca de 278.000 casos de criptococose e 223.100 casos de meningite criptocócica. RAJASINGHAM et al., 2017.

Cryptococcus spp. tem ciclos de vida sapróbios e parasitários, gerando esporos infecciosos no ambiente. Os esporos infecciosos, ou propágulos infecciosos, que são os esporos ou leveduras secas, possuem como via de infecção o sistema respiratório do hospedeiro (BAHN; JUNG, 2013). As fontes saprofíticas de *C. neoformans* mais importantes globalmente são os excrementos do pombo (*Columba livia*) e o solo. As amostras positivas para *C. neoformans* possuem como principal origem as áreas frequentadas por pombos, galinhas, perus e outras espécies de aves. O isolamento dessa levedura a partir de casca e ocos de tronco de árvores e de madeiras em estado de decomposição também é possível, tendo mais de 36 gêneros de árvores relatados com a presença do fungo. Por outro lado, *C. gattii* não foi isolado de guanos aviários. Na Austrália, um número crescente de árvores foram identificadas como reservatórios ambientais do *C. gattii*, com árvores que abrigam tanto *C. gattii* quanto *C. neoformans*, em várias partes do mundo (KWON-CHUNG et al., 2015).

Um importante fator a ser considerado no habitat de ambas as espécies no solo é sua interação com amebas. A interação entre espécies do gênero *Cryptococcus* e amebas de vida livre no solo contribuiu para a evolução de *C. neoformans* como um patógeno intracelular facultativo de sucesso. Células de *Cryptococcus spp.* possuem a capacidade de sobreviver em amebas utilizando a mesma estratégia patogênica que ocorre em macrófagos humanos. A predação da levedura pelos fagócitos de vida livre, em alguns aspectos, proporciona um ambiente semelhante ao encontrado durante o contexto de infecção, e tal predação no nicho

ambiental selecionou traços de virulência criptocócica que contribuem para a patogênese em hospedeiros humanos (CASADEVALL, 2012; CASADEVALL; PIROFSKI, 2007; CHRISMAN et al., 2011; FU; CASADEVALL, 2018; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

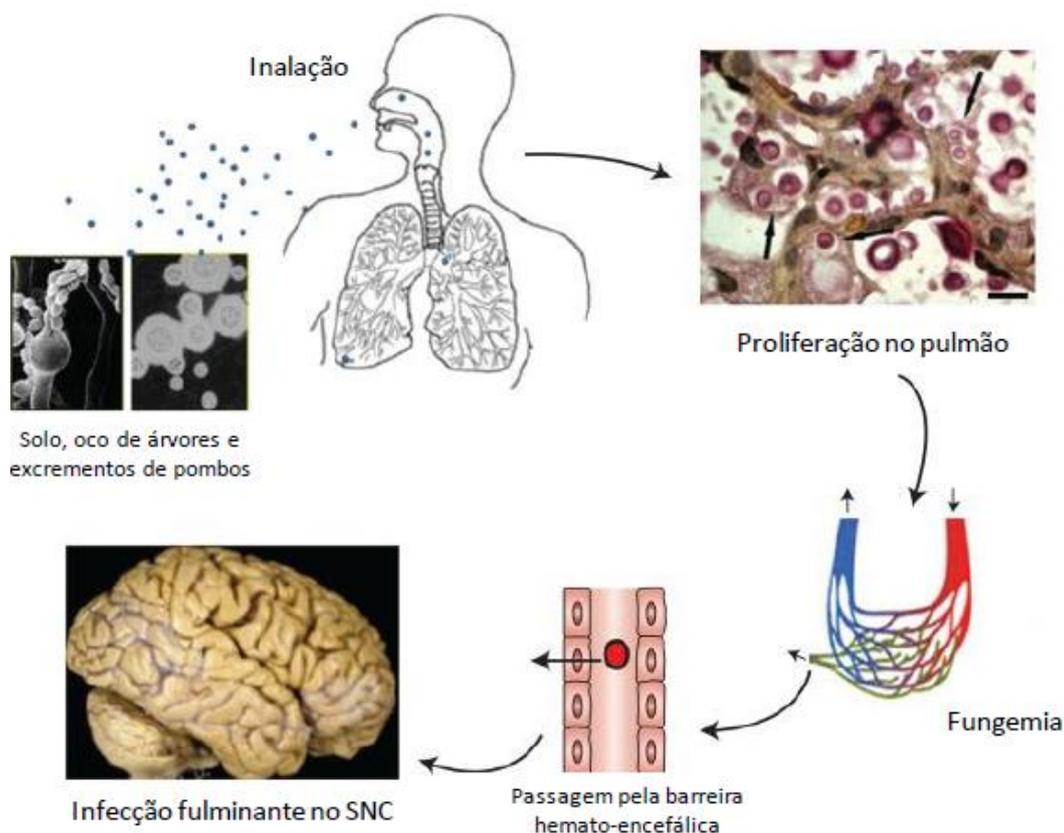
1.2. VIA DE INFECÇÃO

A criptococose se origina a partir da inalação de aerossóis, nos quais estão os propágulos infecciosos (esporos ou leveduras dessecadas) de *Cryptococcus spp.* presentes no ambiente, os quais possuem um tamanho ideal para deposição alveolar. A partir da exposição do hospedeiro a *Cryptococcus spp.*, é estabelecida uma infecção pulmonar inicial que pode ser assintomática ou limitada, a qual, em muitos hospedeiros é facilmente eliminada. Em outros indivíduos o micro-organismo estabelece uma forma granulomatosa latente, chamado criptococoma, nos linfonodos hilares (VELAGAPUDI et al., 2009).

Ao se depositarem nos alvéolos pulmonares, a primeira linha de defesa celular contra os esporos de *Cryptococcus spp.* são os macrófagos alveolares, com os quais as leveduras patogênicas possuem uma relação dinâmica. A depleção de macrófagos reduz a sobrevivência em modelos murinos de infecção. Elementos clássicos de virulência, como cápsula e melanina, ajudam o *Cryptococcus spp.* a minimizar a fagocitose e morte por macrófagos, mecanismo crucial para disseminação eficiente para o sistema nervoso central (SNC) (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018).

Na criptococose pode haver disseminação hematogênica do pulmão para o cérebro e outros órgãos. Para causar meningoencefalite, as células fúngicas devem sobreviver na corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (CHANG et al., 2004). *Cryptococcus spp.* se adaptam aos níveis subótimos de oxigênio e às condições nutricionais do cérebro, algo essencial para sua multiplicação e sobrevivência (CHUN; LIU; MADHANI, 2007). Alguns estudos relatam que infecções por *C. gattii* geralmente evoluem para uma doença pulmonar grave e morte com disseminação reduzida, enquanto *C. neoformans* possui tropismo ao sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite potencialmente fatal (BIELSKA; MAY, 2016; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011b; LIN; HEITMAN, 2006; MA; MAY, 2009; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014a).

Figura 2. Infecção – Via de meningoencefalite criptocócica.



As células criptocócicas transportadas pelo ar são inaladas pelo hospedeiro e se proliferam no pulmão antes de se disseminarem de forma hematogênica para o cérebro. Imagem adaptada de (KWON-CHUNG et al., 2014).

A manifestação da criptococose pode ser como uma doença pulmonar aguda, subaguda, crônica, meningite não purulenta do líquido cefalorraquidiano ou como uma infecção grave com febre, anemia, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Os olhos podem ser afetados, com potencial perda da visão, de forma parcial ou total. O diagnóstico depende da observação direta do agente causador por meio de estudos histopatológicos, isolamento em cultura e presença de antígeno capsular (NEGRONI, 2012).

1.3. DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA EM *CRYPTOCOCCUS SPP.*

C. neoformans e *C. gattii* compartilham diversos determinantes de virulência. O principal determinante de virulência das espécies de *Cryptococcus spp* é a cápsula polissacarídica. Sua composição básica é glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GXMGal) e manoproteínas. GXM e GXMGal representam, respectivamente, cerca de 88% e 12% da composição dessa estrutura. A cápsula polissacarídica pode ter uma grande variação

em seu tamanho, dependendo das condições ambientais (FRASES et al., 2009; ZARAGOZA et al., 2009). Em condições de cultivo *in vitro* o tamanho da cápsula é geralmente pequeno, podendo ter seu aumento induzido por fatores como elevação da concentração de CO₂ e restrição de ferro. Em condições de infecção em mamíferos, o tamanho da cápsula aumenta drasticamente, sendo um fator relevante para a patogênese criptocócica. A cápsula polissacarídica interfere nas respostas imunes ao mesmo tempo em que fornece ao *Cryptococcus spp.* uma defesa antifagocítica e capaz de contornar o estresse oxidativo no ambiente intracelular de fagócitos. A cápsula polissacarídica de *Cryptococcus spp.* tem efeito sobre a ativação e a redução de ligação do sistema complemento, a não responsividade de anticorpos, a inibição da migração de leucócitos e a inibição da fagocitose, e possui ainda um papel protetor contra a dessecação e fagocitose, funcionando ofensivamente e defensivamente. (GARCÍA-RODAS et al., 2014; ZARAGOZA et al., 2008, 2009).

Cryptococcus spp. possuem a capacidade de sobreviver em meio a estresses ambientais severos em ambientes naturais e no hospedeiro. Durante a transição entre esses dois nichos, *Cryptococcus spp.* responde e se adapta às mudanças ambientais dinamicamente para o sucesso de sua sobrevivência e proliferação (BAHN; JUNG, 2013). Células de *Cryptococcus spp.* secretam diversas enzimas que contribuem para a virulência, como a urease e a lacase. A capacidade de se desenvolver à temperatura de 37 ° C e a capacidade de produzir o pigmento melanina também são características que contribuem para a virulência. A melanina, encontrada na parede celular, desempenha um papel importante na virulência dos fungos por servir como defesa antioxidante no hospedeiro e impactar na sobrevivência do fungo no meio ambiente. Em *C. neoformans*, a melanina tem papel protetor contra a fagocitose por macrófagos, o que configura uma etapa fundamental na defesa do hospedeiro contra o patógeno. *C. neoformans* sofre melanização em resposta a estressores, como a privação de nutrientes e a exposição a precursores de melanina exógena. A melanina protege contra danos oxidativos e outros estressores ambientais, como calor, frio, compostos antimicrobianos e radiação ionizante (CORDERO; CAMACHO; CASADEVALL, 2020). O processo de melanização fúngica é dependente da presença de substrato, como L-3,4-dihidroxifenilalanina (L- DOPA) e outras catecolaminas. Além disso, esse processo é dependente da expressão de lacase, uma enzima da parede celular associada à virulência. A melanização também está associada à resistência adquirida aos medicamentos das classes polienos e equinocandinas, podendo ser responsável pela refratariedade à terapia (EISENMAN et al., 2009).

