

RESUMO

A levedura basidiomicética *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, patologia que pode acometer diferentes órgãos do hospedeiro, incluindo pele, pulmões e sistema nervoso central. O ciclo infeccioso se inicia com a deposição de partículas infecciosas nas vias aéreas do hospedeiro. Neste ambiente, o micro-organismo se depara com diversas limitações impostas pelo hospedeiro para conter a progressão da infecção, sendo uma delas denominada imunidade nutricional. Esta é caracterizada pela criação de um ambiente com restrita disponibilidade de nutrientes, em especial metais, fundamentais para o desenvolvimento do patógeno. Visto que a privação de zinco constitui um exemplo de imunidade nutricional, os mecanismos de captação e metabolismo deste metal possivelmente estão relacionados ao processo de interação patógeno-hospedeiro. Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar a modulação da homeostase do metal zinco em macrófagos e a sua influência na atividade antifúngica dessas células. Em ensaios de viabilidade celular de macrófagos murinos em concentrações crescentes de cloreto de zinco ($ZnCl_2$) ou do quelante de zinco DTPA, foi observada redução drástica da viabilidade celular apenas em concentrações de $ZnCl_2$ superiores a 500 μM . A taxa de desenvolvimento de *C. neoformans* foi alterada apenas na ausência de zinco (concentrações superiores a 50 μM de DTPA). Para avaliar se a privação de zinco influencia a atividade fungicida de macrófagos, realizamos testes de viabilidade de *C. neoformans* após a interação com células de macrófagos murinos. Observamos que a privação de zinco levou a menor atividade fungicida de macrófagos; entretanto, células de *C. neoformans* previamente tratadas com o quelante de zinco TPEN se mostraram mais sensíveis à atividade antifúngica de macrófagos. Levando em consideração que a privação de zinco altera a sensibilidade de *C. neoformans* à atividade antifúngica de macrófagos, foi realizada análise quantitativa dos níveis de transcritos de 10 genes da família ZnT e 4 genes da família ZIP de transportadores de zinco. Os genes ZnT1, ZnT5, ZnT6 e ZnT7 apresentaram uma redução significativa dos níveis relativos de transcritos após 3 ou 6 horas de interação com *C. neoformans*. Esta mesma redução foi observada para os níveis relativos dos transcritos referentes aos genes ZIP1, ZIP8, ZIP13 e ZIP14. Em ensaios para avaliar se ocorre mobilização de zinco intracelular total em células de macrófagos durante a interação com *Cryptococcus*, não houve diferença significativa, sugerindo que pode haver compartimentalização ou aumento da expressão de proteínas ligantes de zinco, modulando desta forma a disponibilidade de zinco em macrófagos durante a infecção por *C. neoformans*.

RESULTADOS

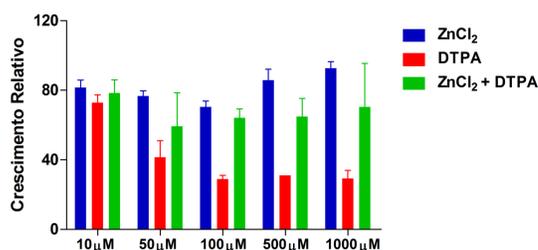


Figura 1. Análise da viabilidade celular de *Cryptococcus neoformans* em diferentes concentrações de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA. A linhagem H99 de *Cryptococcus neoformans* foi cultivada em YNB ou YNB contendo concentrações crescentes de $ZnCl_2$ ou do quelante de zinco DTPA, ou ambos em concentrações equivalentes. Após 24 horas de cultivo a densidade óptica (600 nm) foi determinada. Dados normalizados em relação ao cultivo apenas em YNB. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão.

