

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE ZINCO EM *Acanthamoeba castellanii* COMO UMA POSSÍVEL ESTRATÉGIA ANTIFÚNGICA”**

Dissertação de Mestrado

Nicole Sartori Ribeiro

Porto Alegre, Março de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE ZINCO EM *Acanthamoeba castellanii* COMO UMA POSSÍVEL ESTRATÉGIA ANTIFÚNGICA”**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Nicole Sartori Ribeiro**

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre, Março de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Charley C. Staats pela oportunidade de realizar esse trabalho de mestrado sob sua orientação, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e ensinamentos transmitidos ao longo do período de realização desse projeto.

Agradeço aos professores Dr<sup>a</sup> Marilene Henning Vainstein e Dr. Augusto Schrank pelo acolhimento no laboratório e ensinamentos transmitidos, e à Dr<sup>a</sup>. Lívia Kmetzsch pelo auxílio intelectual prestado.

À professora Marilise Rott por abrir as portas de seu laboratório e me auxiliar no aprendizado sobre o amplo mundo das amebas.

Aos meus colegas do laboratório 220 que, além de criarem um ambiente de trabalho prazeroso, sempre estavam dispostos à ajudar nos experimentos e dar conselhos. Em especial, agradeço à doutoranda Francine Melise dos Santos por ter sido peça fundamental na execução desse trabalho, tanto de forma intelectual e prática quanto de apoio psicológico e companheirismo.

Agradeço aos meus pais, Celi Sartori e Jorge Ribeiro, pelo suporte afetivo, por confiarem em mim, acreditarem no meu potencial e por permanecerem ao meu lado em todos os momentos. Se não fosse o apoio deles, eu não teria alcançado essa vitória.

À minha irmã Jéssica Sartori, por sempre me apoiar, me ouvir e ser minha melhor conselheira. Sempre será minha maior fonte de inspiração por sua persistência e coragem.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	10
1.1. Gênero <i>Cryptococcus</i> .....	12
1.2. Fatores de Virulência .....	14
1.3. Criptococose.....	15
1.4. Ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i> spp. e sua interação com hospedeiros mamíferos 16	
1.5. Protozoários ambientais .....	19
1.6. <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	20
1.7. Interação de micro-organismos com o hospedeiro ameboide .....	23
1.8. Comparação entre fagócitos: macrófagos e Amebas .....	24
1.9. Imunidade Nutricional.....	26
1.10. Mecanismos de homeostase de zinco .....	28
2. OBJETIVOS .....	33
2.1. Objetivos específicos.....	33
3. RESULTADOS .....	34
4. DISCUSSÃO GERAL.....	56
5. CONCLUSÕES .....	58
6. PERSPECTIVAS .....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	<i>Degree Celsius</i> , Graus Celsius
μM	<i>Micromolar</i> , Micromolar
μm	<i>Micrometer</i> , Micrometros
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> , Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Coleção de micro-organismos Norte americana
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , Adenosina trifosfato
B	<i>B lymphocytes</i> , Linfócitos B
BHE	Barreira hemato-encefálica
CA	Ceratite Amebiana
CFU	<i>Colony-forming unit</i> , Unidade formadora de colônia
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Meio Eagle Modificado de Dulbecco
EAG	Encefalite Amebiana Ganulomatosa
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GXM	<i>Glucuronoxylomannan</i> , Glucuronoxilomanana
GXMGal	<i>Glucuronoxylomannogalactan</i> , Glucuronoxilomanogalactana
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> , Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> . Vírus da imunodeficiência humana
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i> , Interferon gama
IL-4	<i>Interleukin 4</i> , Interleucina 4
IL-10	<i>Interleukin 10</i> , Interleucina 10
IPR	<i>Intracellular proliferation rate</i> , Taxa de proliferação intracelular
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> , Fator estimulador de colônias de macrófagos
mL	<i>Milliliter</i> , Mililitros
mM	<i>Millimolar</i> , Milimolar
MT	<i>Metallothionein</i> , Metalotioneína
M1	<i>Classically activated macrophages</i> , Macrófagos ativados via clássica
M2	<i>Alternatively activated macrophage</i> , Macrófagos ativados via alternativa
NK	<i>Natural killers</i> , Células exterminadoras naturais
NO	<i>Nitric oxide</i> , Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em cadeia da polimerase
pH	<i>Potential of hydrogen</i> , Potencial hidrogeniônico
PYG	<i>Peptone Yeast Glucose medium</i> , Meio proteose peptona, extrato de levedura

---

	e glicose
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i> , PCR em tempo real quantitativo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ácido ribonucleico
SD	<i>Standard deviation</i> , Desvio-padrão
SLC30A	<i>Solute carrier family 30</i> , Proteína transportadora de zinco
SLC39A	<i>Solute carrier family 39</i> , Proteína transportadora de zinco
SNC	Sistema nervoso central
Sod	<i>Superoxide dismutase</i> , Superóxido dismutase
T	<i>T lymphocytes</i> , Linfócitos T
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> , Fator de transformação do crescimento beta
Th1	<i>T-helper 1</i> , T-ajudante 1
Th2	<i>T-helper 2</i> , T-ajudante 2
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis receptor alfa</i> , Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
Ure1	<i>Cryptococcal urease 1</i> , Proteína urease
YPD	<i>Yeast peptone-dextrose</i> , Meio de cultura para levedura
ZIP	<i>Zrt/IRT-like protein family</i> , Família de proteínas tipo-Zrt/IRT
ZnCl <sub>2</sub>	<i>Zinc chloride</i> , Cloreto de zinco
ZnT	<i>Zn transporter</i> , Transportador de zinco

---

## RESUMO

*Cryptococcus gattii* é um dos principais agentes de infecção oportunista em todo o mundo. Esse fungo está presente no meio ambiente e, por isso, pode infectar diversos hospedeiros, inclusive seres humanos, nematóides e células ameboides. *Acanthamoeba* spp. são protozoários de vida livre que fagocitam diversos organismos, especialmente bactérias e fungos. Apesar de macrófagos e amebas serem evolutivamente distantes, eles compartilham diversas etapas comuns no processo de fagocitose e eliminação do patógeno. Além disso, existem teorias de que amebas e macrófagos possuem um ancestral comum. Para averiguar se essas duas células fagocíticas apresentam estratégias antifúngicas similares, nós analisamos o mecanismo de imunidade nutricional. Essa estratégia imunológica reduz a disponibilidade de nutrientes essenciais para o patógeno, inclusive metais de transição como o zinco. Neste trabalho, nós analisamos se há modulação da homeostase de zinco em *Acanthamoeba castellanii* durante sua interação com *C. gattii*. Testes de fagocitose e taxa de replicação intracelular (IPR) realizados através da interação de amebas com a linhagem selvagem (WT) e mutante do gene *ZIP1* de *C. gattii*. O mutante utilizado (*zip1Δ*) é caracterizado pela sua incapacidade de crescer sem a presença de zinco. Nós observamos que a linhagem mutante foi mais fagocitada por células de *A. castellanii* comparado com WT. Também, o teste de IPR mostrou que a atividade antifúngica das células hospedeiras apresentou-se mais efetiva contra as células mutantes. Entretanto, a sobrevivência de *zip1Δ* foi maior quando zinco extracelular (10  $\mu$ M) foi adicionado ao meio de interação. Esses resultados sugerem que as células criptocócicas internalizadas podem estar sofrendo uma privação da disponibilidade de zinco no interior do fagossomo. Para analisar alterações nos transportadores de zinco das células hospedeiras durante sua interação com *C. gattii*, análises de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas para os transportadores de zinco das famílias ZIP e ZnT. Uma intensa modulação de alguns genes foi observado após 3 e 24 horas pós-infecção. Além disso, análises de citometria de fluxo mostraram que os níveis de zinco livre das amebas estavam reduzidos devido a presença do fungo. Esses resultados sugerem que amebas podem modular a disponibilidade de zinco, afim de prejudicar o patógeno.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus gattii*, *Acanthamoeba castellanii*, zinco, transportadores de zinco.



## ABSTRACT

*Cryptococcus gattii* is one of the most important agents of opportunistic infections worldwide. They are found in the environment, where it can interact with different host types, including humans, nematodes and amoebic cells. *Acanthamoeba* spp. are free-living protozoa that basically feed on bacteria and yeast through phagocytosis. Macrophages and amoebae, although evolutionarily distant, share conserved mechanisms related to steps of phagocytosis and microbial killing. In addition, it has been hypothesized that amoeba and macrophage have a common ancestor. To investigate if there are similar antifungal strategies between both cellular types, we analyzed the nutritional immunity mechanism. It is a process defined as a reduction of essential nutrients availability to the pathogen, such as zinc. In this context, we investigate if amoeba cells are able to modulate zinc homeostasis during the interaction with *C. gattii*. Phagocytosis and intracellular replications (IPR) analysis performed through the interaction between amoebae and wild-type (WT) and mutant for the *ZIP1* gene (*zip1Δ*) strains of *C. gattii*. The mutant is unable to grow in absence of zinc. We found that *zip1Δ* strain is more readily engulfed by *A. castellanii* cells compared to WT. In addition, IPR analysis showed that the antifungal activity of such host cells was more effective against the mutant cells. However, the mutant strain survival was increased when additional extracellular zinc (10 μM) was added to the interaction medium. This data suggests that engulfed cryptococcal cells might have been experiencing a deprivation of zinc inside the phagosome. To further evaluate alterations of zinc transporters in host cells due to cryptococcal infection, RT-qPCR analysis was performed for the ZIP and ZnT zinc transporter families. An intense modulation of some genes was found after 3 and 24 hours' post-infection. Furthermore, flow cytometry analysis showed that free zinc levels from amoebae are reduced by the cryptococcal presence. These results indicate that amoebae are able to modulate zinc availability to harm the pathogen.

**Keywords:** *Cryptococcus gattii*. Amoebae. Zinc. Zinc transporters.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Fungos são seres de vida livre, considerados grandes decompositores em alguns ecossistemas. Podem também viver associados à diversos outros organismos, muitas vezes em uma relação parasitária (Kobayashi, 1996). Há estudos que estimam a existência de mais de 5 milhões de espécies fúngicas (Blackwell, 2011). Eles são ubíquos na natureza, sendo encontrados tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres, inclusive em condições extremas como solos polares e água com extrema acidez (Kobayashi, 1996; Maganti *et al.*, 2011). Alguns fungos do filo Ascomycota e Basidiomycota já foram isolados de diversos locais, como folhas de árvores, madeira e solo (Maganti *et al.*, 2011). Dentre os organismos basidiomicéticos, encontra-se o gênero *Cryptococcus*, sendo as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* as mais conhecidas devido a sua patogenicidade e capacidade de infectar diversos hospedeiros (Velagapudi *et al.*, 2009). *C. neoformans* é encontrado especialmente em excretas de pombos, enquanto *C. gattii* está presente abundantemente em árvores e ao redor de árvores, contudo ambos apresentam-se na forma de partículas fúngicas dessecadas ou esporos. Estando presentes no ambiente, essas células fúngicas podem ser inaladas por um amplo espectro de hospedeiros, incluindo o ser humano. Após sua inalação, o fungo instala-se nos pulmões e pode disseminar-se pelo sistema sanguíneo até chegar ao sistema nervoso central (SNC) e causar um quadro de criptococose (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Ainda nos pulmões, esses esporos entram em contato com macrófagos alveolares, que utilizam diversas estratégias antifúngicas na tentativa de conter e eliminar o patógeno (Gibson e Johnston, 2015).

No solo, *Cryptococcus* spp. podem entrar em contato com outros organismos, como diversas bactérias, amebas e nematóides. As amebas de vida livre são protozoários que utilizam como fonte de alimento basicamente bactérias e fungos. Já foi descrito na

literatura que as amebas são capazes de interagir e fagocitar *Cryptococcus* spp. para utilizá-lo como alimento (Steenbergen *et al.*, 2001). Todavia, esse fungo desenvolveu mecanismos para escapar dessa célula fagocítica, o que pode ter sido importante e determinante para o sucesso na sua evolução como patógeno intracelular facultativo (Siddiqui e Khan, 2012b; Kwon-Chung *et al.*, 2014). *C. neoformans* apresenta a capacidade de sobreviver no ambiente intracelular de amebas, como *Acanthamoeba castellanii*, e utilizar estratégias para escapar e replicar-se no interior das mesmas. Essas ações são semelhantes às que são utilizadas durante a interação do fungo com macrófagos. Isso indica que há a geração de um ambiente similar em ambas células fagocíticas e que a passagem do fungo por essa situação no ambiente estimulou a seleção de seus fatores de virulência que contribuíram para sua sobrevivência em hospedeiros humanos (Steenbergen *et al.*, 2001; Derengowski *et al.*, 2013).

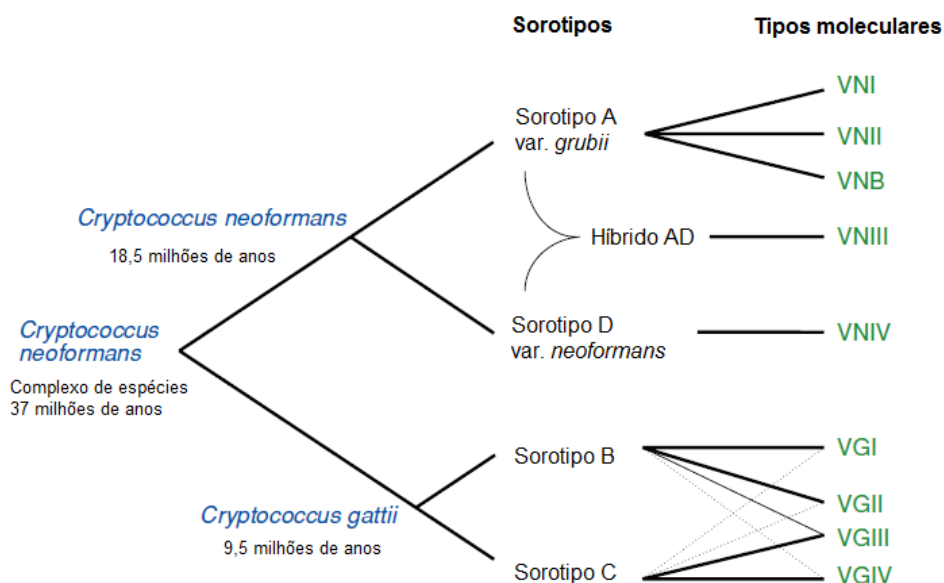
A similaridade entre amebas e macrófagos se estende desde a estrutura celular e fisiologia bioquímica até processos de captação e interação com micro-organismos patogênicos, sendo sugerido que amebas e macrófagos possuem um ancestral comum (Siddiqui e Khan, 2012a; Gaudet *et al.*, 2016). A partir desses dados, nos questionamos se essas duas células fagocíticas compartilhariam mecanismos antifúngicos conservados, na tentativa de destruir o patógeno com o qual entram em contato. Um exemplo seria a privação de micronutrientes essenciais, como metais de transição, necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Potrykus *et al.*, 2014). Nesse contexto, esse trabalho versa sobre a análise da capacidade de organismos ameboides alterarem a homeostase de metais, mais especificamente do zinco, durante sua interação com o fungo *Cryptococcus gattii*, como uma tentativa de eliminá-lo.

### 1.1. Gênero *Cryptococcus*

Fungos pertencentes ao gênero *Cryptococcus* são leveduras basidiomicéticas encapsuladas e são encontrados dispersos no ambiente (Pappas, 2013). Esse grupo é composto por 37 espécies diferentes reconhecidas, contudo *C. neoformans* e *C. gattii* são as duas espécies mais estudadas por serem patogênicas, com capacidade de crescer à 37°C, tendo assim a habilidade de infectar seres humanos e causar a criptococose (Li e Mody, 2010).

Antigamente, os agentes etiológicos da criptococose eram considerados espécies homogêneas, sendo nomeados somente como complexo de espécies *C. neoformans*. Contudo, posteriormente, a classificação desse complexo foi alterada e as espécies foram então diferenciadas e classificadas como *C. neoformans* e *C. gattii*, em decorrência da identificação de diversas diferenças entre ambos, como distribuição geográfica, nichos ecológicos, epidemiologia, patobiologia, sintomas clínicos, características moleculares e heterogeneidade genética. Atualmente, isolados de *C. neoformans* podem ser classificados em duas variedades: *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo D), podendo ainda haver a recombinação de ambos e geração de AD híbridos (Cogliati, 2013; Hagen *et al.*, 2015). Os sorotipos são diferenciados de acordo com o grau reações de aglutinação capsular, baseada na reação imunológica produzida com componentes da sua cápsula polissacarídica. Além disso, esses sorotipos são subdivididos em nove tipos moleculares diferentes, com base na identificação de polimorfismos no seu DNA, isto é, baseado na variação genética intra e inter espécies (Figura 1). O sorotipo A contém os padrões VNI, VNII e VNB; híbridos AD contém o

padrão VNIII; sorotipo D contém o padrão VNIV (Lin e Heitman, 2006). A espécie *C. gattii* é dividida em dois sorotipos, sorotipo B e sorotipo C. Sorotipo B agrega os padrões VGI, VGII e VGIII; e o sorotipo C define padrões predominantemente VGIII e VGIV (Figura 1) (Lin e Heitman, 2006).