Em *C. neoformans*, a urease possui papel relevante durante a infecção. A urease catalisa a degradação da ureia em CO₂ e amônia para disponibilizar nitrogênio para utilização

durante a infecção. A ausência da urease resulta em dificuldade de desenvolvimento da levedura sob variação de pH, especialmente em meio de pH baixo, como em fagossomos. A urease promove o sequestro de células criptocócicas nos vasos microcapilares. A amônia produzida por essa degradação possui efeito sobre a adesão de *C. neoformans*, seja por aumentar a expressão de adesinas no endotélio ou por um efeito tóxico direto nas junções herméticas BHE, o que facilitaria a invasão ao cérebro (ZARAGOZA, 2019). A lacase, por sua vez, promove a disseminação extrapulmonar de *C. neoformans* para o SNC. A lacase é necessária para a biossíntese da melanina e da prostaglandina E2. Este fator está associado ao aumento da sobrevivência do fungo em macrófagos. A expressão da lacase modula as respostas das células T auxiliares inatas e adaptativas do hospedeiro, promovendo a patogênese das infecções criptocócicas (HANSAKON; NGAMSKULRUNGROJ; ANGKASEKWINAI, 2020).

Além dos determinantes de virulência citados, existem diversas vias de sinalização celular, outras estratégias para infectar fagócitos do hospedeiro e mecanismos para romper a barreira hematoencefálica, também comuns a ambas as espécies. *C. gattii* possui capacidade de interromper a migração de neutrófilos em condições de laboratório e em animais infectados. Isso ajuda a explicar o motivo de pessoas saudáveis poderem desenvolver a infecção. Além disso, metabólitos de *C. gattii*, em especial a acetoína e a di-hidroxiacetona, promovem menos respostas pró-inflamatórias do que metabólitos de *C. neoformans*. Tal característica impacta na sobrevivência e na multiplicação de fungos no hospedeiro (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011a).

1.4. IMUNIDADE NUTRICIONAL E MECANISMOS ADAPTATIVOS DE PATÓGENOS

A presença de metais como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) é essencial para todos os organismos vivos, e durante as interações patogênicas com um hospedeiro, a sua homeostase se torna vital. Esses metais se incorporam às metaloproteínas, como metaloenzimas, proteínas de armazenamento e fatores de transcrição. Suas funções podem ser não catalíticas, de catálise redox e de catálise não redox (HOOD; SKAAR, 2012). Os metais podem atuar como cofatores de enzimas, incluindo superóxido dismutases dependentes de metal (SODs) e lacases produtoras de melanina. Mn, Fe e Cu fornecem atividade redox e catalítica para diversos processos biológicos. Esses metais de transição possuem estado de oxidação estável, podendo haver estados de oxidação estáveis adicionais

como ocorre com o Mn. Essa característica lhes permite mudar seus estados de oxidação em reações biológicas. Zn é uma exceção, mas desempenha importante papel na regulação de gênica (GERWIEN et al., 2018).

Cryptococcus spp. infecta e sobrevive em células fagocíticas, como os macrófagos alveolares. Estas células, durante a infecção, desenvolvem um meio intracelular hostil para as células fúngicas produzindo espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, diminuindo o pH e reduzindo a biodisponibilidade de metais e nutrientes. Nessas condições estressantes para o patógeno, como o de baixo teor de metal, aumenta-se a expressão de transportadores de alta afinidade. *Cryptococcus spp.* possui mecanismos específicos para a absorção de micronutrientes de seus hospedeiros, a fim de neutralizar a baixa disponibilidade de metais imposta pelos fagócitos (DE PAULA et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2017; FERRAREZE et al., 2017; STAATS et al., 2013). Para manter a homeostase de metais, transportadores de íons metálicos desempenham um papel essencial. Na escassez de Mn, aumenta-se a expressão do transportador de Mn de alta afinidade, chamado transportador supressor da função de importação de mitocôndrias, ou Smf (COHEN; NELSON; NELSON, 2000).

. A atividade dos transportadores de zinco é regulada nos níveis transcricional e pós-transcricional em resposta ao zinco. Esses diferentes mecanismos trabalham juntos para equilibrar a absorção de zinco e seu armazenamento e utilização (EIDE, 2003). Em *S. cerevisiae*, a homeostase do zinco é regulada pela atividade controlada dos transportadores de captação de zinco na membrana plasmática e transportadores responsáveis pela compartimentalização intracelular do zinco. Zap1p é um fator de transcrição de dedo de zinco que atua como um regulador mestre de zinco, ligando-se a elementos responsivos ao zinco nas regiões promotoras de genes como *ZRT1* e *ZRT2* (EIDE, 2009). Pela expressão do gene *ZAP1*, *C. gattii* regula a obtenção de zinco do ambiente restritivo do hospedeiro durante o processo de infecção. *ZAP1* de *C. gattii* é ortólogo de *zafA* e *ZAP1*, que são os genes codificantes de proteínas reguladoras principais do metabolismo de zinco em *Aspergillus fumigatus* e *S. cerevisiae*, respectivamente (SCHNEIDER et al., 2012; STAATS et al., 2013). Zap1, um homólogo funcional de Zap1p de *S. cerevisiae*, regula a expressão de transportadores ZIP de zinco e proteínas de ligação de zinco distintas, regulando também o zinco intracelular. A deleção de *ZAP1* reduz a virulência de *C. gattii* (SCHNEIDER et al., 2012). O fator de transcrição Zap1 de *S. cerevisiae* e o fator de transcrição Loz1 de *Schizosaccharomyces pombe* são responsáveis pela homeostase do zinco, controlando a expressão de genes necessários para o metabolismo do zinco. Zap1 ativa a expressão gênica quando as células se

encontram em um ambiente com limitação de zinco, enquanto *Loz1* é necessário para a repressão gênica quando o zinco está em excesso (WILSON; BIRD, 2016).

O cobre e o zinco desempenham papel fundamental na resposta ao estresse oxidativo, como cofatores da superóxido dismutase citosólica (SOD1) e por estar contido em metalochaperona e metalotioneínas com propriedades antioxidantes (BERTERAME et al., 2018). Mesmo o cobre sendo um oligoelemento essencial, seu excesso pode causar danos à membrana, oxidação de proteínas e clivagem do DNA. Para manter a homeostase adequada, as células possuem mecanismos sofisticados para regular a aquisição, distribuição e armazenamento de cobre. Em *S. cerevisiae*, *Ace1p* e *Mac1p* desempenham papéis como ativadores transcricionais para a regulação da expressão gênica em resposta ao cobre. *Ace1p* medeia a expressão gênica induzida por cobre em células expostas a níveis estressantes de sais de cobre (GROSS et al., 2000). *Ace1p* também é responsável pela ativação do gene *SOD1*, controlando a resposta de SOD1 ao cobre (GRALLA et al., 1991). *Mac1p* ativa a transcrição de genes envolvidos na captação de cobre de alta afinidade durante os períodos de deficiência (KENT WOOD; THIELE, 2009). *C. neoformans* difere por expressar um único fator de regulação da homeostase de cobre, *Cuf1*, o qual funciona como um regulador positivo, tanto para ativar a captação de cobre em condições de escassez, quanto para promover o mecanismo de sequestro de cobre quando as células possuem excesso de cobre (KOSMAN, 2018). *Cryptococcus spp.* encontram altos níveis de cobre no pulmão, onde a infecção é iniciada, e baixos níveis de cobre no cérebro. Os dois transportadores de cobre de *Cryptococcus spp.*, *Ctr1* e *Ctr4*, influenciam diferencialmente a sobrevivência do fungo durante a infecção pulmonar e o início da meningoencefalite. A proteína *Ctr1* é rapidamente degradada sob as condições de alto teor de cobre encontradas nos pulmões infectados, não havendo efeito sobre a virulência fúngica quando não presente. Por outro lado, a deleção de *Ctr4* resulta em um fenótipo hipervirulento. A superexpressão de *Ctr1* ou *Ctr4* leva à grande redução na carga fúngica no pulmão. Durante o início da meningoencefalite, a expressão dos transportadores de cobre é induzida e é crítica para a virulência de *Cryptococcus* (TS et al., 2014).

1.5. MANGANÊS E TRANSPORTADORES NRAMP E SMF

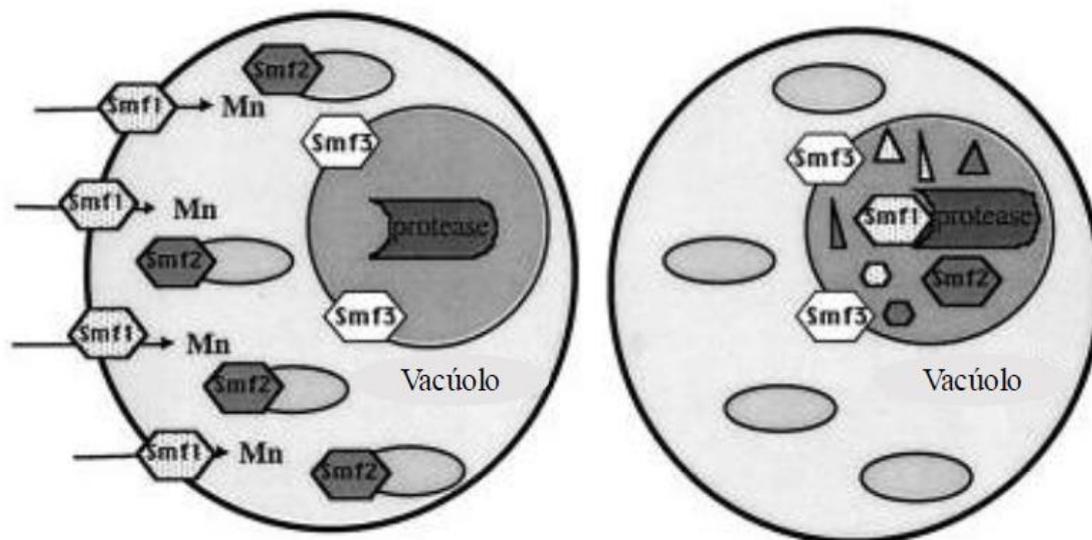
O manganês é um oligoelemento essencial utilizado por praticamente todas as formas de vida. O manganês é um metal ativo redox que serve como um cofator chave para uma ampla gama de metaloenzimas, incluindo oxidases e desidrogenases, DNA e RNA polimerases,

quinases, descarboxilases e açúcar transferases. Além de servir como um nutriente essencial, o manganês também pode ser tóxico (CULOTTA; YANG; HALL, 2005). O manganês se torna importante também por estar incluído uma classe de antioxidantes não proteicos em pequenos complexos de moléculas que podem eliminar os radicais ânion superóxido e fornecer um backup para as enzimas superóxido dismutase. (REDDI; CULOTTA, 2011). O gene *ZIP3* de *C. gattii*, um ortólogo de *ATX2* em *S. cerevisiae*, codifica um transportador de manganês cuja ausência reflete em tolerância a concentrações tóxicas de manganês, expressão desequilibrada de transportadores de metal intracelular e maior sensibilidade a espécies reativas de oxigênio (ROS), com alteração substancial na expressão de genes codificadores de enzimas desintoxicantes de ROS (GARCIA et al., 2020).