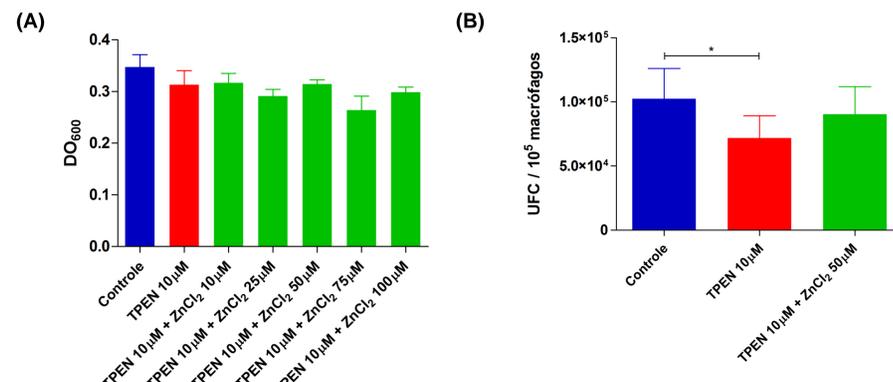


Figura 4. O quelante de zinco TPEN não altera a viabilidade celular de *Cryptococcus neoformans*, mas torna as células fúngicas mais suscetíveis a atividade antifúngica de macrófagos. (A) A linhagem H99 de *Cryptococcus neoformans* foi cultivada em YPD, YPD contendo 10 μM de TPEN ou YPD contendo 10 μM de TPEN e concentrações crescentes de $ZnCl_2$. Após 24 horas de cultivo a densidade óptica (600 nm) foi determinada. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. (B) Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM, e induzidos com LPS e IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, YPD contendo 10 μM de TPEN ou YPD contendo 10 μM de TPEN e 50 μM de $ZnCl_2$, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por Student *t* test. (*) $p < 0.05$.

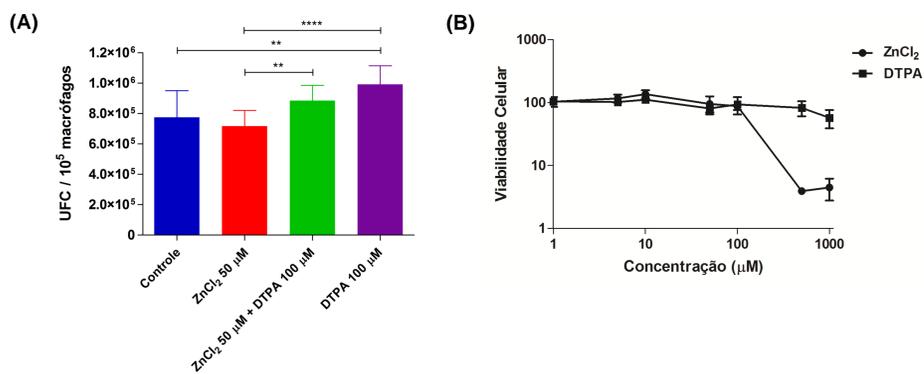


Figura 2. Zinco altera a atividade fungicida de macrófagos. (A) A disponibilidade de zinco altera as taxas fagocíticas e microbicidas de macrófagos contra *C. neoformans*. Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e ativados com LPS e IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. A interação foi realizada em DMEM, DMEM contendo 50 μM de $ZnCl_2$, DMEM contendo 50 μM de $ZnCl_2$ e 100 μM de DTPA ou DMEM contendo 100 μM de DTPA. Após 20 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por Student *t* test. (**) $p < 0.005$, (****) $p < 0.0001$. (B) Análise da viabilidade celular de macrófagos em diferentes concentrações de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA. Macrófagos RAW264.7 foram cultivados em meio DMEM acrescido de concentrações crescentes de $ZnCl_2$ ou DTPA, e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com MTT por 3 horas a 37°C e 5% de CO_2 . O MTT foi retirado e DMSO foi adicionado para posterior leitura a 560 nm e 670 nm (background). Dados normalizados em relação ao cultivo apenas em DMEM. Os pontos representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão.

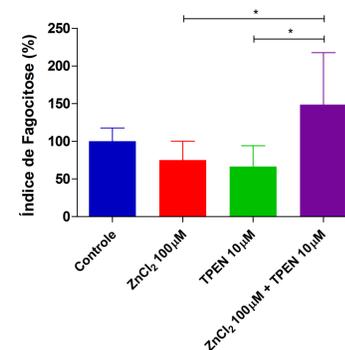


Figura 5. A disponibilidade de zinco altera a taxa de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos. Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e induzidos com LPS e de IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram pré-incubadas em YPD, YPD contendo 100 μM de $ZnCl_2$, YPD contendo 10 μM de TPEN ou YPD contendo 10 μM de TPEN e 100 μM de $ZnCl_2$. As células foram lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7, coradas com FITC e inoculadas na proporção 10:1. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e *trypan blue* foi adicionado para leitura e quantificação da fluorescência das células fúngicas internalizadas. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por One-way ANOVA: (*) $p < 0.05$.

