

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE COBRE  
CTR1 EM CÉLULAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM  
LEVEDURAS PATOGÊNICAS**

NICOLE SARTORI RIBEIRO

Porto Alegre  
Dezembro/2014

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE COBRE  
CTR1 EM CÉLULAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM  
LEVEDURAS PATOGÊNICAS**

**NICOLE SARTORI RIBEIRO**

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

*Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharela em Biomedicina.*

PORTO ALEGRE

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu professor orientador Dr. Charley Staats pela orientação, pelos incentivos e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do período de realização desse projeto. Agradeço pela recepção no laboratório e pela confiança no meu desempenho nesse trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica: Rafael Schneider, Alícia Piffer e, em especial, à doutoranda Francine Melise pelo importante auxílio, paciência, ensinamento e companheirismo durante toda a execução deste trabalho.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Marilene Henning Vainstein e Dr. Augusto Schrank pelo acolhimento no laboratório.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia Kmetzsch por sua disponibilidade em ajudar e sempre transmitir seus conhecimentos de forma clara e consistente.

Aos colegas da turma 7 da Biomedicina que me acompanharam durante os anos de graduação, especialmente às minhas queridas amigas Carla Basso, Édina Poletto, Giovana Bristot e Pâmela Menegotto pela amizade verdadeira e o apoio compartilhado ao longo dessa trajetória.

Aos meus pais, Celi e Jorge, pelo suporte, por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial para atingir meus objetivos, estando do meu lado em todos os momentos. Também à minha irmã Jéssica por me apoiar e ser uma fonte de inspiração.

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* são leveduras e agentes etiológicos de duas importantes infecções fúngicas oportunistas que acometem o ser humano, a criptococose e candidíase, respectivamente. A Criptococose ocorre após a inalação de esporos ou células de leveduras dessecadas presentes no meio ambiente em excretas de pombos, no solo ou em eucaliptos e podem acometer pele ou ir até os pulmões, onde se alojam nos alvéolos e causam pneumonia ou ainda se disseminar através da corrente sanguínea e atingir o sistema nervoso central, causando a meningoencefalite ou meningite. Já a Candidíase convive de forma comensal com o hospedeiro na pele e sistemas respiratório, reprodutor e digestório, mas que com a queda da imunidade do indivíduo, torna-se invasiva e causa infecção. Apesar de ambos microrganismos apresentarem diferentes formas de infecção e desenvolvimento no hospedeiro, eles são causas comuns de infecção principalmente em indivíduos imunocomprometidos e desenvolveram mecanismos importantes para sua sobrevivência e proliferação dentro das células de fagocíticas. Uma vez fagocitadas por macrófagos, as células do microrganismo se deparam com um ambiente hostil, tóxico e com baixo pH, gerado no interior do fagolisossomo. Nesse contexto, metais de transição desempenham importante papel. O cobre é essencial para a vida aeróbica, mas em grandes concentrações ele pode tornar-se tóxico. Por isso tanto a sua limitação, denominada imunidade nutricional, quanto o seu excesso, que gera espécies reativas e um potencial tóxico para o patógeno, podem ser utilizados como estratégia antifúngica pelos macrófagos. O transportador de cobre de alta afinidade CTR1 é um dos responsáveis pela modulação da homeostase desse metal, contudo esse mecanismo em macrófagos durante a infecção por fungos ainda está pouco elucidado. Portanto, o objetivo desse projeto foi avaliar a expressão de CTR1 de macrófagos durante sua infecção com *C. neoformans* ou *C. albicans* para melhor esclarecimento da homeostase de cobre nessa interação. Empregando métodos como *Western blot*, *in cell ELISA* e microscopia de imunofluorescência, foi possível observar que ocorre um aumento da expressão de CTR1 em macrófagos infectados com *C. neoformans* ou *C. albicans*. Estes dados sugerem que há um possível aumento de cobre e conseqüentemente de espécies reativas de oxigênio para limitar o desenvolvimento destas leveduras.

