

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

URIEL PERIN KINSKOVSKI

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR ZIP3 NA VIRULÊNCIA DE
*Cryptococcus gattii***

Porto Alegre

2018

URIEL PERIN KINSKOVSKI

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR ZIP3 NA VIRULÊNCIA 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 Bacharel em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: Msc. Ane Wichine Acosta Garcia

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Kinskovski, Uriel Perin

Análise da participação do transportador Zip3 na virulência de *Cryptococcus gattii* / Uriel Perin Kinskovski. -- 2018.

59 f.

Orientador: Charley Christian Saats.

Coorientadora: Ane Wichine Acosta Garcia.

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, 2018.

1. *Cryptococcus gattii*. 2. imunidade nutricional. 3. ZIP. 4. *Galleria mellonella*. I. Saats, Charley Christian, orient. II. Garcia, Ane Wichine Acosta, coorient. III. Título.

Uriel Perin Kinskovski

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR ZIP3 NA VIRULÊNCIA 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 Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 2 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Danielle da Silva Trentin - UFCSPA

Felipe Klein Ricachenevsky - UFSM

Charley Christian Staats - UFRGS

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, a quem eu devo tudo, muito obrigado por todo amor, afeto e ensinamentos. Muito obrigado por sempre acreditar em mim e me incentivar, mesmo quando eu não acreditava. Nunca vou poder te pagar tudo que fizestes por mim.

Ao meu pai e meus irmãos, muito obrigado por todo carinho e pelas risadas.

Aos meus amigos Bernardo e Guilherme, muito obrigado por sempre estarem comigo nos momentos bons e nos ruins, por todas as festas e todos os memes. Calma papi. asd

Aos amigos lindos que fiz no laboratório, Eamim, Júlia, Camila, Bárbara, Heryk, Jackson, Solon, Nátaia, muito obrigado por alegrarem os dias de trabalho e por todo resto, todas as noites e eventos estranhos, conselhos e ajuda pessoais.

A Ane, por ajudar com todas as etapas desse trabalho, por ser uma ótima amiga e estar sempre comigo, mesmo nos momentos mais frustrantes ou de desespero. Obrigado por todo carinho e conselhos, todas as conversas que me ajudaram como pessoa.

Aos demais colegas dos laboratórios 219, 220 e 217 por toda ajuda e pela convivência diária. Certamente o dia a dia não seria o mesmo sem vocês.

Aos demais amigos, pessoal da saidera, grupo dos bostas legais, galera do papinho, pessoal das raves, obrigado por toda alegria e momentos de descontração.

Ao Helber e a professora Danielle, por toda a ajuda e paciência.

Ao meu orientador Charley, por me acolher no laboratório, por todo o conhecimento, por toda a ajuda, por manter a calma pois “trust me, it’ll work”, conversas sobre a vida e piadinhas sem graça.

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose, doença fúngica que afeta humanos e outros animais. Essa patologia é caracterizada por uma infecção pulmonar primária, com possível disseminação sistêmica posterior e resultando no quadro potencialmente letal de meningoencefalite. Nesse contexto, macrófagos alveolares representam a primeira linha de defesa do hospedeiro e, por meio da fagocitose, expõem as leveduras a um ambiente hostil caracterizado por um pH ácido, presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, peptídeos antimicrobianos e privação de nutrientes. Em contrapartida o patógeno expressa transportadores de alta afinidade, como os membros da família ZIP, para prover a célula da levedura com todos os componentes necessários para se desenvolver neste ambiente. O transportador codificado pelo gene *ZIP3* de *C. gattii* é ortólogo a *Atx2p* de *Saccharomyces cerevisiae*, uma proteína presente no Golgi e responsável pelo transporte de manganês para o citoplasma da célula. Dados não publicados do nosso grupo demonstram que *Zip3* está envolvido na homeostase de manganês e na resposta oxidativa da levedura. Visto que linhagens nulas para *ZIP3* apresentam: maior sensibilidade a espécies reativas de oxigênio in vitro; (ii) decréscimo na expressão das duas isoformas de SOD; e (iii) que linhagens nulas para as isoformas de SOD foram consideradas avirulentas em modelo murino; esse trabalho teve como objetivo a avaliação da participação do transportador *Zip3* na virulência de *C. gattii*. Para isso, distintos modelos de fagócitos, como células de macrófagos de murinos ou a ameba *Acanthamoeba castellanii*, foram expostas à células das linhagens selvagem ou mutante nulo para o gene *ZIP3* de *C. gattii*, sendo avaliada a taxa de fagocitose e o índice de replicação intrafagossômico. Para avaliação da influência do transportador *Zip3* na virulência de *C. gattii* in vivo, realizou-se uma curva de sobrevivência no modelo inseto de *Galleria mellonella*. Não foi observada diferença na replicação intracelular em nenhum dos modelos testados, no entanto, *Zip3* influencia a taxa de fagocitose das leveduras in vitro. Também não houve diferença na letalidade das larvas, sugerindo que o transportador *Zip3* não é importante para a virulência de *C. gattii* nos modelos avaliados

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; imunidade nutricional; ZIP; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are the etiologic agents of cryptococcosis, a fungal disease that affects humans and other animals. This disease is characterized by a primary lung infection that may disseminate systematically and has as primary outcome meningoencephalitis. In this context, alveolar macrophages represent the host's first line of defense and, through phagocytosis, expose yeasts to a hostile environment characterized by acid pH, presence of reactive oxygen and nitrogen species, antimicrobial peptides and nutrient deprivation. In contrast the pathogen expresses high affinity transporters, such as members of the ZIP family, to provide the yeast cell with all the components necessary to develop in this environment. Unpublished data from our group demonstrate that *C. gattii* ZIP3 product, an ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* manganese transporter Atx2p, is involved in manganese homeostasis and oxidative metabolism. As the ZIP3 null strains have greater sensitivity to reactive oxygen species *in vitro*, lower expression of both SOD's isoforms and that *C. gattii* SODs null strains were considered avirulent, this work focus on evaluate the participation of Zip3 in the virulence of *C. gattii*. distinct phagocyte models, such as murine macrophages cells or *Acanthamoeba castellanii* amoeba, were exposed to the wild-type or null mutant cells for the *C. gattii* ZIP3 gene, and the rate of phagocytosis and replication index intraphagosomal. To evaluate the influence of the Zip3 transporter on the virulence of *C. gattii* *in vivo*, a survival curve was performed on the insect model of *Galleria mellonella*. No difference was observed in intracellular replication in any of the models tested, however, Zip3 influences the rate of phagocytosis of yeasts *in vitro*. There was also no difference in lethality of the larvae, suggesting that the Zip3 transporter is not important for the virulence of *C. gattii* in the evaluated models

Keywords: *Cryptococcus gattii*; nutritional immunity; ZIP; *Galleria mellonella*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CFU	Unidades formadoras de colônia
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glicuronoxilomanana
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleucina-2
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Plb1	Fosfolipase B1
PYG	<i>Peptone-yeast-glucose</i>
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Cobre/Zinco superóxido desmutase
SOD2	Manganês superóxido desmutase
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
YPD	<i>Yeast extract-peptone-dextrose</i>
ZIP	<i>Zrt-Irt Protein</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 Criptococose e seus agentes etiológicos	9
1.2 Via de infecção.....	10
1.3 Determinantes de virulência em <i>Cryptococcus</i> spp.	12
1.4 Interações patógeno-hospedeiro.....	13
1.5 Modelos alternativos de virulência: amebas e insetos	15
1.6 Imunidade nutricional	16
1.6.1 Família ZIP e sua importância no processo de infecção.....	17
1.6.2 Manganês como alvo de imunidade nutricional	17
1.7 Justificativa	19
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. ARTIGO CIENTÍFICO	21
3.1 Resumo	23
3.2 Introdução	24
3.3 Materiais e métodos	26
3.3.1 <i>Linhas celulares e condições de cultivo</i>	26
3.3.2 <i>Experimento de interação macrófago-Cryptococcus</i>	26
3.3.3 <i>Experimento de interação ameba-Cryptococcus</i>	27
3.3.4 <i>Análise estatística</i>	27
3.3.5 <i>Análise da virulência em Galleria mellonella</i>	27
3.4 Resultados	29
3.5 Discussão	31
3.6 Figuras	35
3.7 Legendas das figuras	39
3.8 Referências	41
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO "MICROBES & INFECTION"	56

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Criptococose e seus agentes etiológicos

A criptococose, também conhecida como doença de Busse-Buschke, é uma micose sistêmica infecciosa que afeta humanos e outros mamíferos, cujos agentes etiológicos são as leveduras encapsuladas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Os principais órgãos acometidos pela doença são os pulmões, onde a multiplicação das leveduras pode levar a um quadro de pneumonia, e o sistema nervoso central (SNC), podendo evoluir para meningite ou meningoencefalite, quadro potencialmente letal da doença. No entanto, as leveduras também podem afetar outros órgãos como a pele, ossos, fígado, baço e os nódulos linfáticos (SABITI; MAY, 2012).

Embora ambas espécies patogênicas pertençam ao mesmo gênero, elas diferem em relação a localização geográfica, hospedeiro alvo, progressão da infecção e manifestações clínicas da doença (KWON-CHUNG et al., 2014). *C. neoformans* possui uma distribuição global e é considerado um patógeno oportunista, causando infecções majoritariamente em pacientes imunocomprometidos, além de possuir maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e causar um quadro de meningite criptocócica (LI et al., 2014). Já *C. gattii* é capaz de infectar hospedeiros saudáveis e está mais relacionado com o quadro pulmonar da doença (PAPPAS, 2013).

Globalmente, estimam-se 223.100 casos de meningite criptocócica por ano, com maior incidência na África subsaariana, sendo que 181.100 desses casos evoluem para o óbito, uma mortalidade estimada de aproximadamente 80%. Além disso, a meningite fúngica causa cerca de 15% da mortalidade total relacionada a HIV/AIDS (RAJASINGHAM et al., 2017). No Brasil, há maior prevalência da doença nas regiões sul e sudeste, coincidindo com a distribuição de HIV no país. Dentre esses casos, *C. neoformans* é isolado em 50% dos pacientes com HIV/AIDS que vão a óbito e apresentam micose sistêmica como condição associada (PRADO et al., 2009).

Considerado um patógeno primário, *C. gattii* pode acometer tanto indivíduos imunocomprometidos, como indivíduos imunocompetentes. Normalmente está associado a lesão pulmonar com formação de criptococoma, mas também é capaz de desenvolver infecção no SNC (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012). No ambiente,

pode ser encontrado, preferencialmente, em madeira em decomposição e cavidades no tronco de árvores, em especial as do gênero *Eucalyptus* (GROVER et al., 2007; HAGEN; BOEKHOUT, 2010).

Estima-se que *C. gattii* divergiu de *C. neoformans* há aproximadamente 37 milhões de anos e posteriormente nos sorotipos B e C, classificados de acordo com a composição estrutural da cápsula polissacarídica (BELAY et al., 1996; LIN; HEITMAN, 2006). Com o avanço das técnicas moleculares, como PCR *fingerprinting* e polimorfismo por tamanho de fragmento amplificado (AFLP), foi possível detectar subtipos moleculares que apresentam características fenotípicas distintas. Sendo as leveduras do sorotipo B associados aos tipos moleculares VGI e VGII e as do sorotipo C a VGIII e VGIV (LIN; HEITMAN, 2006; SORRELL et al., 1996). O subtipo VGIIa é considerado o mais virulento e com a mais baixa susceptibilidade a drogas antifúngicas (TRILLES et al., 2012).