**Figura 1: Evolução do complexo de espécies de *C. neoformans*.** O complexo de espécies de *Cryptococcus* contém pelo menos duas subespécies: *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum. Eles são divididos em quatro sorotipos, consistindo de pelo menos nove tipos moleculares. Adaptado de Lin and Heitman, 2006.

*C. neoformans* é amplamente encontrado em solos contaminados com excretas de pomba, tem uma distribuição global e infecta especialmente pessoas imunocomprometidas, como pacientes com AIDS (Cogliati, 2013). Também apresenta um maior tropismo pelo sistema nervoso central, sendo o principal causador do quadro de meningoencefalite (Perfect, 2012). *C. gattii* tem sua presença mais associada com árvores de eucalipto e solo ao redor de árvores, sua distribuição é mais frequente em regiões tropicais e subtropicais, todavia já foi identificada sua presença também em regiões temperadas, durante um surto

de criptococose ocorrido na Ilha de Vancouver, BC, Canadá em 1999. A infecção por *C. gattii* ocorre especialmente em pessoas imunocomprometidas, imunocompetentes e também indivíduos aparentemente saudáveis (Kidd *et al.*, 2004; Li e Mody, 2010; Cogliati, 2013; Kwon-Chung *et al.*, 2014).

Além disso, há diferenças na morfologia dos esporos sexuais de ambas espécies patogênicas de *Cryptococcus* e nas propriedades nutricionais para o crescimento das mesmas. Por exemplo, *C. gattii* utiliza glicina como fonte de carbono e nitrogênio, enquanto *C. neoformans* utiliza apenas glicina como fonte de carbono. Essa diferença permite diferenciar as duas linhagens através de um diagnóstico colorimétrico (Chang *et al.*, 2015).

Entretanto, apesar das diferenças, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam diversas características em comum, sendo considerados organismos correlatos. Dentre as similaridades, pode-se destacar: (1) compartilham 85-90% de identidade genômica, (2) são patógenos intracelulares facultativos, (3) podem iniciar uma infecção e causar doença em modelos animais de estudo, (4) as medidas terapêuticas utilizadas para combater a criptococose são as mesmas (Springer *et al.*, 2012). Também são haplóides, possuem morfologia celular similar de brotamento, a maioria dos isolados se reproduz sexualmente e apresentam os mesmos fatores de virulência (Kronstad *et al.*, 2008).

## **1.2. Fatores de Virulência**

Diversos fatores de virulência são utilizados por *Cryptococcus* para manter-se viável no interior de células hospedeiras (Springer *et al.*, 2012). Dentre os principais, que parecem ser os responsáveis por diferenciá-los de outros fungos, destacam-se: (i) termotolerância; isto é, capacidade de crescimento à 37°C, temperatura do corpo do

hospedeiro mamífero (Perfect, 2006); (ii) produção de uma cápsula polissacarídica composta principalmente por glucuronoxilomanana (GXM), glucuronoxilomanogalactana (GXMGal) e manoproteínas, que aumenta seu diâmetro durante a infecção e tem ação protetora contra fagocitose, especialmente de macrófagos. Também apresenta propriedades imunomodulatórias, com redução da inflamação sistêmica e secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Kronstad *et al.*, 2008); (iii) produção e depósito de melanina na parede celular, um pigmento com papel protetor contra estresse oxidativo (Kronstad *et al.*, 2008; Bielska e May, 2016); (iv) Secreção de fosfolipase B, enzima que facilita adesão do fungo às células epiteliais do pulmão, ajuda a iniciar infecção intersticial pulmonar e a disseminação via linfática e sanguínea (Wright *et al.*, 2007); (v) Atividade de urease, enzima que hidroliza uréia em amônia e carbamato, contribuindo para atravessar a barreira hematoencefálica, provavelmente via ação da amônia em causar dano nas células epiteliais cerebrais (Shi *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Além disso, os atributos da virulência permitem a esses micro-organismos escapar da ação de células de defesa. Já foi descrita a capacidade desse fungo de sobreviver, mantendo-se em estado latente, e replicar no interior de macrófagos, além de fazer exocitose lítica ou não-lítica após sua fagocitose (Alvarez e Casadevall, 2006).

### **1.3. Criptococose**

A criptococose foi diagnosticada pela primeira vez na Alemanha, em 1894 pelos médicos Busse e Bushke. Nesse mesmo ano, o agente etiológico foi isolado de um suco de pêssigo pelo micologista Sanfelice, na Itália. A sua fonte no meio ambiente se manteve desconhecida até 1951 quando Dr. Chester Emmons isolou o fungo do solo, verificou sua

alta concentração em excretas de aves e elucidou sua patobiologia, caracterizando assim o agente etiológico (Mitchell e Perfect, 1995).

Considerada uma das doenças fúngicas fatais mais prevalentes (Schmiedel e Zimmerli, 2016), a criptococose é uma infecção oportunista, responsável por gerar em média um milhão de novos casos em todo o mundo e mais de 600 mil mortes por ano, devido especialmente ao comprometimento do sistema nervoso central em pacientes imunodeficientes (Pappas, 2013). A meningite criptocócica é rara na Europa, todavia possui altos índices de incidência na África sub-saariana devido ao grande número de indivíduos HIV positivos. A maioria dos casos são causadas pela espécie *C. neoformans* por essa estar mais associada com a infecção em pacientes imunocomprometidos e também por *C. gattii* ter uma distribuição geográfica mais restrita (Schmiedel e Zimmerli, 2016). A epidemiologia dessa doença tem um amplo espectro, variando desde uma infecção cutânea, uma pneumonia até infecção sistêmica fatal (Srikanta *et al.*, 2014).

#### **1.4. Ciclo de vida de *Cryptococcus* spp. e sua Interação com Hospedeiros**

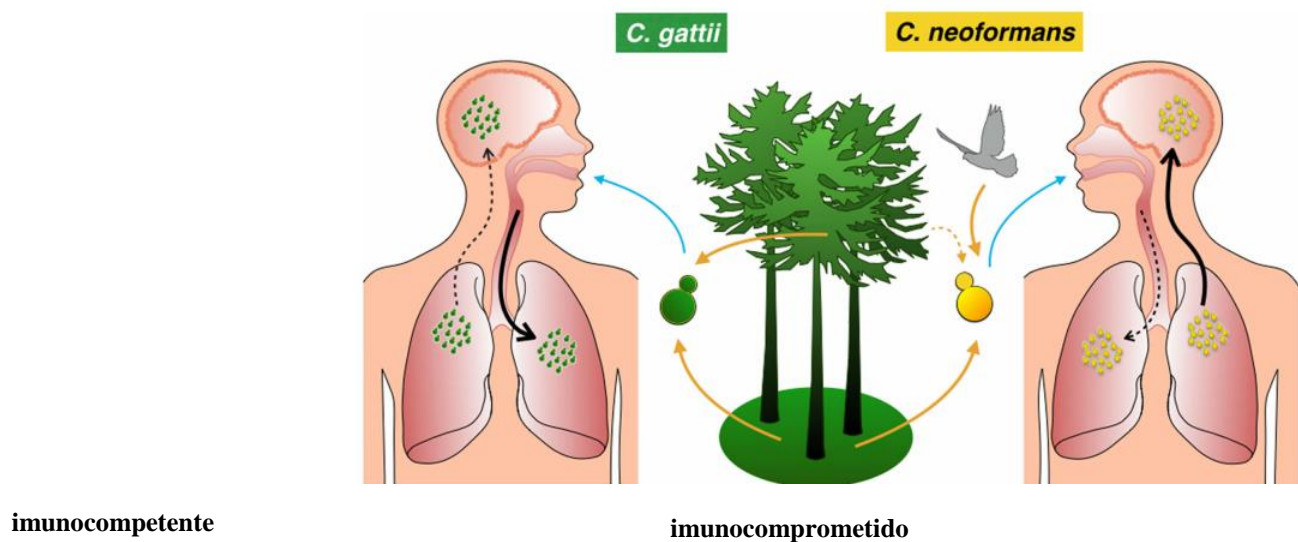
##### **Mamíferos**

Assim como outros fungos patogênicos para hospedeiros humanos, *Cryptococcus* spp. propaga-se através de esporos ou células dessecadas presentes no ambiente. O indivíduo inala essas partículas fúngicas, que chegam até o pulmão e causam uma infecção pulmonar inicial que pode ser assintomática, limitada ao pulmão ou disseminada (Velagapudi *et al.*, 2009). A disseminação da infecção pode ocorrer principalmente de duas maneiras: (i) via sanguínea, no qual o fungo consegue percorrer todo o corpo do hospedeiro e atingir diferentes órgãos através do fluxo sanguíneo; ou (ii) via sistema linfático (Li e Mody, 2010). Entretanto, também pode disseminar-se através de um



mecanismo denominado “Cavalo de Tróia”, no qual as células criptocócicas são fagocitadas por células de defesa no estágio inicial da infecção e conseguem manter-se viáveis no interior das mesmas. Dessa forma, o fungo acaba sendo então levado a tecidos distantes, sem ser exposto à ação do sistema imune (Ma *et al.*, 2006). Além disso, células fúngicas que realizaram exocitose podem ser fagocitadas rapidamente novamente, de forma intencional, para evitar o disparo de uma resposta imune hospedeira (Liu *et al.*, 2012).

Através dessas estratégias, o fungo pode então chegar até a barreira hematoencefálica (Chang *et al.*, 2004), atravessá-la via danos causados às células epiteliais cerebrais, e assim atingir o SNC e causar um quadro de meningoencefalite (Figura 2) (Wright *et al.*, 2007).



**Figura 2: Processo de infecção de *C. gattii* (esquerda) e *C. neoformans* (direita).** A infecção inicia pela inalação de esporos ou células fúngicas dessecadas, que irão alojar-se nos pulmões. Se o fungo conseguir espalhar-se e chegar até o sistema nervoso central (SNC), pode gerar um quadro de meningoencefalite, muitas vezes letal. Há diferenças entre as duas espécies de *Cryptococcus spp.* quanto sua origem ambiental, condições do hospedeiro e tropismo por diferentes órgãos. Adaptado de Bielska, 2016.

No pulmão, esse patógeno entra em contato com neutrófilos, células dendríticas e macrófagos alveolares, que são as primeiras linhagens celulares a encontrar com essas partículas criptocócicas. As células de defesa, especialmente os macrófagos, agem contra a presença do fungo através da fagocitose (Gibson e Johnston, 2015). Essas células fagocíticas então englobam o organismo invasor, formando um fagossomo que irá maturar, acidificar e fundir-se com o lisossomo e originar uma outra estrutura denominada fagolisossomo. No interior desse vacúolo, há a formação de um ambiente inóspito para que haja a destruição do patógeno. Esse ambiente é caracterizado por ter baixo pH, presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), e também de peptídeos antimicrobianos (Flannagan *et al.*, 2015; Leopold Wager *et al.*, 2016). Além disso, os macrófagos alveolares também fazem o recrutamento de outras células de defesa para o local de infecção (e.g. células T CD4+ e CD8+) através da apresentação de antígenos e da liberação de citocinas e quimiocinas, como IL-2, IL-12, IL-18, interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). A presença dessas moléculas promove uma resposta especialmente Th1, que tem ação protetora contra *Cryptococcus* spp.. Porém quando há uma exacerbação do processo inflamatório, ocorre uma resposta imune anti-inflamatória tipo Th2, com liberação de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. Essa segunda resposta é estimulada quando a infecção apresenta grandes proporções, visando diminuir o grau de dano tecidual no hospedeiro (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Leopold Wager *et al.*, 2016).

Em indivíduos saudáveis, a resposta do sistema imune costuma ser efetiva na eliminação de células fúngicas inaladas. Contudo, indivíduos que tem ou estão com esse sistema prejudicado, não conseguem eliminar o patógeno e ainda permitem a sua disseminação (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

### 1.5. Protozoários ambientais

Por estar presente no meio ambiente, *Cryptococcus* spp. pode interagir com diversos outros organismos, incluindo protozoários. Até os anos 90, mais de 50 mil espécies de protozoários haviam sido identificadas, sendo a maioria delas organismos de vida livre, encontrados em praticamente todos os habitats existentes. Além dessas, existem também espécies parasitárias (Yaeger, 1996).

As espécies parasitárias patogênicas, capazes de causar doença em seres humanos, podem ser adquiridas através de diversas formas, incluindo: vetores artrópodes como mosquitos, via fecal-oral, trato respiratório e geniturinário, pele ou por transmissão indireta via objetos inanimados como toalhas, lentes de contato e instrumentos cirúrgicos (Khan, 2006). Muitos desses patógenos causam infecções amenas que podem não ser percebidas em indivíduos saudáveis, porém podem gerar um quadro grave em pessoas imunodeprimidas, especialmente em pacientes com AIDS que não realizam terapia anti-retroviral. Por exemplo, *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita muito comum, causador de doença com leves sintomas em pessoas híginas. Todavia, pode levar a morte em indivíduos HIV+ por um quadro de encefalite toxoplásmica fatal (Yaeger, 1996).

Dentre os protozoários, encontram-se um grupo de organismos amebóides. Baseado na análise de sequências de rRNA, estima-se que amebas divergiram evolutivamente dos demais grupos de eucariotos como os fungos ( $\sim 1.2 \times 10^9$  anos atrás), plantas e animais ( $\sim 1 \times 10^9$  anos atrás) (Siddiqui e Khan, 2012b). Esses organismos ganharam a atenção de estudiosos ao longo do tempo devido seu importante papel no ecossistema e por algumas de suas espécies serem capazes de infectar os seres humanos (Marciano-Cabral e Cabral, 2003).

### **1.6. *Acanthamoeba* spp.**

*Acanthamoeba* é um dos gêneros da família Acanthamoebidae, pertencente à ordem Amoebida. *Acanthamoeba* foi descoberta e descrita pela primeira vez por Castellani, em 1930, como um contaminante de uma cultura do fungo *Cryptococcus pararoseus* (Castellani, 1930). Entretanto, somente no ano seguinte seu gênero foi estabelecido e nele estão reunidas amebas que apresentam projeções espinhosas e superficiais, conhecidas como acantopódios (Siddiqui e Khan, 2012b). São organismos de vida livre, habitantes de solos e águas. Já foram isolados de diversos locais como águas de rios, mares, locais de armazenamento de água, solos de regiões tropicais e árticas, de rochas e também de locais como casas e hospitais, em umidificadores, ar-condicionado, ventiladores, aquecedores, pias, chuveiros e inclusive em materiais cirúrgicos e lentes de contato (Schuster e Visvesvara, 2004).

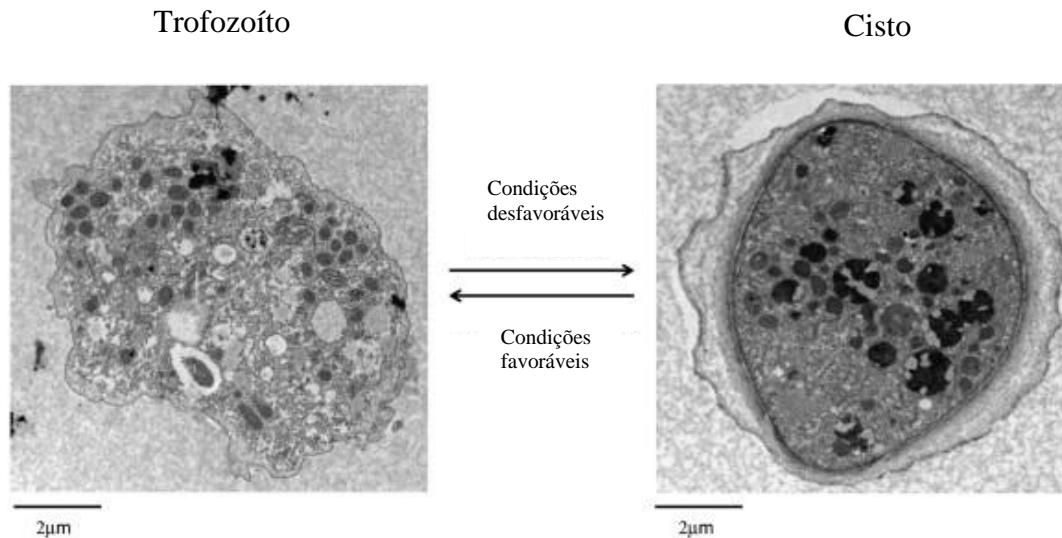
O ciclo de vida de *Acanthamoeba* consiste em dois estágios: (1) trofozoíto e (2) cisto (Figura 3). O trofozoíto varia seu tamanho médio entre 25-40µm e é a fase em que a célula está metabolicamente ativa, isto é, quando ela pode se alimentar (principalmente de bactérias e fungos), se reproduzir (por fissão binária) e se locomover (via acantopódios) (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Sua mudança para o estágio de cisto ocorre quando as condições do meio ambiente tornam-se desfavoráveis, como restrição de nutrientes, mudança na osmolaridade, temperatura ou pH. Nessas situações, o trofozoíto diferencia-se em cisto, medindo entre 13-20 µm de diâmetro e sendo esse considerado um estado dormente, isto é, quando a célula diminui muito sua atividade metabólica (Khan, 2008). Os cistos são constituídos por uma dupla parede: o ectocisto (externo) e o endocisto (interno).