## ABSTRACT

The yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* are the ethiological agents of the most important opportunistic fungal pathogen that affects humans, cryptococcosis and candidiasis, respectively. Cryptococcosis occurs via inhalation of the yeast or spores present in environment in pigeons excreta, soil or eucalyptus and it can affect the skin or go to the lungs, where the fungal particles adhere in the alveoli and cause pneumonia or spread through the bloodstream and reach the central nervous system, causing meningoencephalitis or meningitis. Candidiasis is a commensal to the human respiratory, reproductive and digestive tract, as well to the skin. However, with the imbalance of human immunity it becomes invasive and cause infection. Although both have different forms of infection and growth inside of the host, these two microorganisms are common causes of infections, especially in immunocompromised individuals, and also they developed important mechanisms to survive and proliferate in phagocytic cells. When it faces the host immune system and are phagocytosed by macrophages into phagolysosomes, the microorganisms are exposed to a hostile, toxic and low pH environment. In this context, transition metals develop an important role. Copper is an essential transition metal for aerobic life, but can be toxic in high concentrations due to the formation of reactive oxygen species. In this way, either its limitation (nutritional immunity) or its accumulation may constitute antifungal strategies used by macrophages. The high affinity copper transporter CTR1 is one of the responsible for the modulations of this metal homeostasis in macrophages. However, its role in macrophages during the infection with fungal cells is still poorly characterized. Hence, the aim of this work was evaluate the expression of CTR1 in macrophages during *C.neoformans* or *C.albicans* infection to improve the understanding of copper homeostasis during this interaction. In this project, we used *Western blot*, *in cell ELISA* and Immunofluorescence methods to evaluate CTR1 expression and we were able to observe an increased expression of it in macrophages infected by *C. neoformans* ou *C. albicans*. These results indicate that there is a possible copper uptake e consequently creation of reactive oxygen species (ROS) by macrophage to avoid fungal development.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de *Cryptococcus spp.*

Figura 2. Mecanismo de aquisição e disseminação de *Cryptococcus neoformans*

Figura 3. Avaliação da expressão do transportador de cobre CTR1 em células de macrófagos J774A na presença de células de *C.neoformans* vivas ou mortas por calor.

Figura 4. Avaliação da expressão do transportador de cobre CTR1 em células de macrófagos infectados com células *C.albicans* vivas ou mortas por calor.

Figura 5. Quantificação através de técnica colorimétrica da expressão de CTR1 em macrófagos infectados com *C.neoformans* ou *C.albicans*.

Figura 6. Imunolocalização do transportador de cobre de alta afinidade CTR1 na membrana externa de macrófagos após terem interagido duas horas com *Cryptococcus neoformans*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
µM	micromolar
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP7	ATPases transportadoras de cobre tipo P
°C	graus Celsius
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CM	meningite criptococócica
CTR	<i>receptor transportador de cobre 1</i>
Cu	cobre
Cuf 1	<i>fator de transcrição dependente de cobre 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
GalXM	galactoxilomanana
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GXM	glucoroxilomanana
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN-γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetros
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial hidrogeniônico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
Th1	T-helper 1
YPD	<i>extrato fúngico/peptona/dextrose</i>
ZIP	<i>proteínas tipo-Zrt e Irt</i>
ZnT	família transportadora de zinco

<b>1. SUMÁRIO</b>	
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>9</b>
1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> .....	10
1.1.1 <i>Estabelecimento da infecção</i> .....	12
1.1.2 <i>Resposta Imune à Criptococose</i> .....	13
1.2 <i>Candida albicans</i> .....	15
1.3 <i>Imunidade Nutricional</i> .....	16
1.3.1 <i>Ferro</i> .....	17
1.3.2 <i>Zinco</i> .....	18
1.3.3 <i>Cobre</i> .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	23
2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	23
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>24</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>26</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>27</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>8 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO BIOMETALS</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O grande avanço da medicina nos últimos anos vem acompanhado do aumento do número de transplantes, e conseqüentemente do uso de fármacos imunossupressores a fim de evitar a rejeição do órgão ou tecido transplantado. Associado a isto, o crescente número de casos de AIDS no mundo contribui para o aumento de infecções oportunistas (Voelz and May, 2010). Uma destas infecções é a Criptococose, doença de origem fúngica que atinge mais de um milhão de pessoas por ano no mundo e atualmente é a quarta causa de morte por doença infecciosa na África Subsaariana (Park et al., 2009). Seus principais agentes etiológicos são as leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Cogliati, 2013; Lin and Heitman, 2006), que são adquiridos por inalação de esporos ou células fúngicas dissecadas e, na ausência de um sistema imune efetivo, essas células fúngicas se espalham sistematicamente, causando meningoencefalite (Kretschmer et al., 2014). A levedura *C. neoformans* causa infecções oportunistas principalmente em pacientes imunocomprometidos devido a condições clínicas como HIV, leucemia e câncer ou uso de medicamentos corticosteroides (Voelz and May, 2010) e, além disso, possui um maior tropismo pelo tecido cerebral (forma mais grave da doença) sendo o principal causador dos casos de meningoencefalite (Perfect, 2012). Em contraste, *C. gattii* possui a habilidade de causar infecção em indivíduos imunocompetentes, sendo esse responsável por um surto que ocorreu em 1999 nas ilhas de Vancouver, no Canadá, causando muitas infecções em seres humanos e animais (Kronstad et al., 2011). Em modelo murino de infecção, *C. gattii* fica mais restrito ao pulmão, raramente se disseminando pelo sistema nervoso central (Perfect, 2012).

