

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

**ALÍCIA CORBELLINI PIFFER**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ZINCO NA**  
**IMUNIDADE INATA EM MODELO DE *Cryptococcus gattii***

**PORTO ALEGRE**  
**MAIO/2014**

**ALÍCIA CORBELLINI PIFFER**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ZINCO  
NA IMUNIDADE INATA EM MODELO 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 obtenção do título de Bacharela  
em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

**PORTO ALEGRE**

**MAIO/2014**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Charley Staats, pelo auxílio ao longo deste trabalho, pelos ensinamentos ao longo de toda a graduação e pela amizade construída. Obrigado por acreditar em mim e no meu potencial.

A professora Marilene Henning Vainstein que me acolheu no laboratório, acreditou em mim e me orientou durante os anos de iniciação científica.

A Lívia, que me acompanhou durante toda a iniciação científica, por me ajudar em todos os momentos que precisei de auxílio e estar sempre disposta a me ensinar. Obrigada pela amizade construída e pelo apoio e carinho de sempre.

A Caru por ser minha guia e mestre durante toda a minha iniciação científica, por todos os ensinamentos dentro do laboratório e fora dele. Obrigada pela amizade, pelo carinho e pela atenção que dedicou a mim, em todos os momentos, me tornaste uma pessoa e uma pesquisadora melhor.

Aos colegas e amigos do grupo, Fran, Rafa, Ane por todo o apoio e auxílio durante a realização deste trabalho, por me aguentarem nos momentos difíceis e me apoiarem em todos eles, pelos momentos de descontração e diversão.

Aos amigos e colegas do laboratório 220 e 217 pela amizade, pelos anos de convivência e pelos ensinamentos. Tenham certeza, todos vocês contribuíram com a realização deste trabalho e acrescentaram muito em mim.

Aos amigos que construí durante a graduação por estarem presentes em todos os momentos dessa etapa da minha vida, por serem meus companheiros e me apoiarem sempre que precisei de ajuda, pela diversão que com vocês é garantida. A Djeni for being my person e toda a galera. Muito obrigada, vocês são demais!

Mãe, pai e mana obrigada por nunca duvidarem do meu potencial, acreditarem que eu sempre posso mais, incentivarem a minha caminhada e pelo amor incondicional que eu recebo todos os dias de vocês. Ao meu namorado, pelo apoio e companheirismo de sempre, por tornar esta etapa muito mais tranquila, pelo incentivo em todos os momentos e por sempre acreditar em mim. Sem vocês eu não teria conseguido.

A UFRGS pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento da minha formação, aos professores pelos conhecimentos passados e as agências de fomento CNPq, CAPES, Fapergs e Propesq UFRGS que possibilitaram a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>10</b>
1.1 As leveduras <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	11
1.2 Resposta imune à Criptococose.....	13
1.3 Imunidade Nutricional .....	14
1.3.1 Ferro.....	15
1.3.2 Cobre.....	16
1.3.3 Zinco.....	17
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>22</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>23</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>24</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 <i>Linhagens celulares e meios de cultivo.....</i>	28
2.2 <i>Avaliação da atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares contra C. gattii e C. neoformans.....</i>	28
2.3 <i>Avaliação da viabilidade celular das células epiteliais pulmonares linhagem A549 frente a condições de suplementação de zinco.....</i>	29
2.4 <i>Avaliação da atividade antifúngica de células epiteliais pulmonares contra C. gattii na presença de diferentes concentrações de zinco .....</i>	29
2.5 <i>Avaliação quantitativa da expressão de defensina e calprotectina pelas células epiteliais pulmonares durante a interação com células de C. gattii em diferentes concentrações de zinco. ....</i>	30

2.6	<i>Análises Estatísticas</i> .....	30
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## RESUMO

As leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes causadores da criptococose, uma enfermidade que pode acometer vários órgãos, dentre eles a pele, os pulmões e o sistema nervoso central. A infecção ocorre a partir da inalação de esporos ou leveduras dessecadas que se alojam no alvéolo podendo causar quadros de pneumonia. Neste ambiente, o fungo encontra como primeiro obstáculo, além de macrófagos alveolares, células epiteliais pulmonares, as quais, além de atuarem como uma barreira física, secretam moléculas que atuam no sistema imune. O patógeno também encontra como limitação a privação de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento, mecanismo de defesa do hospedeiro conhecido como imunidade nutricional. Dentre os nutrientes que estão com a biodisponibilidade diminuída está o metal zinco, relacionado com várias funções moleculares em praticamente todos os organismos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de células epiteliais e a expressão de proteínas ligadoras de zinco na imunidade inata e sua associação como um mecanismo de imunidade nutricional no modelo *C. gattii*. Observamos que a presença de células epiteliais pulmonares A549 viáveis, em co-cultivo com *C. gatti* ou de *C. neoformans*, levam a uma menor recuperação de células viáveis do fungo do que quando as células epiteliais estão mortas, evidenciando uma atividade antifúngica. Quando suplementamos o meio durante o co-cultivo de A549 e *C. gattii* com zinco, esta atividade antifúngica foi parcialmente suprimida. A expressão dos genes *S100A8*, *S100A9*, cujos produtos formam o complexo quelante de zinco calprotectina, e *hD5*, um possível quelante de zinco, pelas células epiteliais pulmonares foi avaliada por qRT-PCR e verificamos que a expressão dos três genes é aumentada durante o co-cultivo com o fungo, em diferentes períodos de co-cultivo avaliados. Em conclusão, sugerimos que as células epiteliais pulmonares apresentam ação antifúngica, aumentando a secreção de proteínas ligadoras de zinco e com isso diminuindo a biodisponibilidade deste metal para o uso da levedura *C. gatti*, sendo esse um mecanismo de imunidade nutricional.

## ABSTRACT

The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the causative agents of cryptococcosis, a disease that can affect various organs, including the skin, lungs as well the central nervous system. The infection process begins with the inhalation of spores or desiccated yeast that lodge in the alveoli and may lead to pneumonia. In this environment, the fungus finds, along with alveolar macrophages, epithelial cells, which acts both as a physical barrier and the source of secreted molecules that participate on the immune system. The pathogen also is submitted to a condition characterized by the deprivation of important nutrients for their development, a defense mechanism of the host known as nutritional immunity. Among the nutrients with reduced bioavailability is the zinc ion, which is related to various functions in almost all organisms. Thus, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of pulmonary epithelial cells and the expression of zinc-binding proteins in innate immunity and its association as a mechanism of nutritional immunity in model *C. gattii*. We observed that the presence of viable A549 pulmonary epithelial cells in co-culture with *C. gattii* or *C. neoformans* lead to a lower recovery of viable yeast cells in comparison to dead epithelial cells. The addition of zinc to the medium during co-cultivation of *C. gattii* and A549 led to suppression of the antifungal activity. Gene expression of *S100A8*, *S100A9*, whose products form the zinc chelator calprotectin, and *hD5*, which codes for a possible zinc chelator, by pulmonary epithelial cells was assessed by qRT-PCR. We found that the expression of all three genes is increased during co-cultivation with the fungus, in the periods evaluated. In conclusion, we suggest that pulmonary epithelial cells have antifungal activity, increasing secretion of zinc-binding proteins, thus reducing the bioavailability of this metal to the use of the yeast *C. gattii*, being a mechanism nutritional immunity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Rota de infecção de <i>Cryptococcus</i> .....	13
Figura 2. Zinco e magnésio são sequestrados pela família de proteínas S100 no hospedeiro.	18
Figura 3. Defensinas humanas são liberadas nas criptas do intestino.....	19
Fig 1. Células epiteliais pulmonares apresentam atividade antifúngica. ....	31
Fig 2. A atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares é revertida quando o meio é suplementado com cloreto de zinco. ....	32
Fig 3. A linhagem de células epiteliais pulmonares A549 não apresentou viabilidade diminuída frente às concentrações de cloreto de zinco testadas.....	33
Fig 4. A expressão da defensina hD5 e do complexo calprotectina é aumentada durante a interação com <i>C. gattii</i> .....	34



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	adenosina trifosfato
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTPA	penta-acetato de dietilenotriamina
GalXM	galactoxilomanana
GXM	glucoroxilomanana
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-2	interleucina 2
IL-8	interleucina 8
IL-22	interleucina 22
LPS	lipopolissacarídeo
MT	metalotioneína
MTT	metil-tiazolil-tetrazólio
NK	<i>células natural killer</i>
NRAMP1	<i>natural resistance-associated macrophage protein one</i>
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	transcrição reversa acoplada a PCR quantitativo em tempo real
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
TLR	receptor do tipo Toll
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
UFC	unidades formadoras de colônia

YPD	<i>yeast-extract/peptone/dextrose</i>
ZIP	<i>Zrt- and Irt-like proteins</i>
ZnT	<i>zinc transporter family</i>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A maior sobrevivência de pacientes com AIDS, associado ao uso mais expressivo de imunossupressores por indivíduos recém-transplantados, está resultando em um aumento no número de indivíduos portadores de doenças fúngicas oportunistas, entre elas a criptococose. Esta enfermidade tem como agentes etiológicos as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e pode ocasionar lesões de pele, olhos, ossos e mais comumente pulmões e sistema nervoso central (Lin e Heitman, 2006). Apesar de compartilharem muitas características, duas grandes diferenças entre as espécies são: a condição imune do hospedeiro e os principais órgãos acometidos, uma vez que *C. neoformans* infecta principalmente indivíduos imunocomprometidos e apresenta grande tropismo para o SNC, enquanto *C. gattii* possui habilidade de infectar indivíduos imunocompetentes e a doença fica comumente restrita ao pulmão (Perfect, 2012).

O sistema imune do hospedeiro, a fim de se proteger contra danos como os causados por infecções, emprega duas grandes linhas de defesa que atuam de forma sinérgica, o sistema imune inato, que apresenta uma resposta imune inespecífica, e o sistema imune adaptativo, que realiza uma resposta específica ao patógeno. Durante a infecção por *Cryptococcus* spp. os maiores efetores da imunidade inata são as células fagocíticas, principalmente macrófagos; já a imunidade adaptativa apresenta principalmente ativação celular, diretamente por efeito citotóxicos ou indiretamente, por funções regulatórias das células natural killer (NK) ou linfócitos T auxiliares, sendo a Th1 mais efetiva na remoção do patógeno (Voelz e May, 2010).

Metais de transição, como ferro, cobre e zinco, estão envolvidos em vários processos biológicos cruciais, sendo necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Hood e Skaar, 2012). Como componente da imunidade inata, o hospedeiro pode limitar a disponibilidade destes metais ou outros nutrientes, como a glicose, para a utilização pelo patógeno, sendo este processo denominado imunidade nutricional. Uma das maneiras de realizar a privação destes nutrientes é através da secreção de moléculas capazes de ligarem-se aos metais e, com isso, impedir que esses sejam utilizados pelas células patogênicas (Stafford *et al.*, 2013).

O metal zinco está amplamente relacionado com o desenvolvimento e crescimento da maioria dos organismos, além de estar relacionado com quase todas as células do sistema imune (Prasad, 2008). Foi descrito que a presença deste metal, em concentrações da ordem de micromolar, aumenta a atividade antimicrobiana de moléculas efectoras presentes nas vias

áreas humanas (Cole *et al.*, 2001). Sendo este metal de grande importância para a biologia do fungo, além das células epiteliais pulmonares serem o primeiro obstáculo encontrado por ele durante a infecção, faz-se necessário mais estudos sobre a expressão de proteínas ligadoras de zinco durante a interação patógeno-hospedeiro.