O ectocisto é enrugado, com diversas ondulações, constituído de proteínas e lipídeos e funciona como uma “concha” para proteger a ameba durante condições desfavoráveis. O endocisto contém celulose e pode variar seu formato, sendo estrelado, poligonal, oval ou esférico (Visvesvara *et al.*, 2007).

Estudos prévios mostraram que os cistos são capazes de manter-se viáveis por pelo menos 25 anos no meio ambiente (Mazur *et al.*, 1995). Além disso, possuem estruturas conhecidas como ostíolos ou poros, que estão presentes na junção entre o ecto e endocisto e são usados para detectar mudanças no ambiente (Visvesvara *et al.*, 2007). Se as condições ambientais tornam-se favoráveis novamente, o cisto diferencia-se em trofozoíto, possibilitando sua reprodução e fechamento do ciclo (Siddiqui e Khan, 2012b). Para algumas espécies patogênicas (oportunistas ou não) de *Acanthamoeba*, os cistos presentes no meio ambiente podem ser inalados por hospedeiros suscetíveis (Marciano-Cabral e Cabral, 2003; Khan, 2008).

Quando metabolicamente ativas, as *Acanthamoeba* apresentam um ou mais vacúolos contráteis no citoplasma, que tem a função de expelir água para manter a regulação osmótica. Há a presença de outros vacúolos no citoplasma, como lisossomos, vacúolos digestivos (partículas são capturadas nesses vacúolos) e outros contendo glicogênio (Bowers e Korn, 1968). Sua membrana plasmática é constituída por 33% de proteínas, 25% de fosfolipídeos, 13% de esteróis e 29% de lipofosfoglicanos (Korn e Wright, 1973). Possuem um grande número de mitocôndrias, podem apresentar um núcleo que ocupa 1/6 do tamanho celular ou serem multinucleados (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Movem-se relativamente rápido através de acantopódios formados por citoplasma hialino e disposto como espinhos, sendo esses importantes para movimentos celulares e

captura de presas, além de terem filamentos de actina mais concentrados abaixo da membrana plasmática que são responsáveis por resistir à tensão e formar protrusões citoplasmáticas (Siddiqui e Khan, 2012b). Também já foi observado sua capacidade de produzir prostaglandinas (Hadas e Mazur, 1997).



**Figura 3: Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.** Em ambiente favorável, com nutrientes, temperatura, pH e osmolaridade ideais, *Acanthamoeba* se mantém na forma metabolicamente ativa de trofozoíto (A). Em condições desfavoráveis, com mudança nos parâmetros anteriormente descritos, a célula se diferencia em sua forma dormente de cisto (B), que é muito resistente, inclusive em situações extremas. Adaptado de Siddiqui, 2012b.

Esse micro-organismo também desenvolve um papel importante no ecossistema. Dentre suas funções estão: alterar a comunidade microbiana e reciclar nutrientes no ambiente, regulando a população bacteriana no solo. Isto é, as bactérias são decompositores primários, que decompõe o material orgânico, mas não são capazes de liberar minerais de sua própria massa. Sendo assim, as amebas, decompositores secundários, consomem essas bactérias e liberam os minerais, disponibilizando esses nutrientes novamente para os decompositores primários (Siddiqui e Khan, 2012b).

Algumas das espécies do gênero *Acanthamoeba* são consideradas patogênicas, podendo infectar seres humanos. Uma das principais desordens que tem esses micro-

organismos como agente causador é a ceratite por *Acanthamoeba* (CA) ou ceratite amebiana que implica em infecções oculares (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Elas contaminam especialmente lentes de contato e atacam diretamente a superfície da córnea, causando danos à mesma quando em contato com o olho (Schuster e Visvesvara, 2004). Além disso, espécies como *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* e *A. divionensis* já foram identificados como causadores de Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), doença que atinge principalmente pessoas HIV+ ou com doenças crônicas, que normalmente leva ao óbito (Visvesvara *et al.*, 2007). Ademais, ainda há diferentes linhagens de uma mesma espécie, como *A. castellanii*, por exemplo, que apresentam variações em seu genótipo, podendo variar o grau de virulência desde de virulentas, pouco virulentas até avirulentas (Khan, 2006).

### **1.7. Interação de micro-organismos com o hospedeiro ameboide**

Espécies do gênero *Acanthamoeba* podem servir como hospedeiros para diversos outros micro-organismos como vírus, bactérias e fungos. Em 1956 foi descrita pela primeira vez a capacidade de bactérias invadirem e romperem amebas (Drozanski, 1956). Em 1975, observou-se que eles podiam apresentar uma relação de endossimbiose (Greub e Raoult, 2004). Posteriormente, verificou-se que *Acanthamoeba* spp. eram capazes de “abrigar” bactérias patogênicas para mamíferos, incluindo *Mycobacterium avium* e *Legionella* spp (Visvesvara *et al.*, 2007). Todavia, já está bem estabelecido que essas mesmas amebas que podem acolher bactérias são grandes consumidoras desses organismos no meio ambiente. As amebas alimentam-se através da captura das bactérias via fagocitose, para posterior lise em fagolisossomos. Resumindo, a interação entre *Acanthamoeba* e bactérias é bastante complexa e depende tanto da virulência da ameba (se

a ameba que interage for de uma linhagem virulenta) como da bactéria e das condições do ambiente (Khan, 2006).

De alguma forma, esses micro-organismos procariotos, assim como fungos e algas, desenvolveram resistência à ação desses protistas. Além de bactérias, outros organismos conhecidamente virulentos também foram identificados como ameba-resistentes, incluindo: *C. neoformans*, mimivirus, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Francisella tularensis* (Greub e Raoult, 2004).

Vários dos patógenos intracelulares capazes de desenvolver-se no interior de amebas também se mantêm viáveis e resistentes no interior de macrófagos (Steenbergen *et al.*, 2001). *Legionella pneumophila* foi um dos primeiros micro-organismos patogênicos a humanos descrito com habilidade de persistir e se multiplicar no interior de células de macrófagos e amebas (Bozue e Johnson, 1996). Vários estudos demonstraram que *C. neoformans* também apresenta uma infecção com características semelhantes durante a interação com macrófagos e células ameboides, indicando a existência de um ambiente intrafagossômico similar em ambas interações (Steenbergen *et al.*, 2001; Chrisman *et al.*, 2010; Derengowski *et al.*, 2013).

### **1.8. Comparação entre fagócitos: macrófagos e amebas**

Como citado anteriormente, *L. pneumophila* é capaz de manter-se viável no interior de hospedeiros muito distantes evolutivamente, como amebas e macrófagos (Bozue e Johnson, 1996). Estudos genéticos, biológicos e epidemiológicos evidenciaram que amebas atuaram como um organismo incubador e preparador para essa bactéria tornar-se patógeno oportunista para macrófagos alveolares (Greub e Raoult, 2004; Molmeret *et al.*, 2005). Desta forma, pode-se postular que a virulência de *L. pneumophila* em macrófagos é uma



consequência da evolução por sua interação com amebas, baseado no fato que fatores utilizados por essa bactéria para sobreviver e replicar no interior das células de defesa são as mesmas requeridas durante seu contato com organismos ameboides (Segal e Shuman, 1999; Swanson e Hammer, 2000; Escoll *et al.*, 2013; Price e Vance, 2014).

Evidências similares foram observadas para o fungo *C. neoformans*. Steenbergen (Steenbergen *et al.*, 2001) comprovou que *Acanthamoeba castellanii* (Ac) fagocita *C. neoformans* para utilizá-lo como alimento, contudo essa levedura tem a capacidade de lisar essas células, além de conseguir se replicar e escapar das ações antifúngicas de *A. castellanii*, da mesma forma que em macrófagos.

Dentre os fatores de virulência utilizados por *C. neoformans* para manter-se viável tanto no interior de amebas quanto de macrófagos, estão incluídos: cápsula polissacarídea aumentada para evitar a fagocitose e a atividade de fosfolipase (Steenbergen *et al.*, 2001; Chrisman *et al.*, 2010). O fato de *C. neoformans* responder de forma semelhante durante a sua interação com ambas células fagocíticas implica que esses fungos enfrentam um ambiente intracelular similar. De fato, os processos de infecção de *C. neoformans* com *A. castellanii* e macrófagos são muito parecidos em nível molecular: (1) tanto a célula mamífera quanto a protozoária fagocitam e internalizam *C. neoformans*; (2) a célula fúngica internalizada é englobada por vacúolos ligados à membrana, onde é capaz de replicar-se; (3) esses vacúolos são preenchidos com polissacarídeo (contra-ção fúngica de defesa) que resultam em protrusões da membrana de ambas células fagocíticas; (4) fusão do fagossomo com lisossomos para geração de um ambiente tóxico para o patógeno; (5) secreção de enzimas lisossomais e hidrolíticas, espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos; (6) lipídeos polares de origem ameboide ou animal, especificamente

glicofosfocolina, podem induzir crescimento capsular do fungo (Steenbergen *et al.*, 2001; Derengowski *et al.*, 2013). Além disso, outras similaridades incluem: morfologia e ultra estruturas semelhantes, metabolismo oxidativo com maior captação de O<sub>2</sub> durante a fagocitose e aumento no número de mitocôndrias em trofozoítos e macrófagos ativados (Siddiqui e Khan, 2012a).

Assim como *Cryptococcus* spp. pode “esconder-se” no interior de células de defesa no intuito de não ativar a resposta imune do hospedeiro em um mecanismo chamado de “Cavalo de Tróia”, amebas são também consideradas os “Cavalos de Tróia ambientais” do mundo microbiano (Winiecka-Krusnell e Linder, 1999). No caso, alguns micro-organismos podem manter-se no interior de células ameboides enquanto essas amebas invadem hospedeiros suscetíveis (Winiecka-Krusnell e Linder, 2001; Guimaraes *et al.*, 2016). Com base em todos os aspectos em comum acima descritos, há estudos que inferem que amebas e macrófagos possuem um antecessor comum, que provavelmente apresentava atividade fagocítica. Contudo, é provável que as amebas tenham sofrido uma menor interferência na escala evolutiva, enquanto as células mamíferas diversificaram e especializaram suas funções (Siddiqui e Khan, 2012a; Gaudet *et al.*, 2016).

### **Imunidade Nutricional**

A imunidade nutricional pode ser definida como um processo de restrição de nutrientes essenciais pelo hospedeiro ou aumento dos mesmos a níveis tóxicos, visando prevenir ou eliminar infecção causada por agentes patogênicos (Hood e Skaar, 2012). Dentre os nutrientes essenciais, encontram-se os metais de transição como ferro, zinco e cobre. Eles desempenham importantes papéis biológicos como cofatores enzimáticos (catalíticos e estruturais), importantes para realização de processos celulares e funções

imunológicas, sendo por isso fundamentais para todos os organismos vivos (Kehl-Fie e Skaar, 2010).

Na relação patógeno-hospedeiro, os micronutrientes são extremamente importantes para ambos. No hospedeiro mamífero, eles são fundamentais para o funcionamento correto do sistema imune. Sabe-se que a deficiência de metais de transição inibe as funções imunes por afetar a resposta inata mediada por células T e a resposta adaptativa, gerando um desbalanceamento da resposta hospedeira e tornando-o mais suscetível a infecções (Wintergerst *et al.*, 2007; Stafford *et al.*, 2013). Já para o micro-organismo invasor, esses metais de transição são essenciais para seu metabolismo e processos bioquímicos, contribuindo assim para a patogenicidade e efetividade dos fatores de virulência (Kehl-Fie e Skaar, 2010).

Pelo fato de os metais de transição serem tão importantes, durante a infecção ocorre uma resposta complexa, na qual ambos os organismos que estão interagindo utilizam estratégias para manter os níveis adequados desses elementos (Silva *et al.*, 2011). Por esse motivo, como citado anteriormente, as células hospedeiras desenvolveram a capacidade de alterar os níveis disponíveis desses metais como uma estratégia antimicrobiana e protetora, no qual o organismo é capaz de reduzir o acesso do patógeno a esses nutrientes através do sequestro dos metais via proteínas carregadoras ou compartimentalizando-os em estoques intracelulares (Potrykus *et al.*, 2014).

A maioria das informações sobre imunidade nutricional quanto a sua utilização por células mamíferas estão relacionadas com resposta defensiva contra bactérias. Todavia, já foi descrito também o uso dessa estratégia durante interações com células fúngicas, como *Histoplasma capsulatum* (Winters *et al.*, 2010), *Candida albicans* (Crawford e Wilson,

2015), *Cryptococcus neoformans* (Ballou e Wilson, 2016; Dos Santos, 2016) e *Cryptococcus gattii* (Potrykus *et al.*, 2014).

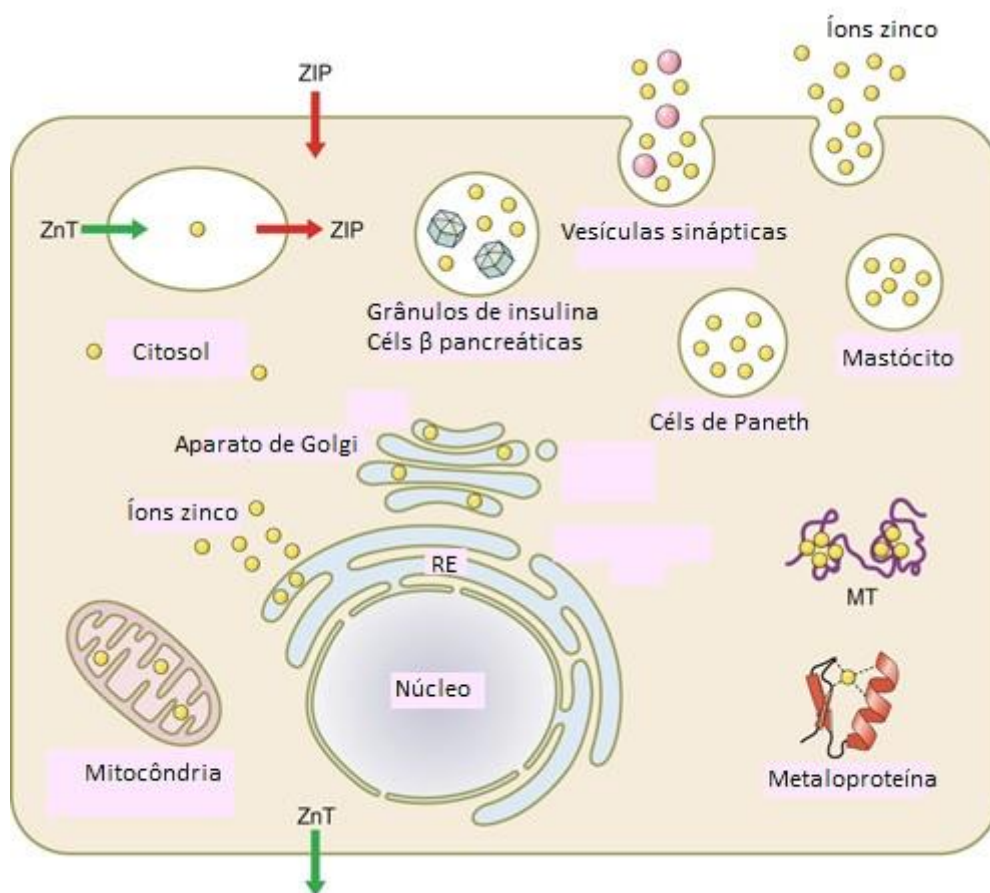
Zinco (Zn) é o segundo metal de transição mais abundante no ser humano (Ballou e Wilson, 2016). Esse metal é um cátion divalente e importante cofator, que desempenha tanto papel estrutural quanto catalítico e já foi sugerido interagir com aproximadamente 10% das proteínas do hospedeiro vertebrado (Kehl-Fie e Skaar, 2010). A deficiência de zinco já foi associada com atrofia do timo, resposta prejudicada de células de defesa (células T, B e NK) e produção de citocinas T helper-1 (Th1). Nas células eucarióticas, Zn é distribuído no citoplasma (50%), núcleo (30-40%) e membrana (10%) e a regulação de seus níveis é feita por proteínas ligadoras, metalotioneínas (MT) e transportadores de zinco (Subramanian Vignesh *et al.*, 2013a; Kambe *et al.*, 2015).

### **1.9.Mecanismos de homeostase de zinco**

Como citado acima, a disponibilidade de Zn tem papel regulatório no sistema imune. Alguns estudos mostraram que Zn estimula a capacidade fagocítica de macrófagos e que a eliminação de patógenos ocorre através da regulação da disponibilidade desse metal no interior dessas células (ação antimicrobiana) (Stafford *et al.*, 2013).