Originalmente acreditava-se que *C. gattii* era restrito a regiões de climas tropicais e subtropicais como a Austrália e a América do Sul (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984), mas em 1999 houve um surto que acometeu a ilha de Vancouver, no Canadá e o noroeste dos Estados Unidos (MA et al., 2009; STEPHEN et al., 2002). A partir de amostras desses pacientes foi isolada a linhagem R265, considerada hipervirulenta e classificada como sorotipo B, tipo molecular VGII (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009).

1.2 Via de infecção

A infecção inicia-se por via respiratória, através da inalação de propágulos infecciosos, os quais são basidiósporos ou leveduras dessecadas, que possuem um tamanho reduzido e, dessa forma, são capazes de ultrapassar as barreiras físicas do muco, ação ciliar e turbulência do ar e poder alojar-se nos alvéolos pulmonares (SHOHAM; LEVITZ, 2005). Os propágulos infecciosos se encontram no ambiente (Figura 1), *C. gattii* é comumente isolado a partir de árvores e madeira em decomposição, enquanto *C. neoformans* pode ser encontrado com maior frequência em solo com excretas de pombos, ou ainda, interagindo com amebas de vida livre (GROVER et al., 2007; LIN; HEITMAN, 2006).

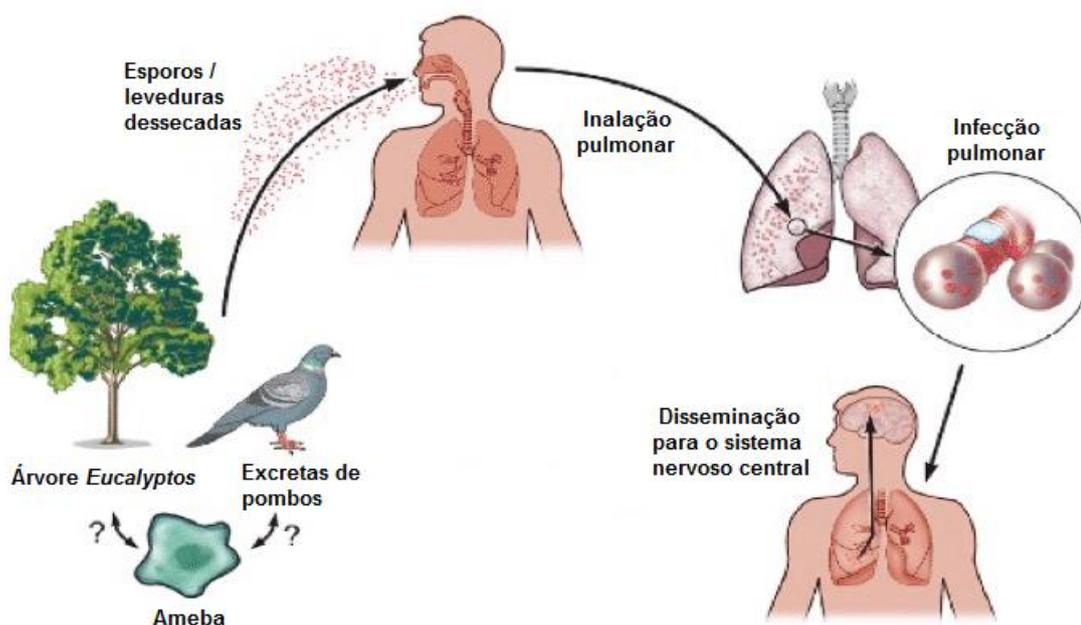


Figura 1: Via de infecção de *Cryptococcus* spp. O fungo sobrevive no ambiente associado a excretas de pássaros, árvores ou amebas ambientais. A inalação de esporos ou leveduras dessecadas pode levar ao quadro de pneumonia, forma pulmonar da doença. Posteriormente, o patógeno pode se disseminar via hematogênica para o sistema nervoso central, onde pode causar a meningite criptocócica, forma mais grave e letal da doença. Adaptado de (GRODSKY; WANG, 2014).

Uma vez que essas partículas alcançam os alvéolos pulmonares, elas são desafiadas pelos fagócitos do sistema imune inato do hospedeiro, como os macrófagos, as células dendríticas e os neutrófilos, que representam a primeira linha de defesa contra as leveduras patogênicas (SHAO et al., 2005). Os macrófagos alveolares desempenham um papel central na contenção da infecção graças a fagocitose dessas leveduras que podem: (I) ser eliminadas no fagolisossomo; (II) permanecer latentes no interior dos macrófagos; (III) replicar-se dentro do macrófago causando a lise do mesmo; (IV) escapar do interior do macrófago sem causar lesões aparentes ao mesmo, num mecanismo conhecido como vomocitose (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; JOHNSTON; MAY, 2013; TUCKER; CASADEVALL, 2002).

Após o estabelecimento de uma infecção pulmonar primária, as leveduras podem se disseminar via corrente sanguínea ou linfática, caracterizando uma infecção sistêmica (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). Para que o fungo consiga alcançar o sistema nervoso central e causar o quadro de meningite ou meningoencefalite, é necessário atravessar a barreira hematoencefálica. Já foram descritas três maneiras pelas quais as leveduras patogênicas realizam essa migração: (I) migração

transcelular, através das células endoteliais que constituem a barreira hematoencefálica; (II) migração paracelular, por entre as junções ocludentes das células endoteliais; (III) pelo mecanismo conhecido como “Cavalo de Troia”, onde a levedura utiliza macrófagos para atravessar a barreira por entre as células endoteliais (LIU; PERLIN; XUE, 2012).

1.3 Determinantes de virulência em *Cryptococcus* spp.

Embora exista algumas diferenças marcantes entre as duas espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*, ambas partilham o mesmo grupo de determinantes de virulência centrais. Dentre os determinantes mais importantes, destaca-se a capacidade das leveduras de se desenvolverem a temperaturas elevadas, como as dos hospedeiros mamíferos (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). De fato, esse pode ser considerado o maior fator diferencial entre as espécies patogênicas e as não patogênicas do mesmo gênero (PETTER et al., 2001).

Outro determinante de extrema importância é atividade da enzima lacase. Lacases são oxidases dependentes de cobre presentes em diversas plantas, fungos e bactérias. Nas leveduras do gênero *Cryptococcus*, a atividade de lacases está relacionada com a produção de melanina, fosfolipase B (Plb1), urease, superóxido dismutase (SOD1) e trealose (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). A melanina é um pigmento capaz de estabilizar radicais livres, atuando como um antioxidante contra moléculas geradas pelas células do hospedeiro (WANG; CASADEVALL, 1994). Além disso, o pigmento também é capaz de absorver radiação eletromagnética, protegendo o organismo de vida livre, e é um importante constituinte da parede celular, aumentando sua rigidez (DADACHOVA et al., 2008; WILLIAMSON, 1997).

Dentre as enzimas secretadas pelo patógeno, destacam-se a urease e a fosfolipase B. A urease catalisa a hidrólise de ureia a amônia, e em *Cryptococcus* parece estar envolvida com a transmigração e invasão do SNC (FEDER et al., 2015; OLSZEWSKI et al., 2004). Já as fosfolipases atuam na hidrólise de ligações de fosfolipídios, como os presentes nas membranas das células do hospedeiro. A secreção da fosfolipase B está relacionada com sobrevivência das leveduras fagocitadas por macrófagos, e é teorizado que atue na permeabilização do

fagolisossomo, dessa forma tendo um papel direto na aquisição de nutrientes (CHRISMAN et al., 2011; COX et al., 2001).

As espécies do complexo *Cryptococcus* são conhecidas pela produção de uma cápsula polissacarídica, essa sendo um dos principais fatores de virulência associados a esse fungo. Essa estrutura varia de tamanho dependendo de diversos estímulos e é composta, principalmente, por glicuronoxilomanana (GXM), que é responsável por 90 a 95% da massa capsular, galactoxilomanana (GalXM), de 5 a 10%, e manoproteínas, numa proporção inferior a 1% (ZARAGOZA et al., 2009). Os componentes são sintetizados internamente e secretados para o meio extracelular via vesículas, a montagem da cápsula, provavelmente, ocorre de fora para dentro (RODRIGUES et al., 2007; ZARAGOZA et al., 2009). Ainda, sabe-se que a agregação de GXM capsular é dependente de cátions divalentes (NIMRICHTER et al., 2007).

A cápsula polissacarídica possui diversas funções na patogenicidade dessas leveduras. Na ausência de opsoninas, ela é capaz de inibir a fagocitose das leveduras, agindo, também, como uma “capa” ao encobrir os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como as moléculas presentes na parede celular fúngica (KOZEL, 1993; LEOPOLD WAGER et al., 2016). Além disso, é descrita a capacidade da cápsula em proteger a levedura de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peptídeos antimicrobianos, promovendo a sobrevivência dentro do fagolisossomo (TUCKER; CASADEVALL, 2002; ZARAGOZA et al., 2008).

Os polissacarídeos que compõem a cápsula apresentam, ainda, atividade imunomodulatória em mamíferos. Já foi observado a ação dessas moléculas afetando a migração de células do sistema imune do hospedeiro, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de células imunes, além de interferir na apresentação de antígenos via o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (ELLERBROEK et al., 2004; PERICOLINI et al., 2013; VECCHIARELLI et al., 2011).

1.4 Interações patógeno-hospedeiro

Após vencer as barreiras físicas e alojarem-se no parênquima pulmonar, as células fúngicas desencadeiam uma resposta pró-inflamatória, induzindo a produção de citocinas do tipo Th1, como interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (HUFFNAGLE; LIPSCOMB, 1998). Sabe-se que os perfis

de resposta Th1 e Th17 são protetores contra espécies de *Cryptococcus*, diminuindo a carga fúngica pulmonar e estão relacionados a um bom prognóstico da doença (HUFFNAGLE; LIPSCOMB, 1998; ZHANG et al., 2009). O resultado é um ambiente inflamatório com recrutamento de células fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. No entanto, já foi descrito que uma linhagem hipervirulenta de *C. neoformans* é capaz de modular a resposta imune para um perfil Th2, que não é protetor e propicia o desenvolvimento da infecção (VOELZ; LAMMAS; MAY, 2009; ZHANG et al., 2009). De forma semelhante, *C. gattii* pode atenuar a função de células dendríticas e, dessa forma, diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ANGKASEKWINAI et al., 2014).

Os macrófagos podem, dependendo de citocinas e outras moléculas sinalizadoras presentes no microambiente em que se encontram, ser ativados em um perfil clássico (M1) ou um perfil alternativo ou reparador (M2) (MURRAY et al., 2014). Macrófagos M1 são ativados por citocinas pró-inflamatórias, como as do perfil Th1, e são conhecidos por sua capacidade de eliminar patógenos intracelulares, como as leveduras de *Cryptococcus sp.* A ativação alternativa, induzida por citocinas do perfil Th2, contribui para a regulação da resposta inflamatória, fagocitose de restos celulares e possui um papel chave na cicatrização, porém não é protetora contra patógenos (LEOPOLD WAGER; WORMLEY, 2014; MURRAY et al., 2014).