As proteínas de macrófago associadas à resistência natural, ou Nramp, correspondem a uma família de proteínas integrais de membrana (CELLIER et al., 1995), com a função de importar prótons e metais como manganês, ferro, cádmio e cobre. Em eucariotos, estão localizados na superfície celular ou em sítios e vesículas intracelulares fazendo o transporte de metal na direção do citosol (CULOTTA; YANG; HALL, 2005). Os transportadores Nramp conduzem a translocação dos metais através das membranas por acoplamento o fluxo de prótons e metais (REDDI; JENSEN; CULOTTA, 2009).

Smf1 e Smf2 de *S. cerevisiae* foram identificados em 1992 como supressores de um defeito de processamento de proteína mitocondrial sem conexão ainda conhecida com metais ou transporte (REDDI; JENSEN; CULOTTA, 2009). Smf1 e Smf2 são transportadores de alta afinidade de Mn e localizam-se em compartimentos celulares distintos durante condições de privação deste metal. Smf1 localiza-se na membrana celular das leveduras e Smf2 localiza-se na membrana de vesículas intracelulares. Smf3 localiza-se na membrana vacuolar, possui expressão constitutiva e é regulado negativamente pelo ferro por meio de um mecanismo que não envolve a transcrição ou a estabilidade da proteína (PORTNOY; LIU; CULOTTA, 2000). A regulação pós-traducional de Smf1p se dá pela presença de íons metálicos. A depleção de metais do meio de crescimento afeta a estabilização de Smf1p, resultando no acúmulo do transportador na superfície celular. A suplementação de manganês é suficiente para desencadear a degradação rápida de Smf1 de uma maneira dependente de Bsd2, uma proteína de membrana do retículo endoplasmático que direciona Smf1 para o vacúolo para ser degradado por proteases. Juntos, a ação de Bsd2 e íons metálicos fornecem um meio rápido e eficaz para controlar o transporte de metal em resposta às mudanças ambientais (LIU; CULOTTA, 1999).

Figura 3. Ilustração esquemática da localização dos transportadores Smf1, Smf2 e Smf3 de *Saccharomyces cerevisiae*.



À esquerda, representação de situação de privação de manganês, a qual induz a expressão dos genes *SMF1* e *SMF2* responsáveis pela transcrição de suas respectivas proteínas, Smf1 e Smf2. Smf1 localiza-se na membrana celular, importando manganês em direção ao citosol. Smf2 localiza-se em vesículas celulares e também possui a função de transportar manganês. Smf3 localiza-se na membrana vacuolar transportando ferro e a expressão de seu respectivo gene, *SMF3*, é constitutiva. À direita da imagem, representação da restituição do equilíbrio de manganês, a qual sinaliza para o direcionamento dos transportadores Smf1 e Smf2 para o vacúolo. Smf1 e Smf2 são direcionadas com auxílio da proteína Bsd2 degradadas no vacúolo por proteases. Imagem adaptada de (PORTNOY, M. E., LIU, X. F., CULOTTA, V. C., 2000).

1.6. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ENZIMAS DE DETOXIFICAÇÃO

Um desequilíbrio entre a geração de ROS e a desintoxicação dos intermediários reativos é definido como estresse oxidativo. Em condições aeróbias, ROS são geradas como subprodutos do metabolismo do oxigênio durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Além de seus efeitos deletérios, ROS funcionam como reguladoras de sinalização. ROS podem modular as funções mitocondriais por meio da regulação de enzimas da cadeia de transferência de elétrons e do potencial de membrana mitocondrial. ROS são essenciais em diversos processos celulares, como no crescimento celular, na apoptose, na adesão celular e em respostas imunes. Algumas ROS também atuam como segundas mensageiras na sinalização redox (CANDAS; LI, 2014).

A presença de diferentes isoformas específicas de SODs em compartimentos subcelulares distintos aponta a necessidade de um controle rígido da homeostase de ROS e

sugere um papel para ROS na sinalização entre compartimentos. Mudanças na atividade de SODs em um compartimento específico podem levar à produção de um gradiente de concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando a um fluxo de H_2O_2 e, subsequentemente, à ativação de determinadas vias sensíveis ao sistema redox (WANG et al., 2018).

Baixos níveis de ROS podem funcionar como mensageiros de sinalização redox ativos, enquanto altos níveis de ROS induzem danos celulares. A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) é um derivado sintético da vitamina K que permite um ciclo redox rápido nas células e, assim, gera ROS (J; R, 2019). A geração de ROS por meio do ciclo redox, trazendo altas concentrações, desencadeia a morte celular. Sugere-se que a menadiona desencadeia a liberação de citocromo c da mitocôndria e ativa poros de transição da permeabilidade mitocondrial, que é o mediador da morte celular (LOOR et al., 2010).

O dicloreto de paraquat (metil viologen, MV ou PQ) é um herbicida eficaz e amplamente usado que tem um histórico de segurança comprovado quando aplicado de forma adequada para eliminar ervas daninhas (RJ et al., 2008). ROS são intermediários de sinalização chave no metabolismo, defesa e adaptação ao estresse das plantas. Nas plantas, tanto o cloroplasto quanto as mitocôndrias são centros de controle metabólico e produção de ROS, que coordenam as respostas ao estresse em outros compartimentos celulares. MV induz a geração de ROS no cloroplasto sob iluminação, mas também é tóxico em organismos não fotossintéticos. A SOD2 é necessária para a tolerância a ROS e as mitocôndrias estão envolvidas na resposta a ROS induzida por MV em plantas (F et al., 2019). Estudos anteriores de nosso grupo (GARCIA et al., 2020a) demonstraram que a adição de manganês é capaz de diminuir os níveis do SOD1 ao passo que atenua o efeito tóxico do MV em mutantes nulos *zip3* de *C. gattii*. Portanto, homeostase de Mn fornece equilíbrio na defesa contra ROS, tendo um papel na defesa oxidativa, por ser um metal redox ativo com rápida capacidade de extinção de radicais peroxila.

1.6.1. SUPERÓXIDO DISMUTASES

SODs são metaloenzimas que desintoxicam os radicais de oxigênio por meio da conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (I, 1995). Essas metaloenzimas estão presentes em praticamente todas as células eucarióticas e seu alto grau de conservação aponta para sua importância na homeostase celular. O principal papel das SODs é proteger as células do ânion superóxido gerado endogenamente, que é um subproduto da respiração aeróbia. SODs podem ser complexadas com ferro, manganês e cobre mais zinco. SODs de ferro

e manganês são geneticamente semelhantes entre si, enquanto CuZnSOD não exibe homologia significativa com as outras duas enzimas. As células eucarióticas geralmente contêm MnSOD na matriz mitocondrial e CuZnSOD que está localizado predominantemente no citoplasma e em menor extensão nos peroxissomos (COX et al., 2003).

A cobre zinco superóxido dismutase (CuZnSOD ou SOD1) é uma metaloenzima abundante e altamente conservada que catalisa a conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. SOD1 tem ação sobre a proteção contra o estresse oxidativo e na sinalização redox. SOD1 elimina radicais superóxido citotóxicos e produz peróxido de hidrogênio que pode ser usado para oxidar e regular a atividade de alvos a jusante. Apenas parte do total de SOD1 é necessária para proteção contra a toxicidade do superóxido, sendo que esta porção está localizada no espaço intermembranar mitocondrial. Grandes quantidades de SOD1 extra-mitocondrial são necessárias para a sinalização redox mediada por peróxido (MONTLLOR-ALBALATE et al., 2019). Na levedura modelo *S. cerevisiae* mutantes nulos para o gene *SOD1* possuem defeito de crescimento severo, auxotrofia para aminoácidos contendo enxofre, uma maior taxa de mutação espontânea sob condições aeróbias e rápida perda de viabilidade sob privação de nutrientes (NARASIPURA et al., 2003).

Para que o manganês alcance SOD2 na matriz mitocondrial, o metal deve cruzar as membranas externa e interna da mitocôndria. Os poros da membrana externa podem permitir a translocação de pequenos complexos de manganês, como o manganês-fosfato ou manganês-glutamina. A passagem pela membrana mitocondrial interna exige um transportador de membrana. Em *S. cerevisiae*, SOD2 da matriz mitocondrial e enzimas de transferase de açúcar que requerem manganês (STase) localizadas no Golgi são dois marcadores enzimáticos para manganês. Smf1p não é a única fonte de captação de manganês celular e outros transportadores de superfície celular de manganês são ativos em condições fisiológicas. Dessa forma, incluem-se transportadores de alta afinidade para outros metais, como ferro, cobre ou zinco, que também transportam manganês, mas com baixa afinidade. Alternativamente, manganês é internalizado por meio de transportadores de fosfato, sendo que um ou mais sistemas de absorção de fosfato na levedura contribuem para o acúmulo de manganês intracelular. (CULOTTA; YANG; HALL, 2005).

SOD2 é surpreendentemente não seletiva na ligação de metal, sendo que apenas o complexo de manganês é cataliticamente ativo. Tanto a SOD2 de levedura quanto de procariontes, como *Escherichia coli*, podem se ligar a Fe ou Mn *in vivo*, com o metal que está ligado sendo determinado pela disponibilidade (WHITTAKER; WHITTAKER, 2012). SOD2 é essencial para o crescimento em alta temperatura, como à 37°C, demonstrando uma

importante ligação entre a regulação de ROS produzidos endogenamente e a adaptação às condições ambientais do hospedeiro (GILES et al., 2006). SOD1 de *C. neoformans*, SOD2, citocromo *c* peroxidase (Ccp1) e oxidase alternativa (Aox1) contribuem para a resistência contra o estresse oxidativo. Aox1 e SOD1 contribuem para a patogênese de *C. neoformans*. Cepas *aox1* e *sod1* nulas possuem virulência diminuída em modelo murino de infecção por inalação de *C. neoformans* (GILES et al., 2006).

1.6.2. CATALASES

C. neoformans sobrevive a agentes estressores, incluindo estresse oxidativo e nitrosativo, e privação de nutrientes, na condição de interação com o hospedeiro. As enzimas catalases não têm o papel notável na resistência ao estresse oxidativo externo, mas peroxidases específicas são críticas para a resistência aos estresses oxidativo e nitrosativo (BROWN; CAMPBELL; LODGE, 2007). *CAT1* e *CAT3* codificam catalases putativas específicas de esporos, e *CAT2* codifica uma catalase peroxissomal putativa. *CAT4* codifica uma catalase citosólica putativa. Apenas Cat1 possui atividade bioquímica detectável *in vitro*, sendo que a atividade de Cat1 é constitutiva na forma de levedura. Apesar de serem importantes em esporos, Cat1 e Cat3 não são essenciais para o acasalamento ou a viabilidade dos esporos.