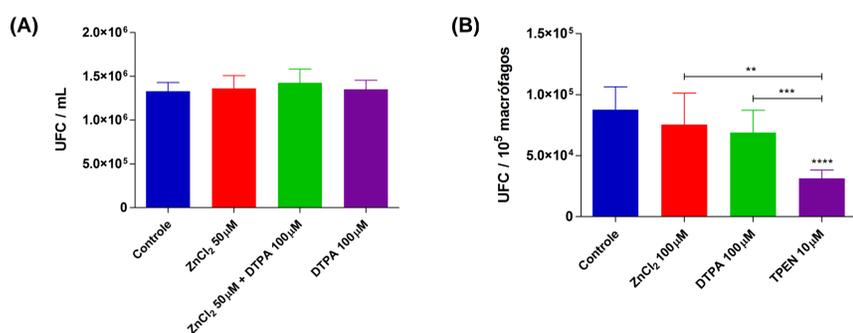


Figura 3. A disponibilidade de zinco altera a viabilidade de *C. neoformans* durante a interação com macrófagos. (A) Análise da viabilidade celular de *C. neoformans* na presença de cloreto de zinco ou do quelante de zinco DTPA. Células de *C. neoformans* foram cultivadas em meio DMEM, DMEM contendo 50 μM de $ZnCl_2$, DMEM contendo 50 μM de $ZnCl_2$ e 100 μM de DTPA ou DMEM contendo 100 μM de DTPA, e incubadas por 20 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e semeadas em meio YPD sólido para determinação do número de UFC. As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. (B) A privação de zinco torna *C. neoformans* mais suscetível à ação antifúngica de macrófagos. Macrófagos J774.1 foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM e induzidos com LPS e IFN- γ . Células de *C. neoformans* foram cultivadas em YPD, YPD contendo 100 μM de $ZnCl_2$, YPD contendo 100 μM de DTPA ou YPD contendo 10 μM de TPEN, lavadas com PBS, opsonizadas com o anticorpo 18-B7 e inoculadas na proporção 10:1. Após 2 horas de interação a 37°C e 7,5% de CO_2 , os poços foram lavados com PBS, e os macrófagos foram lisados com água milli-Q gelada. O lisado foi diluído e semeado em YPD sólido para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). As barras representam a média de ensaios realizados em triplicata e os traços o desvio padrão. Análise estatística realizada por Student *t* test. (**) $p < 0.005$, (****) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$.

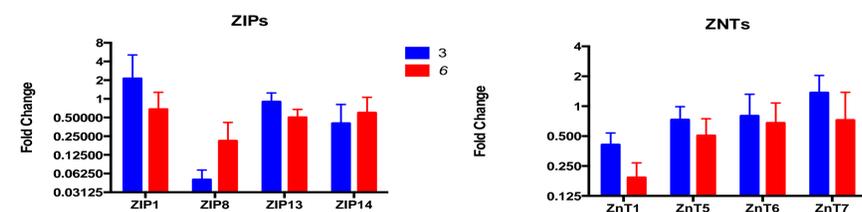


Figura 6. Avaliação quantitativa dos níveis relativos de transcritos de genes que codificam transportadores de zinco. A expressão dos 10 transportadores de zinco da família ZnT e de 4 transportadores de zinco da família ZIP foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real a partir do RNA extraído de macrófagos. A quantidade relativa de cada transcrito foi normalizada de acordo com os valores de Ct obtidos para os transcritos referentes ao gene GAPDH. Os resultados representam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por Student *t* test. (****) $p < 0.0001$, (****) $p < 0.0007$, (**) $p < 0.008$, (*) $p < 0.02$; (###) $p < 0.0009$, (##) $p < 0.007$, (#) $p < 0.02$. Análises representadas por * se referem às comparações entre as interações no tempo de 3 horas, ao passo que as representadas por # se referem ao tempo de 6 horas.

CONCLUSÕES

- ▶ A disponibilidade de zinco altera a atividade antifúngica de macrófagos murinos, assim como a suscetibilidade de *C. neoformans* à fagocitose. Em condições de privação de zinco os macrófagos apresentam uma menor atividade antifúngica contra *C. neoformans*, entretanto, quando as células fúngicas são pré-tratadas com o quelante de zinco TPEN, elas se tornam mais suscetíveis à fagocitose por macrófagos.
- ▶ Ocorre a redução dos níveis de transcritos de transportadores de zinco da família ZnT e ZIP em células de macrófagos infectadas com *C. neoformans*, mas os níveis intracelulares de zinco não são alterados durante a interação, o que sugere que existem mecanismos mais complexos envolvidos na privação de zinco como mecanismo de defesa de macrófagos contra fungos patogênicos intracelulares. Provavelmente esses transportadores estão envolvidos na regulação fisiológica das concentrações de zinco, ou na modulação durante processos inflamatórios, mas sem participar da modulação desse metal como um mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares.
- ▶ Além disso, os quelantes de zinco DTPA e TPEN podem agir como quelantes de ferro, portanto os resultados obtidos também podem estar associados à privação desse metal de transição.

PERSPECTIVAS

- ▶ Repetir ensaios de fagocitose utilizando maiores concentrações de DTPA.
- ▶ Investigar o papel do metal de transição ferro na modulação da homeostase de zinco.
- ▶ Quantificar níveis relativos de transcritos de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias.
- ▶ Investigar outros mecanismos que possam estar envolvidos na modulação da homeostase de zinco em macrófagos durante a interação com *Cryptococcus neoformans*.

APOIO FINANCEIRO