Os macrófagos alveolares, dessa forma, desempenham um papel central na contenção da infecção, principalmente na fase aguda, visto que são os primeiros recrutados para o sítio da infecção (OSTERHOLZER et al., 2009). As leveduras fagocitadas são expostas a um microambiente hostil devido a polarização de macrófagos para o perfil M1. Quando há fusão do fagossomo com o lisossomo, forma-se o fagolisossomo, organela responsável pela eliminação de patógenos. Essa organela é caracterizada por um pH ácido, presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ausência de nutrientes e presença de enzimas e peptídeos com ação antimicrobiana (GIBSON; JOHNSTON, 2015; UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012). Apesar disso, as leveduras podem sobreviver e até se desenvolver nesse ambiente, podendo acarretar na lise do macrófago ou não, pelos mecanismos já descritos anteriormente (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; TUCKER; CASADEVALL, 2002). Curiosamente, o ambiente ácido do fagolisossomo é favorável ao desenvolvimento do fungo, já que esse desenvolve-se melhor em pHs baixos em comparação a meios neutros ou alcalinos (LEVITZ et al., 1999).

1.5 Modelos alternativos de virulência: amebas e insetos

Modelos animais alternativos apresentam diversas vantagens quando comparados aos modelos mamíferos, como custo, facilidade de manutenção, ciclo de vida rápido, reprodução em grande escala e não necessitar de aprovação de um comitê de ética. Amebas de vida livre são organismos ambientais que se encontram no solo e se alimentam de microrganismos como fungos e bactérias. Amebas representam um importante reservatório ambiental para *Cryptococcus sp.*, já que essas leveduras conseguem sobreviver e proliferar no interior das mesmas (GREUB; RAOULT, 2004). Além disso, amebas possuem propriedades fagocíticas semelhantes às de macrófagos e utilizam-se de mecanismos parecidos para eliminação dos microrganismos fagocitados, da mesma forma que *C. neoformans* utiliza-se dos mesmos determinantes de virulência para promover a sobrevivência intracelular (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Teoriza-se que, portanto, as leveduras desenvolveram seus fatores de virulência coevoluindo com predadores ambientais, tais como as amebas, e, posteriormente, foram capazes de se adaptar a outros hospedeiros, como os mamíferos (DERENGOWSKI et al., 2013; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Além disso, existem vantagens experimentais em utilizar amebas para ensaios de fagocitose frente a macrófagos, pois essas não precisam ser pré-ativadas com citocinas e os microrganismos não precisam ser opsonizados (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

As larvas de *Galleria mellonella*, ou a traça grande da cera, são usadas em ensaios de infecção de microrganismos e avaliação de ação antimicrobiana de drogas *in vivo* (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Embora insetos não possuam sistema imune adaptativo, a sua resposta imune inata a patógenos é extremamente similar a dos vertebrados e, ainda, as larvas toleram temperaturas elevadas como 37°C, mimetizando a temperatura corporal de hospedeiros mamíferos (FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014).

Estudos comparando o modelo clássico murino ao modelo inseto mostraram que linhagens consideradas hipervirulentas em mamíferos, também apresentavam o mesmo fenótipo nas larvas (FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014; MYLONAKIS et al., 2005). Além disso, comportamentos de virulência clássicos de *Cryptococcus sp.*, como melanização, aumento do diâmetro da cápsula, secreção de vesículas,

formação de células gigantes e replicação no interior de fagócitos já foram observados no modelo de infecção de *Galleria* (EISENMAN et al., 2014; GARCÍA-RODAS et al., 2011; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2015).

1.6 Imunidade nutricional

Microrganismos patogênicos evoluíram para serem capazes de sobreviver e proliferar no interior de outros organismos e, para isso, desenvolveram mecanismos para lidar com diversos tipos de estresse e serem capazes de adquirir nutrientes nesse ambiente. Esses hospedeiros, por sua vez, também desenvolveram uma série de defesas e ferramentas para combater os microrganismos invasores. Uma das diversas estratégias utilizadas por fagócitos para eliminação de patógenos intracelulares é o controle da biodisponibilidade de nutrientes no sítio da infecção, a qual denomina-se imunidade nutricional (HOOD; SKAAR, 2012).

Foi primeiramente observada em resposta a infecção por bactérias, onde ferro era sequestrado por proteínas ou para dentro de organelas que o patógeno não teria acesso (HOOD; SKAAR, 2012). Hoje, sabe-se que diversos metais de transição, como zinco, manganês e cobre também possuem sua homeostase alterada frente a uma infecção (KEHL-FIE; SKAAR, 2010). Metais de transição representam micronutrientes necessários para todos os seres vivos, uma vez que desempenham funções essenciais para a fisiologia celular, seja como cofator de enzimas ou apresentando um papel estrutural (BLEACKLEY; MACGILLIVRAY, 2011; KEHL-FIE; SKAAR, 2010). Estima-se que, aproximadamente, 30% de todas as proteínas interagem com algum cofator metálico, por análises de bancos de dados proteicos (WALDRON et al., 2009).

Além dos mecanismos descritos acima, o hospedeiro, em resposta a infecção, pode diminuir a disponibilidade de metais ativando células epiteliais e recrutando neutrófilos, ambos são capazes de secretar proteínas quelantes de metais para o meio extracelular, as quais possuem função antimicrobiana (DIAZ-OCHOA et al., 2014). Em contrapartida, já foi observado um comportamento contrário, no qual o hospedeiro aumenta os níveis disponíveis de metais com finalidade de intoxicar o patógeno (DJOKO et al., 2015).

Ainda, sobre a necessidade de metais em uma variedade de processos celulares, metais de transição são essenciais para o funcionamento correto do sistema

imune do hospedeiro, visto que leves deficiências de metais estão relacionadas a maior incidência de infecções e piores prognósticos (WINTERGERST; MAGGINI; HORNIG, 2007). Diante desse contexto de disputa por micronutrientes, ocorre modulação da expressão de diversos transportadores de metais com finalidade de manter a homeostase desses íons, tanto por parte da célula patogênica quanto por parte das células do hospedeiro (BLEACKLEY; MACGILLIVRAY, 2011; CRAWFORD; WILSON, 2015).

1.6.1 Família ZIP e sua importância no processo de infecção

Uma família de transportadores conhecidamente envolvida na modulação de disponibilidade de metais na interface patógeno-hospedeiro é a ZIP (*Zrt-Irt Protein*). (GUERINOT, 2000; MILNER et al., 2013). Tratam-se de proteínas com, geralmente, oito domínios transmembrana que realizam o transporte de, principalmente, zinco, mas também ferro, manganês e cobre, de organelas ou do meio extracelular em direção ao citoplasma (DEMPSKI, 2012; GUERINOT, 2000).

Foi observado o envolvimento de transportadores da família ZIP tanto na patogênese de micróbios quanto na defesa do hospedeiro (KIMURA; KAMBE, 2016). Tanto *C. gattii* quanto *C. neoformans* possuem transportadores de alta e baixa afinidade por zinco, respectivamente, Zip1p e Zip2p que são modulados durante a interação com hospedeiro e sua deleção tem impacto na virulência do patógeno (DO et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2015). Em contrapartida, os macrófagos do hospedeiro também modulam seus transportadores em resposta ao patógeno, porém de forma a reduzir a disponibilidade de metal para o mesmo (DOS SANTOS et al., 2017; WINTERS et al., 2010).

1.6.2 Manganês como alvo de imunidade nutricional

Dados não publicados de nosso grupo revelaram que o gene *ZIP3* de *C. gattii*, ortólogo ao produto de *ATX2* de *Saccharomyces cerevisiae*, parece não estar diretamente envolvido no metabolismo de zinco, mas sim de manganês. *ATX2* codifica uma proteína transportadora de manganês presente no Golgi (Atx2p) e que, quando

sobre-expressa, está relacionada ao aumento dos níveis intracelulares de manganês e redução da sensibilidade a estresse oxidativo (LIN; CULOTTA, 1996).

Manganês é um íon redox-ativo de extrema importância para organismos vivos, visto que é cofator de diversas enzimas como oxidases, desidrogenases, polimerases de DNA e RNA, quinases, descarboxilases e transferases de açúcar (CULOTTA; YANG; HALL, 2005). Adicionalmente, possui um papel chave na resposta redox de eucariotos, já que uma das isoformas da enzima superóxido dismutase (Sod2) utiliza manganês como cofator. As leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus* também expressam Sod2, o que as torna mais resistentes a espécies reativas de oxigênio geradas pelos macrófagos do hospedeiro (FRÉALLE et al., 2005). A inativação do gene *SOD2* não permite o desenvolvimento próprio a 37°C na presença de oxigênio do ar e tem profundos impactos na virulência tanto de *C. gattii* quanto de *C. neoformans* (GILES et al., 2005; NARASIPURA; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2005).

Durante uma infecção, manganês é sequestrado do meio extracelular pela proteína S100 calprotectina, que é secretada por células do hospedeiro, e no ambiente intracelular é removido do fagolisossomo e armazenado em organelas por transportadores da família NRAMP (Proteína associada a resistência natural de macrófagos) (BROPHY; NOLAN, 2015; CANONNE-HERGAUX et al., 1999; KEHLFIE; SKAAR, 2010). Inclusive, mutações no gene *NRAMP1*, que codifica um transportador presente no fagolisossomo responsável pela retirada de metais dessa organela, está relacionado a maior susceptibilidade a diversos patógenos intracelulares (CANONNE-HERGAUX et al., 1999).

Na levedura modelo *S. cerevisiae*, a homeostase desse metal é controlada por transportadores da família NRAMP, Smf1p que se encontra na membrana plasmática e realiza o importe de manganês para o citoplasma e Smf2p que se localiza em vesículas intracelulares que funcionam como depósito de metais (CULOTTA; YANG; HALL, 2005). Para diminuição dos níveis intracelulares de manganês a levedura conta, principalmente, com os transportadores Pmr1p, Cc1p e Vcx1p que são capazes de exportar o metal em excesso para dentro de organelas (CULOTTA; YANG; HALL, 2005). Pmr1p é considerado o principal exportador de manganês em condições de intoxicação pelo metal. O transportador ativamente diminui os níveis citoplasmáticos do metal ao bombear ele para o Golgi, onde pode ser utilizado por enzimas transferase de açúcar ou ser eliminado por exocitose (CULOTTA; YANG; HALL, 2005). Dessa

forma, Pmr1p e Atx2p possuem papéis contrários, visto que um transporta manganês do citoplasma para o Golgi e o outro o retira da organela e importa para o citoplasma (LIN; CULOTTA, 1996).