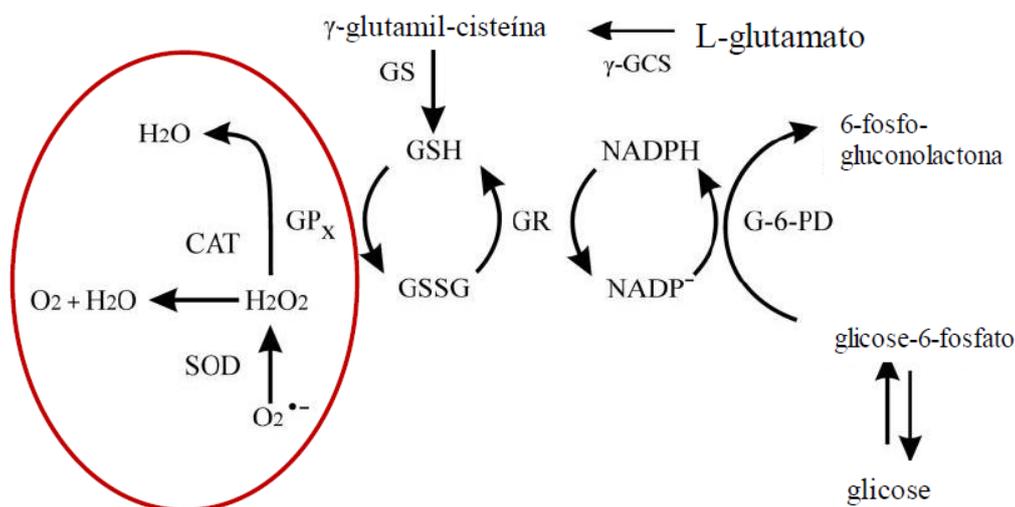
1.6.3. GLUTATIONA PEROXIDASES (GPX)

As glutionas peroxidases catalisam a redução dos peróxidos pela redução da glutationa. O sistema de glutationa, que em última análise depende dos reservatórios de glutationa reduzida (GSH) mantidos pela glutaredoxina, é fundamental para a resistência ao estresse oxidativo e nitrosativo. GPX remove o peróxido de hidrogênio e mutantes *gpx* nulos são sensíveis a peróxidos. A glutationa redutase é outra proteína no sistema da glutationa que impacta a resistência ao estresse nitrosativo, mas não o estresse oxidativo (BROWN; CAMPBELL; LODGE, 2007). Em *S. cerevisiae*, *Gpx1* está localizado na matriz peroxissomal, e utiliza tioredoxina ou glutationa para realizar a oxirredução (OHDATE; INOUE, 2012).

Em *S. cerevisiae*, a expressão de *GPX2* é induzida por estresse oxidativo (OHDATE et al., 2010). *GPX1* e *GPX2* são induzidas durante o estresse de t-butilhidroperóxido ou de hidroperóxido de cumeno e reprimidas durante o estresse de óxido nítrico. *GPX2* é induzida em resposta ao estresse de peróxido de hidrogênio. Mutantes de deleção de *GPX1* e *GPX2* são sensíveis a vários estresses de peróxido, enquanto o tipo selvagem é resistente a outros estresses oxidantes, como superóxido e óxido nítrico. Mutantes nulos *gpx* são ligeiramente sensíveis à morte por estresse oxidativo causado pela fagocitose por macrófagos. GPX podem catalisar a

redução de algumas espécies reativas de nitrogênio. Durante o estresse de óxido nítrico há regulação negativa de ambos os genes *GPX1* e *GPX2*. Tal fato sugere um mecanismo diferente independente das glutatona peroxidases para resistência ao estresse nitrosativo em *C. neoformans*. *Gpx1* e *Gpx2* possuem sensibilidade distinta entre si a diferentes estressantes compostos de peróxido. Isso sugere uma diferença na localização das duas enzimas *Gpx*, uma diferença em sua atividade ou uma regulação alternativa nos mutantes de deleção para *GPX1* e *GPX2* (MISSALL; CHERRY-HARRIS; LODGE, 2005).

Figura 4. Esquema da atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase.



Destacado pelo círculo em vermelho a atividade da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). H_2O_2 é decomposto pela catalase em água (H_2O) e O_2 . A glutatona peroxidase (GPX) reduz o H_2O_2 pela redução da glutatona (GSH). A GPX requer a atividade de outras enzimas secundárias, como a glutatona redutase (GR). Caso haja inibição ou redução da atividade destas outras enzimas, como representado à direita do esquema, a remoção do H_2O_2 pelo sistema GPX não será eficiente. Imagem adaptada de (WEYDERT; CULLEN; 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que os mutantes nulos para o gene *SMF1* de *C. gattii* apresentam decréscimo em seu desenvolvimento quando exposto ao (i) agente quelante de metais EDTA e (ii) ao agente gerador de espécies reativas de oxigênio paraquat, é possível hipotetizar que o transportador *Smf1* participe na homeostase de ROS de *C. gattii*.

3. OBJETIVOS

Avaliar a participação do transportador Smf1 de *C. gattii* na modulação da homeostase de ROS.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de *SMF1* no crescimento de *C. gattii* em condições de privação de metais;
- Avaliar a influência de *SMF1* no crescimento de *C. gattii* em condições de geração de ROS;
- Avaliar os níveis de transcrito dos genes *SMF1*, *SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *GPX2*, *CAT1* e *CAT2* nas linhagens WT e *smf1* cultivadas em privação ou não de metais;

4. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Caracterização funcional do gene *SMF1* de *Cryptococcus gattii*” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *Fungal Biology* (Anexo A).

O transportador *Smf1* está associado ao adequado metabolismo redox em *Cryptococcus gattii*

Carolina Anton^a, Uriel Perin Kinskovksi^a, Camila Diehl^a, Charley Christian Staats^{ab}

^aCentro de Biotecnologia e ^bDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

* Correspondência: Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 219. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Telefone +55 51 3308 6080; Fax +55 51 3308 7309. E-mail: staats@ufrgs.br

Destaques

- A ausência de *SMF1* acarreta em deficiência de desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de micronutrientes
- A presença de *SMF1* é importante para o desenvolvimento de *C. gattii* em estresse oxidativo
- A adequada expressão de *SODs* depende da presença de *SMF1*

RESUMO

A criptococose é uma doença causada principalmente pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Ambas as espécies infectam o hospedeiro, humano ou animal, por via respiratória, estabelecendo-se nos pulmões e podendo se disseminar para o cérebro causando meningoencefalite. A principal linha de defesa do sistema imune contra a infecção por *Cryptococcus spp.* é a fagocitose por macrófagos alveolares, os quais privam os patógenos de nutrientes, incluindo metais. Ao passo que a levedura encontra um ambiente restrito de metais, tal como manganês, é promovido o aumento da expressão de genes responsáveis por codificar proteínas transportadoras de metais. Smf1p é uma proteína presente na superfície das células e que transporta manganês para o lúmen celular. Células fúngicas mutantes nulas para o gene *SMF1* apresentam dificuldade de manutenção da homeostase de manganês e maior suscetibilidade ao estresse oxidativo. Para proteger a célula do dano oxidativo, enzimas como as superóxidos dismutase complexadas com cobre-zinco e manganês, SOD1 e SOD2, respectivamente, são expressas em situações de estresse oxidativo. Visto que os mutantes nulos para o gene *SMF1* de *C. gattii* apresentam decréscimo em seu desenvolvimento quando exposto ao agente quelante de metais EGTA e ao agente gerador de espécies reativas de oxigênio menadiona, avaliamos o papel do transportador Smf1 na participação da homeostase de ROS em *C. gattii*. Para isso, realizamos a construção de um mutante complementado *smf1::SMF1* a confirmar a associação dos fenótipos observados na linhagem nula *smf1*. Posteriormente, avaliamos a expressão relativa dos genes associados à homeostase de manganês, ou seja, *SMF1*, e à homeostase de ROS, ou seja, *SOD1*, *SOD2*, *CAT1*, *CAT2*, *GPX1* e *GPX2*. Observamos significativo aumento da expressão de *SMF1* nas linhagens tratadas com EDTA. *SOD1* teve níveis significativos de expressão na linhagem WT quando comparados ao cultivo na presença de EDTA. Na linhagem *smf1*, não foi possível detectar a expressão deste gene. Em contrapartida, *SOD2* apresentou significativo aumento da expressão no tratamento com EDTA nas linhagens WT e *smf1*, sendo que a expressão em WT foi maior do que em *smf1*. Esses dados em conjunto sugerem que SOD2 possui papel importante na manutenção da homeostase de ROS e que sua menor expressão no tratamento com EDTA pode estar atrelada à baixa disponibilidade de manganês, visto que esta SOD é complexada a este metal. Além disso, *GPX1*, *CAT1* e *CAT2* não demonstraram serem afetadas pela condição de privação de metais e *GPX2* apresentou-se mais expresso somente na linhagem *smf1*, o que sugere que sua atividade é importante na privação de manganês.

Keywords: Manganês, Smf1, transportadores, Cryptococcus

1. Introdução

Cryptococcus gattii é um fungo basidiomiceto que atua como patógeno oportunista em pacientes imunossuprimidos e pode causar doença em imunocompetentes (Zaragoza, 2019). Estima-se que cerca de 10% das pessoas com HIV-AIDS sejam afetados pela criptococose causada por *C. neoformans*. Na África Subsaariana, em média, são causadas 180.000 mortes por infecção por *Cryptococcus spp.* (Rajasingham et al., 2017a). A infecção se dá via inalação de esporos ou células dessecadas provenientes do ambiente e se estabelece no pulmão. Após infecção pulmonar, pode ocorrer disseminação, ocasionado meningoencefalite. Este quadro é associado a uma alta taxa de mortalidade que pode variar de 20% a 50% dos casos (Rajasingham et al., 2017b; Vallabhaneni et al., 2016).

Espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*, como *C. neoformans* e *C. gattii*, podem resistir dentro de macrófagos alveolares mesmo após fagocitose (Evans et al., 2017; Johnston and May, 2013; Mansour et al., 2014). Dentre os diversos mecanismos pelos quais os macrófagos alveolares podem impedir o desenvolvimento de patógenos, pode ser citado um mecanismo de imunidade nutricional, que priva *Cryptococcus spp.* de metais a fim de inibir sua sobrevivência e proliferação (Crawford and Wilson, 2015; Kehl-Fie and Skaar, 2010; Malavia et al., 2017). Nessas condições, as células criptocócicas ativam a transcrição dos transportadores de metais para manter a homeostase (Silva et al., 2011a).