Uma outra infecção oportunista que ocupa um espaço clínico muito significativo atualmente é a Candidíase. *Candida* é um fungo polimórfico que normalmente coloniza as cavidades oral, vaginal, intestinal, assim como a pele de indivíduos saudáveis. Contudo, quando há uma queda do sistema imune do hospedeiro, devido à infecção por HIV, diabetes, uso de antibióticos ou de drogas imunossupressivas, esse fungo pode tornar-se invasivo e causar diversas doenças, no qual as mais comuns são candidíase orofaríngea ou vulvovaginal (Miramón et al., 2013). Dentre as 150 espécies compreendidas pelo gênero *Candida*, contudo, apenas 20 delas são responsáveis por causar infecções fúngicas, sendo *Candida albicans* a causadora mais comum de candidíase (Miramón et al., 2013).

Os atuais guias de como administrar e tratar a criptococose recomendam tratamento com antifúngicos que variam de acordo com o local e grau de severidade da infecção (Smith

et al., 2014). Contudo, o tratamento para Cryptococcal meningitis (CM) é dividido em três fases: indução, consolidação e manutenção; elas têm como objetivo atingir rapidamente a atividade fúngica, substituição da droga caso haja intolerância e prevenir a alta taxa de recidiva da meningite, respectivamente, e os fármacos utilizados são principalmente anfotericina B, fluorocitocina e fluconazol (Antinori, 2013). Embora esse seja o tratamento indicado, está longe de ser ideal devido aos diversos efeitos adversos dos fármacos e pelo aumento da resistência à essas drogas antifúngicas nas últimas décadas (Simm et al., 2011).

Já o tratamento contra a candidíase tinha o Fluconazol como fármaco de primeira linha de escolha para terapia ou ainda Anfotericina B. Contudo, as opções disponíveis para tratar a candidíase invasiva foram expandidas na última década e incluíram novas formulações com azoles, por exemplo. Um problema comum está associado com o tempo de início do tratamento, pois viu-se em um estudo que as drogas antifúngicas começam a ser dadas aos pacientes após a positivação e identificação da cultura em apenas 15% dos indivíduos, sendo que o tratamento precoce é criticamente importante para evitar a mortalidade por essa infecção (Parkins et al., 2007).

### **1.1 *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***

*C.neoformans* foi identificado por Sanfelice em 1894 e foi dividido em dois subtipos com base em ensaios de aglutinação capsular: *var. grubii* (sorotipo A) é a causa mais comum de infecção de criptococose no mundo, tipicamente do sistema nervoso central em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes órgão-transplantados e indivíduos HIV infectados; *var. neoformans* (sorotipo D) é caracterizado por baixa patogenicidade, se divergiu do sorotipo A há mais ou menos 18,5 milhões de anos atrás e é mais prevalente na Europa. Por outro lado, *C.gattii* infecta indivíduos saudáveis e originalmente estava restrito à regiões tropicais e subtropicais, até a ocorrência do surto em Vancouver em 1999, onde atualmente esse sorotipo é endêmico e tem uma alta incidência (Feretzaki et al., 2014).

As espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus sp.* possuem alguns fatores de virulência clássicos nos quais estimulam a infecção intracelular, capazes de alterar o estado do sistema imune do hospedeiro humano para estabelecer a doença (Kronstad et al., 2011), sendo eles:

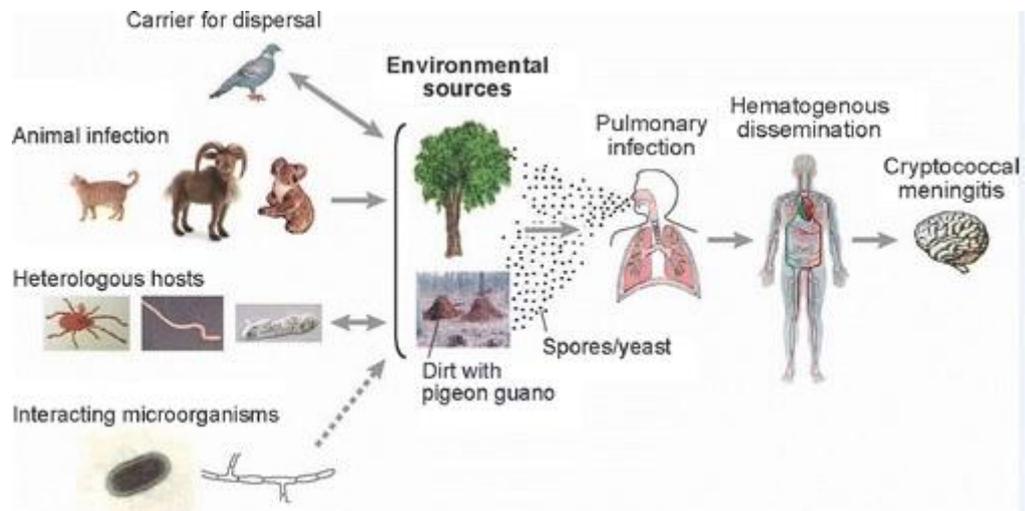
- I. Cápsula polissacarídica, que é composta basicamente por dois tipos de polissacarídeos, glucoroxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), além de manoproteínas, as

quais possuem propriedades imunomoduladoras, estimulando a resposta imunológica mediada por células T (Kronstad et al., 2011). Tem um importante papel na proteção do organismo contra algumas condições de estresse como desidratação, é importante para a virulência já que mutantes acapsulares não causam o desenvolvimento da doença em modelo murino e também tem propriedades imunomodulatórias e promovem evasão imune e sobrevivência no hospedeiro (Zaragoza et al., 2009);

- II. produção de melanina, que protege as células microbianas de danos oxidativos durante a infecção, causado por fagossomos ou radiação ionizante, protege contra antifúngicos e tem efeitos imunomodulatórios que podem contribuir com a virulência (Mednick et al., 2005). A melanina é produzida pela enzima laccase que, por sua vez, é estimulada por diversos fatores, incluindo o metabolismo de cobre (Mauch et al., 2013);
- III. Produção de enzimas extracelulares, como fosfolipase B, urease e superóxido desmutase (Kronstad et al., 2012). A fosfolipase B facilita a invasão no tecido pulmonar do hospedeiro através da hidrólise dos fosfolípídeos da membrana de células de mamíferos e surfactante pulmonar, além de ser essencial para disseminação hematogênica da infecção (Siafakas et al., 2007). Urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbamate, gerando um aumento do pH em condições necessárias para sobrevivência, e ainda parece facilitar a disseminação de *C. neoformans* pelo sistema nervoso central, possivelmente pelo resultado da toxicidade da amônia sobre as células epiteliais do cérebro (Singh et al., 2013). Superóxido desmutase é uma enzima que converte radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio e parece contribuir para a virulência por sua habilidade de neutralizar níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio gerada pelo hospedeiro (Cox et al., 2003);
- IV. Capacidade de desenvolvimento à 37°C, mesma temperatura do corpo do hospedeiro (Sabiiti and May, 2012);
- V. Capacidade de desenvolvimento intrafagossômico (Sabiiti and May, 2012).

### 1.1.1 Estabelecimento da infecção

Para ambas espécies, a infecção inicia-se através da inalação de esporos ou células de leveduras dessecadas presentes no meio ambiente em excretas de pombos, no solo ou em eucaliptos, que podem acometer pele ou ir até os pulmões, onde se alojam nos alvéolos devido a um fluido tensoativo e surfactante presente nos mesmos, que promove a adesão das células de *Cryptococcus spp.* nas células epiteliais pulmonares (Sabiiti and May, 2012). Esse depósito e consequente colonização no hospedeiro pode resultar em diferentes consequências: não gerar o desenvolvimento da doença pela eliminação do fungo através da resposta imune do hospedeiro; pode produzir uma infecção assintomática, onde o fungo entra em um período de latência e pode ser ativado quando o hospedeiro encontra-se imunocomprometido; causar doença pulmonária, caracterizada por nódulos pulmonares e inflamação dos pulmões; ou gerar uma doença disseminada, que pode potencialmente ocorrer em todos os órgãos sistêmicos, mas mais frequentemente no sistema nervoso central, causando meningoencefalite ou meningite (Figura 1), especialmente em indivíduos imunocompetentes (Feldmesser et al., 2000; Kronstad et al., 2011; Sabiiti and May, 2012; Sorrell, 2001).