### 1.1 As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii*

As leveduras basidiomicéticas *C. neoformans* e *C. gattii* são as mais importantes do gênero, sendo essas responsáveis pela enfermidade conhecida como criptococose (Coelho, Bocca e Casadevall, 2014). Esta infecção pode acometer vários órgãos, dentre eles: pele, ossos, glândula prostática, fígado, baço, nódulos linfáticos, pulmões e o sistema nervoso central (Sabiiti e May, 2012). *C. gattii* foi, por um longo tempo, considerado um sorotipo de *C. neoformans*, entretanto, baseado em estudos filogenéticos e diferenças na ecologia, epidemiologia e biologia das mesmas, estas leveduras são agora consideradas espécies distintas (Kwon-Chung e Varma, 2006). Devido aos diferentes antígenos presentes na cápsula os fungos foram sub-classificados em 5 sorotipos: A, B, C, D e o híbrido AD, sendo que A, D e o híbrido AD são pertencentes a espécie *C. neoformans* e os sorotipos B e C pertencentes a *C. gattii* (Lin e Heitman, 2006).

O fungo *C. neoformans* é dito um patógeno oportunista, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos, dentre eles pacientes com HIV/AIDS ou recém-transplantados. Sua distribuição é mundial, sendo responsável por cerca de um milhão de casos de meningoencefalite mundialmente por ano em pacientes com AIDS (Park *et al.*, 2009). A espécie *C. gattii*, por sua vez, é um patógeno primário, possuindo a habilidade de causar infecção em indivíduos imunocompetentes, entretanto em uma frequência menor do que *C. neoformans*, e os seus isolados, principalmente de árvores, são endêmicos de regiões tropicais e subtropicais (Lin, 2009). Apesar disto esta espécie também é encontrada em climas mais amenos, sendo a responsável por um surto em curso no oeste da América do Norte, acometendo pessoas e animais saudáveis (Kronstad *et al.*, 2011).

Apesar de possuírem várias distinções, como no grupo de risco acometido, distribuição ao redor do globo e local preferencial de isolamento, ambas espécies compartilham vários fatores de virulência clássicos, que as tornam capazes de sobreviver dentro do hospedeiro, resistir ao ataque do sistema imune e eventualmente causar dano. Um destes é a termotolerância, visto que estas leveduras são capazes de sobreviver e se

desenvolver muito bem na temperatura corporal de mamíferos (Coelho, Bocca e Casadevall, 2014). Outro fator de extrema importância no processo de infecção é a produção de uma cápsula polissacarídica, a qual é composta majoritariamente por glucuroxilomanana (GXM) e por uma menor quantidade de galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (Idnurm *et al.*, 2005). Já é bem estabelecido que esta cápsula polissacarídica possui propriedades imunomodulatórias, uma vez que afeta a migração de células imunes, a secreção de citocinas e a apresentação do MHC, além de interferir na fagocitose e inibir a ativação da via clássica do complemento (Coelho, Bocca e Casadevall, 2014). A produção do pigmento melanina também é considerado um fator de virulência conferindo proteção contra fagocitose e morte oxidativa por macrófagos e contribuindo para a disseminação extrapulmonar das leveduras (Kronstad *et al.*, 2011). O fungo possui a capacidade de desenvolvimento e replicação intrafagossômico, tendo que sobreviver ao ataque antimicrobiano e a pouca disponibilidade de nutrientes (Johnston e May, 2013). Além destes fatores o fungo possui uma série de enzimas que facilitam a infecção e disseminação, tais como a urease e fosfolipase B (Kronstad *et al.*, 2011).

A rota de infecção inicia através da inalação de propágulos infecciosos, os quais podem ser leveduras dessecadas ou esporos, do ambiente até os pulmões (Figura 1). A colonização do hospedeiro pode levar a diferentes resultados dependendo de uma complexa interação dos fatores de virulência do patógeno com a resposta imune do hospedeiro. Sendo assim, a inalação do fungo pode resultar no (i) não desenvolvimento da doença, quando o patógeno consegue ser eliminado pelo sistema imune do hospedeiro; na (ii) infecção assintomática, na qual o patógeno entra em latência, formando granulomas, e pode ser reativado quando o hospedeiro torna-se imunocomprometido; na (iii) doença pulmonar, caracterizada pela presença de nódulos pulmonares e inflamação do órgão ou na (iv) doença disseminada, na qual o patógeno consegue entrar na corrente sanguínea e através deste alcançar outros órgãos (Sabiiti e May, 2012). *C. neoformans* possui um imenso tropismo para o sistema nervoso central, porém este fato não foi observado em *C. gattii* embora este patógeno também consiga atravessar a barreira hemato-encefálica (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012).

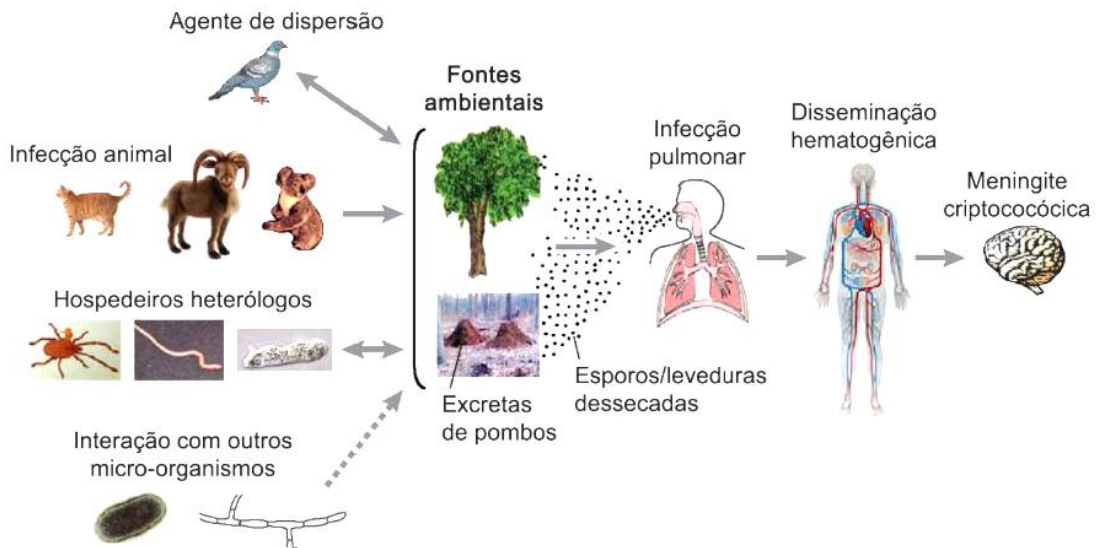


Figura 1. Rota de infecção de *Cryptococcus* spp. O fungo sobrevive no solo geralmente associado a árvores e excretas de pombos, possuindo a capacidade de infectar outros hospedeiros mamíferos. A infecção ocorre por inalação de esporos ou células leveduriformes dessecadas, que se depositam nos alvéolos pulmonares, causando pneumonia, e podem se disseminar para outros órgãos por via hematogênica, dentre eles o sistema nervoso central causando uma forma mais grave da doença conhecida como meningoencefalite. Adaptado de Lin e Heitman, (2006).

## 1.2 Resposta imune à Criptococose

Durante o processo infeccioso, o sistema imune do hospedeiro ativa uma resposta com o objetivo de eliminar o patógeno, a qual varia conforme a espécie invasora. Na infecção por *Cryptococcus* spp., se fazem presentes tanto elementos da imunidade inata como da imunidade adaptativa, sendo os macrófagos e as células dendríticas os elementos centrais para uma resposta efetiva contra o fungo (Shoham e Levitz, 2005).

As leveduras do complexo *Cryptococcus* spp. ao entrar nas vias aéreas superiores do hospedeiro encontram a barreira física do muco, além da ação ciliar e turbulência do ar e desta forma, poucas células conseguem alcançar o pulmão (Shoham e Levitz, 2005). Aquelas que atingem o parênquima pulmonar acionam uma resposta imune, a qual se mostra distinta conforme a espécie: *C. neoformans* causa uma maior produção de uma resposta inflamatória protetora, através do estímulo de secreção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , ao contrário da resposta iniciada por *C. gattii* (Cheng, Sham e Kronstad, 2009).

No alvéolo, o fungo interage tanto com macrófagos, pelo qual é fagocitado, quanto com células epiteliais pulmonares. Existem fortes evidências de que as células epiteliais pulmonares conseguem induzir uma resposta imune localizada, através da secreção de

citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, além de servir como uma barreira física para exclusão dos propágulos infecciosos inalados (Bals e Hiemstra, 2004). Para *C. neoformans* já é descrito que o polissacarídeo GXM presente em sua cápsula medeia a interação do fungo com células epiteliais pulmonares (Barbosa *et al.*, 2006) e que esta interação, através do receptor CD14, resulta na produção da interleucina pró-inflamatória IL-8 (Barbosa *et al.*, 2007).

Macrófagos são células cruciais para o controle da criptococose, uma vez que a depleção deste tipo celular no hospedeiro diminui a sobrevivência deste após a infecção com *C. neoformans*, em modelo murino (Osterholzer *et al.*, 2009). Entretanto, já foi demonstrada a presença das leveduras associadas com macrófagos dos hospedeiros tanto em infecções precoces quanto em infecções persistentes, evidenciando a importância da residência dentro de células fagocíticas pelas células fúngicas (Feldmesser *et al.*, 2000). Dentro do fagossomo, o fungo encontra um ambiente com baixo pH, espécies reativas e privação de nutrientes, o que pode eliminá-lo (Shoham e Levitz, 2005). Porém, já foi observado que o fungo consegue proteger-se deste ambiente desfavorável e usa esta estratégia para disseminar-se para o sistema nervoso central ficando menos exposto ao sistema imune, um processo conhecido como cavalo de Tróia (Charlier *et al.*, 2009).

### **1.3 Imunidade Nutricional**

Metais de transição, tais como ferro, cobre e zinco, estão envolvidos em vários processos biológicos cruciais, sendo frequentemente incorporados em metaloproteínas, tais como metaloenzimas, proteínas de armazenamento e fatores de transcrição, e por este motivo são extremamente necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Hood e Skaar, 2012). Fazendo uso desta grande dependência dos metais e com o objetivo de proteger-se de infecções, o hospedeiro limita a disponibilidade de metais de transição ou outros nutrientes, como a glicose, para a utilização pelo patógeno, processo este denominado imunidade nutricional (Cassat e Skaar, 2012). Em alguns casos, entretanto, o organismo hospedeiro aumenta a concentração de determinado metal no interior da célula, tornando o ambiente intracelular tóxico para o patógeno (White *et al.*, 2009). Ambos os processos fazem parte da imunidade inata e é descrito a sua ocorrência em uma vasta gama de espécies patogênicas.

### 1.3.1 Ferro

Ferro é o metal de transição mais abundante no corpo humano e é considerado um nutriente essencial para a proliferação de patógenos, e por este motivo hospedeiros vertebrados limitam a disponibilidade deste metal, sendo este um potente mecanismo de defesa contra infecções (Hood e Skaar, 2012). A resistência natural a infecções é um mecanismo de proteção que depende de níveis extremamente baixos de ferro livre nos tecidos e fluídos corporais (Bullen 2006). No organismo humano, os locais que possuem a maior quantidade de ferro estão relacionados à sua associação ao heme, onde é requerido para transporte de oxigênio pela hemoglobina ou o estoque de oxigênio pela mioglobina, estocada intracelularmente pela proteína ferritina, ou ainda circulando ligado a transferrina, a qual é responsável pela distribuição do metal nas células (Johnson e Wessling-Resnick, 2012). Além disso, a proteína transferrina realiza o sequestro do metal no plasma e no líquido cefalorraquidiano (Weinberg, 2009), sendo esta molécula uma das principais moléculas de defesa contra micro-organismos (Schaible e Kaufmann, 2004).