Os níveis de Zn intracelular podem ser controlados através de alguns mecanismos, como: (i) aquisição desse metal pelo deslocamento do mesmo do espaço extracelular para o intracelular, (ii) redistribuição de zinco entre diferentes compartimentos intracelulares, e (iii) reversão da liberação oxidativa de íons zinco de proteínas armazenadoras (Haase e Rink, 2009). Para manter a homeostase desse metal estritamente regulada, já que seu excesso pode tornar-se tóxico para a célula (Stafford *et al.*, 2013), há duas importantes famílias de proteínas transportadoras regulando o sistema: SLC39 (ZIPs) e SLC30 (ZnTs)

(Figura 4). Proteínas pertencentes à família ZIP, caracterizadas pelo domínio conservado de código PF02535 junto ao banco de dados PFAM, são responsáveis por transportar Zn provindos do meio extracelular ou de organelas celulares para o citosol. Já as proteínas pertencentes à família ZnT, as quais contêm o domínio conservado de código PF01545 junto ao banco de dados PFAM, fazem o papel oposto, no qual o metal é deslocado para fora do citosol via exportação ou sequestro para o interior de organelas (Haase e Rink, 2009; Haase, 2013). Além disso, existem as metalotioneínas (MT), que são proteínas intracelulares ricas em cisteína que ligam até 7 íons zinco e os carregam até os compartimentos. Essas proteínas MT estão envolvidas na homeostase de zinco e atuam de forma a reduzir a intoxicação por metais, proteger contra estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS) e regular metabolismo via doação de Zn (Coyle *et al.*, 2002).



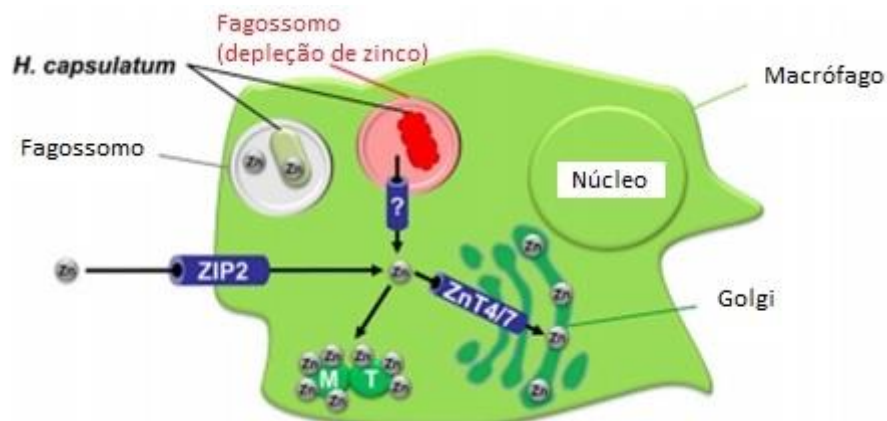
**Figura 4: Distribuição do zinco nas células.** O sistema de controle da homeostase celular de zinco é composto por transportadores ZnT (seta verde) e ZIP (seta vermelha). Os íons de zinco ( $Zn^{2+}$ ) no citosol são ligados à metaloproteínas e metalotioneínas (MTs), sequestrados ou liberados de organelas intracelulares via ZIPs ou ZnTs, respectivamente. Adaptado de Kamb, 2015.

As células mamíferas dispõem de 14 proteínas da família ZIP e 10 proteínas da família ZnT. É predito que ZIPs tenham 8 domínios transmembrana, enquanto ZnT tem 6 domínios (Lichten e Cousins, 2009). Sabe-se que a expressão de alguns desses transportadores pode ser célula-específica, sendo dinamicamente regulados em resposta aos níveis de Zn e citocinas ou ainda sua expressão pode regular o sinal transducional através dos níveis de Zn no interior da célula (Haase e Rink, 2009). Além disso, análises filogenéticas mostraram que os ortólogos desses transportadores entre humanos e camundongos são bastante relacionados e evolutivamente próximos (Stafford *et al.*, 2013).

Dentre as células mamíferas, os macrófagos tem recebido atenção ao longo dos anos quanto às estratégias antimicrobianas que utilizam para eliminar patógenos invasores do corpo hospedeiro (Appelberg, 2006). Macrófagos são uma população de células residentes de tecido auto-renovável e podem originar de monócitos circulantes em resposta a um estímulo fisiológico, como liberação de citocinas. Apresentam um amplo espectro de funções, incluindo combate à infecção via reconhecimento de micróbios, remodelamento de tecidos e reparo (Flannagan *et al.*, 2015). Essa ampla plasticidade funcional originou o termo “polarização”, no qual se observou *in vitro* que monócitos estimulados com GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, em inglês) e sinais inflamatórios (ex:  $IFN-\gamma$  e LPS) originam macrófagos M1, enquanto monócitos em contato com M-CSF (macrophage colony-stimulating factor, em inglês) e IL-4 diferenciaram-se em macrófagos M2 (Lacey *et al.*, 2012; Flannagan *et al.*, 2015). O fenótipo M1 é caracterizado pela expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, produção de reativos de oxigênio e

nitrogênio, promove resposta Th1 e forte resposta antimicrobiana e antitumoral; sua ativação implica em iniciar e manter uma inflamação. Já macrófagos M2 estão envolvidos com infecção por parasitas e promoção do remodelamento tecidual e função imunomodulatória; sua ativação está relacionada com resolução de inflamação crônica (necessária para manter o equilíbrio do corpo). Ou seja, macrófagos M1-M2 expressam e respondem a diferentes citocinas (Sica e Mantovani, 2012).

A função dos macrófagos pode também ser influenciada pelos níveis de zinco. Este metal estimula a fagocitose por macrófagos e sua regulação no interior dessa célula atua na resposta antimicrobiana (Stafford *et al.*, 2013), através da utilização do mecanismo de imunidade nutricional (Haase, 2013). Por exemplo, durante a interação entre macrófagos e *M. tuberculosis*, essas células de defesa aumentam os níveis de Zn, tornando o interior do fagolisossomo tóxico para o micro-organismo fagocitado (Botella *et al.*, 2012; Haase, 2013; Stafford *et al.*, 2013). Todavia, outros estudos mostram que macrófagos podem utilizar o mecanismo oposto: durante sua interação com o fungo *H. capsulatum*, macrófagos ativados com estímulo pró-inflamatório deslocaram Zn do interior do fagolisossomo em direção ao complexo de Golgi, a fim de evitar o acesso da célula fúngica a esse metal para prejudicá-lo (Figura 5) (Haase, 2013; Subramanian Vignesh *et al.*, 2013b; Crawford e Wilson, 2015).



**Figura 5: Redistribuição de zinco no interior de macrófagos na presença do fungo *H. capsulatum*.** Ocorre uma mudança na expressão dos transportadores de zinco em resposta a GM-CSF, levando a um influxo de Zn extracelular e o sequestro do mesmo via metalotioneínas (MT) e via Golgi. Ao mesmo tempo, zinco é removido do fagossomo onde está *H. capsulatum*, gerando um ambiente desfavorável para o fungo. Adaptado de Haase *et al* 2013.

Além de *H. capsulatum*, outros fungos também mostraram sofrer com a deficiência de Zn no interior dos fagossomos de macrófagos, como *C. neoformans*, descrito recentemente por nosso grupo (Dos Santos, 2016). Nesse estudo, descreveu-se que macrófagos-like murinos da linhagem J774.A1 reduziram a disponibilidade de Zn no interior das células durante sua interação com *C. neoformans* através da modulação de seus transportadores de Zn (ZIPs e ZnTs).

Com base nesses dados, surge a questão: como essas células de defesa decidem utilizar a intoxicação ou a deficiência de metais para eliminar um patógeno? O transporte de Zn em macrófagos pode apresentar ações divergentes, dependendo de qual agente infeccioso foi fagocitado e dos níveis de zinco presentes (Haase, 2013; Stafford *et al.*, 2013).

Em relação à homeostase e transporte de Zn em células ameboides, não há dados na literatura. Sabe-se apenas que existem transportadores de zinco nessas células, como por



exemplo, na ameba modelo *Dictyostelium discoideum*. Foram identificados 12 membros na família de transportadores de zinco, todavia não há dados disponíveis da possível localização desses no fagossomo, nem seu papel durante a interação patógeno-hospedeiro (Bozzaro *et al.*, 2013). Em *A. castellanii*, os dados envolvendo metais referem-se apenas à superóxido desmutase de Cu-Zn (cobre e zinco), que cataliza superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, desenvolvendo um papel na defesa antioxidante do organismo (Siddiqui e Khan, 2012b).

Mesmo havendo similaridades nos mecanismos de ação antimicrobianos de amebas com macrófagos e de dados evidenciando que patógenos humanos interagem com amebas no meio ambiente (o que possivelmente os ajudou a desenvolver fatores de virulência para sobreviver no hospedeiro mamífero), há uma grande escassez de estudos sobre o transporte e regulação de zinco em células ameboides. Por esse motivo, o presente trabalho buscou avaliar a homeostase de zinco em *A. castellanii* em resposta à *C. gattii*. Além disso, buscou-se verificar se essas células podem alterar essa homeostase de Zn como uma estratégia antifúngica, objetivando destruir o patógenos para sua ingestão sob a forma de alimento.

## **2. OBJETIVOS**

Objetivo geral foi avaliar a homeostase de zinco em *A. castellanii* como uma possível estratégia antifúngica contra *C. gattii*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Verificar a importância da captação de zinco em *C. gattii* para sua sobrevivência no interior das células fagocíticas de *A. castellanii*;
- Determinar a capacidade de *C. gattii* replicar-se no interior de amebas;
- Avaliar a influência de zinco extracelular na replicação e sobrevivência das células fúngicas no interior de *A. castellanii*;
- Avaliar a expressão de transportadores de zinco em amebas expostas a *C. gattii*;
- Quantificar zinco intracelular em amebas expostas a *C. gattii*;
- Sugerir um possível mecanismo conservado de modulação da homeostase de zinco entre amebas e macrófagos durante a interação com *C. gattii*.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados obtidos durante o período de mestrado estão apresentados em manuscrito intitulado “*Modulation of zinc homeostasis in Acanthamoeba castellanii as an antifungal strategy against Cryptococcus gattii*”, formatado conforme normas para publicação junto ao periódico FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY. Para facilitar a análise, as figuras e suas respectivas legendas estão apresentadas junto ao corpo do texto.

1        **Modulation of zinc homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a possible**  
2        **antifungal strategy against *Cryptococcus gattii*.**

3        Nicole Sartori Ribeiro<sup>a</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>a</sup>, Ane Wichine Acosta Garcia<sup>a</sup>,  
4        Patrícia Aline Gröhs Ferrareze<sup>a</sup>, Laura Fuhrich Fabres<sup>c</sup>, Augusto Schrank<sup>a,b</sup>, Livia  
5        Kmetzsch<sup>a,b</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>c</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>a,b</sup>, Charley Staats<sup>a,b</sup> \*

6        <sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de  
7        Biotecnologia, UFRGS.

8        <sup>b</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências,  
9        UFRGS.

10       <sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de  
11       Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

12

13

14

15

16

17        \*Corresponding author:

18        E-mail address: [staats@cbiot.ufrgs.br](mailto:staats@cbiot.ufrgs.br) (C.C. Staats)

19

20

21

22

23

24 **ABSTRACT**

25 *Cryptococcus gattii* is a basidiomycetous yeast that can be found in environment and  
26 can infect different hosts, including humans. During its life cycle, cryptococcal cells  
27 eventually can take place inside environmental predators, as amoebae and nematodes.  
28 *Acanthamoeba* spp. are free-living protozoa that phagocytes a diversity of microorganisms,  
29 specially bacteria and yeast. Although macrophages and amoebae have a significant  
30 evolutionary distance, they share conserved similar steps of phagocytosis and microbial  
31 killing. In addition, it has been hypothesized that amoebae and macrophages have a  
32 common ancestral. To investigate if there are antifungal strategies in common between  
33 both cellular types, we analyzed the nutritional immunity mechanism. This immunological  
34 strategy reduces the availability of essential nutrients to the pathogen, including zinc. Here,  
35 we investigate the modulation of zinc homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* infected  
36 with *C. gattii*. Phagocytosis and intracellular replications (IPR) inside amoebae cells were  
37 performed using WT strain of *C. gattii* and mutants for the *ZIP1* gene, unable to grow in  
38 absence of zinc. We found that the mutant strain is more readily engulfed by *A. castellanii*  
39 cells compared to WT. In addition, the antifungal activity of such host cells was more  
40 effective against the mutant cells, revealed by IPR analysis. However, the *zip1* $\Delta$  strain  
41 survival increased when additional zinc (10  $\mu$ M) was added to the medium of infected  
42 amoeba cells. These data suggest that engulfed cryptococcal cells are experiencing the  
43 deprivation of zinc inside the phagosome. To further evaluate alterations of zinc  
44 transporters in host cells due to cryptococcal infection, RT-qPCR analysis was performed  
45 for the ZIP and ZnT zinc transporters. An intense modulation of some genes was found  
46 after 3 and 24 hours' post-infection. Furthermore, flow cytometry analysis showed the free  
47 zinc from amoebae are reduced by the cryptococcal presence. These results indicate that  
48 amoeba may use nutritional immunity to reduce fungal cells proliferation, reducing the  
49 zinc availability to the pathogen. Therefore, the presence of living *C. gattii* cells leads to an  
50 alteration in expression of zinc transporters, suggesting that there is a complex modulation  
51 of amoebae zinc homeostasis in response to fungal pathogen.

52 **Keywords:** zinc, zinc transporters, *Cryptococcus gattii*, *Acanthamoeba castellanii*

53

54

## 55 **1. Introduction**

56 *Cryptococcus gattii* is a basidiomycetous yeast that is present in the environment  
57 and it is one of the etiological causes of cryptococcosis, a life-threatening disease that is  
58 associated with near 600.000 deaths worldwide (Park *et al.*, 2009). Yeast or spores are  
59 found in diverse ecological niches, especially in trees or soil around trees, and are able to  
60 infect different hosts (May *et al.*, 2016). The infection in mammalian host begins with the  
61 inhalation of airborne dehydrated yeast cells or spores from the air that arrives in the lung  
62 and typically causes pneumonia or meningitis, which is driven by the dissemination in the  
63 blood system (Harris *et al.*, 2013). In the lung, alveolar macrophages initiate the defense by  
64 the phagocytosis of the yeast cells. Despite the effectiveness of the host defense, the *C.*  
65 *gattii* developed virulence factors that allows it to inhibit and escape from the immune  
66 system, being able to survive in the host (Fan *et al.*, 2005).

67 During its life cycle, *C. gattii* can also interact with other organisms in the  
68 environment, such as amoebae and nematodes (Springer *et al.*, 2012). Free-living amoebae  
69 are a fresh water and soil protozoa that feeds on both bacteria and fungi by phagocytosis  
70 (Rodríguez-Zaragoza, 1994). *Acanthamoeba castellanii*, for instance, can phagocyte and  
71 digest *Cryptococcus neoformans* in a similar mechanism that macrophages uses when this  
72 fungi enters host system (Steenbergen *et al.*, 2001). However, the yeast also developed  
73 strategies to inhibit and escape from amoeba antifungal repertoire. Cryptococcal cells are  
74 capable to kill this amoeba, replicate in the phagocytic vacuole and make nonlytic  
75 exocytosis (Chrisman *et al.*, 2010; Guimaraes *et al.*, 2016). Indeed, these yeast responses  
76 are similar to the infection of *C. neoformans* in macrophage (Alvarez e Casadevall, 2006;  
77 Guimaraes *et al.*, 2016). Furthermore, both protozoan and mammalian phagocytes share  
78 common properties and strategies. During *C. neoformans* infection, both macrophage and  
79 amoebae can engulf the yeast cells in vacuoles, promoting the interaction of such  
80 phagosomes with other organelles, and secret lysosomal enzymes (Swanson e Hammer,  
81 2000; Steenbergen *et al.*, 2001). In fact, it was suggested that amoebae and macrophage  
82 have a common ancestor that probably was a phagocytic cell (Steenbergen *et al.*, 2001;  
83 Siddiqui e Khan, 2012b; Gaudet *et al.*, 2016). Furthermore, it was shown that the  
84 interaction of pathogens such as *Cryptococcus* spp. and *Legionella pneumophila* with

85 phagocytic cells in the environment have helped them to develop a repertoire of anti-  
86 phagocytic mechanisms to subvert the action of the mammalian host immune system,  
87 which means that these abilities could have been acquired during the evolution of prior  
88 fungus-amoeba interaction in the environment (Greub e Raoult, 2004; Bielska e May,  
89 2016).

90 Nutritional immunity can be defined as a restriction of essential nutrients, including  
91 transition metals, such as iron, zinc and copper, that are needed for pathogens development  
92 (Hood e Skaar, 2012). Zinc is the second most abundant transitional metal in living  
93 organisms and it develops an important role in biochemical reactions as enzyme cofactor  
94 (Hood e Skaar, 2012). Macrophages are capable of reducing zinc availability in fungal-  
95 containing phagolysosomes during its infection with different pathogens, such as  
96 *Histoplasma capsulatum* (Haase, 2013) and *Candida albicans* (Lorenz *et al.*, 2004;  
97 Crawford e Wilson, 2015) as a strategy to reduce the proliferation of these microorganisms  
98 (Crawford e Wilson, 2015). Also, data from our group indicated that J774.A1  
99 macrophages-like are also able to decrease zinc levels in the phagosome during the  
100 interaction with *Cryptococcus neoformans* (Dos Santos *et al.*, 2017).