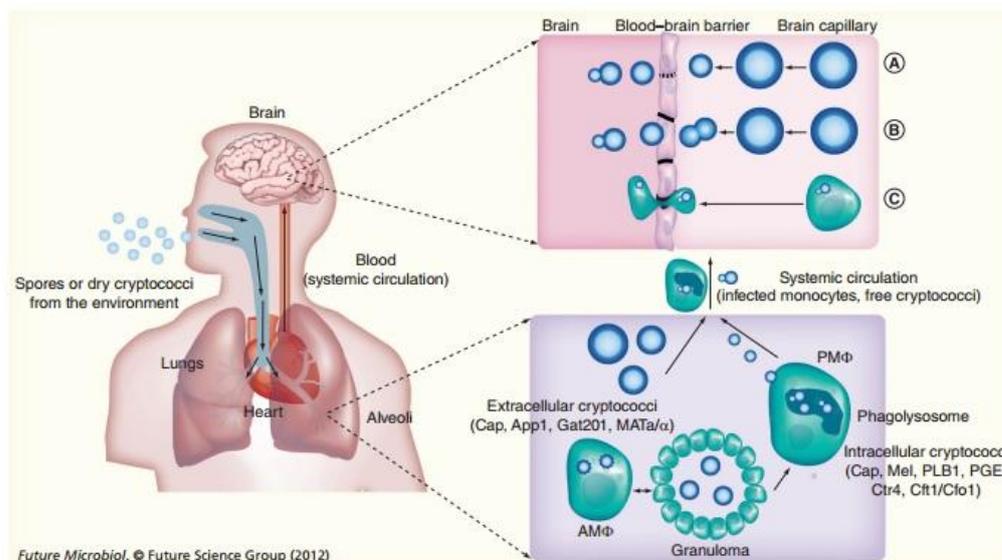
**Figura 1: Representação do ciclo de infecção do *Cryptococcus* (ambiente e hospedeiro).** O fungo sobrevive no meio ambiente como em solo e árvores. Aves, especialmente pombos, são responsáveis pela dispersão do fungo que infecta diversos hospedeiros como gatos, cabras e coalas. Além disso, o fungo pode interagir com outros microrganismos, como bactérias ou fungos. *Cryptococcus* estabelece uma infecção pulmonar no hospedeiro através da inalação dos esporos ou células fúngicas dessecadas presentes no ambiente e, se o hospedeiro estiver imunocomprometido, o fungo pode ser reativado e entrar no sistema nervoso central (forma mais severa da doença Criptococose). Adaptação de (Lin and Heitman, 2006).

### 1.1.2 Resposta Imune à Criptococose

Uma vez no espaço pulmonar, células fúngicas de *Cryptococcus* podem sobreviver extracelularmente e/ou transitar no tecido pulmonar através da internalização pelas células epiteliais ou por macrófagos alveolares residentes. Esses macrófagos representam 95% da população de células broncoalveolares, o que faz deles os fagócitos de primeira linhagem predominantes no pulmão. A interação entre macrófagos e leveduras é determinante para o estabelecimento da infecção pulmonar e subsequente disseminação sistêmica. As ações dessas células contra *C. neoformans* incluem fagocitose, morte, sequestro de polissacarídeos, produção de citocinas e quimiocinas e apresentação de antígeno (García-Rodas and Zaragoza, 2012). No âmbito da fagocitose, macrófagos e células dendríticas fagocitam fungos opsonizados após o reconhecimento de receptores específicos do patógeno, como receptores de manose, CD14, TLR-2, TLR-4 e CD18, e esses ligam-se em epítomos presentes na superfície desse patógeno, especialmente na parede celular (García-Rodas and Zaragoza, 2012; Shoham and Levitz, 2005). Macrófagos alveolares respondem à presença de *C. neoformans* com liberação de sinais pró-inflamatórios, como a secreção de quimiocinas e IL-1, que induzem uma resposta Th1 com intenção de eliminar o *Cryptococcus*, mas em imunocomprometidos essa resposta é muito forte, o que resulta na formação de granulomas que previne a disseminação extracelular das células fúngicas (Sabiiti and May, 2012; Shoham and Levitz, 2005). Ocorre a formação de fagossomos e como mecanismo de morte intracelular, esses irão se fundir com lisossomos, que possuem pH ácido e enzimas hidrolíticas, resultando então na digestão da matéria orgânica do patógeno. Já o mecanismo de morte extracelular é mediado pela liberação de peptídeos antifúngicos, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Todavia, *C. neoformans* desenvolveu múltiplos mecanismos que prejudicam sua internalização por ação de células fagocíticas, alguns deles dependentes da cápsula e outros de proteínas antifagocíticas e caminhos de sinalização celular (García-Rodas and Zaragoza, 2012). Primeiramente, *C. neoformans* pode se desenvolver de forma intra ou extracelular, o que aumenta suas chances de replicação; pode haver um espessamento da cápsula polissacarídica, que diminui susceptibilidade à radicais livres e ação de peptídeos antimicrobianos, protege de condições de estresse e ainda aumentar o tamanho do fagolisossomo, diluindo os compostos lisossomais (Feldmesser et al., 2000); a melanina e enzimas antioxidantes também auxiliam na redução de fatores estressores dentro do fagossomo.