Lactoferrina, um potente quelante de ferro extracelular, membro da família das transferrinas, também está envolvido na modulação da quantidade de ferro disponível. Esta proteína está presente na maioria das secreções, tais como saliva, lágrimas e o leite materno (Ward, Uribe-Luna e Conneely, 2002). Sua secreção está associada com a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , liberando-a de grânulos neutrofílicos no sítio da infecção (Afeltra *et al.*, 1997). Foi relatada que a adição exógena de lactoferrina reduziu a quantidade da carga pulmonar de *Mycobacterium tuberculosis* em modelo murino com sobrecarga de ferro, evidenciando a sua importância na resposta inata a infecções (Schaible *et al.*, 2002).

No microrganismo *Candida albicans* foi observado que a privação de ferro acarreta uma redução do crescimento celular (Holbein e Mira De Orduña, 2010), além de aumentar a suscetibilidade a antifúngicos, visto que regula negativamente o gene ERG1, responsável pela produção de ergosterol (Prasad *et al.*, 2006). Sendo o ergosterol um constituinte essencial da membrana fúngica, a diminuição na sua quantidade leva a um aumento da fluidez da membrana celular e com isso uma maior difusão dos antifúngicos, entre eles o fluconazol (Prasad *et al.*, 2006). Além do efeito no ergosterol, a privação do metal afeta a biossíntese de esfingolipídios, também constituintes da membrana celular, e diminui a expressão de genes envolvidos na sinalização por calcineurina (Hameed *et al.*, 2011).



Em *C. neoformans*, o fator de transcrição Cir1 foi identificado como o responsável por regular a expressão de genes envolvidos no transporte e na homeostase de ferro (Choi *et al.*, 2012). Durante a privação deste metal, foi observado por análises globais de transcrito que o gene *CIG1* foi o gene com maior taxa de indução de transcritos frente à condição controle (Lian *et al.*, 2005). Mutantes nulos deste gene exibem alterações na cápsula polissacarídica, um dos maiores fatores de virulência do fungo, e uma demora no crescimento quando a fonte de ferro é o heme (Kronstad, Cadieux e Jung, 2013).

### 1.3.2 Cobre

O metal cobre é essencial para vários processos metabólicos, dentre eles a manutenção e o desenvolvimento do sistema imune, sendo, por exemplo, o componente essencial da enzima superóxido dismutase, a qual catalisa a produção de peróxido de hidrogênio em neutrófilos e monócitos (Maggini *et al.*, 2007). Foi observado também que macrófagos proveniente de ratos com deficiência de cobre possuíam habilidade comprometida na eliminação de *C. albicans* (Babu e Failla, 1990). Entretanto, a concentração deste metal deve ser muito bem controlada, pois é tóxico em excesso devido a sua alta capacidade de doar e receber elétrons, causando danos a proteínas, lipídios e DNA não somente do patógeno, o que é desejado, mas também das células do organismo do hospedeiro (Veldhuis *et al.*, 2009).

O transporte de cobre e a sua homeostase são mantidos pelas proteínas da família CTR e de ATP7 (Stafford *et al.*, 2013). Já é descrito que tanto IFN $\gamma$ , quanto LPS, realizam a regulação das vias de transporte de cobre por macrófagos, aumentando a sua captação durante a interação com patógeno (White *et al.*, 2009) e deslocando-o para o fagossomo, através da proteína de transporte ATP7A, para a destruição do patógeno alvo (Stafford *et al.*, 2013). Além destas, a proteína ceruplasmina também é responsável pela homeostase de cobre no organismo humano, sendo mais de 95% deste metal no soro ligado a esta proteína (Gray *et al.*, 2009).

Em relação a homeostase de cobre em *C. neoformans* observou-se que este metal participa de fatores importantes na virulência do fungo, relacionado com a enzima Cu/Zn superóxido dismutase, que possui papel na proteção do fungo contra espécies reativas de oxigênio (Cox *et al.*, 2003), a enzima lacase, responsável pela melanização da levedura (Salas *et al.*, 1996), além de estar envolvido com a aquisição de ferro, sendo o substrato da enzima transportadora Fet3 (Sedlák *et al.*, 2008). A deficiência na aquisição de cobre, pela falta do transportador Ctr4, provoca uma redução na melanização, no crescimento do fungo em meio

com poucos nutrientes, uma diminuição na fagocitose e uma atenuada virulência durante a infecção de camundongos (Waterman *et al.*, 2012).

### 1.3.3 Zinco

O metal zinco é essencial para o desenvolvimento e crescimento da maioria dos organismos (Prasad, 2008) e, em humanos, é o segundo metal de transição mais abundante (Andreini *et al.*, 2006). O zinco é essencial para o adequado funcionamento de quase todos os elementos participantes do sistema imune (Beck *et al.*, 1997). Foi demonstrado através da indução experimental de uma leve deficiência de zinco em humanos, a diminuição na relação de células T CD4<sup>+</sup> para CD8<sup>+</sup> e diminuição da resposta Th1, avaliada pela secreção de IFN $\gamma$ , IL-2 e TNF $\alpha$  (Beck *et al.*, 1997).

A homeostase de zinco em células mamíferas é mantida por metalotioneínas (MT), que são proteínas ligadoras de zinco que controlam a distribuição celular deste metal (Maret e Vallee, 1998) e por duas famílias de proteínas transportadoras de zinco, a família (*Zrt- and Irt-like proteins SLC39A*) e ZnT (*Zinc Transporters SLC30A*) (Stafford *et al.*, 2013). Durante processos infecciosos, pode ser observada uma alteração na homeostase de zinco, ocorrendo de maneira distinta para cada patógeno. Durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* observou-se um acúmulo de zinco no fagossomo em resposta ao patógeno como mecanismo de defesa, promovido pelas citocinas ativadoras de macrófagos TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Wagner *et al.*, 2005). Já o microrganismo *Histoplasma capsulatum* induz uma privação de zinco como parte da resposta dos macrófagos à sua presença, o que causa a diminuição no desenvolvimento do fungo (Winters *et al.*, 2010).

Calprotectina, um heterodímero formado por calgranulina A (S100A8) e calgranulina B (S100A9), também possui importância na homeostase de zinco, uma vez que realiza ligação com zinco e manganês, quelando estes metais (Corbin *et al.*, 2008) (Figura 2). Esta proteína está presente no citoplasma de neutrófilos, numa proporção de 40-50% da composição proteica, e está amplamente relacionada com um papel antimicrobica contra uma ampla gama de bactérias e fungos, dentre eles *Salmonella enterica*, *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. (Hood e Skaar, 2012). No fungo *C. neoformans* foi mostrado que a exposição da levedura à calprotectina causa inibição do crescimento e morte celular (Mambula *et al.*, 2000).

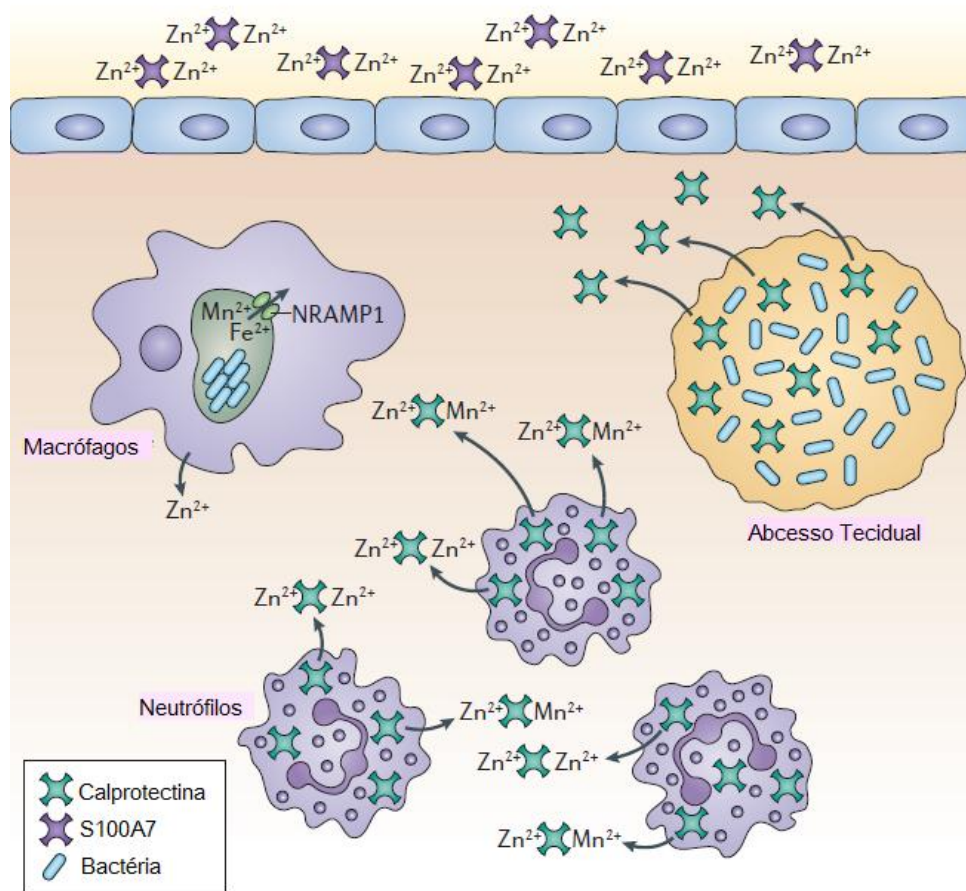


Figura 2. Zinco e magnésio são sequestrados pela família de proteínas S100 no hospedeiro. S100A7 é liberada na superfície do epitélio, inibindo a invasão de microrganismos através da ligação ao zinco. Dentro do tecido, a infecção leva ao recrutamento de neutrófilos, os quais secretam calprotectina (heterodímero de S100A8 e S100A9) no abscesso tecidual. Calprotectina inibe o desenvolvimento do patógeno através da diminuição da biodisponibilidade de magnésio e zinco. A fagocitose do patógeno pelos macrófagos resulta numa diminuição de captação de zinco, um aumento no efluxo de zinco do citoplasma da célula fagocítica e efluxo de magnésio e ferro do fagossomo através da proteína de macrófagos associada com a resistência natural 1 (NRAMP1, do inglês natural resistance-associated macrophage protein 1). Adaptado de Hood e Skaar, (2012).

Defensinas são membros pertencentes a uma grande família de peptídeos antimicrobianos, com tamanho em torno de 100 aminoácidos, que contribuem para a atividade microbicida de granulócitos e de células epiteliais (Ganz, 2003). Em humanos foram descritas duas grandes classes de defensinas, as  $\alpha$ -defensinas, abundante em neutrófilos, alguns macrófagos e células de Paneth, e as  $\beta$ -defensinas, produzidas em maior quantidade por células epiteliais de diferentes órgãos (Silva, Gonçalves e Santos, 2014). Embora mais caracterizada na literatura como presente nas criptas do intestino humano, onde é secretada pelas células de Paneth (Figura 3) (Selsted e Ouellette, 2005) a defensina humana 5 (hD5), uma  $\alpha$ -defensina, já foi vista sendo expressa em células do trato reprodutor feminino, e outras  $\alpha$ -defensinas já foram identificadas em rins de coelho (Ghosh *et al.*, 2002). Recentemente foi descrito que a defensina humana 5 possui ligação com o metal zinco, passando da forma

reduzida para a forma oxidada e nesta conformação persiste por mais tempo na circulação (Zhang *et al.*, 2013). A metalotioneína 7 (MMP7), proteína ligadora de zinco, foi relacionada com a clivagem de pro  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas para a sua forma ativa (Wilson *et al.*, 2009). Além disso, foi descrito que o zinco, juntamente com isoleucina, possuem papel na indução da expressão de  $\beta$ -defensinas por células epiteliais intestinais (Mao *et al.*, 2013).