1.7 Justificativa

Considerando que mutantes nulos do gene *ZIP3* de *C. gattii* (*zip3Δ*) apresentam: (I) decréscimo na expressão de SOD2 e SOD1; (II) maior sensibilidade a espécies reativas de oxigênio *in vitro* (GARCIA; STAATS, dados não publicados); (III) que a linhagem nula para SOD2 (*sod2Δ*) de *C. gattii* foi considerada avirulenta em modelo murino (NARASIPURA; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2005), é possível hipotetizar que a proteína Zip3p participe na virulência de *C. gattii*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação de Zip3 na virulência de *C. gattii* em distintos modelos experimentais de criptococose.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de ausência do gene *ZIP3* na sobrevivência de *C. gattii* em linhagens de macrófagos
- Avaliar a influência de ausência do gene *ZIP3* na sobrevivência de *C. gattii* na ameba *Acanthamoeba castellanii*
- Avaliar a influência de ausência do gene *ZIP3* na virulência de *C. gattii* em *Galleria mellonella*

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Análise da participação do transportador *ZIP3* na virulência de *Cryptococcus gattii*” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *Microbes and Infection* (Anexo A).

Análise da participação do transportador *ZIP3* na virulência de *Cryptococcus gattii*

Uriel Perin Kinskovski^a, Ane Wichine Acosta Garcia^a, Helber Barboza Pinto^c, Danielle da Silva Trentin^c, Livia Kmetzsch^{ab}, Marilene Henning Vainstein^{ab}, Charley Christian Staats^{ab*}.

^a Centro de Biotecnologia e ^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brasil

^c Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite 245, Porto Alegre, RS 90050-170, 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

3.1 Resumo

Criptococose é uma micose sistêmica que acomete, principalmente, indivíduos imunocomprometidos e possui uma alta incidência na África subsaariana e Ásia. Um dos mecanismos utilizados por macrófagos do hospedeiro contra patógenos intracelulares é o controle da biodisponibilidade de nutrientes, estratégia denominada imunidade nutricional. O patógeno, em meio a privação de nutrientes, expressa transportadores de alta afinidade para captar metais do hospedeiro e causar a infecção. ZIP é uma família de transportadores de zinco, ferro e manganês conservada entre os três domínios da vida e está relacionada ao aumento dos níveis desses metais no citoplasma. Análises *in silico* demonstraram que o gene *ZIP3* de *Cryptococcus gattii* é ortólogo a *ATX2* de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica uma proteína presente no Golgi e relacionada com o transporte de manganês para o citoplasma. Com o intuito de avaliar a participação de Zip3 na virulência de *C. gattii*, distintos modelos de fagócitos, como células de macrófagos de murinos ou a ameba *Acanthamoeba castellanii*, foram expostas à células das linhagens selvagem ou mutante nulo para o gene *ZIP3* de *C. gattii*, sendo avaliada a taxa de fagocitose e o índice de replicação intrafagossômico. Para avaliação da influência do transportador Zip3 na virulência de *C. gattii* *in vivo*, realizou-se uma curva de sobrevivência no modelo inseto de *Galleria mellonella*. Não foi observada diferença na capacidade de replicação intracelular em nenhum dos modelos testados quando comparadas a linhagem selvagem e o mutante nulo para o gene *ZIP3*. Ainda, não parece haver envolvimento significativo do transportador Zip3 na virulência de *Cryptococcus gattii* pois não foi observada diferença no modelo de infecção de *Galleria mellonella*.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; imunidade nutricional; *Galleria mellonella*; ZIP.

3.2 Introdução

Cryptococcus gattii é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica emergente que afeta mais de 220 mil pacientes por ano e possui uma alta mortalidade associada [1]. Conhecido por sua capacidade de infectar tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes, esse patógeno causa, primeiramente, doença pulmonar, podendo, posteriormente se disseminar para o sistema nervoso central, tendo como resultado principal o quadro de meningoencefalite [2].

Nesse contexto, macrófagos alveolares são tidos como a primeira linha de defesa do hospedeiro, que, por meio da fagocitose, expõem as leveduras patogênicas a um ambiente hostil, caracterizado por um pH ácido, presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio e peptídeos antimicrobianos [3,4]. No entanto, as leveduras de *C. gattii* podem sobreviver e proliferar no interior de macrófagos, podendo ainda sair desses sem causar lesões aparentes [5,6]. Dentre as estratégias empregadas pelas células fagocíticas está o controle da biodisponibilidade de nutrientes, a qual denomina-se imunidade nutricional, e é essencial para eliminação de diversos patógenos [7]. Metais de transição como ferro, zinco, manganês e cobre são de extrema importância para a fisiologia de todos os seres vivos, dessa forma, tornando-se um alvo interessante de modulação pela célula do hospedeiro [8,9].

Níveis intracelulares de metais são estritamente regulados em células eucarióticas por transportadores de íons e metaloproteínas. Ao mesmo tempo que a célula fagocítica expressa proteínas com finalidade de sequestrar metais do patógeno, o mesmo expressa transportadores de alta afinidade para adquirir esses nutrientes do hospedeiro e causar a infecção [7,10]. Uma família de transportadores bem conservada e já descrita em diversos modelos é a ZIP [11,12]. Tratam-se de proteínas

presentes na membrana plasmática ou na membrana de organelas e são responsáveis pelo transporte de zinco, manganês e ferro em direção ao citoplasma. Nosso grupo já descreveu o papel dos transportadores Zip1p e Zip2p no importe de zinco do meio extracelular e seu impacto na virulência de *C. gattii* [13].

Análises in silico demonstraram que *ZIP3* de *C. gattii* é ortólogo de *ATX2* da levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, cujo produto é descrito como uma proteína presente no Golgi, responsável pelo transporte de manganês para o citoplasma [14]. Manganês é um metal de transição de grande importância para os seres vivos, visto que é cofator de diversas enzimas como oxidases, desidrogenases, polimerases de DNA e RNA, quinases e transferases de açúcar [15]. Uma das isoformas de superóxido dismutase (*SOD2*), enzima responsável pela destoxificação por radicais livres de oxigênio em eucariotos, utiliza manganês como cofator [14]. *C. gattii* também expressa *SOD2*, o que o torna mais resistente as ROS geradas pelos macrófagos do hospedeiro [16].

Dados não publicados do nosso grupo demonstram que mutantes nulos do gene *ZIP3* de *C. gattii* (*zip3Δ*) apresentam decréscimo na expressão dos genes *SOD1* e *SOD2*, bem como uma maior sensibilidade a ROS in vitro. Além disso, foi observado que mutantes nulos para *SOD2* (*sod2Δ*) foram incapazes de causar infecção em modelo murino [17]. Nesse contexto, esse trabalho visa avaliar a participação do transportador Zip3 de *C. gattii* na virulência desse patógeno in vitro e in vivo.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens celulares J774.16 e RAW 264.7 de macrófagos murinos foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen) acrescido de soro fetal bovino inativado por calor (10%) e complementado com 1% de piruvato de sódio (100 mM), 1% de L-glutamina (200 mM), 1% de tampão HEPES, 1% de MEM (aminoácidos não essenciais), penicilina 20 U/mL e estreptomicina 20 µg/mL. O cultivo celular foi mantido incubado a 37°C em ambiente umidificado e na presença de 5% de CO₂.

A cepa R265 e os mutantes nulos *zip3Δ.1* e *zip3Δ.2* de *C. gattii* foram mantidos em ágar YPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura).

Para o ensaio com amebas, a linhagem Neff (ATCC 30010) de *Acanthamoeba castellanii*, foi cultivada em meio PYG (peptona, extrato de levedura, glicose) acrescido de penicilina 20 U/mL e estreptomicina 20 µg/mL e incubada a 30°C.

3.3.2 Experimento de interação macrófago-Cryptococcus

Macrófagos da linhagem J774.16 ou RAW 264.7 foram semeados em placa de 96 poços, na quantidade de 10⁶ células por poço e pré-ativados com IFN-γ murino (100U/mL) e LPS (500ng/mL) *overnight*. As linhagens de *C. gattii* foram cultivadas em meio YPD a 30°C em plataforma giratória (200 rpm) por 18 horas. Após sua replicação, as células de *C. gattii* foram lavadas 3 vezes com PBS e um total de 10⁷ células foram opsonizadas com anticorpo anti-GXM 18B7 (1µg/mL) a 37°C por 1 hora. Foram adicionados células da linhagem R265 ou das linhagens *zip3Δ* opsonizados na quantidade de 10⁶ células por poço e foi permitida a interação por 2 horas. Ao final do tempo, os sistemas foram lavados com PBS 3 vezes para remoção das leveduras não internalizadas e um sistema foi lisado com uma solução de PBS adicionada de Triton X-100 0,1%. Diluições do lisado foram semeadas em ágar YPD para determinação da

taxa de fagocitose pela contagem das unidades formadoras de colônia (CFU). Outro sistema foi, então, incubado com meio DMEM a 37°C em ambiente umidificado e na presença de 5% de CO₂ por 24 horas. Transcorrido esse tempo, o sistema foi lavado 3 vezes com PBS e lisado, diluições do lisado foram semeadas em ágar YPD para determinação de CFU. Para avaliação do índice de replicação intrafagossômica (IPR), os valores obtidos ao final do tempo de 24 horas foram normalizados pelo número de leveduras internalizadas no tempo de 2 horas, determinado pelo número de CFU.

3.3.3 Experimento de interação ameba-Cryptococcus

As linhagens de *C. gattii* foram cultivadas em meio YPD a 30°C em plataforma giratória (200 rpm) por 18 horas. Após o crescimento, as células foram lavadas e contadas. Foram semeadas 10⁵ células de *A. castellanii* por poço em placa de 96 poços, bem como 10⁶ células da linhagem R265 ou das linhagens *zip3Δ* e foi permitida a interação por 3 horas a 30°C. Após esse tempo, foi determinada a taxa de fagocitose e o IPR pelo mesmo método descrito acima.

3.3.4 Análise estatística

Dados foram expressos como média ± desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados sob 3 condições experimentais, cada uma com triplicata técnica. Análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6, utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Turkey.

3.3.5 Análise da virulência em *Galleria mellonella*

As larvas de *G. mellonella* utilizadas nesse experimento foram gentilmente cedidas pela Prof. Danielle da Silva Trentin (UFCSPA). Larvas no último estágio larval ínstar pesando entre 220 a 260 mg foram selecionadas para o experimento e separadas em grupos de 10. As linhagens de *C. gattii* foram cultivadas em meio YPD a 30°C em plataforma giratória (200 rpm) por 18 horas. Após a replicação das

leveduras, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foram preparadas suspensões de 10^8 células/mL. Utilizando uma seringa Hamilton-10 μ L, 10^6 células de *C. gattii* R265 ou *zip3* Δ foram inoculadas na hemocele do inseto via última *pro-leg*. Um grupo de 10 larvas foi inoculado com PBS estéril para monitoramento de possíveis efeitos na sobrevivência devido a danos da inoculação. Após a injeção, as larvas foram incubadas em placas de Petri a 37°C e monitoradas diariamente para mortalidade por 7 dias. As larvas eram consideradas mortas quando não demonstravam nenhum movimento após toque. A curva de sobrevivência foi grafada e a estimativa de diferença na sobrevivência foi analisada pelo método Log-rank (Mantel-Cox) no *software* GraphPad Prism 6.