A habilidade de *C. neoformans* de escapar da ação das células de defesa e sobreviver no hospedeiro são importantes para sua disseminação através de dois tipos de processo:

- I. Atravessando a barreira hematoencefálica como células individuais: em um mecanismo denominado transcitose (Figura 2), no qual atravessam células endoteliais microvasculares que revestem os vasos sanguíneos do cérebro. Esse processo envolve diretamente absorção de células fúngicas por células endoteliais e transmigração do fungo através do citoplasma até alcançar o cérebro (Kronstad et al., 2011).
- II. No interior de células fagocíticas: há evidências de que as células fúngicas podem atravessar o endotélio pela estratégia de “Cavalo de Tróia”, no qual envolve a migração de células fagocíticas que contém *Cryptococcus* até tecidos distantes sem ser exposto ao sistema imune, já que é bem estabelecido que esse fungo pode sobreviver e proliferar dentro de macrófagos, resistindo ao ambiente adverso encontrado no interior dos fagossomos (Charlier et al., 2009).



**Figura 2: Modelo de disseminação do *Cryptococcus neoformans* vindos do ambiente até atingir o cérebro.**

Esporos fúngicos colonizam o espaço alveolar nos pulmões que, em indivíduos imunocompetentes, causam a formação de granulomas. *Cryptococcus* nos granulomas podem ficar latentes ou serem reativados e causar infecção no hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes, esse fungo intracelular usa seus mecanismos de disseminação através do sistema circulatório, enquanto fungos extracelulares podem permanecer localizados nos pulmões ou disseminar transcelularmente através da circulação sanguínea. No sistema circulatório, *Cryptococcus* associam-se com monócitos ou são carregados livremente até capilares cerebrais, onde podem penetrar a barreira hematoencefálica (BHE) por ligação com células endoteliais, transcitose ou no interior de monócitos/macrófagos (cavalo de tróia). Adaptado de (Sabiiti and May, 2012).

## 1.2 *Candida albicans*

A resposta imune varia de acordo com a espécie de fungo que invade o hospedeiro e o sítio onde ocorre a infecção, o que também diferencia a importância dos mecanismos de defesa inatos e adaptativos. Contudo, muitos mecanismos de defesa são comuns em resposta à invasão por diferentes fungos, especialmente se os fungos compartilham formas de instalação ou disseminação no hospedeiro (Shoham and Levitz, 2005). *Candida albicans*, por exemplo, apesar de poder partilhar de um sistema comensal no trato digestivo, respiratório, reprodutivo e na pele do ser humano, é uma causa comum de infecção sistêmica grave entre população de indivíduos imunocomprometidos devido a presença de vírus HIV, imunossupressão por drogas, transplantados, doenças hematológicas e outras terapias, assim como o *Cryptococcus neoformans* (Nicola et al., 2012).

*C. albicans* é uma das espécies mais predominantes e essa possui habilidade de crescer tanto como fungo ou com formas filamentosas, como pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. Sua habilidade de trocar sua morfologia é considerada necessária para virulência, contudo ambas hifas e pseudo-hifas são invasivas (Sudbery et al., 2004). Além disso, *C. albicans* consegue se aderir em superfícies biológicas ou inertes através da liberação de uma variedade de adesinas, o que a permite formar biofilmes, composto por ambas formas filamentosas e células fúngicas, mergulhados em uma matriz extracelular. A formação de biofilme em cateteres ou outros equipamentos médicos de longa permanência aumenta a resistência à terapia antifúngica, fagocitose e pode prover uma fonte contínua de inóculo fúngico capaz de se espalhar através da circulação sanguínea, que permite chegarem a sítios distantes com potencial para infecção metastática de órgãos profundos, causando candidíase invasiva com mortalidade de 30 a 40% (Miramón et al., 2013; Uppuluri et al., 2010). Outros fatores de virulência de *C. albicans* são a secreção de hidrolases, que permitem ao fungo utilizar componentes do hospedeiro para nutrição e crescimento, adaptação à mudanças de pH e do metabolismo, especialmente relacionado ao ambiente nutricional, resposta ao ambiente estressante que permite a adaptação do fungo em mudança de condições e o protege de fatores estressores produzidos pelo hospedeiro, produção de proteínas de choque térmico (Hsps) que previnem o desdobramento e agregação de proteínas e as estabilizam e mecanismos de aquisição ou restrição à metais importantes (Mayer et al., 2013).