101 Based on the fact that amoebae and macrophages share similar antifungal  
102 mechanisms and on the closeness pathogenicity and behavior between *C. neoformans* and  
103 *C. gattii* inside the host (Velagapudi *et al.*, 2009), we hypothesized that amoeboid cells  
104 could also reduce transitional metals as an antifungal strategy. We investigated the possible  
105 usage of nutritional immunity mechanism by amoebae, specifically zinc, as an antifungal  
106 strategy against *Cryptococcus gattii*.

107

## 108 **2. Materials and Methods**

109

### 110 **2.1 Strains.**

111 The *C. gattii* R265 and *C. gattii zip1Δ* mutant (Schneider, R. D. *et al.*, 2015) strains  
112 were used in this work. Yeast strains were routinely cultured in YPD medium (2% glucose,  
113 2% peptone and 1% yeast extract) and incubated in an orbital shaker (200 rpm) at 30 °C  
114 for at least 18 hours. *Acanthamoeba castellanii* strain *Neff* (ATCC 30010) was kindly  
115 provided by Marilise Rott (Immunology and Parasitology Department UFRGS) and

116 cultured in PYG (2% peptone; 0.2% yeast extract; 1.8% glucose, pH 6.5) supplemented  
117 with penicillin 20 U/ml, streptomycin 20 U/ml and incubated at 30 °C.

## 118 **2.2 Phagocytic index and intracellular proliferation rate (IPR) assays.**

119 To evaluate the phagocytic index and fungal survival inside amoebae, protozoa  
120 cells were cultured in cell culture flasks, counted in Neubauer chamber ( $1 \times 10^5$  cells) and  
121 grown in 96-well plate containing PYG for 2 hours for its adhesion in the plate. *C. gattii*  
122 WT or *zip1* $\Delta$  cells were inoculated in YPD medium for 18 hours at 30 °C. Cryptococcal  
123 cells were washed 3 times with phosphate *buffered* saline (PBS) and counted in Neubauer  
124 chamber ( $1 \times 10^6$  cells). Yeast cells were inoculated at a ratio 10:1 with *A. castellanii* and  
125 the incubation was allowed for 3 and/or 24 hours. The wells were washed 3 times with  
126 warm PBS to remove non-phagocytosed *C. gattii* cells. Amoeba cells were lysed with  
127 0.1% Triton X-100 (Sigma) for recovery of phagocytosed-yeast cells. The lysate was  
128 diluted and plated on YPD-agar for the analysis of the number of colony forming units  
129 (CFU) and determine interaction rate.

130 Intracellular proliferation rate (IPR) was performed as previously described for  
131 macrophages (Ma *et al.*, 2009). Briefly, infection of amoebae was performed as above  
132 described. After 3 hours of incubation, the amoebae cells were washed with PBS. One set  
133 of wells had their amoeba lysed and the intracellular fungi determined by CFU  
134 determination in YPD-agar plates. Fresh YPD medium was added to another set of wells  
135 and the interaction was allowed to occur for further 24 hours. Then, amoebae cells were  
136 washed with PBS, lysed and intracellular yeast cells determined by CFU in YPD-agar as  
137 above described.

138 Another set of experiments was performed to assess the effect of the presence of  
139 extracellular zinc on fungal replication and survival inside amoebae. The phagocytosis  
140 was allowed for 3 hours in the same conditions as described above. Next, the interaction  
141 cells were washed with PBS and incubated with fresh medium containing 10  $\mu$ M of zinc  
142 ( $ZnCl_2$ ) for further 24 hours. Amoeba cells were then lysed and the CFU analysis was  
143 performed in YPD solid agar to determine IPR.

144

## 145 **2.3. Phylogenetic tree construction**

146 Sequences from *Mus musculus*, *A. castellanii* and *Saccharomyces cerevisiae*  
147 belonging to the SLC39 and SLC30 transporter families were collected in Uniprot  
148 (Consortium, 2015) and AmoebaDB (Aurrecochea *et al.*, 2011). Such sequences were  
149 identified based on PFAM conserved domains signatures ZIP (PF02535) and Cation\_efflux  
150 (PF01545), respectively. The protein sequences were aligned using webPRANK  
151 (Löytynoja e Goldman, 2010) with the default options. The best fitting model of amino  
152 acid substitution was evaluated using ProtTest (Abascal *et al.*, 2005) under the BIONJ JTT  
153 assumption. Bayesian inference was conducted employing a JTT model using Mr. Bayes.  
154 MCMC sampling approach was used to calculate posterior probabilities. Four Markov  
155 chains were run 1,000,000 times. The chain was sampled every 100<sup>th</sup> generation, and burn-  
156 in values were determined from the likelihood values. The final tree diagram was  
157 generated using FigTree (Rambaut, 2007).

158

#### 159 **2.4. RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR).**

160 Total RNA was extracted from *A. castellanii* infected with *C. gattii* WT after 3 and 24  
161 hours of interaction using Trizol® reagent (Invitrogen) according to manufacturer's  
162 recommendations. RNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel and  
163 RNA concentration was measured by spectrophotometry (NanoDrop 2000  
164 spectrophotometer - Thermo Scientific). The samples were treated with DNase (Promega)  
165 to purify RNA. Reverse transcription and cDNA synthesis were prepared with ImProm-II  
166 Reverse transcriptase (Promega) using oligo-dT. Relative expression of genes identified as  
167 zinc transporters by the conserved domain (PF02535 and PF01545) in *A. castellanii* were  
168 determined by qRT-PCR (StepOne Real Time PCR System) with an initial step at 95°C for  
169 10min, followed by 50 cycles at 95°C for 15s, 55°C for 15s and 60°C for 60s. All  
170 experiments were performed in triplicate and each cDNA sample was also analyzed in  
171 triplicate for each primer pair. A melting curve analysis was performed at the end of the  
172 reaction to confirm the presence of a single PCR product. The results were processed  
173 according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak and Schmittgen 2001) and the relative transcript  
174 levels were normalized with actin transcript levels. The specific primers are listed in Table  
175 S1.

176

#### 177 **2.5 Flow cytometry assay.**



178 To measure zinc levels in amoeba with internalized-fungal cells, protozoa cells  
179 ( $1 \times 10^5$  cells) were seeded in 12-well plate for 2 hours at 30°C for adhesion to the plate. The  
180 *C. gattii* WT cells were then added to the amoeba culture in a 10:1 ratio and this incubation  
181 was performed in the presence or absence of 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>. The interaction was allowed  
182 for 24 hours. The cells were washed 3 times with warm PBS and the plate attached cells  
183 were incubated with 20  $\mu$ M of Zinpyr-1 fluorescent probe (Sigma) for 30 min at 30°C in  
184 the dark. Non-incorporated probe was removed by washing with PBS and the cells were  
185 collected from the well with cell scraper. Total free zinc level in amoeba cells was  
186 analyzed with a Guava easyCyte Flow Cytometer (Merk Millipore) by measuring green  
187 fluorescence of 5000 events.

188

## 189 **2.6 Statistic analysis**

190 Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of replicates. All assays  
191 were performed in three experiments conditions, with triplicate technical repetitions for  
192 each of them. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 6 software. The  
193 Student's *t*-test or One-way ANOVA (with Tukey post-test) was employed to test for  
194 significance between values. *P*-values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

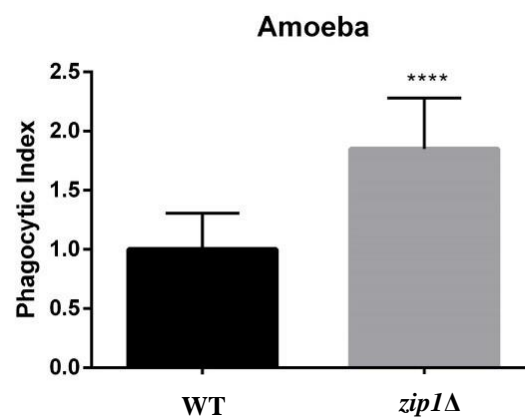
195

## 196 **3. Results and Discussion**

### 197 *3.1. Zinc is important for C. gattii to escape and survive from phagocytic cells action.*

198 It is well known that zinc is an essential transitional metal for all living cells  
199 (Maret, 2013), including *Cryptococcus sp.* Our group provided evidence that zinc  
200 metabolism regulation by the master regulator Zap1 and uptake by zinc transporters from  
201 the ZIP family are important for *C. gattii* virulence and its survival inside macrophages  
202 (Schneider, R. D. *et al.*, 2012; Schneider, R. D. *et al.*, 2015). Null mutants for genes *ZAP1*  
203 and *ZIP1* showed a reduced intracellular zinc levels and it were also hypersensitive to zinc  
204 deprivation, implying *ZIP1* product as the main zinc uptake transporter and the main  
205 responsible for zinc acquisition in *C. gattii* cells. The *ZIP1* ortholog in the sibling species  
206 *C. neoformans* was also associated with zinc transport (Do *et al.*, 2016). In the present  
207 work, we used this same mutant strain as a probe to understand if amoebae change zinc  
208 homeostasis during the interaction with *C. gattii*.

209 The interaction between *A. castellanii* and *C. gattii* WT and *zip1* $\Delta$  strains showed  
210 that the mutant strain is more readily phagocytosed by amoebae (Fig. 1) compared to WT.  
211 This result is similar to that observed by Schneider *et al.*, 2015, in which the absence of  
212 *ZIP1* reduced the fungal virulence and resulted in an increase of its phagocytosis by  
213 J774.A1 macrophage-like. Indeed, both protozoa and mammalian phagocytic cells are able  
214 engulf *C. gattii*, specially the less virulent yeast strain (*zip1* $\Delta$ ). This emphasize the  
215 importance of this metal to the fungal virulence and to its ability to escape from antifungal  
216 host actions.



217

218 **Fig.1: Absence of zinc transporter in *C. gattii* influenced the phagocytosis by *A. castellanii*:** *A. castellanii*  
219 ( $1 \times 10^5$  cells) were incubated with WT or *zip1* $\Delta$  *C. gattii* strains ( $1 \times 10^6$  cells) in PYG medium for 3 hours in  
220 96-well plate to allow the phagocytosis. The wells were washed with PBS and *A. castellanii* cells were lysed  
221 and yeast CFU count was performed in YPD agar. Data are shown as mean  $\pm$  SD. The asterisks denote  
222 statistically significant differences between the conditions (\*\*\*\*,  $p < 0.05$ ).

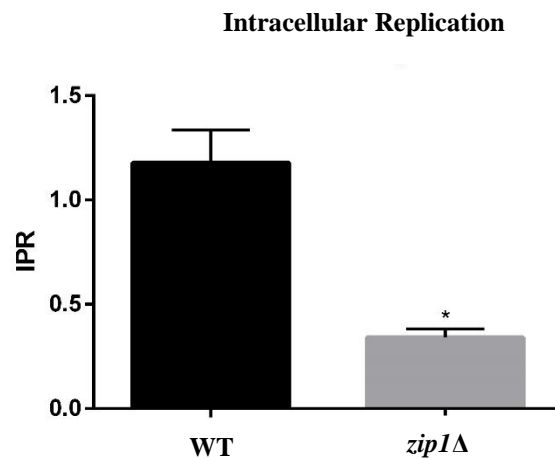
223 *3.2. Decrease of fungal survival may be caused by a reduced availability of zinc levels.*

224 As *C. gatti zip1* $\Delta$  is more phagocytosed than WT by amoebae, we hypothesized that  
225 reduced intracellular zinc levels in cryptococcal cells would led to defects to survive after  
226 phagocytosis. As macrophages, amoebae form a phagolysosome that contains a diversity  
227 of molecules involved in the degradation of engulfed particles (Salah *et al.*, 2009). On the  
228 other hand, the intracellular pathogens developed many strategies to survive inside host  
229 cells. For instance, the inhibition of the phagolysosome formation through blockage of the  
230 fusion between vacuole and lysosome has been shown for *Legionella pneumophila*.  
231 Moreover, interference in phagosome maturation and acidification was described in

232 *Histoplasma capsulatum* and *Mycobacterium* species (Voelz e May, 2010). For  
233 *Cryptococcus sp.*, studies have shown its capacity to replicate inside the phagosome and  
234 escape through nonlytic exocytosis from macrophage and amoebae (Steenbergen *et al.*,  
235 2001; Chrisman *et al.*, 2010). However, these abilities can be affected by host antifungal  
236 actions, such as reduction of transitional metals availability inside the phagosome.

237 For this reason, we analyzed the intracellular replication rate (IPR) of the WT and  
238 *zip1Δ* mutant strains that were phagocytosed by *A. castellanii* to verify if these fungal cells  
239 are facing a zinc deficiency environment. We observed that the capability of *C. gattii* to  
240 survive and replicate inside amoebae was affected in the *zip1Δ* mutant strain compared to  
241 WT, based on the recovery of a lower number of CFUs from the infected amoebae (Fig. 2).  
242 This observation allowed us to hypothesize that engulfed cryptococcal cells are  
243 experiencing a reduced zinc bioavailability, which would lead to a deficiency in *zip1Δ*  
244 survival.

245

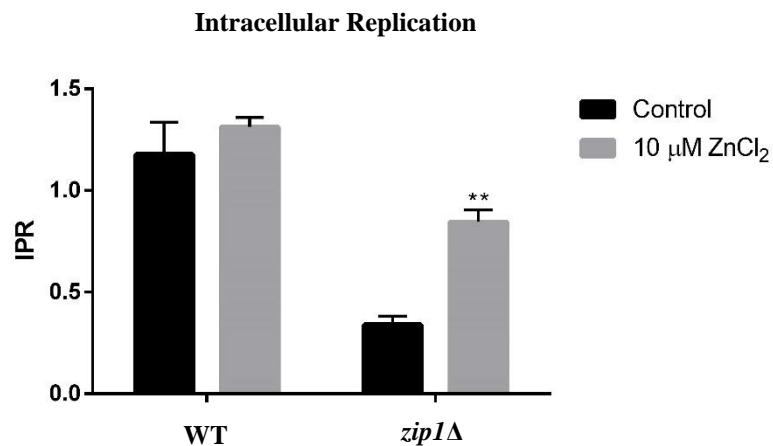


246

247 **Fig. 2: The capacity of fungi replication inside phagosome is reduced in *zip1Δ* *C. gattii*:** *A. castellanii*  
248 ( $1 \times 10^5$  cells) were incubated with WT or *zip1Δ* *C. gattii* strains ( $1 \times 10^6$  cells) in PYG medium for 3 hours in  
249 96-well plate. After extensive washing to remove non-phagocytized yeast cells, one set of wells had the yeast  
250 CFU determined and another set of wells had the incubation remained for further 24 hours at 30°C. The *A.*  
251 *castellanii* cells were washed with PBS, lysed, and yeast CFU count was performed in YPD agar for further  
252 intracellular proliferation rate (IPR) analysis. Data are shown as mean  $\pm$  SD. The asterisks denote statistically  
253 significant differences between the conditions (\*,  $p < 0.05$ ).

254 To confirm this hypothesis, we repeated the IPR assay including 10 $\mu$ M of ZnCl<sub>2</sub> to  
255 the interaction system. After extracellular zinc addition, we were able to recover more  
256 colony-forming unit (CFU) from amoebae infected by *zip1* $\Delta$  (Fig 3). This result reinforces  
257 our idea that amoeba's phagosome expose yeast to a low zinc environment. This metal  
258 supplementation probably provides the *C. gattii* a minimum zinc quota that the *zip1* $\Delta$  strain  
259 requires to reestablish the metabolic activities. Thus, *A. castellanii* is apparently capable to  
260 use nutritional immunity as an antifungal mechanism.

261



262

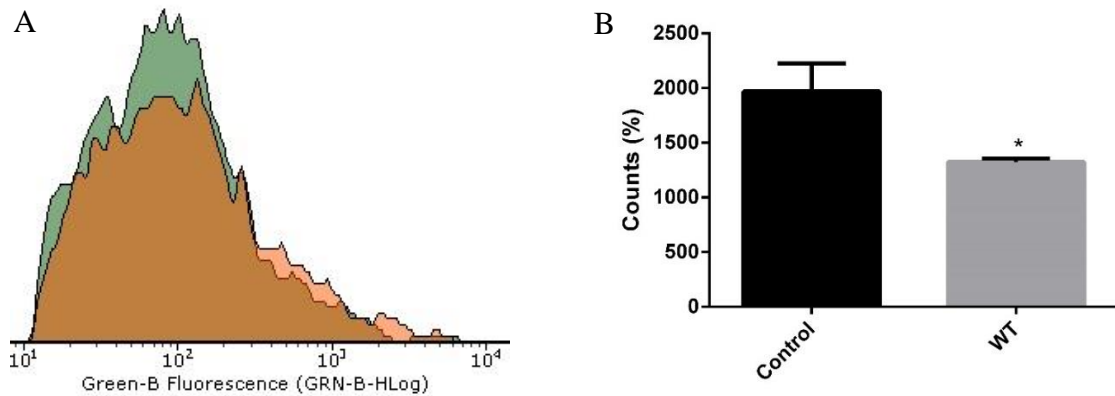
263 **Fig. 3: Extracellular zinc modify the intracellular replication index of *C. gattii* inside *A. castellanii* cells:**  
264 *A. castellanii* cells were incubated with WT or *zip1* $\Delta$  of *C. gattii* strains in PYG medium for 3 hours in 96-  
265 well plate. After extensive washing to remove non-phagocytized yeast cells, one set of wells had the yeast  
266 CFU determined and another set of wells had ZnCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) added to the medium and incubation remained  
267 for further 24 hours at 30°C. The *A. castellanii* cells were washed with PBS, lysed, and yeast CFU count was  
268 performed in YPD agar. Data are shown as mean  $\pm$  SD. The asterisks denote statistically significant  
269 differences between the conditions (\*\*, p<0.01).