3.4 Resultados

Como análise preliminar, utilizamos uma linhagem celular de macrófagos murinos para avaliar o papel do transportador *zip3p* na virulência de *C. gattii* in vitro. Para isso, a linhagem R265 selvagem ou nula para o gene *ZIP3* (*zip3Δ*) foi co-cultivada com a linhagem de macrófago murino peritonial J774.16. Após duas horas de interação, tempo descrito como necessário e suficiente para que ocorra o evento de fagocitose [18], pode-se observar uma menor taxa de fagocitose das duas linhagens deletadas quando comparadas a linhagem selvagem (Fig. 1A). No entanto, ao tempo de 24 horas as leveduras não são capazes de se replicar propriamente no interior dos macrófagos, visto que o número de células recuperadas foi menor do que no tempo de duas horas. Quando comparadas, após normalização pelo número de células recuperadas em 2 horas, não há diferença significativa entre a linhagem *zip3Δ.2* e a selvagem (Fig. 1B). A diferença observada entre a linhagem *zip3Δ.1* e R265 não foi observada nas repetições do experimento, nem nos demais modelos testados, dessa forma sendo desconsiderada.

Para avaliar se esse comportamento era conservado entre linhagens de macrófagos diferentes, utilizou-se a linhagem diferenciada de sangue RAW 264.7. De forma semelhante, ambas linhagens *zip3Δ* apresentaram uma menor taxa de fagocitose após duas horas de interação (Fig. 2A). Não foi observada diferença significativa no índice de replicação intrafagossômica entre as linhagens mutantes e a selvagem, no entanto o número de leveduras recuperadas foi drasticamente menor do que para a linhagem J774.16, podendo indicar uma maior eficiência da linhagem RAW 264.7 na eliminação de *Cryptococcus* (Fig. 2B).

Amebas ambientais, como *A. castellanii*, representam um importante reservatório para as espécies de *Cryptococcus*, visto que ambos podem habitar o

mesmo nicho e as leveduras são capazes de se reproduzir no interior das amebas [19]. Um perfil semelhante ao observado para as linhagens murinas pode ser observado por *A. castellanii*, visto que após 3 horas de interação houve uma redução significativa na fagocitose das duas linhagens *zip3Δ* quando comparadas a linhagem R265 (Fig. 3A). Embora exista uma tendência ao aumento do IPR das linhagens nulas para o transportador *zip3p* em amebas, não foi observada diferença estatística entre as mesmas e a linhagem selvagem em nenhuma das repetições do experimento (Fig. 3B).

Para avaliação da participação do transportador *zip3p* na virulência de *C. gattii* in vivo foi escolhido o modelo de infecção inseto de *Galleria mellonella*. O modelo apresenta diversas vantagens como facilidade e custo de manutenção, ciclo de vida rápido, reprodução em larga escala e não necessitar de aprovação por um comitê de ética. Embora pode-se avaliar uma influência do transportador na fagocitose in vitro em diversos modelos, as linhagens nulas *zip3Δ* não diferiram, de forma significativa, da linhagem selvagem R265 na mortalidade das larvas (Fig. 4).

3.5 Discussão

A levedura *C. gattii* pode ser considerada um patógeno intracelular facultativo, uma vez que pode se desenvolver no interior de células fagocíticas do hospedeiro bem como no parênquima extracelular. Macrófagos alveolares constituem a primeira linha de defesa contra esses patógenos inalados e são responsáveis pela resposta aguda a infecção [20]. Diversos estudos demonstraram a eficácia da redução de metais disponíveis para o patógeno na contenção de infecções fúngicas [21]. Os transportadores *ZIP1* e *ZIP2* demonstraram papel importante na virulência de *C. gattii* e *C. neoformans* através da modulação da aquisição de zinco, permitindo a proliferação desses patógenos mesmo em condições de restrição de nutrientes [13,22]. No entanto, *ZIP3* não parece estar envolvido na homeostase de zinco mas sim de manganês.

Observou-se que em nenhuma das linhagens de macrófagos murinas utilizadas houve diferença na virulência dos mutantes *zip3Δ* quando comparados a linhagem selvagem, visto que não houve alteração na proliferação intracelular. (Fig. 1B; Fig. 2B). Um dos mecanismos utilizados por macrófagos para eliminação de patógenos intracelulares é a produção de ROS, os quais são poderosos oxidantes que podem causar danos em diversas estruturas celulares [3]. Células eucarióticas possuem diversas defesas antioxidantes para conseguir lidar com as ROS geradas pela sua respiração celular e de origem exógena, dentre as quais se destacam as SODs. De maneira geral, os eucariotos possuem duas isoformas dessa enzima, uma presente no citoplasma e que utiliza zinco e cobre como cofator (*SOD1*), e uma dependente de manganês presente na mitocôndria (*SOD2*) [23].

Observamos previamente que as linhagens *zip3Δ* apresentavam uma expressão reduzida de ambas as isoformas da enzima SOD, e essa redução era

acompanhada de maior sensibilidade a ROS in vitro [Garcia e Staats, não publicado]. A redução na expressão das enzimas pode ser consequência da menor disponibilidade de cofatores para o funcionamento das mesmas. Além disso, manganês é um íon redox-ativo que, quando em maior quantidade no citoplasma, é capaz de promover o crescimento celular mesmo em condições de stress oxidativo [14]. Em *C. gattii*, *SOD1* apresenta um papel fundamental na expressão de fatores de virulência clássicos da levedura e *SOD2* se demonstrou essencial para o desenvolvimento a 37°C em condições aeróbicas e, conseqüentemente, para causar infecção em hospedeiros mamíferos [17,24]. No entanto, dano oxidativo não parece ser efetivo contra *Cryptococcus*, visto que camundongos nulos para NADPH-oxidase conseguem lidar melhor com a infecção, sugerindo que ROS resultante da inflamação é mais prejudicial ao próprio organismo que ao fungo [25]. Portanto, a maior sensibilidade a ROS observada pelas linhagens *zip3Δ* não se mostrou suficiente para promover sua eliminação no interior de macrófagos. Essa redução na defesa redox pode ser compensada por outros mecanismos no ambiente de infecção, como pelo aumento da cápsula polissacarídica, maior produção do pigmento antioxidante melanina ou pelos demais membros do sistema redox como catalases e glutathione peroxidases [26,27].

No entanto, foi possível observar uma redução na taxa de fagocitose das linhagens nulas por linhagens de macrófagos ativadas por IFN- γ e LPS (Fig 1A; Fig 2A). Os principais mediadores da fagocitose de *Cryptococcus* não opsonizado foram recentemente elucidados, tratam-se de polissacarídeos presentes na cápsula ou na parede celular da levedura que são caracterizados como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) [28]. Os PAMPs são reconhecidos por receptores reconhecedores de padrões (PRRs) por células do sistema imune, podendo então

induzir uma resposta de defesa do hospedeiro [29]. Sabe-se que a cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* possui capacidade imunomodulatória e é capaz de inibir a fagocitose na ausência de opsoninas [30–32]. A montagem da cápsula se dá de fora para dentro e a agregação de GXM capsular, principal componente da cápsula, é dependente de cátions divalentes [33,34]. Dessa forma, é possível que a ausência de *ZIP3* influencie, de forma indireta, na correta montagem da cápsula e, conseqüentemente, no reconhecimento e fagocitose das leveduras por macrófagos.

Amebas de vida livre são predadores naturais de *Cryptococcus sp.* e apresentam propriedades fagocíticas semelhantes às de macrófagos mamíferos, utilizando-se de mecanismos semelhantes para a eliminação dos mesmos [19,35]. Não foi possível observar diferença na virulência das linhagens nulas *zip3Δ* no modelo de infecção de *A. castellanii*. No entanto, o mesmo perfil de menor fagocitose analisado nos macrófagos murinos pode ser no modelo de ameba. Esse resultado demonstra que a redução da fagocitose dos mutantes *zip3Δ* não é dependente de opsoninas, devendo se dar por alguma alteração nos mediadores de fagocitose da levedura.

Apesar de não haver envolvimento de Zip3 na virulência de *C. gattii* in vitro, pode-se observar uma redução na sua fagocitose nos três modelos testados. Visto que *Cryptococcus* parece se desenvolver melhor no ambiente intracelular e que a depleção de macrófagos alveolares ou o uso de inibidores de fagocitose estão relacionados a uma maior sobrevivência do hospedeiro, pode-se hipotetizar que o produto do gene *ZIP3* influencie na virulência de *C. gattii* in vivo [28,36,37]. As larvas de *G. mellonella* são amplamente utilizadas em ensaios de virulência de microrganismos e avaliação de ação de drogas microbicidas in vivo [38]. Embora não possuam sistema imune adaptativo, apresentam uma resposta imune inata muito

semelhante a de vertebrados e toleram a temperatura de 37°C, mimetizando a temperatura corporal de hospedeiros mamíferos [39]. Entretanto, não houve diferença na sobrevivência das larvas quando infectadas pelas linhagens *zip3Δ* comparadas a linhagem selvagem.

Dessa forma, apesar de influenciar na homeostase de manganês e, indiretamente, na resposta celular de *C. gattii* a estressores oxidativos, *ZIP3* não parece ser importante para a virulência da levedura. Há diversas estratégias utilizadas por células eucarióticas para se defender de ROS que podem compensar a menor disponibilidade de manganês e menor expressão das enzimas SOD. Assim como outros fungos e bactérias, *Cryptococcus sp.* produz o pigmento melanina, importante fator de virulência, que é capaz de estabilizar radicais livres e absorver radiação eletromagnética, protegendo a levedura de ROS gerados pelo hospedeiro e da radiação ambiental [26,40,41]. Além disso, evidências sugerem que ROS não são eficientes para eliminação de *Cryptococcus sp.* in vivo, mas espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) gerado por macrófagos, apresentam um papel protetor contra as leveduras [25,42].