SMF1 é um dos homólogos da família Nramp de transportadores de metais expressos por *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus spp.* (Silva et al., 2011b). Nramp (proteína de macrófago associada à resistência natural) facilita o transporte de íons de metais (Cellier et al., 1995, 2007). Smf1 se acumula na superfície da membrana celular e funciona no acúmulo celular de Mn, sendo co-regulada pela disponibilidade de manganês. Em condições repletas de Mn, a proteína Bsd2 facilita o tráfego de Smf1 para o vacúolo, onde Smf1 é degradada (Portnoy et al., 2000a). A escassez de Mn é detectada dentro do lúmen da via secretora, enquanto níveis tóxicos de Mn são detectados dentro de um compartimento fora do aparelho de Golgi ou extracitosólico (Jensen et al., 2009). A deleção do gene *SMF1* codificador da proteína Smf1, que possui alta afinidade ao Mn, transportando-o em direção ao citosol, sensibiliza as leveduras à escassez de Mn, justamente por desequilibrar sua homeostase (Supek et al., 1996).

A adaptação à disponibilidade de nutrientes como Mn pode causar alterações na homeostase redox, tanto por mudanças em ROS quanto no conteúdo de moléculas redutoras celulares. As superóxidos dismutase (SOD), são as principais enzimas antioxidantes nas

células eucarióticas. Em *S. cerevisiae*, SOD1, uma superóxido dismutase de cobre-zinco, está localizada no citosol e no espaço intermembranar da mitocôndria, e a SOD2, uma superóxido dismutase de manganês, está localizado na matriz mitocondrial. A fonte de ROS depende do tipo de metabolismo e fontes não mitocondriais são importantes provedores de ROS (Maslanka et al., 2020a). Glutathione peroxidases (GPX) são enzimas com atividade antioxidante que removem peróxidos como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Dessa forma, cepas mutantes nulas *gpx* apresentam sensibilidade a peróxidos. Catalases (CAT) não desempenham papel importante na detoxificação de moléculas reativas exógenas, pois mutantes nulos *cat* não apresentam aumento de vulnerabilidade a ROS ou impactam na virulência (Brown et al., 2007).

Com o intuito de avaliar a participação de Smf1 na obtenção de micronutrientes em *C. gattii*, geramos em nosso grupo mutantes nulos para o gene codificante desta proteína. Foi observada redução de crescimento das linhagens mutantes em meio definido com privação de metais, ocasionadas pelo agente quelante EDTA, assim como aumento da sensibilidade do mutante nulo ao estresse oxidativo (Uriel Kinskovski, dados não publicados). Neste trabalho, descrevemos que a complementação do mutante nulo com o gene selvagem acarreta na reconstituição dos fenótipos da linhagem selvagem. Ainda, detectamos a alteração da expressão na linhagem mutante de alguns genes cujos produtos estão relacionados à modulação do estresse oxidativo, como *SOD1*, *SOD2*, *CAT1*, *CAT2*, *GPX1* e *GPX2*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Linhagens e meios de cultivos

Os experimentos foram realizados com a linhagem R265 de *C. gattii*, assim como o mutante nulo *smf1*. As células eram rotineiramente cultivadas em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%) ou YNB sem aminoácidos suplementado com 40 mM de asparagina e 2% de glicose (Difco) à temperatura de 30 °C sob agitação (200 RPM). Ágar (1,5%) era adicionado em condições de meio semissólido.

2.2. Seleção do mutante complementado

A seleção do mutante complementado da *smf1::SMF1* foi realizada com base em experimentos prévios de transformação da linhagem mutante *smf1* com um cassete de complementação contendo o gene selvagem *SMF1*, associado a uma marca de resistência, a neomicina. Cerca de 100 distintos transformantes foram avaliados quanto a sua capacidade de desenvolvimento na privação de nutrientes por cultura em meio YNB ou meio YNB contendo

EGTA (100 μ M) em placas de 96 poços. Após incubação por 24 h à temperatura de 30 °C, foi determinada a densidade ótica (600 nm) de cada um dos cultivos. Adicionalmente, foi determinada a sensibilidade das linhagens pré-selecionadas em concentrações distintas do quelante EGTA e do agente gerador de espécies reativas de oxigênio menadiona.

2.3. Análise RT-qPCR

Foi realizado um cultivo prévio das linhagens WT e *smf1* em meio YPD, seguido de cultivo em meio YNB acrescido ou não de 100 μ M de EDTA por um período de 1 h. Após centrifugação e liofilização das células, as mesmas foram lisadas por agitação com pérolas de vidro, e o RNA foi isolado com TRIzol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Foram avaliadas a integridade e a concentração do RNA por eletroforese em gel de agarose a 1% e pela quantificação no NanoDrop, respectivamente. Posteriormente, foram preparados os DNAs complementares (cDNAs), usando amostras de RNA total tratadas com DNase (Promega) (500 ng), com Transcriptase Reversa ImProm-II (Promega) usando primers oligo-dT. O PCR quantitativo foi realizado no equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o sistema PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo) com 2 μ L de cDNA a 8 ng/ μ L e 5 pmol de cada primer, previamente utilizados por nosso grupo (Schneider et al., 2012). A etapa inicial das condições de ciclagem térmica foi definida como 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e 72 °C por 60 s. No final da reação foi realizada a análise da curva de fusão para que pudesse ser confirmada a presença de um único produto de PCR. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica, com três culturas independentes. Para cada par de primers, cada amostra de cDNA foi analisada em triplicata. Em cada conjunto de experimentos de RT-qPCR o gene codificador da actina (*ACT1*) utilizado como normalizador. Para determinar a expressão relativa dos genes cujos produtos estão associados à modulação das espécies reativas de oxigênio (*SMF1*, *SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *GPX2*, *CAT1* e *CAT2*) foi utilizado o método do ciclo de limiar comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Schmittgen and Livak, 2008).

3. Resultados

Com o intuito de avaliar se os fenótipos observados na linhagem mutante nula para o gene *SMF1* (hipersensibilidade a EGTA e a menadiona), eram de fato decorrentes da inativação deste gene, realizamos a construção de uma linhagem nula complementada. Para tanto, a linhagem *smf1* foi transformada com um plasmídeo que continha a cópia selvagem do gene

SMF1 associado a uma marca de resistência a neomicina. Cerca de 100 colônias foram isoladas previamente em nosso laboratório (Uriel Perin Kinskovski, dados não publicados). Para selecionar os mutantes complementados que melhor apresentassem a restituição fenotípica, avaliamos o crescimento das linhagens em concentrações crescentes de EGTA ou menadiona (Fig. 1), cujas análises estatísticas do crescimento (Tabela 1) permitiram selecionar o mutante complementado *C9* (*smf1::SMF1*) para prosseguimento dos testes.

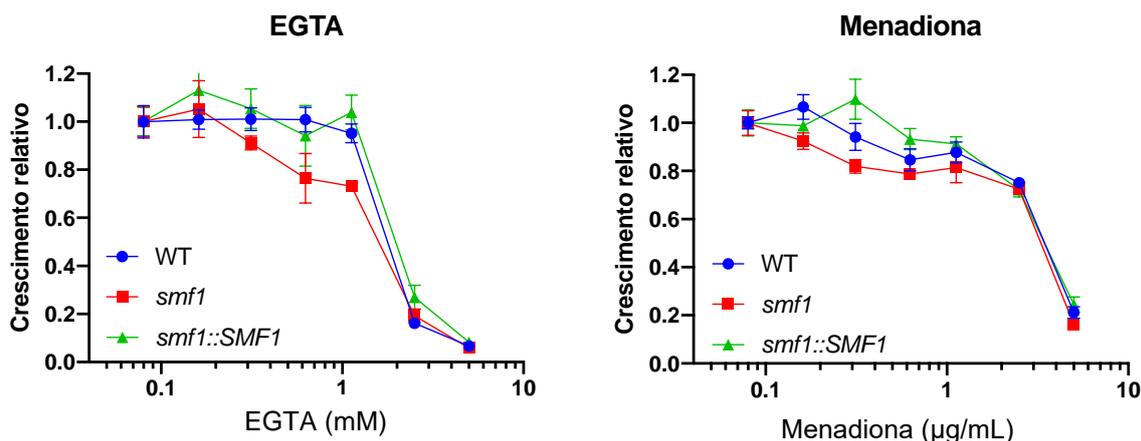


Figura 1. *Smf1* participa do desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de metais e de estresse oxidativo. Medida do crescimento relativo das linhagens WT, *smf1* e *smf1::SMF1* após 24 h em meio YNB (controle) ou YNB suplementado com concentrações crescentes de EGTA ou menadiona por determinação de OD₆₀₀.

Tabela 1: Análise do desenvolvimento de *C. gattii* em condições de privação de metais e de estresse oxidativo utilizando a área sob a curva como parâmetro comparativo

Cultivo em EGTA			
Linhagem	WT	<i>smf1</i>	<i>smf1::SMF1</i>
Área total	2,09	1,81	2,39
Desvio padrão	0,04	0,05	0,09
Intervalo de confiança (95%)	2,00 - 2,17	1,71 - 1,92	2,20 - 2,59
Cultivo em MENADIONA			
Linhagem	WT	<i>smf1</i>	<i>smf1::SMF1</i>
Área total	3,27	3,02	3,35
Desvio padrão	0,05	0,05	0,06
Intervalo de confiança (95%)	3,16 - 3,37	2,91 - 3,13	3,21 - 3,48

Com o intuito de confirmar o genótipo das linhagens, realizamos RT-PCR para determinar a expressão do gene *SMF1* nas linhagens geradas e confirmar a complementação. Como esperado, pudemos detectar a expressão do gene *SMF1* apenas nas linhagens WT e *smf1::SMF1* (Fig. 2), confirmando assim a inativação do gene na linhagem *smf1* e a sua complementação na linhagem *smf1::SMF1*.

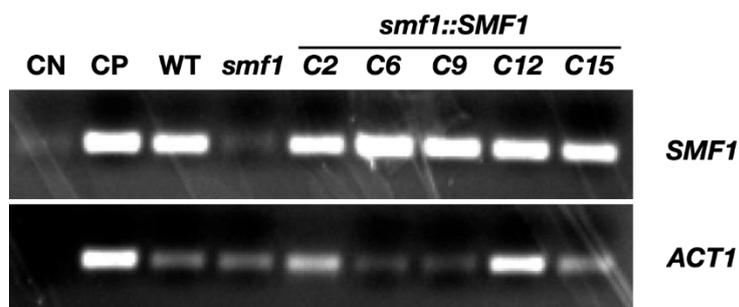


Figura 2: Confirmação da expressão de *SMF1* nas linhagens WT e *smf1::SMF1*. RT-PCR semi-quantitativo usando cDNA de WT, mutante *smf1* e *smf1::SMF1*. As amostras de RNA foram utilizadas como molde para reações de transcrição reversa e PCR para amplificação de *SMF1* (painel superior) ou *ACT1* (painel inferior), como controle de carga. CN, controle negativo; CP, controle positivo, empregando DNA genômico; WT, cDNA da linhagem R265 de *C. gattii*; *smf1*, cDNA da linhagem *smf1* de *C. gattii*; C2, C6, C9, C12 e C15, cDNA de potenciais linhagens *smf1::SMF1* de *C. gattii*.