270 **3.3. Zinc levels of *A. castellanii* are reduced when *C. gattii* is present.**

271 To further reinforce the hypothesis that nutritional immunity is developed by  
272 amoeba cells against *C. gattii*, we quantified zinc inside *A. castellanii* cells employing the  
273 zinc sensor Zinpyr-1. The flow cytometry analysis was assessed at 3 and 24 hours of  
274 interaction. We observed that the metal levels were significantly decreased in amoebae that  
275 were in contact with yeast compared to control after 24 hours (Fig. 4). Although a similar  
276 decrease pattern was observed after 3 hours, the difference was not significant (data not

277 shown). This result confirms our hypothesis that the presence of fungal cell alters zinc  
278 homeostasis in amoebae and these protozoa cells are able to reduce zinc bioavailability,  
279 possibly to repress fungal dissemination. Therefore, nutritional immunity is probably used  
280 by amoeba cells as a strategy to reduce pathogen viability.

281



282

283 **Fig. 4: *A. castellanii* reduces zinc levels in the presence of *C. gattii* after 24 hours of interaction:** (A)  
284 Cytometry histogram of ZinPyr-1 fluorescence *A. castellanii* cells cultured only in PYG (brown) and *A.*  
285 *castellanii* interaction with *C. gattii* (green). (B) *A. castellanii* ( $1 \times 10^5$  cells) and *C. gattii* ( $1 \times 10^6$  cells) were  
286 incubated at 1:10 ratio in PYG medium for 24 h at 30°C. The wells were washed with PBS solution and then  
287 incubated with Zinpyr-1 cell-permeable fluorescent probe (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min. After the  
288 system was washed with PBS and the cells were collected for flow cytometry analysis. Data are shown as  
289 the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates per condition. The asterisk denote statistically significant  
290 differences between the conditions (\*,  $p < 0.05$ ).

### 291 3.3. Identification of zinc transporter in *A. castellanii*.

292 The zinc concentration is controlled by two different family groups of transporters:  
293 ZIP transporters family and Cation efflux family (ZnTs) (Stafford *et al.*, 2013). ZIP family  
294 is mainly responsible for zinc acquirement from extracellular environment or organelles  
295 into the cytoplasm. Cation efflux family, also known as ZnTs, are important for the efflux  
296 of this metal from intracellular environment or sequestration into vesicles/organelles  
297 (Wang e Zhou, 2010). They are predicted to have six and eight transmembrane domains,  
298 respectively (Stafford *et al.*, 2013).

299 Analysis of the *A. castellanii* predicted proteome for a PFAM domain ZIP zinc  
 300 transporter family (PF02535) and Cation efflux family (PF01545) revealed the presence of  
 301 14 and 7 different proteins, respectively (Table 1). In order to gain insights about the  
 302 function of such proteins, we verified the conservative level of these transporters  
 303 comparing them to ZIPs and ZnTs transporters from model organisms, as the yeast  
 304 *Saccharomyces cerevisiae* (4 ZIPs and 5 ZnTs) and the rodent *Mus musculus* (14 ZIPs and  
 305 10 ZnTs).

306

307 **Table 1.** ZIPs and ZnTs proteins identified in *A. castellanii*.

ZIP		ZnT
ACA1_368320	ACA1_069540	ACA1_260050
ACA1_222780	ACA1_093920	ACA1_271600
ACA1_100130	ACA1_154170	ACA1_191570
ACA1_325560	ACA1_385100	ACA1_366570
ACA1_157200	ACA1_148440	ACA1_038150
ACA1_364600	ACA1_271750	ACA1_106270
ACA1_065010	ACA1_358640	ACA1_107270

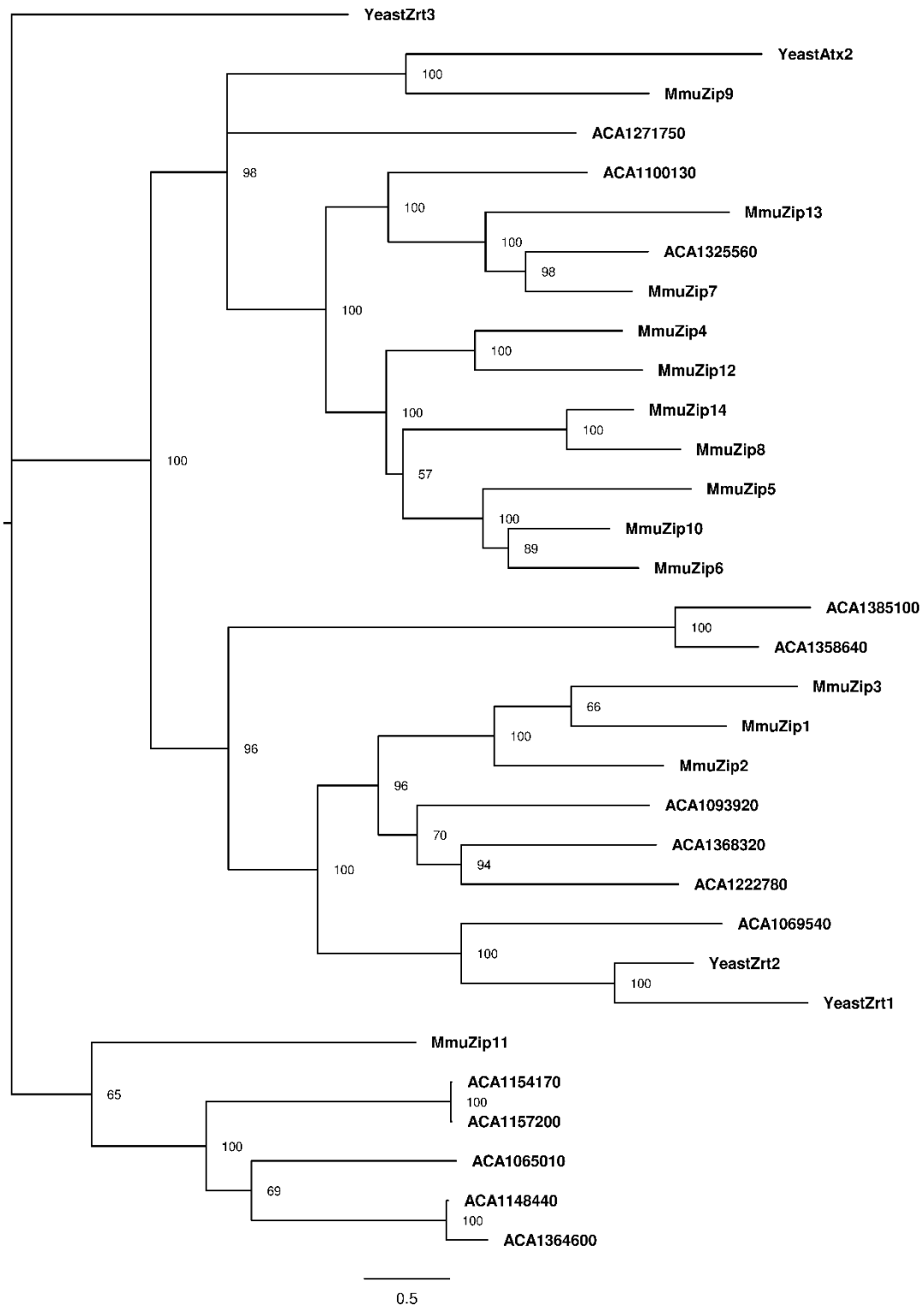
308

309 The phylogenetic analysis of ZIPs protein sequences showed that, with some  
 310 exceptions, each amoeba protein has close relation with some proteins from all 2-different  
 311 analyzed organisms (Fig. 5). Although there was a division into two major groups  
 312 indicating a divergence in the evolution paths of these transporters and the formation of  
 313 clusters composed by transporters only from the same organism, it was possible to  
 314 associate amoebae specific zinc transporters with similar proteins in *M. musculus*, as much  
 315 in *S. cerevisiae*. These relations allow us to suggest that different set of amoebae' zinc  
 316 transporters are closely related with transporters from different organisms. For instance,  
 317 there are three *A. castellanii* proteins related to the main mammalian zinc importers ZIP1

318 and ZIP2 (ACA1\_093920, ACA1\_368320, and ACA1\_222780), one related to the main *S.*  
319 *cerevisiae* zinc importer Zrt1 (ACA1\_069540). Some *A. castellanii* ZIP proteins cluster  
320 with the mammalian ZIP11 transporter and *S. cerevisiae* vacuolar zinc transporter Zrt3  
321 (Macdiarmid *et al.*, 2000) (ACA1\_358640, ACA1\_385100, ACA1\_065010,  
322 ACA1\_157200, ACA1\_154170, ACA1\_364600, ACA1\_148440). ACA1\_271750 is an *A.*  
323 *castellanii* ZIP protein that cluster with mammalian ZIP9 and with the Golgi associated  
324 Atx2p from *S. cerevisiae* (Lin e Culotta, 1996). The ACA1\_325560 and ACA1\_100130  
325 ZIP proteins from *A. castellanii* are associated with several mammalian ZIP transporters  
326 (Fig. 5).

327 The phylogenetic tree of ZnTs revealed a similar pattern as observed to the ZIP  
328 proteins, although it presented only one major group for ZnT from all 3-analyzed  
329 organisms (Fig. 6). Specifically, the *A. castellanii* ACA1\_038150 and ACA1\_106270  
330 cluster with the *S. cerevisiae* mitochondrial iron transporters Mmt1 and Mmt2 (Li e  
331 Kaplan, 1997). ACA1\_107270 from *A. castellanii* cluster with the mammalian Golgi  
332 associated zinc transporter ZnT7 (Kirschke e Huang, 2003).

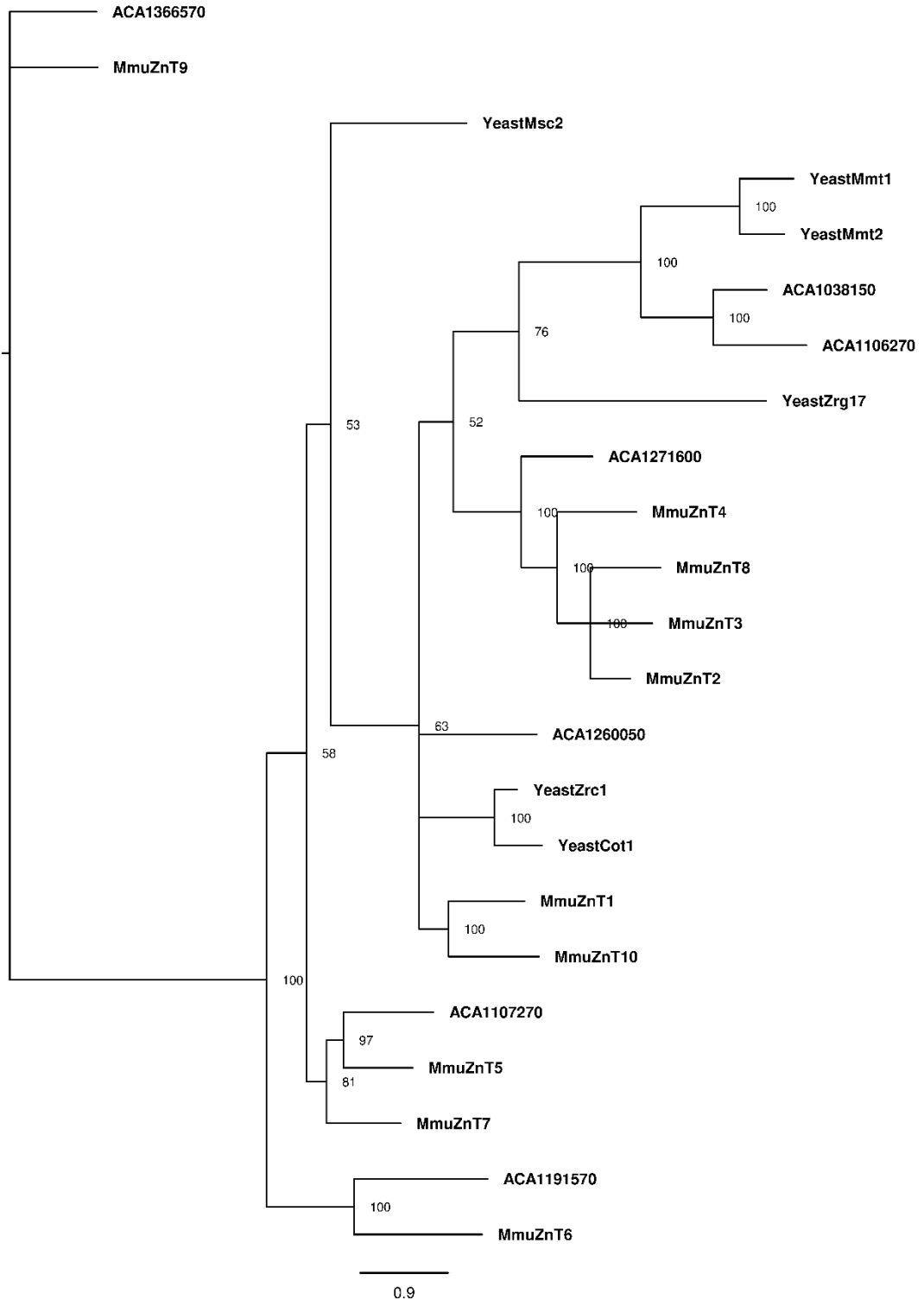
333



334

335 **Fig. 5: Phylogenetic tree comparing ZIP zinc transporters from *A. castellanii* with evolutionary**  
 336 **different organisms.** Predicted transmembrane helices of Zip proteins encoded by the *A. castellanii*, *M.*  
 337 *musculus* and *S. cerevisiae* genomes were evaluated with the Uniprot and AmoebaDB database. Phylogenetic  
 338 analysis was determined applying the likelihood values and the final tree diagram was generated using  
 339 FigTree.





340

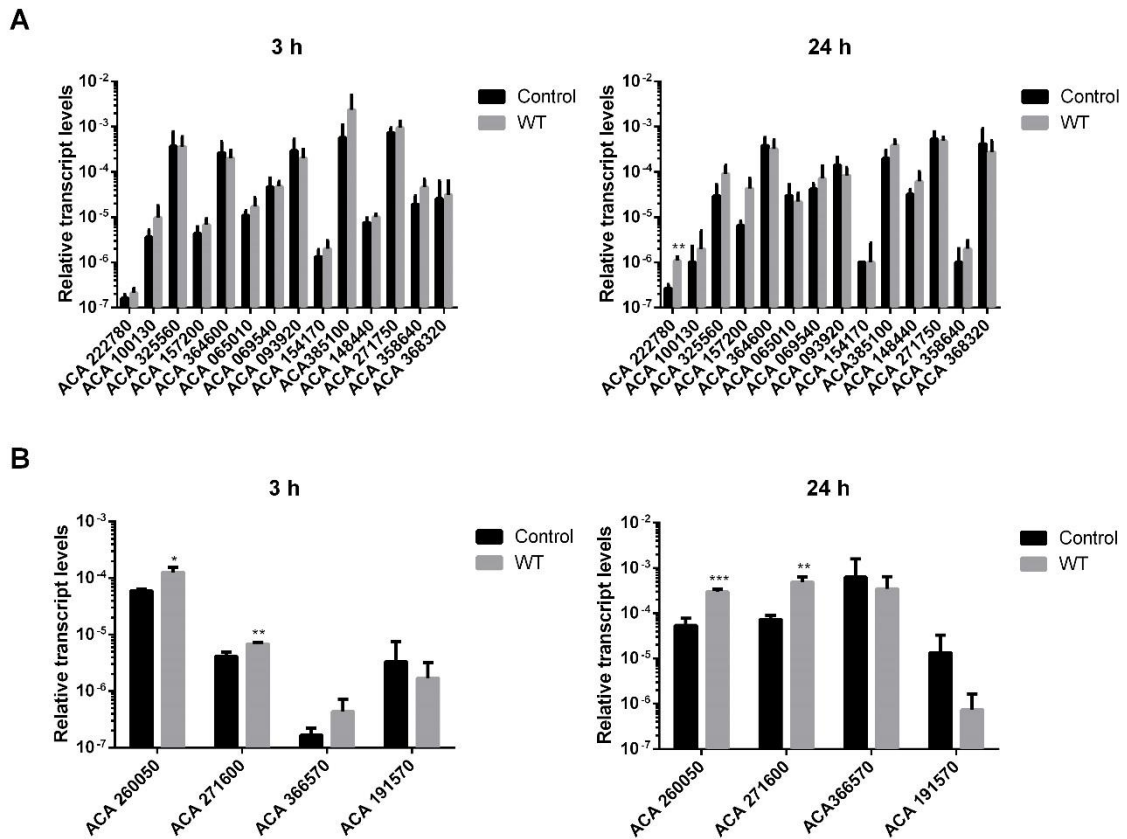
341 **Fig. 6: Phylogenetic tree comparing ZnT transporters from *A. castellanii* with evolutionary different**  
 342 **organisms.** Predicted cation efflux family (Znt) transporters encoded by the *A. castellanii*, *M. musculus* and *S.*  
 343 *cerevisiae* genomes were retrieved from Uniprot and AmoebaDB database. Phylogenetic analysis was  
 344 determined applying the likelihood values and the final tree diagram was generated using FigTree.