3.6 Figuras

Figura 1

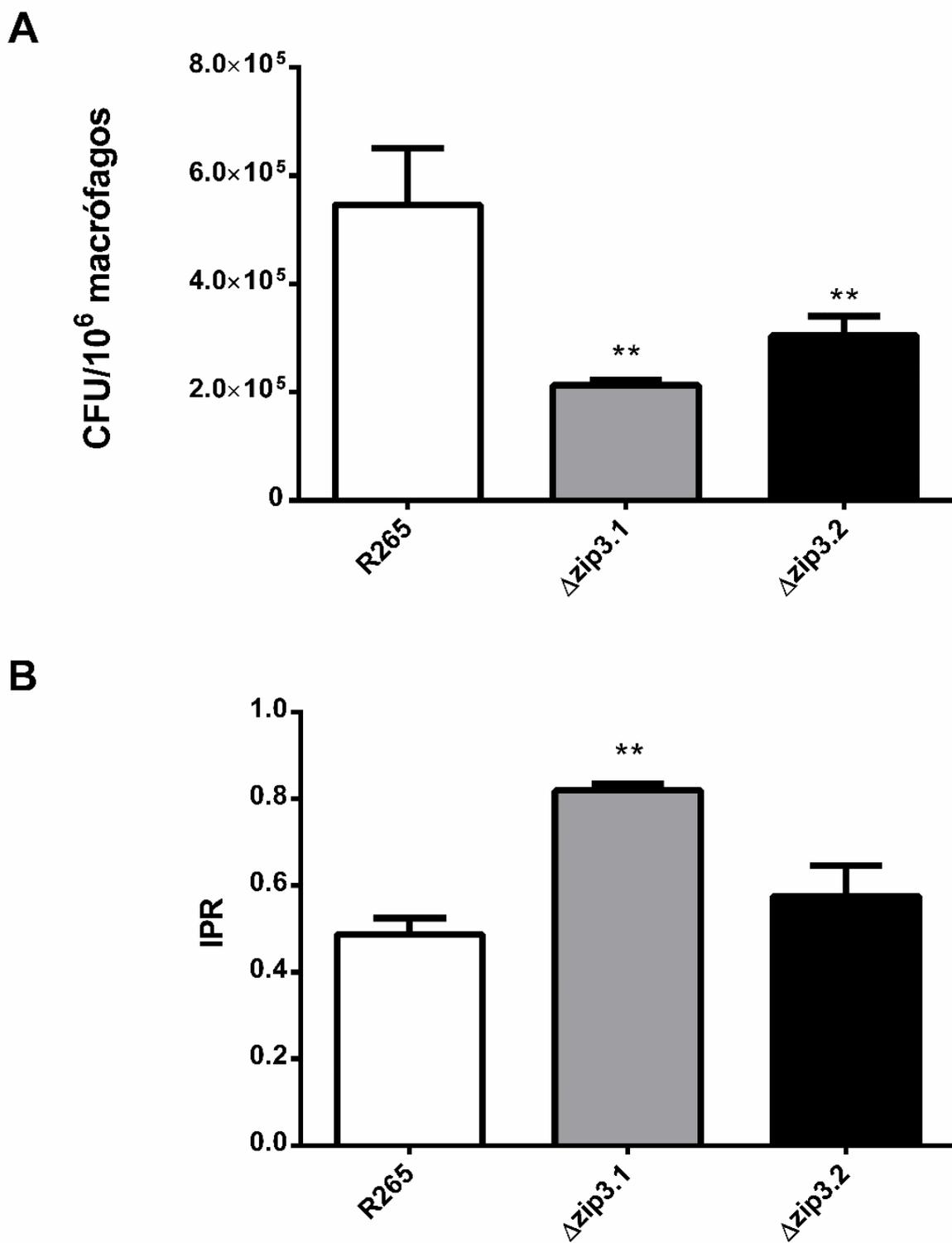
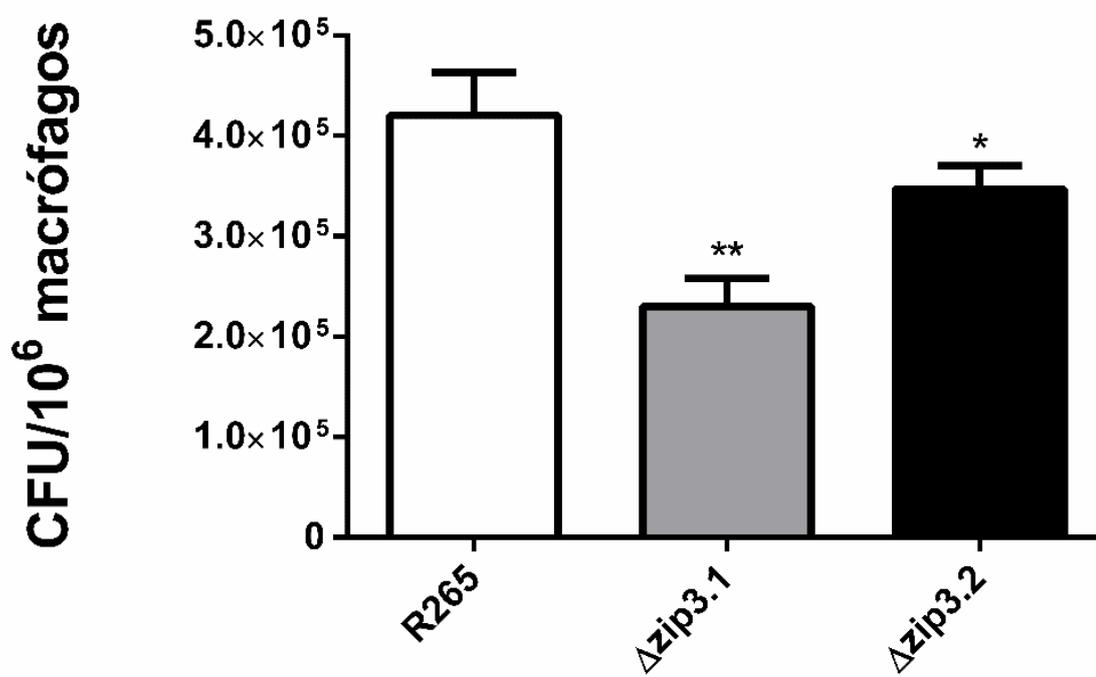


Figura 2

A



B

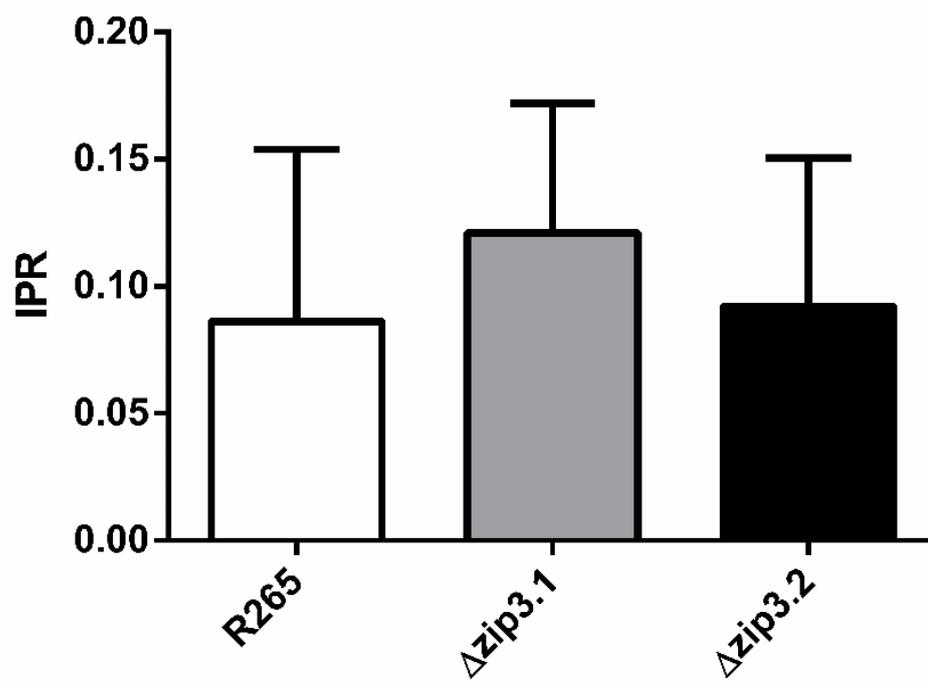


Figura 3

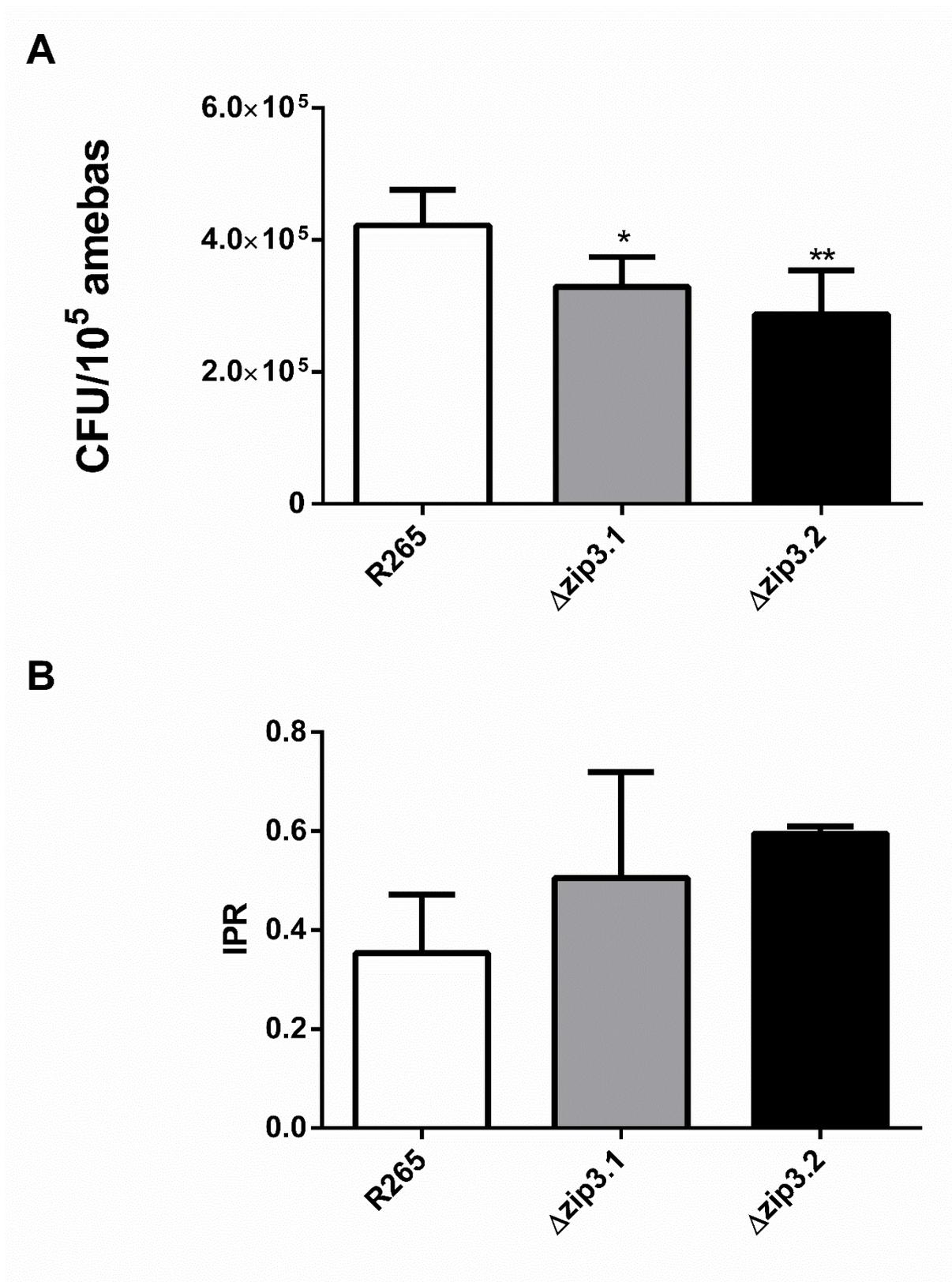
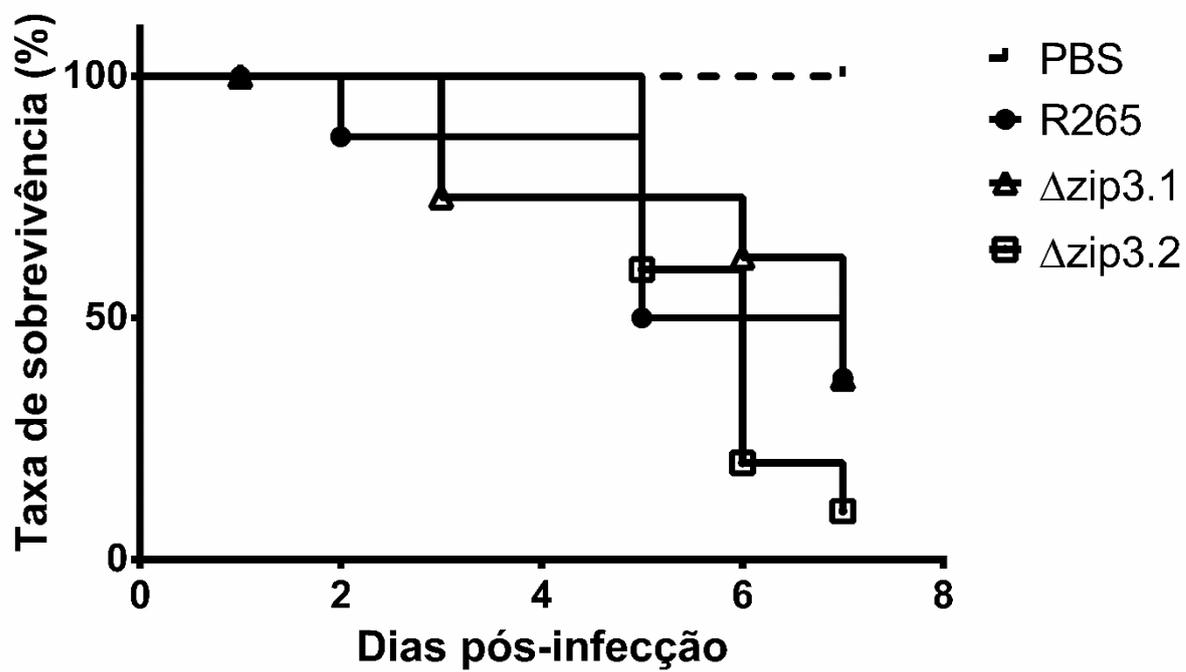