Visto que a linhagem *smf1* apresenta maior sensibilidade ao agente gerados de espécies reativas de oxigênio menadiona, analisamos a expressão relativa de genes codificantes de proteínas associadas ao metabolismo redox (*SOD1*, *SOD2*, *CAT1*, *CAT2*, *GPX1* e *GPX2*). Para tanto, as linhagens WT e *smf1* foram incubadas em meio YNB acrescido ou não de EDTA (100 μ M) por 1 h. A presença de EDTA foi incluída visto que estudos prévios de nosso grupo mostravam que a privação de metais ocasiona desbalanço no metabolismo redox em *C. gattii* (Garcia et al., 2020; Schneider et al., 2012, 2015). Primeiramente, avaliamos se a presença de EDTA ocasionava aumento da expressão de *SMF1*. Empregando RT-qPCR, demonstramos que expressão relativa de *SMF1* foi significativamente maior no tratamento com EDTA em relação ao controle (Fig. 3).

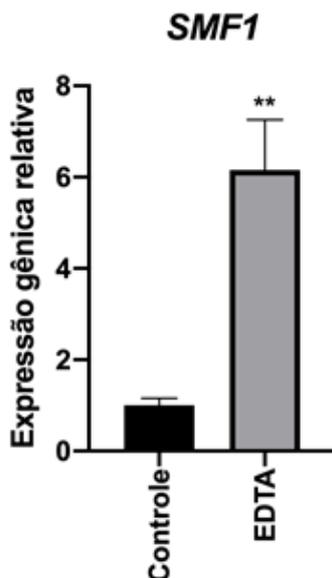


Figura 3: Expressão gênica relativa do gene *SMF1* pela linhagem selvagem (WT). Análise RT-qPCR do gene *SMF1*. A quantidade de mRNA em cada amostra foi normalizada usando os valores de Ct obtidos para o gene *ACT1*. Os dados são apresentados como a média e o desvio padrão (DP) de três réplicas biológicas. A análise estatística foi realizada com um teste *t Student* não pareado. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (** $p = 0,0013$).

Com base neste achado, especulamos que a expressão de genes associados ao metabolismo redox também poderia ter sua expressão regulada pela diminuição da biodisponibilidade de metais. A análise da expressão dos genes relacionados demonstrou que a presença de EDTA ocasionou uma diminuição considerável dos níveis de transcrito de *SOD1* na linhagem WT quando comparado com a condição controle. Este mesmo comportamento não foi observado na linhagem *smf1*. Entretanto, quando comparadas as duas linhagens, foi possível observar diminuição considerável da expressão de *SOD1* em *smf1* em relação a WT (Fig 4, A). Quando considerado *SOD2*, a presença de EDTA leva a um aumento consistente da expressão deste gene, também apenas na linhagem WT. Este aumento significativo não foi observado na linhagem *smf1* (Fig. 4, B). *GPX1* não teve diferença significativa na sua expressão relativa em todos os grupos (Fig. 2, C). O grupo controle de *smf1* de *GPX2* teve sua expressão relativa significativamente maior do que o controle WT (Fig. 4, D). Não houve diferença estatística na expressão sob tratamento com EDTA em ambos os grupos (Fig. 4, D). *CAT1* e *CAT2* não tiveram diferença significativa na sua expressão relativa em todos os grupos (Fig. 4, E e F). Coletivamente, estes dados sugerem que o desbalanço na regulação da expressão destes genes pode contribuir para a maior sensibilidade da linhagem *smf1* ao estresse oxidativo.

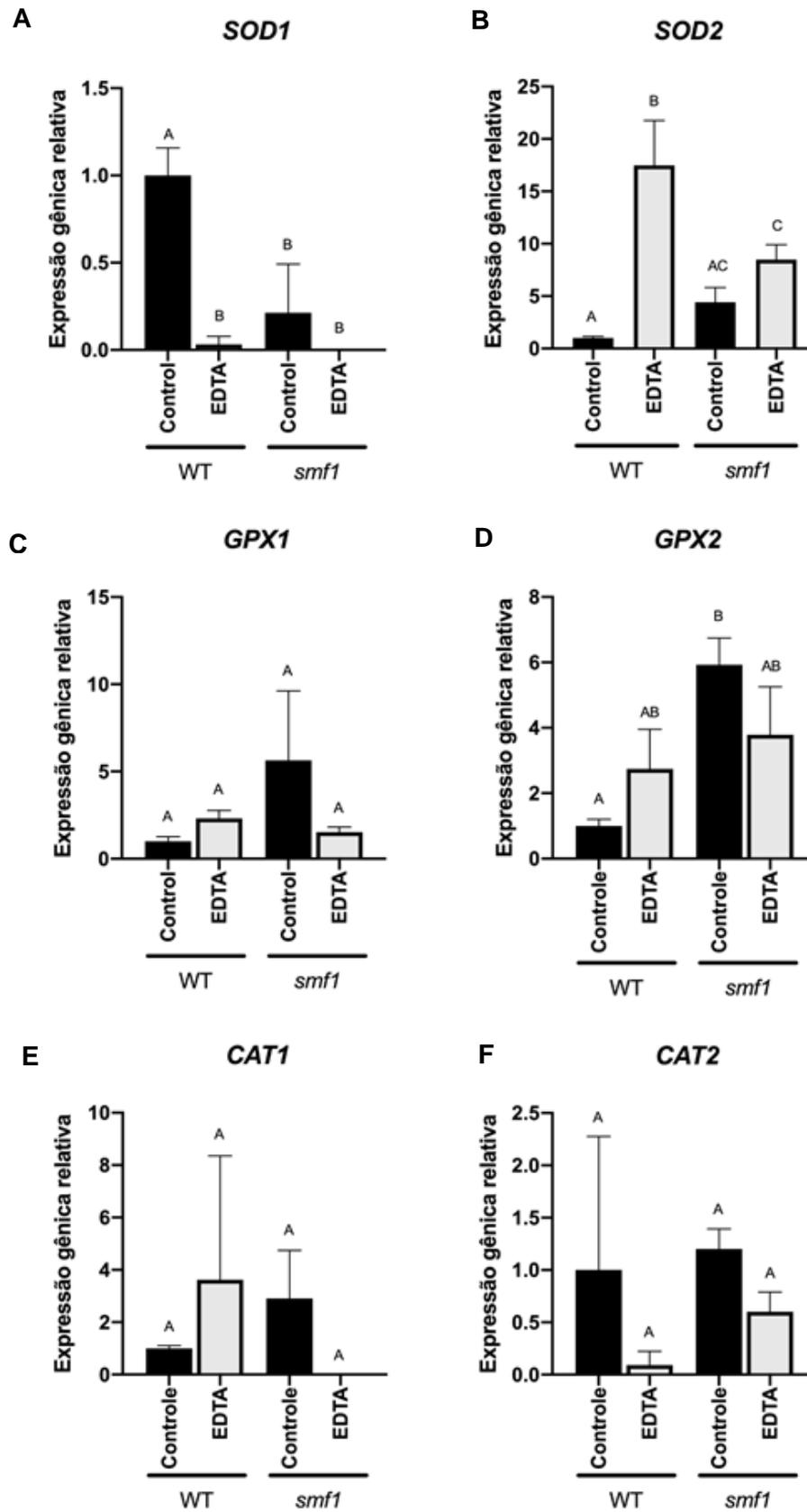


Figura 4: Expressão gênica relativa dos genes *SOD1*, *SOD2*, *GPX1*, *GPX2*, *CAT1* e *CAT2* pelas linhagens selvagem (WT) e mutante nula (*smf1*). Análise RT-qPCR dos genes *SOD1*,

SOD2, *GPX1*, *GPX2*, *CAT1* e *CAT2*. A quantidade medida de mRNA em cada amostra foi normalizada usando os valores de Ct obtidos para o gene *ACT1*. Os dados são apresentados como a média e o DP de três réplicas biológicas. Foi realizado um teste ANOVA de uma via pós-teste de Dunnett. Barras representam a média e traços os desvios-padrão. Letras diferentes acima das barras representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

4. Discussão

SMF1 codifica a proteína Smf1, a qual está localizada na membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A deleção de *SMF1* torna as células sensíveis à baixa concentração de manganês em decorrência de sua baixa captação, sugerindo que Smf1p está envolvido na captação de Mn de alta afinidade (Supek et al., 1996). Smf1p de *S. cerevisiae* é ortólogo de Smf1 de *C. gattii* (Uriel Kinskovski, dados não publicados). O ortólogo de Smf1p em *C. neoformans* é capaz de transportar principalmente manganês, ferro, cobalto e níquel (Agranoff et al., 2005). Demonstramos aqui que, assim como em *S. cerevisiae*, a expressão de *SMF1* de *C. gattii* é aumentada em condições de privação de metais, corroborando também a diminuída capacidade de replicação de linhagens mutantes nulas para este gene nestas condições (Portnoy et al., 2000b). Isso demonstra o papel do transportador de Mn Smf1, no qual, quando há redução da disponibilidade de Mn, aumenta-se a expressão do gene *SMF1* responsável por codificar a proteína Smf1. Assim, com maior quantidade de proteína Smf1 disponível, maior a chance de restabelecer a homeostase de Mn na célula criptocócica.