345 3.4. The zinc transporters of *Acanthamoeba castellanii* are expressed during the  
346 interaction with *C. gattii*.

347 Transcriptional profiling of 18 genes (14 ZIP and 4 ZnTs) was conducted by qRT-  
348 PCR to evaluate if may have changes in zinc concentration inside *A. castellanii* cells  
349 caused by the presence of *C. gattii*. The phagocytosis assay was performed between *A.*  
350 *castellanii* and *C. gattii* WT for 3 and 24 hours (Fig. 7). Transcript of all ZIP transporters  
351 coding genes could be detected in both conditions. However, only the ZIP gene  
352 ACA1\_222780 displayed an increase of its transcript levels. This increase was only  
353 observed after 24 hours of interaction (Fig. 7A). ACA1\_222780 protein was shown to be  
354 evolutionary closer to a cluster composed by ZIP 1, 2 and 3 from *Mus musculus* (Fig 5),  
355 which indicates that indeed this protein is involved in the influx of this metal to the  
356 intracellular environment. When considered the genes that codes for ZnT family zinc  
357 transporters, only four genes were investigated due to the phylogenetic proximity to known  
358 mammalian genes possibly involved in nutritional immunity. Two of them  
359 (ACA1\_260050, ACA1\_271600) were detected as overexpressed in amoeba infected by *C.*  
360 *gattii*, after 3 and 24 hours (Fig 7B). Our *in silico* analysis shows that ACA1\_260050 and  
361 ACA1\_271600 are evolutionary closed to mammalian ZnT4 protein, which is involved  
362 with the mobilization of zinc to Golgi. It allows us to speculate that both zinc transporters  
363 from *A. castellanii* could be functioning as orthologs of this mammalian zinc transporter,  
364 possibly being responsible for zinc availability decrease in cell cytoplasm.

365 These results suggest that the presence of *C. gattii* is capable to generate an amoeba  
366 response, resulting in a modulation of zinc homeostasis that is modified over time.  
367 Furthermore, although some zinc exporters have increased their expression, which  
368 indicates a significant reduction in free zinc in the phagosome, there was also a significant  
369 increase in a zinc importer. We hypothesize two possible mechanisms to explain the  
370 expression of this ZIP: 1) this increase may be due a response to the lower zinc levels  
371 (used to harm the pathogen) as the host need this metal to its survival or 2) it may be a cell  
372 building response that requires zinc to perform the biochemical reactions to further try to  
373 destroy the yeast.

374 Thus, zinc availability to pathogen is altered during interaction with the host,  
 375 however it's still not clear how amoebae use zinc transporters to modify metal levels to  
 376 eliminate the pathogens.



377 **Fig. 7: *C. gattii* can change zinc homeostasis of *A. castellanii* after 3 and 24 hours of interaction:**  
 378 *Acanthamoeba castellanii* ( $1 \times 10^5$  cells) were incubated in PYG medium with R265 ( $1 \times 10^6$  cells) in 12-well  
 379 plate for 3 and 24 hours at 30°C. The plates were washed with PBS solution, lysed with Trizol Reagent  
 380 (Invitrogen) for a RNA extraction. The cDNA synthesis was performed with Improm-II reverse transcriptase  
 381 enzyme. The relative transcript levels of zinc transporters were measured by RT-qPCR, normalized with  
 382 ACTINA transcript levels. (A) Expression of ZIPs transporters after 3 and 24 h. (B) ZnTs expression after 3  
 383 and 24 h. Statistical analysis by t-student comparing control and fungi's presence groups for each transporter  
 384 (\*,  $p < 0.05$ ).  
 385

#### 386 4. Conclusions

387 The mechanisms by which amoeba host regulates zinc homeostasis during fungal  
 388 infections are not well described, although it is known that this metal has great importance  
 389 for pathogenic yeasts, such as *C. neoformans* and *C. gattii*. Based on the results shown  
 390 here, we conclude that the absence of an important zinc transporter in *C. gattii* increases its

391 phagocytosis by *A. castellanii*. Also, the presence of this yeast modulates the zinc  
392 homeostasis in amoeboid cells. However, this modulation is different in 3 and 24 hours of  
393 incubation with the fungi. Furthermore, we found that the limitation of zinc may be used as  
394 an antifungal strategy by amoebae with internalized yeasts, as seen in flow cytometry  
395 analysis, and that zinc transporters from ZIP and ZnT families participate in changes of  
396 zinc levels during infection. Indeed, this study has contributed to better elucidate the zinc  
397 homeostasis in amoeboid cells during fungal interaction, possibly being used as nutritional  
398 immunity mechanism.

399

#### 400 **Acknowledgments**

401 This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de  
402 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). NSR, FMS, AWAG, PAGF and LFF  
403 are recipients of scholarships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
404 Nível Superior (CAPES).

405

#### 406 **References**

- 407 Abascal, F., Zardoya, R., & Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of  
408 protein evolution. *Bioinformatics*, *21*(9), 2104-2105.  
409 doi:10.1093/bioinformatics/bti263
- 410 Alvarez, M., & Casadevall, A. (2006). Phagosome extrusion and host-cell survival after  
411 *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*, *16*(21), 2161-  
412 2165. doi:10.1016/j.cub.2006.09.061
- 413 Aurrecochea, C., Barreto, A., Brestelli, J., Brunk, B. P., Caler, E. V., Fischer, S., . . .  
414 Wang, H. (2011). AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources  
415 for Amoebozoa and Microsporidia species. *Nucleic Acids Res*, *39*(Database issue),  
416 D612-619. doi:10.1093/nar/gkq1006
- 417 Bielska, E., & May, R. C. (2016). What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS*  
418 *Yeast Res*, *16*(1), fov106. doi:10.1093/femsyr/fov106
- 419 Chrisman, C. J., Alvarez, M., & Casadevall, A. (2010). Phagocytosis of *Cryptococcus*  
420 *neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. *Appl*  
421 *Environ Microbiol*, *76*(18), 6056-6062. doi:10.1128/AEM.00812-10
- 422 Consortium, U. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*,  
423 *43*(Database issue), D204-212. doi:10.1093/nar/gku989
- 424 Crawford, A., & Wilson, D. (2015). Essential metals at the host-pathogen interface:  
425 nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens.  
426 *FEMS Yeast Res*, *15*(7). doi:10.1093/femsyr/fov071
- 427 Do, E., Hu, G., Caza, M., Kronstad, J. W., & Jung, W. H. (2016). The ZIP family zinc  
428 transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*.  
429 doi:10.1093/mmy/myw013

- 430 Dos Santos, F. M., Piffer, A. C., Schneider, R. O., Ribeiro, N. S., Garcia, A. W. A.,  
431 Schrank, A., Staats, C. C. (2017). Alterations of zinc homeostasis in response to  
432 *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. *Future Microbiol*, *12*,  
433 491-504. doi:10.2217/fmb-2016-0160  
434
- 435 Fan, W., Kraus, P. R., Boily, M. J., & Heitman, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* gene  
436 expression during murine macrophage infection. *Eukaryot Cell*, *4*(8), 1420-1433.  
437 doi:10.1128/EC.4.8.1420-1433.2005
- 438 Gaudet, R. G., Bradfield, C. J., & MacMicking, J. D. (2016). Evolution of Cell-  
439 Autonomous Effector Mechanisms in Macrophages versus Non-Immune Cells.  
440 *Microbiol Spectr*, *4*(6). doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0050-2016
- 441 Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin*  
442 *Microbiol Rev*, *17*(2), 413-433.
- 443 Guimaraes, A. J., Gomes, K. X., Cortines, J. R., Peralta, J. M., & Peralta, R. H. (2016).  
444 *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge  
445 from environment to host virulence. *Microbiol Res*, *193*, 30-38.  
446 doi:10.1016/j.micres.2016.08.001
- 447 Haase, H. (2013). An element of life: competition for zinc in host-pathogen interaction.  
448 *Immunity*, *39*(4), 623-624. doi:10.1016/j.immuni.2013.09.009
- 449 Harris, J. R., Lockhart, S. R., Sondermeyer, G., Vugia, D. J., Crist, M. B., D'Angelo, M. T.,  
450 . . . Park, B. J. (2013). *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the  
451 US Pacific Northwest. *Emerg Infect Dis*, *19*(10), 1620-1626.  
452 doi:10.3201/eid1910.130441
- 453 Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the  
454 pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol*, *10*(8), 525-537.  
455 doi:10.1038/nrmicro2836
- 456 Kirschke, C. P., & Huang, L. (2003). ZnT7, a novel mammalian zinc transporter,  
457 accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, *278*(6), 4096-4102.  
458 doi:10.1074/jbc.M207644200
- 459 Li, L., & Kaplan, J. (1997). Characterization of two homologous yeast genes that encode  
460 mitochondrial iron transporters. *J Biol Chem*, *272*(45), 28485-28493.
- 461 Lin, S. J., & Culotta, V. C. (1996). Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces*  
462 *cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to  
463 Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol*, *16*(11), 6303-6312.
- 464 Lorenz, M. C., Bender, J. A., & Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of *Candida*  
465 *albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, *3*(5), 1076-1087.  
466 doi:10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004
- 467 Löytynoja, A., & Goldman, N. (2010). webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence  
468 aligner with interactive alignment browser. *BMC Bioinformatics*, *11*, 579.  
469 doi:10.1186/1471-2105-11-579
- 470 Ma, H., Hagen, F., Stekel, D. J., Johnston, S. A., Sionov, E., Falk, R., . . . May, R. C.  
471 (2009). The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by  
472 enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl*  
473 *Acad Sci U S A*, *106*(31), 12980-12985. doi:10.1073/pnas.0902963106
- 474 MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., & Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate  
475 vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, *19*(12), 2845-2855.  
476 doi:10.1093/emboj/19.12.2845

- 477 Maret, W. (2013). Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life.  
478 *Adv Nutr*, 4(1), 82-91. doi:10.3945/an.112.003038
- 479 May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T., & Nielsen, K. (2016).  
480 *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Micro*,  
481 14(2), 106-117. doi:10.1038/nrmicro.2015.6
- 482 Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller,  
483 T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis  
484 among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23(4), 525-530.  
485 doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac
- 486 Rambaut, A. (2007). FigTree. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- 487 Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol*,  
488 20(3), 225-241. doi:10.3109/10408419409114556
- 489 Salah, I. B., Ghigo, E., & Drancourt, M. (2009). Free-living amoebae, a training field for  
490 macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*, 15(10), 894-905.  
491 doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03011.x
- 492 Schneider, R. D., Diehl, C., dos Santos, F. M., Piffer, A. C., Garcia, A. W. A., Kulmann,  
493 M. I. R., . . . Staats, C. C. (2015). Effects of zinc transporters on *Cryptococcus*  
494 *gattii* virulence. *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/Srep10104
- 495 Schneider, R. D., Fogaca, N. D. S., Kmetzsch, L., Schrank, A., Vainstein, M. H., & Staats,  
496 C. C. (2012). Zap1 Regulates Zinc Homeostasis and Modulates Virulence in  
497 *Cryptococcus gattii*. *Plos One*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043773
- 498 Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit*  
499 *Vectors*, 5, 6. doi:10.1186/1756-3305-5-6
- 500 Springer, D. J., Phadke, S., Billmyre, B., & Heitman, J. (2012). *Cryptococcus gattii*, no  
501 longer an accidental pathogen? *Curr Fungal Infect Rep*, 6(4), 245-256.
- 502 Stafford, S. L., Bokil, N. J., Achard, M. E., Kapetanovic, R., Schembri, M. A., McEwan,  
503 A. G., & Sweet, M. J. (2013). Metal ions in macrophage antimicrobial pathways:  
504 emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep*, 33(4). doi:10.1042/BSR20130014
- 505 Steenbergen, J. N., Shuman, H. A., & Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans*  
506 interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular  
507 pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26), 15245-  
508 15250. doi:10.1073/pnas.261418798
- 509 Swanson, M. S., & Hammer, B. K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful  
510 journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol*, 54, 567-613.  
511 doi:10.1146/annurev.micro.54.1.567
- 512 Velagapudi, R., Hsueh, Y. P., Geunes-Boyer, S., Wright, J. R., & Heitman, J. (2009).  
513 Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*,  
514 77(10), 4345-4355. doi:10.1128/IAI.00542-09
- 515 Voelz, K., & May, R. C. (2010). Cryptococcal interactions with the host immune system.  
516 *Eukaryot Cell*, 9(6), 835-846. doi:10.1128/EC.00039-10
- 517 Wang, X., & Zhou, B. (2010). Dietary zinc absorption: A play of Zips and ZnTs in the gut.  
518 *IUBMB Life*, 62(3), 176-182. doi:10.1002/iub.291

## Supplementary material

**Table S1.** Primers used in qRT-PCR reactions.

Primer name	Sequence (5' - 3')	NCBI Gene ID
<b>ACTINA-F</b>	AGGTCATCACCATCGGTAACG	14922056
<b>ACTINA-R</b>	TCGCACTTCATGATCGAGTTG	
<b>ACA1_325560-F</b>	AGGAGAAGAAGAAGAGGGAGAG	14922904
<b>ACA1_325560-R</b>	ATGGCAAAGTCACCGATCTC	
<b>ACA1_100130-F</b>	ACCTCGTGGTGATGCTTATG	14913735
<b>ACA1_100130-R</b>	TGTGGTGGAGACAAAGTGAG	
<b>ACA1_157200-F</b>	CCTCTGTTTCTTCTCCGGC	14922918
<b>ACA1_157200-R</b>	TTGTGGACGCAAATAGCGA	
<b>ACA1_222780-F</b>	TTGGGCATTCTACTGGGTTC	14916731
<b>ACA1_222780-R</b>	AGGAGGAACCTTGATGTACTTGTC	
<b>ACA1_368320-F</b>	GACGGAAGAGGTATCCGCTG	14918922
<b>ACA1_368320-R</b>	GTTCCAGAAGAGGACGCCAA	
<b>ACA1_093920-F</b>	TTTCTCCATCTCCAGCATTC	14913245
<b>ACA1_093920-R</b>	CACCACCGAGACAGTTCATC	
<b>ACA1_069540-F</b>	TTCGGCCTTCTGTTCCATAAC	14924343
<b>ACA1_069540-R</b>	CTCGAAGAAGTGGTGGAAAGAT	
<b>ACA1_154170-F</b>	CGTCGAGATCCTCACCAAATC	14919351
<b>ACA1_154170-R</b>	GGAGAAGAAACAGAGGGGAAGTG	
<b>ACA1_271750-F</b>	CTCGTGCCCAAGTTCATCTATC	14915206
<b>ACA1_271750-R</b>	GTGGCGATGGCGAAGAG	
<b>ACA1_385100-F</b>	CCGCTCCTGACCAAACCTG	14922666
<b>ACA1_385100-R</b>	GTCCTCCATTTCTTCTCTTCTC	
<b>ACA1_065010-F</b>	GGTGCCGATTGCCTACA	14918388
<b>ACA1_065010-R</b>	GAGTTCGTTGAGCGAGATGA	
<b>ACA1_148440-F</b>	CCTACACCTGGCTCTTCTTTG	14923782
<b>ACA1_148440-R</b>	AAAGTGCGGTTCCGGGTATG	
<b>ACA1_364600-F</b>	CATGTGCATCCACAACCTTGC	14914461
<b>ACA1_364600-R</b>	AACCCACAACGAACCTCCTTC	
<b>ACA1_358640-F</b>	AGAAAGCGTCTTCTGGAGTG	14914121
<b>ACA1_358640-R</b>	CTCTTCCAACCTCTGCTCTATC	
<b>ACA1_260050-F</b>	ACGAAGAGAGCCACTACCA	14912155
<b>ACA1_260050-R</b>	CATCGAGATCCCACACCTTTAC	
<b>ACA1_271600-F</b>	CGCTTGTGGCTATGGGTATC	14915201
<b>ACA1_271600-R</b>	GTAATTGATGTCCGCGATGAG	
<b>ACA1_191570-F</b>	GTTGATGGCGTTGAGCTTCC	14915050
<b>ACA1_191570-R</b>	CCGTAGGTGTAGCTAGGGGT	
<b>ACA1_366570-F</b>	GATTCTCGTCTCTCACCATACAC	14914485
<b>ACA1_366570-R</b>	GGGTAGTTCTTGTCGATGTACC	

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

A modulação da homeostase de metais em macrófagos durante a infecção do hospedeiro por organismos patogênicos já está bem descrita em um processo denominado imunidade nutricional, o qual é principalmente caracterizado pela diminuição da disponibilidade desses micronutrientes a fim de eliminar o micro-organismo (Hood e Skaar, 2012). Zinco aparenta ter um papel importante nesse mecanismo, já que mudanças nos seus níveis intrafagossômicos foram observados durante a interação de células de defesa com patógenos humanos, incluindo *H. capsulatum* e *C. neoformans* (Winters *et al.*, 2010; Staats *et al.*, 2013). A homeostase desse metal é realizada por diversos mecanismos regulatórios homeostáticos, sendo eles tanto em níveis pós-traducionais como transcricionais (Lyons *et al.*, 2000). Nesse contexto, um estudo prévio mostrou que o fator de transcrição *ZAP1* é a principal molécula reguladora da homeostase de zinco, responsável por regular a expressão de genes codificantes para transportadores de zinco da família ZIP (Schneider, R. E. O. *et al.*, 2012; Schneider, R. E. O. *et al.*, 2015). ZIPs são importantes importadores de zinco para o citoplasma. Em células mamíferas foram identificados 14 componentes dessa família (ZIP1-14). Além disso, existem outros genes que participam da regulação dos níveis de zinco, como os transportadores da família ZnT (ZnT1-10). ZnTs realizam o transporte inverso aos ZIPs, sendo responsáveis por diminuir a concentração citoplasmática do metal em direção ao meio extracelular ou para o interior de organelas (Lichten e Cousins, 2009; Kambe *et al.*, 2015).