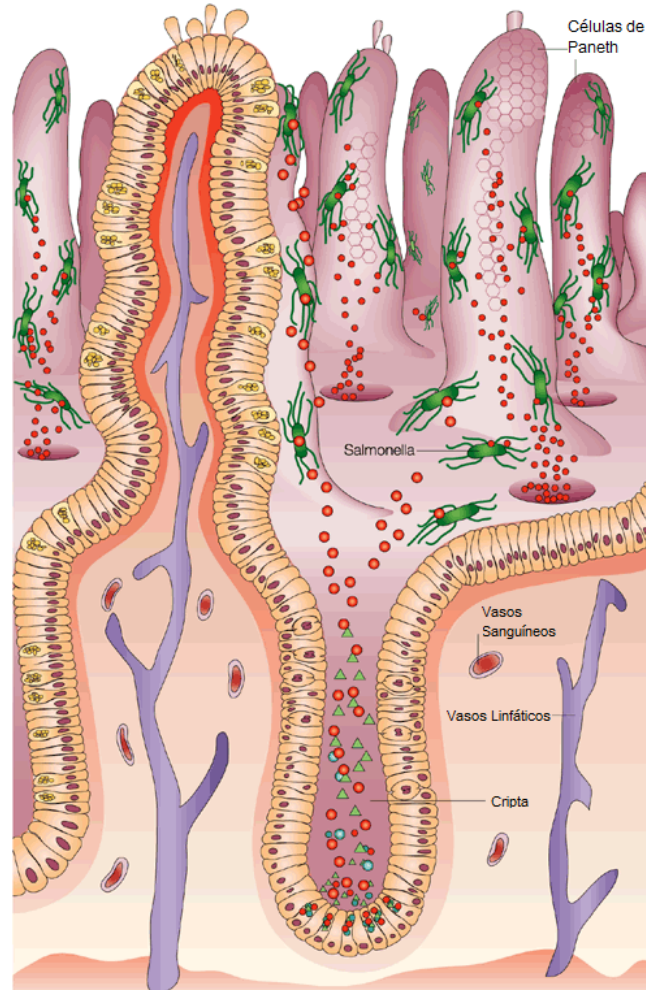


Figura 3. Defensinas humanas são liberadas nas criptas do intestino. O intestino delgado é formado por vilosidades absorptivas espaçadas por criptas – cavidades estreitas contendo um aglomerado de células de Paneth ricas em defensinas na base. Os grânulos das células de Paneth possuem altas concentrações de pró-defensina 5, consistindo em segmentos inativos (círculos azuis) junto com a defensina humana 5 (círculos vermelhos), além de moléculas de tripsina (triângulos verdes). Após a degranulação das células de Paneth, induzida pela presença de bactérias no lúmen intestinal, a defensina 5 é clivada pela tripsina liberando o segmento inativo. Adaptado de Ganz (2003).

Recentemente, foi demonstrado pelo nosso grupo, que a levedura *C. gattii* necessita de um adequado metabolismo de zinco para o seu completo potencial infeccioso (Schneider *et al.*, 2012). Entretanto, pouco foi descrito sobre a importância de zinco durante a interação com o organismo hospedeiro, principalmente a função deste metal na relação da levedura com as células epiteliais pulmonares, primeira barreira encontrada pelo fungo após a sua inalação.

Visto que este metal tem grande importância no sistema imune e que as células epiteliais possuem grande papel na eliminação de patógenos, faz-se necessários mais estudos envolvendo a relação patógeno-hospedeiro e o metabolismo de zinco no modelo de *C. gattii*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de células epiteliais pulmonares e a expressão de proteínas ligadoras de zinco na imunidade inata e sua associação como um mecanismo de imunidade nutricional no modelo *C. gattii*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares contra o fungo *C. gattii*;
- Avaliação da viabilidade celular das células epiteliais na presença de diferentes concentrações de zinco;
- Avaliar a atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares contra *C. gattii* na presença de diferentes concentrações de zinco;
- Avaliar quantitativamente a expressão de defensinas pelas células epiteliais pulmonares durante a interação com células de *C. gattii* viáveis ou mortas pelo calor;

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

O manuscrito intitulado “Células epiteliais pulmonares apresentam atividade antifúngica através da expressão de proteínas ligadoras de zinco em modelo de *C. gattii*” foi formatado conforme normas para publicação no periódico *MICROBES AND INFECTION*. Para facilitar a análise, as figuras e suas respectivas legendas são apresentadas junto ao corpo do texto.

**CÉLULAS EPITELIAIS PULMONARES APRESENTAM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ZINCO EM MODELO DE *Cryptococcus gattii***

*Pulmonary epithelial cells present antifungal activity through the expression of zinc binding proteins in a *Cryptococcus gattii* model*

Alícia Corbellini Piffer<sup>a</sup>, Ane Wichine Garcia<sup>a</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>a</sup>, Livia Kmetzsch<sup>a,b</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>a,b</sup>, Charley Christian Staats<sup>a,b,\*</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Biotecnologia e <sup>b</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

(\*) Correspondência: Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 213. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Telefone +55 51 3308 6091; Fax +55 51 3308 7309.

E-mail: [staats@cbiot.ufrgs.br](mailto:staats@cbiot.ufrgs.br)

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os causadores da doença criptococose, a qual pode acometer pulmões e sistema nervoso central. A infecção inicia através da inalação de propágulos infecciosos que se alojam no pulmão. Células epiteliais pulmonares são o primeiro obstáculo encontrado pelo fungo, atuando tanto como uma barreira física, como pela secreção de citocinas e peptídeos antimicrobianos, dentre eles quelantes de metais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de células epiteliais pulmonares e a expressão de transcritos de genes de proteínas ligadoras de zinco como mecanismo de imunidade inata em modelo de *C. gattii*. Observamos que a presença de células epiteliais pulmonares viáveis, em co-cultivo com *C. gattii*, levam a uma menor recuperação de unidades formadoras de colônias do que quando esse cultivo é realizado com células epiteliais mortas. Quando o meio de co-cultivo era suplementado com zinco, a atividade antifúngica apresentada foi suprimida. A expressão de *S100A8*, *S100A9* e *hD5* pelas células epiteliais



pulmonares foi avaliada e observamos que ambos os genes aumentam sua expressão durante o co-cultivo. Em conclusão, sugerimos que as células epiteliais pulmonares apresentam ação antifúngica, possivelmente pelo aumento da secreção de proteínas ligadoras de zinco, ocorrendo então diminuição da biodisponibilidade deste metal para o uso de *C. gattii*.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*. Células epiteliais pulmonares. Zinco. Calprotectina. Defensinas.

### ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the causing of cryptococcal disease, which can affect the lungs and central nervous system. The infection starts via inhalation of infectious propagules, which become lodged in the lung. Pulmonary epithelial cells are the first barrier encountered by the fungus to cause the disease and it is known that they also secrete cytokines and antimicrobial peptides, including metal chelators. Thus, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of pulmonary epithelial cells and the expression of transcript genes of zinc-binding proteins as a mechanism of innate immunity in *C. gattii* model. We observed that the presence of viable A549 lung epithelial cells in co-culture with *C. gattii*, lead to a lower recovery of colony-forming units than when epithelial cells were dead. When the co-cultivation medium was supplemented with zinc, the presented antifungal activity was suppressed. The expression of S100A8, S100A9 and human defensin 5 by pulmonary epithelial cells was assessed and we observed that the expression of all three genes is increased during co-cultivation with the fungus. In conclusion, we suggest that pulmonary epithelial cells have antifungal activity, increasing secretion of zinc-binding proteins, thus reducing the bioavailability of this metal to the yeast *C. gattii*.

**Keywords:** *Cryptococcus*, pulmonary epithelial cells, zinc, calprotectin, defensins.

## 1 INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as únicas leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus*, sendo essas os agentes etiológicos responsáveis pela doença criptococose [1], a qual acomete vários órgãos, dentre eles a pele, os ossos, a glândula prostática, o fígado, o baço, os nódulos linfáticos, os pulmões e o sistema nervoso central [2]. O fungo *C. neoformans* é dito um patógeno oportunista, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos, dentre estes pacientes com HIV/AIDS e recém-transplantados. Este fungo causa cerca de um milhão de casos de meningoencefalite por ano em pacientes com AIDS, acarretando aproximadamente 600 mil mortes [3]. A espécie *C. gattii*, entretanto, é capaz de causar infecção em indivíduos imunocompetentes sendo a responsável por um surto em curso acometendo pessoas saudáveis e animais no oeste da América do Norte [4]. Apesar de possuir a habilidade de causar a doença em indivíduos imunocompetentes, *C. gattii* não possui predileção por hospedeiro, sendo capaz de infectar também imunocomprometidos [5].

Ambas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* compartilham fatores de virulência essenciais para a infecção e a disseminação da doença. Os principais fatores são (i) a produção de uma cápsula polissacarídica, a qual possui propriedades imunomodulatórias, como a inibição da fagocitose realizada por macrófagos, e a diminuição dos níveis séricos das proteínas complemento [6]; (ii) a produção do pigmento melanina, principalmente, através da oxidação das catecolaminas, que confere proteção contra danos oxidativos e contribui para a disseminação extrapulmonar do fungo [4]; (iii) o crescimento a 37 °C, sendo este um fator indispensável para a disseminação em mamíferos [1], e (iv) a capacidade sobrevivência e o desenvolvimento intrafagossômico [7]. Além destes fatores, o fungo possui uma série de enzimas que facilitam a infecção e disseminação, tais como a urease e fosfolipase B [4].

A rota de infecção de ambos os fungos inicia através da inalação de propágulos infecciosos, os quais podem ser esporos ou leveduras dessecadas, de fontes ambientais. Devido à interação do patógeno com os elementos do sistema imune, pode-se obter diferentes resultados: (i) não desenvolvimento da doença, quando o patógeno consegue ser eliminado pelo sistema imune do hospedeiro; (ii) infecção assintomática, na qual o patógeno entra em latência, formando granulomas, e pode ser reativado quando o hospedeiro torna-se imunocomprometido; (iii) doença pulmonar, caracterizada pela presença de nódulos

pulmonares e inflamação do órgão e (iv) doença disseminada, na qual o patógeno consegue entrar na corrente sanguínea e através deste alcançar outros órgãos [2].

O sistema imune humano, responsável pelo combate aos patógenos, possui duas grandes linhas de defesa, as quais apresentam efeito sinérgico, a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Na infecção por *Cryptococcus* spp. os componentes da imunidade inata que estão mais presentes são: o sistema complemento e as células fagocíticas, principalmente macrófagos e células dendríticas [8]. Já os componentes da imunidade adaptativa presentes durante a infecção por *Cryptococcus* spp. são a resposta imune mediada por anticorpos e principalmente por resposta celular, sendo a resposta Th1 a mais efetiva na remoção do patógeno [9]. No alvéolo, o fungo interage tanto com macrófagos, pelo qual é fagocitado, quanto com células epiteliais pulmonares. Existem grandes evidências de que as células pulmonares epiteliais conseguem induzir uma resposta imune localizada, através da secreção de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, tais como as defensinas, além de servir como uma barreira física para exclusão dos propágulos infecciosos inalados [10].

Metais de transição, como ferro, cobre e zinco, estão envolvidos em vários processos biológicos cruciais, sendo necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos [11]. Como parte da imunidade inata, o hospedeiro limita a disponibilidade de metais de transição ou outros nutrientes, como a glicose, para o patógeno, sendo este processo denominado imunidade nutricional [12]. O zinco é o metal de transição não-redutor mais ubíquo, estando relacionado tanto com proteínas estruturais como naquelas com função catalítica, sendo assim um indispensável micronutriente para todos os organismos [13]. O zinco é essencial para o adequado funcionamento de quase todos os elementos participantes do sistema imune [14]. Foi demonstrado através da indução experimental de uma leve deficiência de zinco em humanos, a diminuição na relação de células T CD4<sup>+</sup> para CD8<sup>+</sup> e diminuição da resposta Th1, avaliada pela secreção de IFN $\gamma$ , IL-2 e TNF $\alpha$  [14].