Smf1 parece ser importante na resistência ao estresse oxidativo, fornecendo manganês para complexos antioxidantes não proteicos, visto que a adição de sais de manganês a células sem uma defesa antioxidante funcional reverte todos os fenótipos observados, e esse resgate é dependente de Smf1, mas não do parálogo Smf2 (Luk and Culotta, 2001). Em *C. neoformans*, a linhagem nula *sod1* possui diminuída sobrevivência no interior de macrófagos comparada à linhagem WT, ressaltando o seu papel na virulência (Cox et al., 2003). *C. neoformans* mutantes nulos para o gene *SOD2* exibem suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo e baixo crescimento em altas temperaturas, assim como hipovirulência em modelo murinho de infecção (Giles et al., 2005). Adicionalmente, mutantes *sod2* acumulam significativamente mais espécies reativas de oxigênio (ROS) à 37 °C, sugerindo Sod2p como defesa primária o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) nas mitocôndrias (Narasipura et al., 2005). Os níveis de ROS em mutantes nulos Δ *sod1* são significativamente maiores em comparação com a cepa WT. O nível de ROS no mutante Δ *sod2* foi menor do que no mutante Δ *sod1*, o que indica para o papel essencial da

SOD1 na redução do nível de ROS (Maslanka et al., 2020b). Dados anteriores de nosso grupo mostraram que a privação de zinco (Schneider et al., 2012, 2015) ou o desbalanço na homeostase de manganês pela inativação do gene codificante do transportador associado ao Golgi Zip3 (Garcia et al., 2020) alteram metabolismo redox, potencialmente em decorrência de alterações na expressão de *SOD1* e *SOD2*. A ausência de *smf1* na cepa mutante para *SOD1* leva ao baixo crescimento em relação ao tipo selvagem e à cepa reconstituída dentro de macrófagos. Isso indica que SOD1 contribui para a virulência, visto que *sod1* teve diminuição da virulência possivelmente devido ao aumento da suscetibilidade a ROS. Além disso, outros sistemas de defesa antioxidante em *C. neoformans* podem compensar a perda de SOD1 *in vivo*. Na Fig.4 A, pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos *smf1* controle, *smf1* e WT tratado em relação à cepa WT controle. WT controle teve alta expressão de transcrito de *SOD1*. Na cepa *smf1* tratada com EDTA, os níveis de transcrito de *SOD1* foram baixos a níveis não detectáveis. Isso pode indicar que a restrição de manganês na levedura, tanto pelo agente quelante EDTA, quanto pela ausência de Smf1, impactam na diminuição da expressão de *SOD1*, visto que em uma situação sem estresse, como no WT controle, há significativo aumento da expressão de *SOD1*. A expressão relativa do gene *SOD2*, que é a superóxido dismutase complexada ao Mn, demonstrado na Fig. 4 B, possui perfil distinto de expressão em relação à *SOD1*. As cepas WT e *smf1* com tratamento com EDTA demonstraram aumento significativo de sua expressão em relação ao controle WT, o que sugere que o desbalanço de Mg, ocasionado pelo EDTA no WT, e pela ausência de Smf1 no mutante nulo conjuntamente com a ausência de metal proporcionam um estresse oxidativo suficiente para aumentar a expressão de *SOD2*.

(TA et al., 2005) demonstraram que *GPX1* e *GPX2* são expressos diferencialmente e que em uma situação estressora com peróxido e óxido nítrico foi observada a indução de ambos os genes da GPX. Durante o estresse de óxido nítrico, a expressão de *GPX1* e *GPX2* foi regulada negativamente para ambos os genes, sugerindo um mecanismo independente da GPX para resistência ao estresse em *C. neoformans*. Demonstramos anteriormente que a ausência de adequando importe de manganês a partir do Golgi acarreta em aumento da expressão dos genes que codificam GPX. Na Fig. 4 C, não há diferença estatística significativa na expressão gênica em nenhum dos grupos, o que sugere que a privação de Mn e a ausência de Smf1 não impactam de maneira suficiente a alterar a expressão de *GPX1*. Também foi possível observar, na Fig. 4 D, que houve aumento significativo da expressão de *GPX2* no controle *smf1*, em relação ao controle WT. Isso indica que, na ausência do transportador Smf1, mas ainda com Mn

disponível, há maior expressão de *GPX2*. Isso sugere que o desequilíbrio de ROS ocasionado pela ausência do transportador *Smf1* na cepa mutante é suficiente para aumentar a expressão de *GPX2* nessa condição, para que aumente a transcrição e tradução deste gene a fim de aumentar a quantidade de GPX2 disponível para restabelecer o balanço redox, evitando o acúmulo de ROS. Comparando os gráficos de *GPX1* e *GPX2*, pode-se observar a expressão diferencial de ambos os genes frente à situação estressora de privação de Mn, ausência do transportador *Smf1* e acúmulo de ROS.

(Giles et al., 2006) demonstraram que as enzimas CAT2, CAT3 e CAT4 não possuem atividade de catalase detectável *in vitro*, mas é possível detectar um transcrito para cada uma das catalases por RT-qPCR. Visto a presença de transcrito, CAT2, CAT3 ou CAT4 podem exibir atividades em condições de crescimento adequadas. Em cultivo sob estresse oxidativo e temperatura elevada (37 °C) não houve detecção de atividade das enzimas CAT2, CAT3 ou CAT4 para a cepa de *C. neoformans*. A atividade de CAT1 não demonstrou ser regulada em resposta ao estresse oxidativo exógeno ou temperatura elevada. Entretanto, na Fig. 4 E e F, nossos resultados apontam que não ocorre modulação da expressão da CAT1 e CAT2 frente à privação de nutrientes ou ausência do gene *SMF1*. Coletivamente, estes dados sugerem que o desbalanço na regulação da expressão destes genes associados ao metabolismo redox pode contribuir para a maior sensibilidade da linhagem *smf1* ao estresse oxidativo, tanto em condições de disponibilidade ou indisponibilidade de metais no meio extracelular.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por bolsas das agências de fomento brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (404141 / 2016–1 e 309897 / 2017–3) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). UPK foi e CD é bolsista CAPES.

6. Referências Bibliográficas

- Agranoff, D., Collins, L., Kehres, D., Harrison, T., Maguire, M., Krishna, S., 2005. The Nramp orthologue of *Cryptococcus neoformans* is a pH-dependent transporter of manganese, iron, cobalt and nickel. *The Biochemical journal* 385, 225–232.
<https://doi.org/10.1042/BJ20040836>

- Brown, S.M., Campbell, L.T., Lodge, J.K., 2007. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current opinion in microbiology* 10, 320. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2007.05.014>
- Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., Gros, P., 1995. Nrap defines a family of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10089–10093. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10089>
- Cellier, M.F., Courville, P., Campion, C., 2007. Nrap1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes and Infection* 9, 1662–1670. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.006>
- Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R., 2003. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infection and Immunity* 71, 173. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.173-180.2003>
- Crawford, A., Wilson, D., 2015. Essential metals at the host-pathogen interface: Nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Research* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov071>
- Evans, R.J., Voelz, K., Johnston, S.A., May, R.C., 2017. Using Flow Cytometry to Analyze *Cryptococcus* Infection of Macrophages, in: *Methods in Molecular Biology*. pp. 349–357. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6581-6_24
- Garcia, A.W.A., Kinskovski, U.P., Diehl, C., Reuwsaat, J.C.V., Motta de Souza, H., Pinto, H.B., Trentin, D. da S., de Oliveira, H.C., Rodrigues, M.L., Becker, E.M., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Staats, C.C., 2020. Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii*. *Fungal Genetics and Biology* 144, 103438. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103438>
- Giles, S.S., Batinić-Haberle, I., Perfect, J.R., Cox, G.M., 2005. *Cryptococcus neoformans* Mitochondrial Superoxide Dismutase: an Essential Link between Antioxidant Function and High-Temperature Growth. *Eukaryotic Cell* 4, 46. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.46-54.2005>
- Giles, S.S., Stajich, J.E., Nichols, C., Gerrald, Q.D., Alspaugh, J.A., Dietrich, F., Perfect, J.R., 2006. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. *Eukaryotic Cell* 5, 1447. <https://doi.org/10.1128/EC.00098-06>

- Jensen, L.T., Carroll, M.C., Hall, M.D., Harvey, C.J., Beese, S.E., Culotta, V.C., 2009. Down-Regulation of a Manganese Transporter in the Face of Metal Toxicity. *Molecular Biology of the Cell* 20, 2810. <https://doi.org/10.1091/MB.C.E08-10-1084>
- Johnston, S.A., May, R.C., 2013. Cryptococcus interactions with macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular Microbiology* 15, 403–411. <https://doi.org/10.1111/cmi.12067>
- Kehl-Fie, T.E., Skaar, E.P., 2010. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current opinion in chemical biology* 14, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>
- Luk, E.E.C., Culotta, V.C., 2001. Manganese Superoxide Dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* Acquires Its Metal Co-factor through a Pathway Involving the Nramp Metal Transporter, Smf2p. *Journal of Biological Chemistry* 276, 47556–47562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108923200>
- Malavia, D., Crawford, A., Wilson, D., 2017. Nutritional Immunity and Fungal Pathogenesis: The Struggle for Micronutrients at the Host–Pathogen Interface, in: *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 85–103. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.01.006>
- Mansour, M.K., Reedy, J.L., Tam, J.M., Vyas, J.M., 2014. Macrophage Cryptococcus interactions: an update. *Current fungal infection reports* 8, 109. <https://doi.org/10.1007/S12281-013-0165-7>
- Maslanka, R., Zadrag-Tecza, R., Kwolek-Mirek, M., 2020. Linkage between Carbon Metabolism, Redox Status and Cellular Physiology in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Devoid of SOD1 or SOD2 Gene. *Genes* 11, 1–19. <https://doi.org/10.3390/GENES11070780>
- Narasipura, S.D., Chaturvedi, V., Chaturvedi, S., 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Molecular microbiology* 55, 1782–1800. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04503.X>
- Portnoy, M.E., Liu, X.F., Culotta, V.C., 2000a. *Saccharomyces cerevisiae* Expresses Three Functionally Distinct Homologues of the Nramp Family of Metal Transporters. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7893–7902. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.21.7893-7902.2000>

- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., Denning, D.W., Loyse, A., Boulware, D.R., 2017a. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet. Infectious diseases* 17, 873. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schneider, R. de O., Fogaça, N. de S.S., Kmetzsch, L., Schrank, A., Vainstein, M.H., Staats, C.C., 2012. Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE* 7, e43773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043773>
- Schneider, R.D.O., Diehl, C., dos Santos, F.M., Piffer, A.C., Garcia, A.W.A., Kulmann, M.I.R., Schrank, A., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Staats, C.C., Melise, F., Piffer, A.C., Wichine, A., Garcia, A.W.A., Iuri, M., Kulmann, R., dos Santos, F.M., Piffer, A.C., Garcia, A.W.A., Kulmann, M.I.R., Schrank, A., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Staats, C.C., 2015. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Scientific Reports* 5, 10104. <https://doi.org/10.1038/srep10104>
- Silva, M.G., Schrank, A., Bailão, E.F.L.C., Bailão, A.M., Borges, C.L., Staats, C.C., Parente, J.A., Pereira, M., Salem-Izacc, S.M., Mendes-Giannini, M.J.S., Oliveira, R.M.Z., Silva, L.K.R. e., Nosanchuk, J.D., Vainstein, M.H., Soares, C.M. de A., 2011. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii*, and *Cryptococcus gattii*: A comparative analysis. *Frontiers in Microbiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00049>
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., Nelson, N., 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5105–5110. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.5105>
- TA, M., JF, C.-H., JK, L., 2005. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology (Reading, England)* 151, 2573–2581. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.28132-0>

Vallabhaneni, S., Mody, R.K., Walker, T., Chiller, T., 2016. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infectious Disease Clinics of North America* 30, 1–11.