Amebas assemelham-se com macrófagos em relação a diversas etapas realizadas durante a fagocitose, como englobar micro-organismos em vacúolo, fundar o fagossomo com lisossomos e liberar enzimas lisossomais que lisam o conteúdo vacuolar (Siddiqui e Khan, 2012b). Por esse motivo, esse trabalho teve como objetivo verificar se amebas



poderiam também utilizar-se da imunidade nutricional, através da modulação dos níveis de zinco, para eliminar células fúngicas, mais especificamente o fungo ambiental e patogênico para mamíferos, *C. gattii*.

Inicialmente, análises de taxa de fagocitose realizadas pela interação de *A. castellanii* com linhagens WT e mutante *zip1Δ* de *C. gattii* mostraram que ambas as linhagens são fagocitadas por *A. castellanii*. Todavia, *zip1Δ* foi significativamente mais fagocitado comparado com WT, possivelmente pelo fato da ausência do principal importador de zinco ZIP1 de alguma forma reduzir a virulência de *C. gattii*. Além disso, observou-se que o mutante teve uma menor capacidade de replicação no interior do fagossomo comparado com WT. Contudo, a multiplicação intracelular dessa linhagem aumentou significativamente após a adição de 10 μM de zinco extracelular no meio de interação. Esses resultados apontam para a hipótese de que o fungo estava tendo dificuldades na aquisição de zinco, pelo fato de sua disponibilidade estar reduzida no interior do fagossomo; todavia, isso foi revertido pela adição de Zn no ambiente de cultivo.

Para compreender melhor como ocorre o mecanismo de modulação da concentração desse metal, identificou-se as sequências dos componentes das famílias ZIP e ZnT em *A. castellanii* através de seu domínio conservado PFAM, resultando em um número total de 14 e 7 genes identificados, respectivamente. A análise quantitativa dos níveis de transcritos desses genes foi realizada após 3 e 24 horas de interação com *C. gattii* WT. Foi possível demonstrar que no início da infecção, após apenas 3 horas de contato com o fungo, apenas 2 genes ZnT (ACA1\_260050 e ACA1\_271600) apresentaram um número de transcritos significativamente maior quando o fungo estava presente, comparado com apenas amebas sozinhas, indicando uma redução nos níveis intracelulares de Zn. Após 24 horas, os

mesmos exportadores de zinco continuaram mais expressos. Todavia, um gene ZIP (ACA1\_222780) teve uma maior expressão, possivelmente com intuito de recuperar os níveis desse metal necessários para a viabilidade da célula protozoária ou para realizar processos bioquímicos e montar uma resposta antifúngica. Isto é, o aumento da importação do metal pode ocorrer em resposta a uma ação (baixos nível de Zn) ou ser prévio a uma ação. Complementando esses resultados, se observou que esses transportadores em amebas possuem funções similares a genes ortólogos em organismos evolutivamente distantes.

Por fim, para melhor elucidar se *C. gattii* de fato pode levar a uma alteração nos níveis globais de Zn livre no interior de *A. castellanii*, mensurou-se quantitativamente os níveis de zinco livre no interior da célula fagocítica durante sua interação com o patógeno. A concentração desse metal, marcado com uma sonda zinco-específica, estava significativamente menor após 24 horas de contato com *C. gattii*, comparado com amebas que não interagiram com o mesmo. Esses resultados, em princípio, confirmam a hipótese de que amebas limitam a disponibilidade de zinco, possivelmente como um mecanismo anti-fúngico contra *C. gattii*.

## 5. CONCLUSÕES

- i. Ocorre uma modulação nos níveis de zinco de amebas durante sua interação com o fungo *C. gattii*.
- ii. Proteínas transportadoras em células de amebas contendo células fúngicas internalizadas podem estar envolvidas na homeostase deste metal durante a infecção.
- iii. Há uma diminuição da concentração de Zn livre no interior de fagossomos de amebas com célula fúngica englobada.

- iv. Os transportadores de zinco das família ZIP e ZnT de *A. castellanii* apresentam função similar aos ortólogos desses transportadores em organismos evolutivamente distantes.
- v. Esta regulação envolve mecanismos mais complexos, uma vez que o metabolismo de fungos patogênicos, como *C. gattii*, provavelmente pode alterar e modular a resposta do hospedeiro, para garantir sua sobrevivência no interior de células fagocíticas.

## **6. PERSPECTIVAS**

O presente estudo foi o primeiro a hipotetizar a utilização da imunidade nutricional como um possível mecanismo anti-microbiano por células ameboides. Embora tenha sido evidenciado que há uma modulação nos níveis do metal zinco em amebas infectadas com *C. gattii*, mais detalhes sobre a relação patógeno-hospedeiro precisam ser elucidadas, especialmente relacionadas à resposta e modulações provindas do patógeno frente à essa redução na disponibilidade de zinco. Dentre as metodologias a serem utilizadas para essas avaliações, estão incluídas o silenciamento de transportadores de zinco em amebas, a análise de fatores de virulência das células fúngicas após terem entrado em contato com as células fagocíticas e avaliação da distribuição de zinco no interior de amebas e fungo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2104-5, May 2005. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647292> >.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2161-5, Nov 2006. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084702> >.

APPELBERG, R. Macrophage nutriptive antimicrobial mechanisms. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 6, p. 1117-28, Jun 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603587> >.

AURRECOECHEA, C. et al. AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D612-9, Jan 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974635> >.

BALLOU, E. R.; WILSON, D. The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v. 32, p. 128-34, Aug 2016. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27327380> >.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 1, p. f0v106, Feb 2016. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614308> >.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **Am J Bot**, v. 98, n. 3, p. 426-38, Mar 2011. ISSN 1537-2197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613136> >.

BOTELLA, H. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. **Trends Microbiol**, v. 20, n. 3, p. 106-12, Mar 2012. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305804> >.

BOZUE, J. A.; JOHNSON, W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. **Infect Immun**, v. 64, n. 2, p. 668-73, Feb 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550225> >.

BOZZARO, S.; BURACCO, S.; PERACINO, B. Iron metabolism and resistance to infection by invasive bacteria in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 50, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066281> >.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. **J Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 95-111, Oct 1968. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5678452> >.

CASTELLANI, A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *J Trop Med Hyg.* 1930;33:160.

CHANG, Y. C. et al. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131865, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132227> >.

CHANG, Y. C. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 4985-95, Sep 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321990> >.

CHRISMAN, C. J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 18, p. 6056-62, Sep 2010. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675457> >.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 675213, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784> >.

CONSORTIUM, U. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D204-12, Jan 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348405> >.

COYLE, P. et al. Metallothionein: the multipurpose protein. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 4, p. 627-47, Apr 2002. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022471> >.

CRAWFORD, A.; WILSON, D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. **FEMS Yeast Res**, v. 15, n. 7, Nov 2015. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26242402> >.

DERENGOWSKI, L. A. S. et al. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 5, p. 761-74, May 2013. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524994> >.

DO, E. et al. The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, Apr 26 2016. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27118799> >.

DOS SANTOS, F. M. et al. Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. **Future Microbiol**, v. 12, p. 491-504, May 2017. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28492340> >.

DROZANSKI, W. Fatal bacterial infection in soil amoebae. **Acta Microbiol Pol (1952)**, v. 5, n. 3-4, p. 315-7, 1956 1956. ISSN 0001-6195. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13410554> >.

ESCOLL, P. et al. From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 376, p. 1-34, 2013. ISSN 0070-217X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23949285> >.

FAN, W. et al. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1420-33, Aug 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087747> >.

FLANNAGAN, R. S.; HEIT, B.; HEINRICHS, D. E. Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 826-68, Nov 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633519> >.

GAUDET, R. G.; BRADFIELD, C. J.; MACMICKING, J. D. Evolution of Cell-Autonomous Effector Mechanisms in Macrophages versus Non-Immune Cells. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 6, Dec 2016. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087931> >.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76-86, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498576> >.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 413-33, Apr 2004. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084508> >.

GUIMARAES, A. J. et al. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. **Microbiol Res**, v. 193, p. 30-38, Dec 2016. ISSN 1618-0623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27825484> >.

HAASE, H. An element of life: competition for zinc in host-pathogen interaction. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 623-4, Oct 2013. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138875> >.

HAASE, H.; RINK, L. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. **Annu Rev Nutr**, v. 29, p. 133-52, 2009. ISSN 1545-4312. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400701> >.

HADAS, E.; MAZUR, T. Biosynthesis of prostaglandins in pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Parasitol Res**, v. 83, n. 3, p. 296-9, 1997. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089729> >.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 16-48, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988> >.

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 10, p. 1620-6, Oct 2013. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050410> >.

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> >.

KAMBE, T. et al. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. **Physiol Rev**, v. 95, n. 3, p. 749-84, Jul

2015. ISSN 1522-1210. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084690> >.

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> >.

KHAN, N. A. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 4, p. 564-95, Jul 2006. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16774587> >.

KHAN, N. A. Acanthamoeba and the blood-brain barrier: the breakthrough. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 9, p. 1051-7, Sep 2008. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719172> >.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 7 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.

KIRSCHKE, C. P.; HUANG, L. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. **J Biol Chem**, v. 278, n. 6, p. 4096-102, Feb 07 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446736> >.

KOBAYASHI, G. S. Disease of Mechanisms of Fungi. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th, 1996. cap. 74, ISBN 0-9631172-1-1.

KORN, E. D.; WRIGHT, P. L. Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. **J Biol Chem**, v. 248, n. 2, p. 439-47, Jan 1973. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4684688> >.

KRONSTAD, J.; JUNG, W. H.; HU, G. Beyond the big three: systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 4, p. 308-10, Oct 2008. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854233> >.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p.



a019760, Jul 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132> >.

LACEY, D. C. et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. **J Immunol**, v. 188, n. 11, p. 5752-65, Jun 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547697> >.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. Cryptococcus and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 105, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903984> >.

LI, L.; KAPLAN, J. Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. **J Biol Chem**, v. 272, n. 45, p. 28485-93, Nov 07 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353309> >.

LI, S. S.; MODY, C. H. Cryptococcus. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010. ISSN 1943-5665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463247> >.

LICHTEN, L. A.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. **Annu Rev Nutr**, v. 29, p. 153-76, 2009. ISSN 1545-4312.

LIN, S. J.; CULOTTA, V. C. Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 11, p. 6303-12, Nov 1996. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887660> >.

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> >.

LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 173-81, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460646> >.

LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076-87, Oct 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470236> >.

LYONS, T. J. et al. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in *Yarrowia lipolytica*. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884426> >.

LÖYTYNOJA, A.; GOLDMAN, N. webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 579, Nov 2010. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110866> >.

MA, H. et al. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2156-60, Nov 2006. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084701> >.

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, Aug 4 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651610> >.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 19, n. 12, p. 2845-55, Jun 15 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856230> >.

MAGANTI, H.; BARTFAI, D.; XU, J. Ecological structuring of yeasts associated with trees around Hamilton, Ontario, Canada. **FEMS Yeast Res**, Sep 2011. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029478> >.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 2, p. 273-307, Apr 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692099> >.

MARET, W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. **Adv Nutr**, v. 4, n. 1, p. 82-91, Jan 2013. ISSN 2156-5376. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319127> >.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Micro**, v. 14, n. 2, p. 106-117, 02//print 2016. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6> >.

MAZUR, T.; HADAŚ, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop Med Parasitol**, v. 46, n. 2, p. 106-8, Jun

1995. ISSN 0177-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525280> >. *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MOLMERET, M. et al. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 20-8, Jan 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640165> >.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-hiv-infected patients. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 124, p. 61-79, 2013. ISSN 0065-7778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874010> >.

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 20 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-8, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696642> >.

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> >.

POTRYKUS, J. et al. Conflicting interests in the pathogen-host tug of war: fungal micronutrient scavenging versus mammalian nutritional immunity. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 3, p. e1003910, Mar 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626223> >.

PRICE, J. V.; VANCE, R. E. The macrophage paradox. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 685-93, Nov 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517611> >.

RAMBAUT, A. FigTree. 2007. Disponível em: < <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> >. Acesso em: 02 Jan.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. **Crit Rev Microbiol**, v. 20, n. 3, p. 225-41, 1994. ISSN 1040-841X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7802958> >.

SALAH, I. B.; GHIGO, E.; DRANCOURT, M. Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 10, p. 894-905, Oct 2009. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845701> >.

SCHMIEDEL, Y.; ZIMMERLI, S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. **Swiss Med Wkly**, v. 146, p. w14281, 2016. ISSN 1424-3997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901377> >.

SCHNEIDER, R. E. O. et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Sci Rep**, v. 5, p. 10104, May 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951314> >.

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: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916306> >.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 9, p. 1001-27, Aug 2004. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313128> >.

SEGAL, G.; SHUMAN, H. A. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. **Infect Immun**, v. 67, n. 5, p. 2117-24, May 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225863> >.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1683-93, May 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424328> >.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 787-95, Mar 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378047> >.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Acanthamoeba is an evolutionary ancestor of macrophages: a myth or reality? **Exp Parasitol**, v. 130, n. 2, p. 95-7, Feb 2012a. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143089> >.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 6, Jan 2012b. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229971> >.

SILVA, M. G. et al. The homeostasis of iron, copper, and zinc in paracoccidioides brasiliensis, cryptococcus neoformans var. Grubii, and cryptococcus gattii: a comparative analysis. **Front Microbiol**, v. 2, p. 49, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833306> >.

SPRINGER, D. J. et al. Cryptococcus gattii, no longer an accidental pathogen? **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, n. 4, p. 245-256, Dec 2012. ISSN 1936-3761. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23243480> >.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. Cryptococcus neoformans: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375706> >.

STAATS, C. C. et al. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 65, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133658> >.

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> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

SUBRAMANIAN VIGNESH, K. et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 697-710, Oct 2013a. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138881> >.

SUBRAMANIAN VIGNESH, K. et al. Zinc sequestration: arming phagocyte defense against fungal attack. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003815, 2013b. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385902> >.

SWANSON, M. S.; HAMMER, B. K. Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 567-613, 2000. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018138> >.

VELAGAPUDI, R. et al. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4345-55, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620339> >.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 1-26, Jun 2007. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428307> >.

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> >.

WANG, X.; ZHOU, B. Dietary zinc absorption: A play of Zips and ZnTs in the gut. **IUBMB Life**, v. 62, n. 3, p. 176-82, Mar 2010. ISSN 1521-6551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20120011> >.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg? **Scand J Infect Dis**, v. 31, n. 4, p. 383-5, 1999. ISSN 0036-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528878> >.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Bacterial infections of free-living amoebae. **Res Microbiol**, v. 152, n. 7, p. 613-9, Sep 2001. ISSN 0923-2508. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11605981> >.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Ann Nutr Metab**, v. 51, n. 4, p. 301-23, 2007. ISSN 1421-9697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726308> >.

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> >.

WRIGHT, L. C. et al. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 37-47, Jan 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17099081> >.

YAEGER, R. G. Protozoa: Structure, Classification, Growth, and Development. In: Baron S, editor. **Medical Microbiology**. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 77. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8325/>