Figura 4



3.7 Legendas das figuras

Figura 1: Zip3 influencia na taxa de fagocitose de *C. gattii* pela linhagem J774.16.

(A) Ensaio de fagocitose in vitro utilizando a linhagem de macrófagos murinos J774.16 ativada com IFN- γ e LPS e a linhagem selvagem (R265) ou as linhagens *zip3* Δ de *C. gattii*. Após duas horas de interação, os macrófagos foram lisados e diluições do lisado foram plaqueadas em YPD ágar para determinação da taxa de fagocitose por contagem de CFU. (B) Após a fagocitose, foram removidas as leveduras não internalizadas e o sistema foi incubado a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 24 horas. Transcorrido esse tempo, os macrófagos foram lisados e houve determinação da carga fúngica intracelular por contagem de CFU. Análises estatísticas realizadas utilizando teste ANOVA de uma via. (**) $p \leq 0.01$. Análises representadas por ** se referem às comparações com a linhagem selvagem (R265).

Figura 2: Zip3 influencia na taxa de fagocitose de *C. gattii* pela linhagem RAW 264.7.

(A) Ensaio de fagocitose in vitro utilizando a linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 ativada com IFN- γ e LPS e as linhagens *zip3* Δ de *C. gattii* e a linhagem selvagem (R265). Após duas horas de interação, os macrófagos foram lisados e diluições do lisado foram plaqueadas em YPD ágar para determinação da taxa de fagocitose por contagem de CFU. (B) Após a fagocitose, foram removidas as leveduras não internalizadas e o sistema foi incubado a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 24 horas. Transcorrido esse tempo, os macrófagos foram lisados e houve determinação da carga fúngica intracelular por contagem de CFU. Análises estatísticas realizadas utilizando teste ANOVA de uma via. (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$. Análises representadas por * se referem às comparações com a linhagem selvagem (R265).

Figura 3: Zip3 influencia na taxa de fagocitose de *C. gattii* por *A. castellanii*. (A) Ensaio de fagocitose in vitro utilizando a ameba *A. castellanii* e a linhagem selvagem (R265) ou as linhagens *zip3* Δ de *C. gattii*. Após três horas de interação, as amebas foram lisados e diluições do lisado foram plaqueadas em YPD ágar para determinação da taxa de fagocitose por contagem de CFU. (B) Após a fagocitose, foram removidas as leveduras não internalizadas e o sistema foi incubado a 30°C por 24 horas. Transcorrido esse tempo, as amebas foram lisados e houve determinação da carga fúngica intracelular por contagem de CFU. Análises estatísticas realizadas utilizando teste ANOVA de uma via. (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$. Análises representadas por * se referem às comparações com a linhagem selvagem (R265).

Figura 4: Zip3 não influencia a virulência de *C. gattii* no modelo de infecção de *Galleria mellonella*. Utilizou-se 10 larvas de *G. mellonella* pesando entre 220 e 260 mg por condição. Foram inoculadas 10^6 células de *C. gattii* selvagem ou *zip3* Δ na hemocele das larvas via última *pro-leg*. PBS foi utilizado como controle do veículo. Após a injeção as larvas foram incubadas a 37°C por 7 dias e avaliadas quanto a mortalidade diariamente. As larvas eram consideradas mortas quanto não respondiam ao toque. A estimativa de diferença na sobrevivência foi analisada pelo método Log-rank (Mantel-Cox).

3.8 Referências

- [1] Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 2017;17:873–81. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
- [2] Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu Rev Microbiol* 2006;60:69–105. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102.
- [3] Underhill DM, Pearlman E. Immune Interactions with Pathogenic and Commensal Fungi: A Two-Way Street. *Immunity* 2015;43:845–58. doi:10.1016/j.immuni.2015.10.023.
- [4] Johnston SA, May RC. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cell Microbiol* 2013;15:403–11. doi:10.1111/cmi.12067.
- [5] Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3165–70. doi:10.1073/pnas.052702799.
- [6] Alvarez M, Casadevall A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. *Curr Biol* 2006;16:2161–5. doi:10.1016/j.cub.2006.09.061.
- [7] Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:10.1038/nrmicro2836. doi:10.1038/nrmicro2836.
- [8] Bleackley MR, MacGillivray RTA. Transition metal homeostasis: from yeast to

- human disease. *BioMetals* 2011;24:785–809. doi:10.1007/s10534-011-9451-4.
- [9] Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14:218–24. doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.008.
- [10] Crawford A, Wilson D. Essential metals at the host–pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res* 2015;15:fov071. doi:10.1093/femsyr/fov071.
- [11] Guerinot M Lou. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2000;1465:190–8. doi:https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3.
- [12] Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian L V. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *J Exp Bot* 2013;64:369–81. doi:10.1093/jxb/ers315.
- [13] Schneider R de O, Diehl C, dos Santos FM, Piffer AC, Garcia AWA, Kulmann MIR, et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. *Sci Rep* 2015;5:10104. doi:10.1038/srep10104.
- [14] Lin SJ, Culotta VC. Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol* 1996;16:6303–12.
- [15] Culotta VC, Yang M, Hall MD. Manganese Transport and Trafficking: Lessons Learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2005;4:1159–65. doi:10.1128/EC.4.7.1159-1165.2005.
- [16] Fréal E, Noël C, Viscogliosi E, Camus D, Dei-Cas E, Delhaes L. Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: An issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:411–

22. doi:10.1016/j.femsim.2005.06.003.
- [17] Narasipura SD, Chaturvedi V, Chaturvedi S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol* 2005;55:1782–800. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04503.x.
- [18] Nicola AM, Casadevall A. In Vitro Measurement of Phagocytosis and Killing of *Cryptococcus neoformans* by Macrophages. In: Ashman RB, editor. *Leucocytes Methods Protoc.*, Totowa, NJ: Humana Press; 2012, p. 189–97. doi:10.1007/978-1-61779-527-5_14.
- [19] Greub G, Raoult D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:413–33. doi:10.1128/CMR.17.2.413-433.2004.
- [20] Shao X, Mednick A, Alvarez M, van Rooijen N, Casadevall A, Goldman DL. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *J Immunol* 2005;175:3244–51.
- [21] Malavia D, Crawford A, Wilson D. Nutritional Immunity and Fungal Pathogenesis: The Struggle for Micronutrients at the Host–Pathogen Interface. *Adv Microb Physiol* 2017;70:85–103. doi:10.1016/BS.AMPBS.2017.01.006.
- [22] Do E, Hu G, Caza M, Kronstad JW, Jung WH. The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2016;54:605–15. doi:10.1093/mmy/myw013.
- [23] Dias A, Brigagão M, Colepicolo P, Siqueira A, Silva E da, Paula C. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubi*, and *neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:107–9. doi:10.1590/S0074-02762006000100021.
- [24] Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A, et

- al. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun* 2003;71:173–80. doi:10.1128/IAI.71.1.173-180.2003.
- [25] Snelgrove RJ, Edwards L, Williams AE, Rae AJ, Hussell T. In the absence of reactive oxygen species, T cells default to a Th1 phenotype and mediate protection against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 2006;177:5509–16.
- [26] Wang Y, Casadevall A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun* 1994;62:3004–7.
- [27] Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* 2008;10:2043–57. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x.
- [28] Lim J, Coates CJ, Seoane PI, Garelnabi M, Taylor-Smith LM, Monteith P, et al. Characterizing the Mechanisms of Nonopsonic Uptake of Cryptococci by Macrophages. *J Immunol* 2018.
- [29] Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Front Microbiol* 2016;7:105. doi:10.3389/fmicb.2016.00105.
- [30] Kozel TR. Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Arch Med Res* 1993;24:211–8.
- [31] Ellerbroek PM, Walenkamp AME, Hoepelman AIM, Coenjaerts FEJ. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte

- migration and inflammatory mediators. *Curr Med Chem* 2004;11:253–66.
- [32] Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Chow S-K, Bistoni F, Cenci E, et al. Cryptococcus neoformans galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:997–1005. doi:10.2217/imt.11.86.
- [33] Nimrichter L, Frases S, Cinelli LP, Viana NB, Nakouzi A, Travassos LR, et al. Self-aggregation of Cryptococcus neoformans capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot Cell* 2007;6:1400–10. doi:10.1128/EC.00122-07.
- [34] Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, et al. Vesicular polysaccharide export in Cryptococcus neoformans is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 2007;6:48–59. doi:10.1128/EC.00318-06.
- [35] Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15245–50. doi:10.1073/pnas.261418798.
- [36] Bojarczuk A, Miller KA, Hotham R, Lewis A, Ogryzko N V, Kamuyango AA, et al. Cryptococcus neoformans Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. *Sci Rep* 2016;6:21489. doi:10.1038/srep21489.
- [37] Kechichian TB, Shea J, Del Poeta M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of Cryptococcus neoformans in immunodeficient mice. *Infect Immun* 2007;75:4792–8. doi:10.1128/IAI.00587-07.