Microrganismos patogênicos necessitam de zinco para a multiplicação e o desenvolvimento da infecção [15]. Linhagens mutantes de *Candida albicans* para um importante fator de transcrição regulador da homeostase de zinco, Csr1, demonstraram redução no crescimento e defeitos na filamentação [16]. Foi recentemente demonstrado pelo nosso grupo que o adequado metabolismo deste metal é fundamental para a virulência de *C. gattii* [17]. Também já foi descrito que a presença desse metal, em concentrações da ordem de micromolar, aumenta a atividade antimicrobiana de moléculas efetoras presentes nas vias aéreas humanas [18].

Calprotectina, um heterodímero formado por calgranulina A (S100A8) e calgranulina B (S100A9), possui, juntamente com transportadores e metalotioneínas [19], importância na homeostase de zinco, uma vez que realiza ligação com zinco e manganês, quelando estes metais [20]. Essa proteína está presente no citoplasma de neutrófilos e está amplamente relacionada com um papel antimicrobica contra uma gama de bactérias e fungos, dentre eles *Salmonella enterica*, *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. [11]. No fungo *C. neoformans* foi demonstrado que a exposição da levedura à calprotectina causa inibição do crescimento e morte celular [21]. As defensinas, membros pertencentes a uma grande família de peptídeos antimicrobianos que contribuem para a atividade microbica de granulócitos e de células epiteliais [22], foram descritos apresentando interações com zinco [23-25]. A defensina humana 5, descrita principalmente presente nas células de Paneth do intestino delgado, possui ligação com o metal zinco, responsável pela passagem da forma reduzida para a forma oxidada, que nesta última conformação persiste um maior tempo na circulação [23]. A metalotioneína 7 (MMP7), proteína ligadora de zinco, foi relacionada com a clivagem das pró-defensinas para a forma ativa [24]. Além disso, foi descrito que o zinco, juntamente com isoleucina, apresenta papel na indução da expressão de  $\beta$ -defensinas por células epiteliais intestinais de porcos [25].

Sendo o zinco um metal de grande importância para a biologia do fungo e sua interação com o hospedeiro, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de células epiteliais pulmonares e a expressão de proteínas ligadoras de zinco na imunidade inata e sua associação como um mecanismo de imunidade nutricional no modelo fúngico *C. gattii*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 *Linhagens celulares e meios de cultivo*

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas as linhagens R265 de *Cryptococcus gattii* e H99 de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, cultivadas rotineiramente em meio YPD (2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedura) e incubadas em plataforma giratória (200 rpm) na temperatura de 30 °C. A linhagem celular A549 (gentilmente cedida pelo Prof. Fábio Klamt, do Departamento de Bioquímica – UFRGS), derivada de um carcinoma epitelial de pulmão humano, foi cultivada em meio DMEM com alta concentração de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 20 U/mL, estreptomicina 20 µg/mL e canamicina 150 µg/mL. A incubação foi realizada em ambiente úmido, com temperatura controlada em 37 °C e concentração de CO<sub>2</sub> em 7,5%.

### 2.2 *Avaliação da atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares contra C. gattii e C. neoformans*

Com o intuito de avaliar se a presença da linhagem A549 afeta a multiplicação de *C. gattii* R265 ou de *C. neoformans* H99, foi realizado um co-cultivo das linhagens em três diferentes condições: A549 viável com R265/H99, A549 mortas com R265/H99 e somente células fúngicas R265/H99.

As células foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino; incubadas em ambiente úmido com 7,5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C. Células de *C. gattii* R265 e de *C. neoformans* H99 foram cultivados em YPD, lavadas três vezes com PBS e adicionadas nos poços já contendo células de A549 na proporção de uma célula de levedura para cada célula de A549 (1x10<sup>5</sup> células por poço). Para obtenção as células de A549 mortas, realizou-se uma incubação destas com 100µL do reagente DMSO puro por 10 minutos, seguido de três lavagens com 100 µL tampão PBS, antes da adição da levedura R265 ou H99. Após 20 horas de interação, o sobrenadante e as células lisadas, com tampão PBS acrescido de Triton X-100 0,05% (v/v), foram recolhidos, realizadas diluições seriadas e semeadas em meio YPD sólido para a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

### 2.3 Avaliação da viabilidade celular das células epiteliais pulmonares linhagem A549 frente a condições de suplementação de zinco

Células da linhagem A549 ( $1 \times 10^5$  células por poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e crescentes concentrações de  $ZnCl_2$ . As concentrações de  $ZnCl_2$  testadas foram de 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM, 1600 nM e 3200 nM. A avaliação da viabilidade celular dos cultivos foi realizada através do ensaio de redução de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) à formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas, conforme protocolo previamente descrito [26]. Após o cultivo com as diferentes concentrações de  $ZnCl_2$ , os poços foram lavados com PBS e adicionado MTT (5 mg/mL) seguido de incubação por 3 horas à 37°C, com 7,5% de  $CO_2$ . Após este período, o reagente MTT foi removido e adicionado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e posterior determinação da absorbância em espectrofotômetro de placas (Spectramax M5) nos comprimentos de onda de 560 nm e 670 nm (*background*).

### 2.4 Avaliação da atividade antifúngica de células epiteliais pulmonares contra *C. gattii* na presença de diferentes concentrações de zinco

Células epiteliais pulmonares A549 foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino; incubadas em ambiente úmido com 7,5% de  $CO_2$  e temperatura de 37°C. Células de *C. gattii* linhagem R265 foram cultivados em YPD, lavadas três vezes com PBS e adicionadas nos poços já contendo células de A549 na proporção de uma célula de R265 para cada célula de A549 ( $1 \times 10^5$  células por poço). Neste momento, o meio foi suplementado com diferentes concentrações de zinco, a fim de avaliar se este afeta a multiplicação das células da levedura na presença das células epiteliais pulmonares. Após 20 horas de interação, as células foram lisadas com tampão PBS acrescido de Triton X-100 2% (v/v) e, juntamente com o sobrenadante do cultivo, foram realizadas diluições seriadas e semeadas em YPD sólido para realizar a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

2.5 *Avaliação quantitativa da expressão de defensina e calprotectina pelas células epiteliais pulmonares durante a interação com células de C. gattii em diferentes concentrações de zinco.*

Para avaliação da expressão dos genes da defensina humana 5 (*hD5*), da calgranulina A (*S100A8*) e da calgranulina B (*S100A9*) foi utilizado a metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) associado à transcrição reversa. Foi extraído RNA de células epiteliais pulmonares de três condições distintas: somente A549, A549 com R265 e A549 com R265 morto por calor. Em todas as condições as células foram cultivadas em DMEM com alta concentração de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino; incubadas em ambiente úmido com 7,5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. A proporção utilizada foi de 1:1 células de R265 para A549 (1x10<sup>5</sup> células por poço). Após os tempos de interação de 4 horas e de 20 horas, o RNA das células epiteliais foi isolado com o reagente Trizol® (Invitrogen). O tratamento com DNase, assim como a síntese de cDNA, o PCR em tempo real e a quantificação da expressão relativa dos genes foi adaptada de protocolos já descritos [17]. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Como normalizador utilizou-se o gene da  $\beta$ -actina.

**Tabela 1. Primers utilizados nas reações de qRT-PCR**

Primer	Sequência	Tamanho (pb)	Gene ID
<i><math>\beta</math>-actina forward</i>	5'- TTAGTTGCGTTACACCCTTTC-3'	21	60
<i><math>\beta</math>-actina reverse</i>	5'- CTGTCACCTTCACCGTTC - 3'	18	
<i>hD5 forward</i>	5'- CGCCATCCTTGCTGCCATTCT-3'	21	1670
<i>hD5 reverse</i>	5'- AACGGCCGGTTCGGCAATAGC-3'	21	
<i>S100A8 forward</i>	5'- GGGATGACCTGAAGAAATTGCTA-3'	23	6279
<i>S100A8 reverse</i>	5'- TGTTGATATCCAACCTTTGAACCA-3'	25	
<i>S100A9 forward</i>	5'- GTGCGAAAAGATCTGCAAAATTT-3'	23	6280
<i>S100A9 reverse</i>	5'- GGTCCTCCATGATGTGTTCTATGA-3'	24	

2.6 *Análises Estatísticas*

Os gráficos e as análises estatísticas por *Student t test* foram realizados utilizando o software *Graph Pad Prism 6*. Os valores são expressos como média das replicatas  $\pm$  desvio padrão.

### 3 RESULTADOS

Com o objetivo de avaliar se as células epiteliais pulmonares linhagem A549 possuíam atividade antifúngica contra a levedura *C. gattii* R265, as duas linhagens celulares foram co-cultivadas e após 20 horas foram determinadas as unidades formadoras de colônias. Verificou-se que a quantidade de células fúngicas recuperadas quando estas estavam na presença de células epiteliais viáveis foi menor do que quando as células epiteliais pulmonares estavam mortas (Fig. 1A), evidenciando a presença de algum fator antifúngico expresso pelas células mamíferas. A fim de verificar se este fato era espécie-específico, o mesmo experimento foi realizado com a linhagem H99 de *C. neoformans* var. *grubii*, sendo obtido a mesma tendência de redução do número de UFCs de levedura (Fig. 1B). Desta forma, podemos afirmar que células de epitélio pulmonar humana produzem moléculas capazes de conter parcialmente o desenvolvimento de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*.

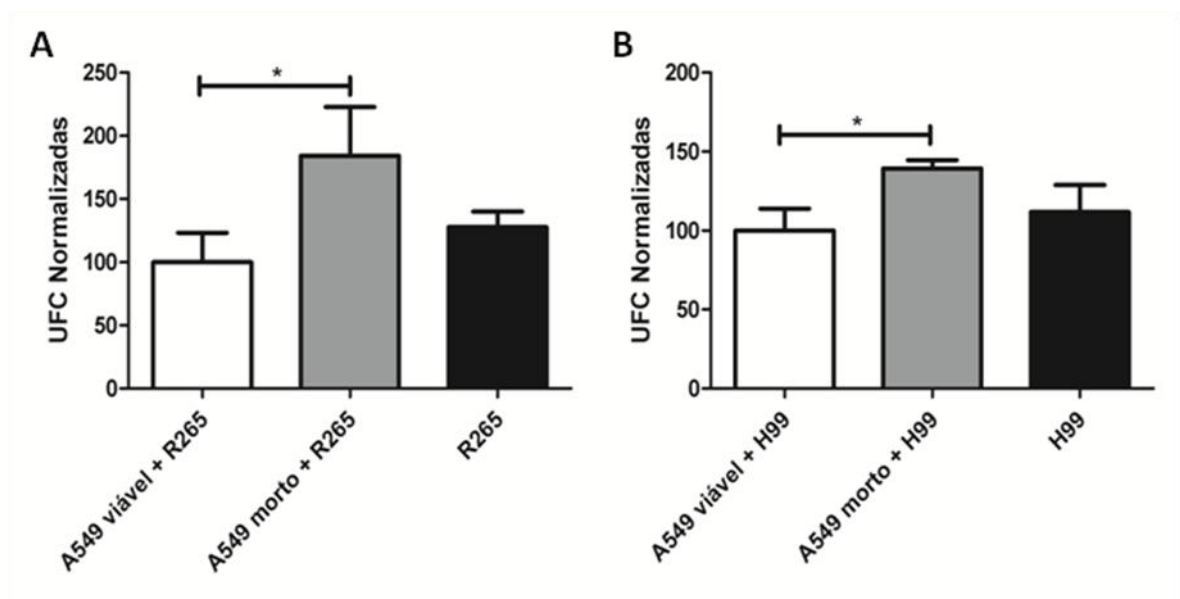


Fig 1. Células epiteliais pulmonares apresentam atividade antifúngica. A interação de células epiteliais A549 viáveis com células de levedura de *C. gattii* (A) ou *C. neoformans* (B) apresentou uma menor quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) do que a interação de células dos fungos testados com células epiteliais A549 mortas. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de três réplicas experimentais de cada uma das três réplicas técnicas. Os valores foram normalizados pela condição A549 viável + R265 (A) ou A549 viável + H99. O teste utilizado foi *t-Student*. \*  $p < 0,05$ .