Macrófagos são as células imunes mais importantes para o controle de *C. albicans* no tecido e na circulação sanguínea devido sua ação de fagocitose e destruição do fungo, além da

secreção de citocinas pró-inflamatórias. O reconhecimento de microrganismos não-opsionizados por fagócitos é mediado via receptores reconhecedores de padrões (PRRs), que incluem receptores Toll-like, lectina tipo C e Nod-like, sendo a parede do fungo a primeira estrutura reconhecida pelos macrófagos. Os mecanismos usados pelas células de defesa para eliminar a *C. albicans* incluem os intra e extracelulares, oxidativos e não-oxidativos e, assim como na infecção por *C. neoformans*, há a formação de fagossomos que contém condições extremas no seu interior para destruir o fungo e também produção de citocinas proinflamatórias, com já dito, e resposta Th1 (Miramón et al., 2013; van de Veerdonk et al., 2010). Todavia, *C. albicans* adaptou suas estratégias para evitar seu reconhecimento por células fagocitárias e o início da resposta inflamatória, interferindo na maturação de fagolissomos e então promovendo sua sobrevivência no interior de macrófagos (Miramón et al., 2013).

### 1.3 Imunidade Nutricional

Metais de transição são essenciais para os sistemas biológicos por estarem envolvidos em processos biológicos importantes e necessários para a sobrevivência de todos os organismos vivos. Esses metais são frequentemente incorporados em metaloproteínas, incluindo metaloenzimas, reserva de proteínas e fatores de transcrição. O papel funcional dos metais de transição nos sistemas biológicos é essencialmente ser requerido por enzimas para promover atividade catalítica, porém pode ser dividido em funções não-catalíticas, catálise redox e catálise não-redox, sendo que dos metais redox ativos, ferro é o mais usado, seguido pelo cobre e manganês. Apesar de o magnésio ser o mais prevalente metal não-redox encontrado nas enzimas, zinco é o metal de transição mais comum (Andreini et al., 2008). As propriedades eletrostáticas dos metais então estabilizam substratos ou reações intermediárias em sítios ativos de enzimas, enquanto sua alta reatividade é utilizada para catálise, contudo essa última característica proporciona propriedades tóxicas aos metais de transição quando estão em altas concentrações. Além disso, o mecanismo usado para limitar a disponibilidade de metais de transição livres serve também como ação de hospedeiros contra a invasão de microrganismos, incluindo bactérias e fungos. Para prever a infecção por organismos patogênicos, o ser humano, incluindo também outros mamíferos, restringem o acesso a metais essenciais, em um processo denominado “imunidade nutricional” (Hood and Skaar, 2012).

### 1.3.1 Ferro

O ferro é o quarto elemento mais abundante na terra e o metal de transição mais abundante no corpo humano (Hood and Skaar, 2012). É um cofator muito versátil e essencial para reações bioquímicas tanto no mamífero hospedeiro quanto micróbios patogênicos, sendo sua biodisponibilidade estritamente controlada. Em particular, ferro tem duas formas mais relevantes  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo que o último pode estar fortemente ligado com proteínas do hospedeiro, como a transferrina e lactoferrina para a manutenção da homeostase, para limitar potenciais danos causados por toxicidade do ferro sob condições fisiológicas e para restringir o acesso por patógenos. Ferro é essencial para os processos biológicos de bactérias e fungos, como replicação do DNA, transcrição, metabolismo e geração de energia via respiratória. Além disso, apesar da aquisição de ferro por microrganismos durante infecção no hospedeiro humano ser difícil, fungos e bactérias desenvolveram estratégias para ter acesso à esse metal (Caza and Kronstad, 2013).

Para prevenir o acesso de microrganismos patogênicos ao ferro, vertebrados usam um número de proteínas que tornam grande parte desse nutriente inacessível à patógenos devido ao seu sistema de captação de Fe, não deixando esse metal disponível na forma livre. Contudo, dentre os mecanismos existentes, as estratégias mais sofisticadas utilizadas por fungos, por exemplo, para subverter esse sequestro de ferro feito pelo hospedeiro são:

- I. Sideróforos: são moléculas de baixo peso molecular quelantes de ferro que são secretados por microrganismos, que se ligam ao  $\text{Fe}^{3+}$  com uma afinidade maior que a transferrina e lactoferrina (*C. neoformans* e *C. albicans* não produzem seus próprios sideróforos, mas eles possuem transportadores de sideróforos que são empregados para obter ferro dos sideróforos produzidos por outros organismos) (Saikia et al., 2014).
- II. Redução extracelular de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  mediante a ação de redutases localizadas na parede fúngica. Essas redutases estão associadas à permeases que permitem a internalização do ferro no citoplasma. Esse mecanismo é muito utilizado por fungos leveduriformes como *C. neoformans*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* que, em situações com baixas concentrações de ferro, podem expressar sistemas de transporte de alta afinidade dependentes de cobre (Álvarez et al., 2013).