- [38] Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2016;7:214–29. doi:10.1080/21505594.2015.1135289.
- [39] Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 2014;9:e105076. doi:10.1371/journal.pone.0105076.
- [40] Dadachova E, Bryan RA, Howell RC, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:192–9. doi:10.1111/j.1755-148X.2007.00430.x.
- [41] Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol* 2009;17:406–13. doi:10.1016/j.tim.2009.06.006.
- [42] Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun* 1991;59:2291–6.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Embora os resultados obtidos anteriormente sugerissem uma alteração na homeostase de manganês e um desbalanço redox nas células nulas para *ZIP3*, o mesmo não é importante para a virulência de *C. gattii*, visto que não foi observada alteração em nenhum dos modelos testados. Entretanto, *ZIP3* pode estar envolvido, de maneira indireta, na montagem correta da cápsula polissacarídica ou envolvido com a apresentação de algum PAMP fúngico, pois, em todos os modelos avaliados, houve uma redução da fagocitose.

Como perspectivas espera-se avaliar a integridade da cápsula polissacarídica por microscopia eletrônica de varredura, além de quantificar GXM secretado nas linhagens nulas. Pode-se, ainda, avaliar os outros PAMPs mais bem estudados, como quitina e β -Glicano. Para compreender-se como a célula reage a *stress* oxidativo na condição de menor expressão das SODs, pode-se avaliar os possíveis fatores compensatórios, como a cápsula polissacarídica, produção do pigmento melanina e expressão de enzimas de atividade antioxidante como catalases e glutational peroxidases.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology**, [s. l.], v. 16, n. 21, p. 2161–2165, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.061>>. Acesso em: 22 nov. 2017.
- ANGKASEKWINAI, P. et al. *Cryptococcus gattii* Infection Dampens Th1 and Th17 Responses by Attenuating Dendritic Cell Function and Pulmonary Chemokine Expression in the Immunocompetent Hosts. **Infection and Immunity**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 82, n. 9, p. 3880–3890, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187835/>>
- BELAY, T. et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by dot enzyme assay. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 34, n. 2, p. 466–470, 1996.
- BLEACKLEY, M. R.; MACGILLIVRAY, R. T. A. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. **BioMetals**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 785–809, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10534-011-9451-4>>
- BROPHY, M. B.; NOLAN, E. M. Manganese and microbial pathogenesis: sequestration by the Mammalian immune system and utilization by microorganisms. **ACS chemical biology**, United States, v. 10, n. 3, p. 641–651, 2015.
- CANONNE-HERGAUX, F. et al. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. **Proceedings of the Association of American Physicians**, United States, v. 111, n. 4, p. 283–289, 1999.
- CHEN, S. C.-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187630/>>
- CHENG, P.-Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, United States, v. 77, n. 10, p. 4284–4294, 2009.
- CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS pathogens**, United States, v. 7, n. 5, p. e1002047, 2011.
- COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, England, v. 39, n. 1, p. 166–175, 2001.
- CRAWFORD, A.; WILSON, D. Essential metals at the host–pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. fov071, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629794/>>

CULOTTA, V. C.; YANG, M.; HALL, M. D. Manganese Transport and Trafficking: Lessons Learned from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 1159–1165, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168969/>>

DADACHOVA, E. et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment cell & melanoma research**, England, v. 21, n. 2, p. 192–199, 2008.

DEMPSKI, R. E. Chapter Nine - The Cation Selectivity of the ZIP Transporters. In: ARGÜELLO, J. M.; LUTSENKO, S. (Eds.). **Current Topics in Membranes**. [s.l.] : Academic Press, 2012. v. 69p. 221–245.

DERENGOWSKI, L. da S. et al. The Transcriptional Response of *Cryptococcus neoformans* to Ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and Macrophages Provides Insights into the Evolutionary Adaptation to the Mammalian Host. **Eukaryotic Cell**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 12, n. 5, p. 761–774, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647765/>>

DIAZ-OCHOA, V. E. et al. Transition metal ions at the crossroads of mucosal immunity and microbial pathogenesis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Switzerland, v. 4, p. 2, 2014.

DJOKO, K. Y. et al. The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 31, p. 18954–61, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26055706>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

DO, E. et al. The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 605–615, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943159/>>

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

EISENMAN, H. C. et al. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. **Virulence**, United States, v. 5, n. 5, p. 611–618, 2014.

ELLERBROEK, P. M. et al. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Current medicinal chemistry**, United Arab Emirates, v. 11, n. 2, p. 253–266, 2004.

FEDER, V. et al. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **The FEBS journal**, England, v. 282, n. 8, p. 1406–1418, 2015.

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

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136835/>>

FRÉALLE, E. et al. Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: An issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 411–422, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2005.06.003>>

GARCÍA-RODAS, R. et al. Cryptococcus neoformans capsular enlargement and cellular gigantism during Galleria mellonella infection. **PLoS ONE**, [s. l.], 2011.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to Cryptococcus neoformans and C. gattii during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 78, p. 76–86, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503824/>>

GILES, S. S. et al. Cryptococcus neoformans mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryotic cell**, United States, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2005.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 413–433, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387402/>>

GRODSKY, J.; WANG, P. **Generation of Intersectin Homolog Cin1 Isoform-Specific Mutants in Pathogenic Fungus Cryptococcus neoformans**. [s.l: s.n.]. v. 1

GROVER, N. et al. Ecological niche of Cryptococcus neoformans var. grubii and Cryptococcus gattii in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 164, n. 4, p. 159–170, 2007.

GUERINOT, M. Lou. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1465, n. 1, p. 190–198, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273600001383>>

HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. The search for the natural habitat of Cryptococcus gattii. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 170, n. 4, p. 209–211, 2010.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 10.1038/nrmicro2836, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875331/>>

HUFFNAGLE, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Cells and cytokines in pulmonary cryptococcosis. **Research in immunology**, France, v. 149, n. 4–5, p. 384–387, 1998.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. Cryptococcus interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cellular microbiology**, England, v. 15, n. 3, p. 403–411, 2013.

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for

manganese and zinc. **Current opinion in chemical biology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 218–224, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847644/>>

KIMURA, T.; KAMBE, T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 336, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813198/>>

KOZEL, T. R. Oponization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Archives of medical research**, United States, v. 24, n. 3, p. 211–218, 1993.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. a019760, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066639/>>

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology**, Germany, v. 257, n. 2, p. 213–218, 1984.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 105, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746234/>>

LEOPOLD WAGER, C. M.; WORMLEY, F. L. J. Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. **Mucosal immunology**, United States, v. 7, n. 5, p. 1023–1035, 2014.

LEVITZ, S. M. et al. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infection and immunity**, United States, v. 67, n. 2, p. 885–890, 1999.

LI, S. S. et al. [Cryptococcosis--a common fungal infection in immunosuppressed patient]. **Proceedings of the American Thoracic Society**, Romania, v. 7, n. 3, p. 186–196, 2014.

LIN, S. J.; CULOTTA, V. C. Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 6303–12, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887660>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 69–105, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>>

LIU, T.-B.; PERLIN, D.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis.

Virulence, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 173–181, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396696/>>

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 106, n. 31, p. 12980–12985, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2722359/>>

MILNER, M. J. et al. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. **Journal of Experimental Botany**, UK, v. 64, n. 1, p. 369–381, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528025/>>

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123412/>>

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 3842–3850, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168598/>>

NARASIPURA, S. D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1782–1800, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2005.04503.x>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **mBio**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. e00103-12, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570277>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

NIMRICHTER, L. et al. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryotic cell**, United States, v. 6, n. 8, p. 1400–1410, 2007.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, United States, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, United States, v. 77, n. 9, p. 3749–3758, 2009.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal Infections in Non-Hiv-Infected Patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, [s. l.], v. 124, p. 61–79, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3715903/>>

PERICOLINI, E. et al. The microbial capsular polysaccharide galactoxylomannan inhibits IL-17A production in circulating T cells from rheumatoid arthritis patients. **PloS one**, United States, v. 8, n. 1, p. e53336, 2013.

PETTER, R. et al. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology (Reading, England)**, England, v. 147, n. Pt 8, p. 2029–2036, 2001.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 104, p. 513–521, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000300019&nrm=iso>

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)>

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryotic cell**, United States, v. 6, n. 1, p. 48–59, 2007.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1297–1313, 2012. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.12.102>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

SCHNEIDER, R. de O. et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 10104, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4423424/>>

SHAO, X. et al. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, v. 175, n. 5, p. 3244–3251, 2005.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **British journal of haematology**, England, v. 129, n. 5, p. 569–582, 2005.

SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 34, n. 5, p. 1253–1260, 1996.

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**, [s. l.], v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC65014/>>

STEPHEN, C. et al. British Columbia: Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 792–794, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339618/>>

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Cryptococcus neoformans induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model Galleria mellonella. **Virulence**, United States, v. 6, n. 1, p. 66–74, 2015.

TRILLES, L. et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the Cryptococcus neoformans/C. gattii species complex. **Medical mycology**, England, v. 50, n. 3, p. 328–332, 2012.

TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, United States, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of Cryptococcus neoformans in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 3165–3170, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122490/>>

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 492–502, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5570470/>>

VECCHIARELLI, A. et al. Cryptococcus neoformans galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, England, v. 3, n. 8, p. 997–1005, 2011.

VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 77, n. 8, p. 3450–7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487474>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

WALDRON, K. J. et al. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, England, v. 460, n. 7257, p. 823–830, 2009.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized Cryptococcus neoformans to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and immunity**, United States, v. 62, n. 7, p. 3004–3007, 1994.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of Cryptococcus neoformans. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, United States, v. 2, p. e99-107, 1997.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Annals of nutrition & metabolism**, Switzerland, v. 51, n. 4, p. 301–323, 2007.

WINTERS, M. S. et al. Metallomic Analysis of Macrophages Infected with

Histoplasma capsulatum Reveals a Fundamental Role for Zn in Host Defenses. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 202, n. 7, p. 1136–1145, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2932870/>>

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in Cryptococcus neoformans confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, England, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 2008.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans. **Advances in applied microbiology**, [s. l.], v. 68, p. 133–216, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2739887/>>

ZHANG, Y. et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent Cryptococcus neoformans H99. **The American journal of pathology**, United States, v. 175, n. 6, p. 2489–2500, 2009.

ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO "MICROBES & INFECTION"

Limit the abstract to 200 words or less; limit the text to 5000 words or less. A maximum of 50 references is allowed; and a maximum of 6 figures and tables (total) is allowed.

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

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

Use a font size of at least 12 points.

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

Number each chapter heading, starting with Introduction

Number lines continuously.

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

When referring to figures in the main text, "figure" is abbreviated to Fig. (e.g., Fig. 1).

When referring to tables, use Arabic numerals (e.g., Table 2).

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

Conventions:

Microorganisms

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

Note the space between the genus abbreviation and the species.

Units of measurement

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

Use of italic/roman type

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

Title page:

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

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

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

Each address is in a separate paragraph.

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

Abstract and keywords:

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

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

Abbreviations:

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

Main text of original reports:

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

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

Model for numbering of chapters

1. Introduction
2. Materials and methods
 - 2.1. Infection models

2.1.1. Mouse model

Titles in bold and subtitles in italic not bold

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

Acknowledgments: personal acknowledgments precede those of agencies and institutions.

References:

References are limited to 50

In main text

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

In reference list

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

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

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