Como o metal zinco está amplamente relacionado com vários aspectos do sistema imune, além de ser de grande importância para o desenvolvimento de vários organismos [27] avaliou-se se a suplementação do meio com zinco, na forma de  $ZnCl_2$ , afeta a atividade



antifúngica das células epiteliais pulmonares em co-cultivo com o fungo *C. gatti*. Observou-se que a suplementação do meio com o  $ZnCl_2$ , mesmo em concentrações menores em relação àqueles corriqueiramente encontradas no plasma, levou a uma maior recuperação de unidades formadoras de colônias, ou seja, um melhor desenvolvimento da levedura, e isto aconteceu de uma maneira dose-dependente (Fig. 2). Assim, podemos sugerir que a adição exógena de zinco inibe a atividade antifúngica de células de epitélio pulmonar.

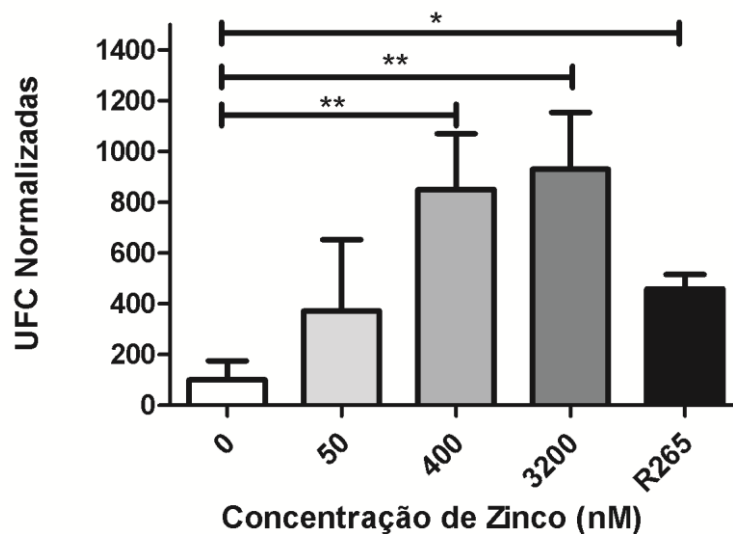


Fig 2. A atividade antifúngica das células epiteliais pulmonares é revertida quando o meio é suplementado com cloreto de zinco. O meio celular foi suplementado com diferentes concentrações de cloreto de zinco (50 nM, 400 nM, 3,2  $\mu$ M) e avaliou-se, através da metodologia de unidades formadoras de colônias, a atividade antifúngica das células. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de três réplicas experimentais de cada uma das três réplicas técnicas. Os valores foram normalizados pelo controle, condição sem adição de zinco. O teste utilizado foi *t-Student*. \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,005$ .

Como um método de confirmação de que a suplementação do meio com zinco realmente afeta a atividade antifúngica das células epiteliais e que isso não é devido a uma diminuição da viabilidade das mesmas, realizou-se um ensaio de viabilidade celular indireto, avaliando a atividade metabólica mitocondrial por intermédio da oxidação do substrato MTT. Não foi observada diminuição significativa da viabilidade das células epiteliais pulmonares nas concentrações de  $ZnCl_2$  testadas (Fig. 3).

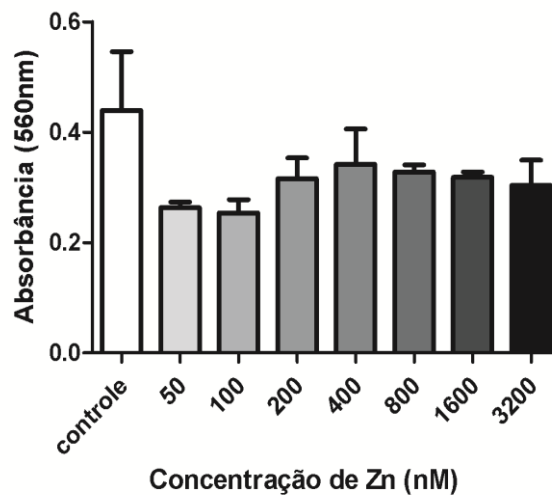


Fig 3. A linhagem de células epiteliais pulmonares A549 não apresentou viabilidade diminuída frente às concentrações de cloreto de zinco testadas. Foram avaliadas diferentes concentrações do sal cloreto de zinco (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM, 1,6  $\mu$ M e 3,2  $\mu$ M) a fim de verificar se havia alteração na viabilidade celular, o qual foi medido indiretamente através do teste de atividade mitocondrial por MTT.

Visto que a adição exógena de zinco afeta a atividade antifúngica de células epiteliais pulmonares, levando a uma maior recuperação de células fúngicas viáveis, foi avaliada a possibilidade de que esta adição estaria inibindo a atividade de importantes moléculas antifúngicas secretadas por células do sistema imune inato, defensina humana 5 (*hD5*) e das proteínas calgranulina A (*S100A8*) e calgranulina B (*S100A9*), formadoras do heterodímero de calprotectina, já que é descrito na literatura a ligação destas com o metal zinco. Para tanto, foram realizados experimentos para quantificação dos níveis relativos de transcritos destes genes por qRT-PCR a partir de RNA extraído de grupos controle (apenas células A549), infectados (células A549 co-cultivada com *C. gattii*) ou células A549 interagindo com células de *C. gattii* mortas por calor em dois períodos distintos de incubação: 4 e 20 horas. Observamos um aumento na expressão dos transcritos das três proteínas avaliadas durante 4 horas de interação entre o fungo, tanto viável quanto morto por calor, e as células epiteliais (Fig. 4A). O mesmo padrão foi obtido durante a interação de 20 horas para a *hD5* e para *S100A9*, entretanto não foi observada mudança na expressão dos transcritos de *S100A8* durante este tempo maior de interação (Fig. 4B). Quando comparados os níveis de transcritos obtidos em 4 horas e em 20 horas de cada gene avaliado, *hD5* (Fig 4C) apresentou um aumento na sua expressão, *S100A8* (Fig. 4D) apresentou aumento significativo somente no controle e *S100A9* (Fig 4C) apresentou uma diminuição nos níveis relativos de transcritos quando comparada a interação de 4 horas com 20 horas. Coletivamente, estes dados sugerem

que ocorre aumento da expressão de proteínas ligadoras de zinco durante a interação com *C. gattii*.

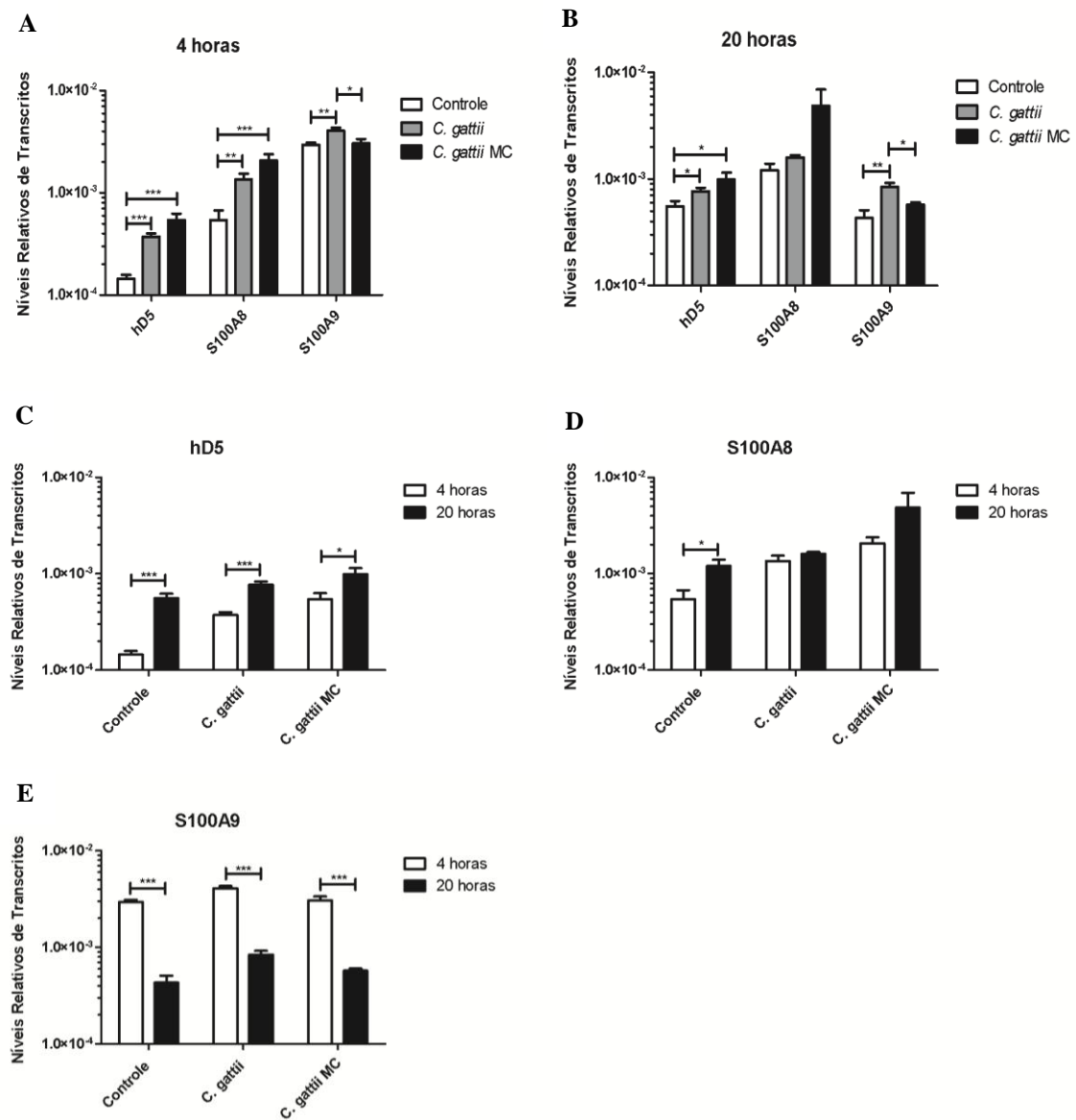


Fig 4. A expressão da defensina hD5 e do complexo calprotectina é aumentada durante a interação com *C. gattii*. Foram avaliadas, através da metodologia de PCR quantitativo em tempo real, o nível de transcritos dos genes defensina humana 5 do complexo calprotectina (S100A8 e S100A9) após interação de 4 horas ou 20 horas. Em ambos os tempos testados (A, B), houve um aumento no nível relativo de transcritos dos três genes de interesse. Quando comparados os níveis de transcritos nos dois tempos avaliados, hD5 (C) apresentou um aumento ao longo do tempo, S100A8 (D) apresentou aumento significativo somente no controle e S100A9 (E) apresentou uma diminuição de níveis de transcritos no tempo de 20 horas comparando com 4 horas. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de duas réplicas experimentais de cada uma das três réplicas biológicas. O teste utilizado foi *t-Student*. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,005$ . \*\*\* $P < 0,0001$ . MC: morto por calor.