<https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.004>

Zaragoza, O., 2019. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence* 10, 490.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O conjunto dos resultados obtidos por meio desse estudo indicam o papel o transportador *Smf1* como um importante elemento para manutenção da homeostase de manganês intracelular. Sob situações estressoras há maior expressão de *SMF1* para restabelecer a homeostase de manganês, indicando que este metal tem papel regulatório sobre a expressão desse gene. Além disso, demonstramos que linhagens mutantes nulas *smf1* apresentam dificuldade em manter a homeostase de ROS. Na ausência de *Smf1p*, *SOD2* teve diminuição de sua expressão em relação ao WT no tratamento com EDTA, o que aponta para sua dependência da disponibilidade de manganês, visto que *SOD2* é complexada a este metal. Além disso, demonstramos que a expressão de *CAT1*, *CAT2* e *GPX1* não é significativamente impactada pelo desbalanço redox e privação de metal aqui estudado. *GPX2* demonstrou ser mais expressa na linhagem *smf1* controle, sugerindo que a privação de manganês e formação de ROS tem impacto na sua atividade.

Como perspectiva espera-se realizar futuramente um ensaio de virulência em larvas de *Galleria mellonella* para avaliar se a ausência do transportador *Smf1* impacta na virulência de *C. gattii* sobre o hospedeiro, assim como avaliar os níveis de manganês e de outros metais nas células mutantes comparado à linhagem selvagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHN, Y. S.; JUNG, K. W. **Stress signaling pathways for the pathogenicity of Cryptococcus** *Eukaryotic Cell* American Society for Microbiology (ASM), , 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3889573/?report=abstract>. Acesso em: 17 jan. 2021.
- BERTERAME, N. M. et al. Copper homeostasis as a target to improve *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to oxidative stress. **Metabolic Engineering**, v. 46, p. 43–50, 1 mar. 2018.
- BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, p. 106, 2016.
- BILLMYRE, R. B. et al. Highly Recombinant VGII *Cryptococcus gattii* Population Develops Clonal Outbreak Clusters through both Sexual Macroevolution and Asexual Microevolution. **mBio**, v. 5, n. 4, p. 1–16, 29 ago. 2014.
- BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 4, p. 320, ago. 2007.
- CANDAS, D.; LI, J. J. **MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx** *Antioxidants and Redox Signaling* Mary Ann Liebert Inc., , 1 abr. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3942709/?report=abstract>. Acesso em: 19 jan. 2021
- CASADEVALL, A. Amoeba Provide Insight into the Origin of Virulence in Pathogenic Fungi. In: MYLONAKIS, E. et al. (Eds.). . **Recent Advances on Model Hosts**. [Casadevall, Arturo] Albert Einstein Coll Med, Dept Microbiol & Immunol, Div Infect Dis, Bronx, NY 10461 USA. [Casadevall, Arturo] Albert Einstein Coll Med, Dept Med, Div Infect Dis, Bronx, NY 10461 USA. Casadevall, A (reprint author), Albert Einstein Col: Springer-Verlag Berlin, 2012. v. 710p. 1–10.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 12, p. 2169, dez. 2007.

CELLIER, M. et al. Nramp defines a family of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 22, p. 10089, 24 out. 1995.

CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985, set. 2004.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. **Cryptococcus gattii: A resurgent fungal pathogen****Trends in Microbiology**Elsevier Ltd, , 2011. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3205261/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22011111/)>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, maio 2011.

CHUN, C. D.; LIU, O. W.; MADHANI, H. D. A Link between Virulence and Homeostatic Responses to Hypoxia during Infection by the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 0225–0238, fev. 2007.

CORDERO, R. J. B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Melanization in *cryptococcus neoformans* requires complex regulation. **mBio**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2020.

COX, G. M. et al. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 173, 1 jan. 2003.

CULOTTA, V. C.; YANG, M.; HALL, M. D. **Manganese transport and trafficking: Lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*****Eukaryotic Cell**American Society for Microbiology (ASM), , jul. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168969/>>. Acesso em: 17 jan. 2021.

DE PAULA, D. A. et al. Identification of genes expressed by *Cryptococcus gattii* during iron deprivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 813–820, set. 2014.

DOS SANTOS, F. M. et al. Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. **Future Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 491–504, maio 2017.

EIDE, D. J. **Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Nutrition*. **Anais...American Institute of Nutrition**, 1 maio 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/133/5/1532S/4558543>>. Acesso em: 24 jan. 2021

EIDE, D. J. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, 2009.

EISENMAN, H. C. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 12, p. 3860, 2009.

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**, v. 113, n. 7, 1 jul. 2018.

F, C. et al. Interaction of methyl viologen-induced chloroplast and mitochondrial signalling in *Arabidopsis*. **Free radical biology & medicine**, v. 134, p. 555–566, 1 abr. 2019.

FERNANDES, C. M. et al. A Reliable Assay to Evaluate the Virulence of *Aspergillus nidulans* Using the Alternative Animal Model *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Bio-protocol**, v. 7, n. 11, p. e2329–e2329, 2017.

FERRAREZE, P. A. G. et al. Transcriptional Analysis Allows Genome Reannotation and Reveals that *Cryptococcus gattii* VGII Undergoes Nutrient Restriction during Infection. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 49, 23 ago. 2017.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105076, ago. 2014.

FRASES, S. et al. The elastic properties of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Biophysical journal**, v. 97, n. 4, p. 937–945, 2009.

FU, M. S.; CASADEVALL, A. Divalent metal cations potentiate the predatory capacity of amoeba for *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 1–12, 2018.

GARCIA, A. W. A. et al. Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 144, 1 nov. 2020.

GARCÍA-RODAS, R. et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–13, 2014.

GILES, S. S. et al. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 9, p. 1447, set. 2006.

GRALLA, E. B. et al. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, p. 8558, 1 out. 1991.

GROSS, C. et al. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 32310–32316, 13 out. 2000.

HANSAKON, A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; ANGKASEKWINAI, P. Contribution of Laccase Expression to Immune Response against *Cryptococcus gattii* Infection. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 3, 1 mar. 2020.

HERKERT, P. F. et al. **Ecoepidemiology of cryptococcus gattii in developing countries** *Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 dez. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35753164/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

I, F. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

J, S.; R, D. Exposure of Cultured Astrocytes to Menadione Triggers Rapid Radical Formation, Glutathione Oxidation and Mrp1-Mediated Export of Glutathione Disulfide. **Neurochemical research**, v. 44, n. 5, p. 1167–1181, 15 maio 2019.

KENT WOOD, L.; THIELE, D. J. Transcriptional activation in yeast in response to copper deficiency involves copper-zinc superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 404–413, 2 jan. 2009.

KOSMAN, D. J. For *Cryptococcus neoformans*, responding to the copper status in a colonization niche is not just about copper. **Molecular microbiology**, v. 108, n. 5, p. 463, 1 jun. 2018.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, 2014.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, 2015.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the Cryptococcus neoformans Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, out. 2006.

LIU, X. F.; CULOTTA, V. C. Post-translation control of Nramp metal transport in yeast: Role of metal ions and the BSD2 gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4863–4868, 19 fev. 1999.

LOOR, G. et al. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 12, p. 1925, 15 dez. 2010.

MA, H.; MAY, R. C. **Chapter 5 Virulence in Cryptococcus Species**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 67

MONTLLOR-ALBALATE, C. et al. Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Biology**, v. 21, 1 fev. 2019.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study Cryptococcus neoformans Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842–3850, jul. 2005.

NARASIPURA, S. D. et al. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1681–1694, 5 mar. 2003.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599–609, 1 nov. 2012.

PORTNOY, M. E.; LIU, X. F.; CULOTTA, V. C. *Saccharomyces cerevisiae* Expresses Three Functionally Distinct Homologues of the Nramp Family of Metal Transporters. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 21, p. 7893–7902, 1 nov. 2000.

- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873, 1 ago. 2017.
- REDDI, A. R.; CULOTTA, V. C. Regulation of manganese antioxidants by nutrient sensing pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1261–1270, dez. 2011.
- REDDI, A. R.; JENSEN, L. T.; CULOTTA, V. C. Manganese homeostasis in *saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4722–4732, 14 out. 2009.
- RJ, D.-O. et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 1, p. 13–71, jan. 2008.
- SCHNEIDER, R. DE O. et al. Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43773, 20 ago. 2012.
- SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 57, n. 2, p. 133–150, 1 fev. 2019.
- SOUTO, A. C. P. et al. Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004885–e0004885, 2016.
- SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast (Chichester, England)**, v. 31, n. 2, p. 47–60, 2014.
- STAATS, C. C. et al. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. OCT, 2013.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001.
- TS, S. et al. Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. **Nature communications**, v. 5, 2014.

- VELAGAPUDI, R. et al. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345, out. 2009.
- WANG, Y. et al. **Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling** *Journal of Cell Biology* Rockefeller University Press, , 1 jun. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5987716/?report=abstract>. Acesso em: 25 jan. 2021
- WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. MEASUREMENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CULTURED CELLS AND TISSUE. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 51, jan. 2010.
- WHITTAKER, M. M.; WHITTAKER, J. W. Metallation state of human manganese superoxide dismutase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 2, p. 191–197, 15 jul. 2012.
- WILSON, S.; BIRD, A. J. Zinc sensing and regulation in yeast model systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 611, p. 30–36, 1 dez. 2016.
- ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, out. 2008.
- ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. v. 68, p. 133–216, 2009.
- ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490, 1 jan. 2019.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO “FUNGAL BIOLOGY”

One author has been designated as the corresponding author with contact details: e-mail, address and full postal address.

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Language: English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these).

Article Structure:

Introduction: state the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods: provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. All materials must be available to others. This means that commercial sources must be identified, proprietary materials must be patented prior to publication (so that they can be released), and all cultures, strains or varieties on which the work is based must be deposited in an identified culture collection from which they can be obtained by others.

Results: results should be clear and concise. Numerical data which lack statistical analysis are valueless and will not be published. Data from a sufficient number of independent experiments should be reported to permit evaluation of the reproducibility and significance of results. When any significance is claimed, the test of significance used should be stated and an estimate of the probability given. If you use complex statistical

transformations a few lines of explanation in plain English of the purpose and the outcome of the test should be provided.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions: the main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices: if there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc.

Essential title page information: title, author names and affiliations, [corresponding author](#) and present/permanent address.

Abstract: a concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions.

Words of non-English origin, like *bona fide*, *prima facie*, *in vitro*, *in situ*, should be in italic type.

Keywords: immediately after the abstract, provide 5 keywords, using British spelling.

Reference style:

Text: All citations in the text should refer to:

- Single Author: the Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
- Two Authors: both Authors' names and the year of publication;
- Three or more Authors: first Author's name followed by " et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters " a" , " b" , " c" , etc., placed after the year of publication.

Scientific names of all ranks are placed in italic type (e.g. *Ascomycota*, *Boletales*, *Fungi*, *Glomaceae*), as in the International Code of Botanical Nomenclature.

Names not used as formal scientific ones are placed in regular type and do not start with a capital letter (e.g. ascomycetes, basidiomycetes, fungi, penicillia, pyrenomycetes).

When first used in the paper, and at the start of each new section, the genus name is to be given in full. Where the name is repeated, the genus name is abbreviated to its initial letter (e.g. *Chaetomium globosum* to *C. globosum*) except at the start of a new sentence.