## 4 DISCUSSÃO

As células epiteliais pulmonares são o primeiro obstáculo encontrado pelas leveduras de *C. neoformans* e de *C. gattii* que conseguem chegar até o parênquima pulmonar, visto que a rota de infecção acontece através da inalação de propágulos infecciosos [28]. Há muito tempo foi sugerido que as células epiteliais não fazem somente uma barreira física para o controle da disseminação de microrganismos, mas sim participam ativamente na eliminação de patógenos, contribuindo com a imunidade inata, pela secreção de uma vasta quantidade de peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias [29]. Já foi demonstrada interação de células epiteliais com outros fungos, além da sua descrição na interação com *C. neoformans*. A levedura *Candida albicans*, por exemplo, é capaz de infectar diversos tipos de células epiteliais, como células da córnea humana [30], e da gengiva [31].

As células epiteliais pulmonares identificam a presença do patógeno através de receptores que reconhecem padrões moleculares presentes nos microrganismos, entre eles estão os receptores da família TLR (Toll-like receptor). Os receptores TLR possuem habilidade de ligação com uma grande gama de moléculas, tais como flagelina, lipopolissacarídeo e peptídeoglicano [31]. Para *C. neoformans* já foi descrito que o polissacarídeo GXM presente em sua cápsula medeia a interação do fungo com células epiteliais pulmonares [32] e que esta interação, através do receptor CD14, resulta na produção da interleucina pró-inflamatória IL-8 [33]. O receptor CD14, juntamente com a proteína MD2, forma parte do complexo do TLR4 [10]. Sendo assim, acreditamos ser provável uma ligação entre GXM do fungo, tanto de células vivas como de células mortas, com o receptor CD14 das células epiteliais pulmonares levando a secreção de peptídeos antimicrobianos.

A atividade antifúngica observada parece possuir relação com a diminuição da biodisponibilidade de zinco, uma vez que a adição do metal reverteu a ação das células epiteliais pulmonares. Como previamente foi demonstrado pelo nosso grupo, o fungo *C. gattii* necessita da presença de um adequado metabolismo de zinco para a sua virulência completa [17]. Outros fungos, como *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* também apresentaram uma diminuição no seu desenvolvimento e na sua virulência quando possuíam mutações em genes importantes para a regulação da homeostase de zinco [16, 34], evidenciando que este metal é essencial para vários patógenos. Aparentemente, o metal zinco se faz mais necessário do que outros metais, uma vez que a adição de zinco reverteu mais rapidamente a inibição do crescimento de *C. albicans* em meio com o quelante DTPA do que o ferro, mesmo sendo a ligação de ferro com DTPA mais estável [35]. Utilizar a privação de zinco como um

mecanismo de defesa já foi sugerida como um mecanismo de imunidade nutricional e foi observada a sua ocorrência por macrófagos com o objetivo de eliminar o fungo *Histoplasma capsulatum* [36].

Dentre as moléculas produzidas pelo organismo humano e, sabidamente, quelantes de zinco está a calprotectina [11]. Sua presença em fluídos de abscessos, devido à morte de neutrófilos e sua liberação extracelular, foi relacionada com a diminuição no desenvolvimento de uma grande variedade de fungos, dentre eles *C. albicans*, *Candida glabrata* e *A. fumigatus* [37]. Nossos resultados mostraram que a presença do fungo *C. gattii* leva a uma maior expressão de ambos os componentes da calprotectina pelas células epiteliais pulmonares, principalmente nas primeiras horas de interação. Já foi demonstrada a expressão destas proteínas por diferentes células epiteliais frente a diferentes estímulos; por exemplo, células da vagina de camundongos, na presença do fungo *C. albicans*, aumentam a expressão de *S100A8* e *S100A9* e o reconhecimento sugere-se ser mediado por TLR4, entre outros receptores [38].

A produção de calprotectina pelas células epiteliais parece ser induzida pela expressão de IL-22 [39], sendo este, juntamente com IL-17A, considerado regulador da produção de antimicrobianos pelo pulmão. Estudos demonstraram que a citocina IL-22 é uma molécula crítica para a proteção de infecções por *C. albicans* em modelos vaginais [40] e que também medeia a defesa do hospedeiro contra pneumonias produzidas por bactérias gram-negativas [41]. Recentemente, foi observado que *C. neoformans* expressando IFN- $\gamma$  humana (H99 $\gamma$ ), em modelo murino, resultou em uma indução de resposta Th1, no aumento de IL-17A e na proteção contra posterior desafio contra a linhagem selvagem de *C. neoformans* [42]. Nesses camundongos desafiados com H99 $\gamma$ , foi visto um aumento na quantidade de *S100A8* e *S100A9* [43]. Além disso, avaliaram a produção dos mesmos peptídeos em camundongos *knockout* para a citocina IL-22 desafiados com *C. neoformans* selvagem e observaram uma diminuição das concentrações destes peptídeos antimicrobianos [43]. Estes dois experimentos evidenciam a importância das citocinas IL-22, IFN- $\gamma$  e IL-17A para a produção de *S100A8* e *S100A9*. Sendo assim, a produção de calprotectina pelas células epiteliais pulmonares avaliada em nosso estudo pode ser devido a um aumento de IL-22, IFN- $\gamma$  ou IL-17A, fazendo-se necessário ensaios para medir a presença destas citocinas.

Defensinas são peptídeos antimicrobianos produzidos, entre outros tipos celulares, por células epiteliais pulmonares [22] e, também foram relacionadas com o metal zinco [23-25]. Já foi demonstrado que as defensinas possuem papel contra uma grande variedade de bactérias e fungos [44]. Nossos resultados apontam para o fato de que a presença de *C. gattii*

induz uma maior expressão de *hD5* pelas células pulmonares, nos dois tempos de interação avaliados. Embora mais descrita na literatura como presente nas criptas do intestino humano, onde é secretada pelas células de Paneth [44] a defensina humana 5 (*hD5*), uma  $\alpha$ -defensina, já foi vista sendo expressa em células do trato reprodutor feminino, e outras  $\alpha$ -defensinas já foram identificadas em rins de coelho [45]. Recentemente foi observado que ocorre uma ligação entre a *hD5* e zinco, acarretando em uma diminuição de zinco livre e em uma maior estabilidade da defensina [23]. Sugerimos que a ligação entre *hD5* e zinco possa estar diminuindo a quantidade de metal para o uso do fungo *C. gatti*, reduzindo a atividade antifúngica observada pelas células epiteliais pulmonares.

Em conclusão, nossos estudos apontam que as células epiteliais pulmonares apresentam ação antifúngica através do aumento da secreção de proteínas ligadoras de zinco e consequente diminuição da biodisponibilidade deste metal para o uso da levedura *C. gatti*, sendo esse um mecanismo de imunidade nutricional.

## REFERÊNCIAS

- [1] Coelho C, Bocca AL, Casadevall A, The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*, *Adv Appl Microbiol* 87 (2014) 1-41.
- [2] Sabiiti W, May RC, Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*, *Future Microbiol* 7 (2012) 1297-1313.
- [3] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM, Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS, *AIDS* 23 (2009) 525-530.
- [4] Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J, Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box, *Nat Rev Microbiol* 9 (2011) 193-203.
- [5] Capilla J, Maffei CM, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA, Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice, *Med Mycol* 44 (2006) 601-610.
- [6] Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J, Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, *Nat Rev Microbiol* 3 (2005) 753-764.
- [7] Johnston SA, May RC, *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen, *Cell Microbiol* 15 (2013) 403-411.
- [8] Shoham S, Levitz SM, The immune response to fungal infections, *Br J Haematol* 129 (2005) 569-582.
- [9] Voelz K, May RC, Cryptococcal interactions with the host immune system, *Eukaryot Cell* 9 (2010) 835-846.
- [10] Bals R, Hiemstra PS, Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens, *Eur Respir J* 23 (2004) 327-333.
- [11] Hood MI, Skaar EP, Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface, *Nat Rev Microbiol* 10 (2012) 525-537.
- [12] Cassat JE, Skaar EP, Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity, *Semin Immunopathol* 34 (2012) 215-235.
- [13] Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM, Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles, *J Biol Inorg Chem* 13 (2008) 1205-1218.
- [14] Beck FW, Prasad AS, Kaplan J, Fitzgerald JT, Brewer GJ, Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans, *Am J Physiol* 272 (1997) E1002-1007.

- [15] Kehl-Fie TE, Skaar EP, Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc, *Curr Opin Chem Biol* 14 (2010) 218-224.
- [16] Kim MJ, Kil M, Jung JH, Kim J, Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*, *J Microbiol Biotechnol* 18 (2008) 242-247.
- [17] Schneider ReO, Fogaça NeS, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC, Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*, *PLoS One* 7 (2012) e43773.
- [18] Cole AM, Kim YH, Tahk S, Hong T, Weis P, Waring AJ, Ganz T, Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions, *FEBS Lett* 504 (2001) 5-10.
- [19] Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, Sweet MJ, Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper, *Biosci Rep* 33 (2013).
- [20] Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP, Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses, *Science* 319 (2008) 962-965.
- [21] Mambula SS, Simons ER, Hastey R, Selsted ME, Levitz SM, Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*, *Infect Immun* 68 (2000) 6257-6264.
- [22] Ganz T, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 710-720.
- [23] Zhang Y, Cougnon FB, Wanniarachchi YA, Hayden JA, Nolan EM, Reduction of human defensin 5 affords a high-affinity zinc-chelating peptide, *ACS Chem Biol* 8 (2013) 1907-1911.
- [24] Wilson CL, Schmidt AP, Pirilä E, Valore EV, Ferri N, Sorsa T, Ganz T, Parks WC, Differential Processing of {alpha}- and {beta}-Defensin Precursors by Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7), *J Biol Chem* 284 (2009) 8301-8311.
- [25] Mao X, Qi S, Yu B, He J, Yu J, Chen D, Zn(2+) and L-isoleucine induce the expressions of porcine  $\beta$ -defensins in IPEC-J2 cells, *Mol Biol Rep* 40 (2013) 1547-1552.
- [26] Morgan DM, Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity, *Methods Mol Biol* 79 (1998) 179-183.
- [27] Prasad AS, Zinc in human health: effect of zinc on immune cells, *Mol Med* 14 (2008) 353-357.
- [28] Lin X, Heitman J, The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex, *Annu Rev Microbiol* 60 (2006) 69-105.



- [29] Waterer GW, Airway defense mechanisms, *Clin Chest Med* 33 (2012) 199-209.
- [30] Hua X, Yuan X, Tang X, Li Z, Pflugfelder SC, Li DQ, Human Corneal Epithelial Cells Produce Antimicrobial Peptides LL-37 and  $\beta$ -Defensins in Response to Heat-Killed *Candida albicans*, *Ophthalmic Res* 51 (2014) 179-186.
- [31] Tamai R, Kiyoura Y, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* rapidly up-regulate galectin-3 secretion by human gingival epithelial cells, *Mycopathologia* 177 (2014) 75-79.
- [32] Barbosa FM, Fonseca FL, Holandino C, Alviano CS, Nimrichter L, Rodrigues ML, Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage, *Microbes Infect* 8 (2006) 493-502.
- [33] Barbosa FM, Fonseca FL, Figueiredo RT, Bozza MT, Casadevall A, Nimrichter L, Rodrigues ML, Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production, *Clin Vaccine Immunol* 14 (2007) 94-98.
- [34] Moreno MA, Ibrahim-Granet O, Vicentefranqueira R, Amich J, Ave P, Leal F, Latgé JP, Calera JA, The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence, *Mol Microbiol* 64 (2007) 1182-1197.
- [35] Sohnle PG, Hahn BL, Karmarkar R, Effect of metals on *Candida albicans* growth in the presence of chemical chelators and human abscess fluid, *J Lab Clin Med* 137 (2001) 284-289.
- [36] Winters MS, Chan Q, Caruso JA, Deepe GS, Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses, *J Infect Dis* 202 (2010) 1136-1145.
- [37] Lulloff SJ, Hahn BL, Sohnle PG, Fungal susceptibility to zinc deprivation, *J Lab Clin Med* 144 (2004) 208-214.
- [38] Yano J, Palmer GE, Eberle KE, Peters BM, Vogl T, McKenzie AN, Fidel PL, Vaginal epithelial cell-derived S100 alarmins induced by *Candida albicans* via pattern recognition receptor interactions are sufficient but not necessary for the acute neutrophil response during experimental vaginal candidiasis, *Infect Immun* 82 (2014) 783-792.
- [39] Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA, Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides, *J Exp Med* 203 (2006) 2271-2279.
- [40] De Luca A, Carvalho A, Cunha C, Iannitti RG, Pitzurra L, Giovannini G, Mencacci A, Bartolommei L, Moretti S, Massi-Benedetti C, Fuchs D, De Bernardis F, Puccetti P, Romani L, IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis, *PLoS Pathog* 9 (2013) e1003486.
- [41] Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg

MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK, IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia, *Nat Med* 14 (2008) 275-281.

[42] Wormley FL, Perfect JR, Steele C, Cox GM, Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain, *Infect Immun* 75 (2007) 1453-1462.

[43] Wozniak KL, Hole CR, Yano J, Fidel PL, Wormley FL, Characterization of IL-22 and Antimicrobial Peptide Production in Mice Protected Against Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection, *Microbiology* (2014).

[44] Selsted ME, Ouellette AJ, Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, *Nat Immunol* 6 (2005) 551-557.

[45] Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL, Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5, *Nat Immunol* 3 (2002) 583-590.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as células epiteliais pulmonares possuem atividade antifúngica contra a levedura *C. gattii*, diminuindo a biodisponibilidade de zinco para a utilização pelo fungo. Quando o zinco é adicionado no meio de co-cultivo, as células mamíferas não conseguem secretar moléculas suficientes para quelar o metal e, com isso, o fungo consegue se desenvolver no ambiente com mais zinco.

Os três genes avaliados possuem descrição na literatura de realizarem ligação com o zinco e todos eles apresentam sua expressão aumentada quando o fungo *C. gattii* está presente comparada com a condição controle. Os dados obtidos sugerem que o fungo é reconhecido pelas células epiteliais, acontece uma ativação de rotas imunológicas culminando com a expressão aumentada de peptídeos antimicrobianos relacionados com mecanismos de imunidade nutricional.

## 5 PERSPECTIVAS

Avaliar a quantidade de zinco extracelular durante um co-cultivo de células epiteliais pulmonares e *C. gatti*.

Avaliar quantitativamente a expressão de  $\beta$  - defensinas e outras proteínas da família S100 pelas células epiteliais pulmonares durante a interação com células de *C. gatti*.

Investigar a presença da citocina IL-22 durante a interação de células A549 com células fúngicas de R265, uma vez que está descrito sua modulação na expressão de calprotectina.

Avaliar se o polissacarídeo da cápsula do fungo afeta a expressão de calprotectina e hD5, visto que ocorre ligação entre GXM e receptores da célula epitelial pulmonar.

## REFERÊNCIAS

AFELTRA, A. et al. Expression of lactoferrin on human granulocytes: analysis with polyclonal and monoclonal antibodies. **Clin Exp Immunol**, v. 109, n. 2, p. 279-85, Aug 1997. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276523> >.

ANDREINI, C. et al. Zinc through the three domains of life. **J Proteome Res**, v. 5, n. 11, p. 3173-8, Nov 2006. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081069> >.

\_\_\_\_\_. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **J Biol Inorg Chem**, v. 13, n. 8, p. 1205-18, Nov 2008. ISSN 0949-8257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604568> >.

AUJLA, S. J. et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nat Med**, v. 14, n. 3, p. 275-81, Mar 2008. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264110> >.

BABU, U.; FAILLA, M. L. Respiratory burst and candidacidal activity of peritoneal macrophages are impaired in copper-deficient rats. **J Nutr**, v. 120, n. 12, p. 1692-9, Dec 1990. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2175781> >.

BALS, R.; HIEMSTRA, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. **Eur Respir J**, v. 23, n. 2, p. 327-33, Feb 2004. ISSN 0903-1936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14979512> >.

BARBOSA, F. M. et al. Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 1, p. 94-8, Jan 2007. ISSN 1556-6811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093102> >.

\_\_\_\_\_. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. **Microbes Infect**, v. 8, n. 2, p. 493-502, Feb 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293436> >.

BECK, F. W. et al. Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. **Am J Physiol**, v. 272, n. 6 Pt 1, p. E1002-7, Jun 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227444> >.

CAPILLA, J. et al. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. **Med Mycol**, v. 44, n. 7, p. 601-10, Nov 2006. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071553> >.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 215-35, Mar 2012. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048835> >.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18936186> >.

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*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827> >.

CHOI, J. N. et al. Influence of iron regulation on the metabolome of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41654, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911836> >.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581388> >.

COLE, A. M. et al. Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. **FEBS Lett**, v. 504, n. 1-2, p. 5-10, Aug 2001. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522286> >.

CORBIN, B. D. et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 962-5, Feb 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276893> >.

COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 173-80, Jan 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496163> >.

DE LUCA, A. et al. IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p. e1003486, 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853597> >.

FELDMESSER, M. et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4225-37, Jul 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858240> >.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 710-20, Sep 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949495> >.

GHOSH, D. et al. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. **Nat Immunol**, v. 3, n. 6, p. 583-90, Jun 2002. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021776> >.

GRAY, L. W. et al. Copper proteins and ferroxidases in human plasma and that of wild-type and ceruloplasmin knockout mice. **Biochem J**, v. 419, n. 1, p. 237-45, Apr 2009. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076073> >.

HAMEED, S. et al. Calcineurin signaling and membrane lipid homeostasis regulates iron mediated multidrug resistance mechanisms in *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18684, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533276> >.

HOLBEIN, B. E.; MIRA DE ORDUÑA, R. Effect of trace iron levels and iron withdrawal by chelation on the growth of *Candida albicans* and *Candida vini*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 307, n. 1, p. 19-24, Jun 2010. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402789> >.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 525-37, Aug 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796883> >.

HUA, X. et al. Human Corneal Epithelial Cells Produce Antimicrobial Peptides LL-37 and  $\beta$ -Defensins in Response to Heat-Killed *Candida albicans*. **Ophthalmic Res**, v. 51, n. 4, p. 179-86, 2014. ISSN 1423-0259. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662332> >.

IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 753-64, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16132036> >.

JOHNSON, E. E.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. **Microbes Infect**, v. 14, n. 3, p. 207-16, Mar 2012. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033148> >.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. Cryptococcus interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 403-11, Mar 2013. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127124> >.

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Curr Opin Chem Biol**, v. 14, n. 2, p. 218-24, Apr 2010. ISSN 1879-0402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015678> >.

KIM, M. J. et al. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 242-7, Feb 2008. ISSN 1017-7825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309267> >.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.

KRONSTAD, J. W.; CADIEUX, B.; JUNG, W. H. Pathogenic yeasts deploy cell surface receptors to acquire iron in vertebrate hosts. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 8, p. e1003498, 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009498> >.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696653> >.

LIAN, T. et al. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 1452-72, Mar 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720553> >.

LIANG, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med**, v. 203, n. 10, p. 2271-9, Oct 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982811> >.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 401-16, Jul 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460306> >.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346> >.

LULLOFF, S. J.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J Lab Clin Med**, v. 144, n. 4, p. 208-14, Oct 2004. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514589> >.

MAGGINI, S. et al. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **Br J Nutr**, v. 98 Suppl 1, p. S29-35, Oct 2007. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922955> >.

MAMBULA, S. S. et al. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6257-64, Nov 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035733> >.

MAO, X. et al. Zn(2+) and L-isoleucine induce the expressions of porcine  $\beta$ -defensins in IPEC-J2 cells. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 2, p. 1547-52, Feb 2013. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065293> >.

MARET, W.; VALLEE, B. L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 7, p. 3478-82, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520391> >.

MORENO, M. A. et al. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 5, p. 1182-97, Jun 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17542914> >.



MORGAN, D. M. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. **Methods Mol Biol**, v. 79, p. 179-83, 1998. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463833> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570277> >.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 3749-58, Sep 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564388> >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PERFECT, J. R. The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. **MBio**, v. 3, n. 4, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782526> >.

PRASAD, A. S. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. **Mol Med**, v. 14, n. 5-6, p. 353-7, 2008 May-Jun 2008. ISSN 1076-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385818> >.

PRASAD, T. et al. Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3597-606, Nov 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954314> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 377-86, Aug 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760791> >.

SCHAIBLE, U. E. et al. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. **J Exp Med**, v. 196, n. 11, p. 1507-13, Dec 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461085> >.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 12, p. 946-53, Dec 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550940> >.

SCHNEIDER, R. E. O. et al. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43773, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916306> >.

SEDLÁK, E. et al. In vitro unfolding of yeast multicopper oxidase Fet3p variants reveals unique role of each metal site. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 49, p. 19258-63, Dec 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033465> >.

SELSTED, M. E.; OUELLETTE, A. J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nat Immunol**, v. 6, n. 6, p. 551-7, Jun 2005. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908936> >.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 569-82, Jun 2005. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916679> >.

SILVA, P. M.; GONÇALVES, S.; SANTOS, N. C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. **Front Microbiol**, v. 5, p. 97, 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24688483> >.

SOHNLE, P. G.; HAHN, B. L.; KARMARKAR, R. Effect of metals on *Candida albicans* growth in the presence of chemical chelators and human abscess fluid. **J Lab Clin Med**, v. 137, n. 4, p. 284-9, Apr 2001. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283523> >.

STAFFORD, S. L. et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. **Biosci Rep**, v. 33, n. 4, 2013. ISSN 1573-4935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738776> >.

TAMAI, R.; KIYOURA, Y. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* rapidly up-regulate galectin-3 secretion by human gingival epithelial cells. **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2, p. 75-9, Feb 2014. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24436012> >.

VELDHUIS, N. A. et al. Phosphorylation regulates copper-responsive trafficking of the Menkes copper transporting P-type ATPase. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 12, p. 2403-12, Dec 2009. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576997> >.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-46, Jun 2010. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382758> >.

WAGNER, D. et al. Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. **J Immunol**, v. 174, n. 3, p. 1491-500, Feb 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661908> >.

WARD, P. P.; URIBE-LUNA, S.; CONNEELY, O. M. Lactoferrin and host defense. **Biochem Cell Biol**, v. 80, n. 1, p. 95-102, 2002. ISSN 0829-8211. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908649> >.

WATERER, G. W. Airway defense mechanisms. **Clin Chest Med**, v. 33, n. 2, p. 199-209, Jun 2012. ISSN 1557-8216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640840> >.

WATERMAN, S. R. et al. Role of CTR4 in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 3, n. 5, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033470> >.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-5, Jul 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675317> >.

WHITE, C. et al. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. **J Biol Chem**, v. 284, n. 49, p. 33949-56, Dec 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19808669> >.

WILSON, C. L. et al. Differential Processing of {alpha}- and {beta}-Defensin Precursors by Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7). **J Biol Chem**, v. 284, n. 13, p. 8301-11, Mar 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181662> >.

WINTERS, M. S. et al. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **J Infect Dis**, v. 202, n. 7, p. 1136-45, Oct 2010. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731582> >.

YANO, J. et al. Vaginal epithelial cell-derived S100 alarmins induced by *Candida albicans* via pattern recognition receptor interactions are sufficient but not necessary for the acute neutrophil response during experimental vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v. 82, n. 2, p. 783-92, Feb 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478092> >.

ZHANG, Y. et al. Reduction of human defensin 5 affords a high-affinity zinc-chelating peptide. **ACS Chem Biol**, v. 8, n. 9, p. 1907-11, Sep 2013. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841778> >.