- III. Sistemas enzimáticos que são capazes de liberar o ferro da hemoglobina através da lise eritrocitária, já que uma grande reserva de ferro nos mamíferos se encontra na forma de grupo hemo. *C. albicans* desenvolveu essas enzimas que tem atividade homóloga a monooxigenase humana, que são capazes de lisar os eritrócitos e capturar o ferro.
- IV. Acidificação do meio em condições anaeróbicas (no qual há formação de hidrogênios livres que se unem à transferrina sérica) (Hood and Skaar, 2012; Álvarez et al., 2013).

Em *C. neoformans*, o ferro é importante para nutrição, sinalização e disseminação do fungo para o sistema nervoso central. Também influencia a virulência do fungo, incluindo regulação na elaboração da melanina e da cápsula polissacarídea através da ação do fator de transcrição Cir1, que regula genes envolvidos no transporte e homeostase de ferro (Kronstad et al., 2013).

De forma similar, para *C. albicans* a aquisição desse metal também é um atributo de virulência, já que colonização e proliferação são possíveis somente na presença de níveis suficientes de ferro (Almeida et al., 2009). Ele é essencial para diversas funções como respiração celular, metabolismo, transporte de oxigênio e *C. albicans* captam ferro do ambiente hospedeiro, que é armazenado ou liberado de diversas organelas e desenvolveram diversas estratégias para adquiri-lo em situações de escassez (Sutak et al., 2008).

### 1.3.2 Zinco

Zinco é o segundo metal de transição mais abundante na maioria dos sistemas vivos e é um metal presente em todas as formas de vida. Sua importância deve-se por compor o centro catalítico e estrutural de um grande número de proteínas de eucariotos, ditas proteínas ligadoras de zinco (Staats et al., 2013). Sabe-se que zinco tem papel central no sistema imune e desempenha papel importante na produção de citocinas. A homeostase de zinco é mantida através da atividade de transportadores de membrana específicos ou pelas proteínas ligadoras de zinco que mediam a captação, excreção, reserva ou distribuição de zinco. Essas proteínas pertencem às famílias ZIP (*Zrt- and Irt-like proteins SLC39*) e ZnT (*Zinc Transporters SLC30*) que tem como principal função fornecer zinco às proteínas recém-sintetizadas, importantes para diversas funções como expressão gênica, imunidade, reprodução ou proteção contra danos causados por radicais livres (Chimienti et al., 2003).

As condições de depleção de zinco são conhecidas para reduzir o crescimento fúngico e evidências sugerem que células hospedeiras sequestram zinco para prejudicar o desenvolvimento de fungos, como já foi exemplificado pela redução de níveis de zinco em macrófagos infectados por *Histoplasma capsulatum* (Winters et al., 2010). A restrição de zinco pelas células hospedeiras é alcançada pela diminuição da disponibilidade de metal através da atividade dos transportadores de zinco do hospedeiro ou da expressão das proteínas ligadoras de zinco, como a calprotectina (proteína produzida por neutrófilos para prejudicar o desenvolvimento de *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* e *C. neoformans*). Contudo, células fúngicas desenvolveram diferentes estratégias para lidar com o estresse causado pela privação de zinco, como alteração da síntese de lipídeos, metionina e metabolismo de sulfato e tolerância do estresse oxidativo (Staats et al., 2013).

Todavia, há evidências crescentes que sugerem que células de mamíferos aproveitam as propriedades tóxicas dos metais de transição para matar bactérias. O excesso de zinco celular podem gerar um desequilíbrio no metabolismo oxidativo e, de fato, macrófagos desenvolveram estratégias para matar células bacterianas fagocitadas através da liberação de zinco de suas reservas intracelulares, resultando no acúmulo desse no fagossomo e gerando intoxicação por zinco no ambiente fagossomal e consequente geração de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos microrganismos invasores (Botella et al., 2011; Hood and Skaar, 2012; Staats et al., 2013). Enquanto isso, bactérias como *M. tuberculosis* usariam a expressão de sistemas de efluxo de zinco para sobreviver dentro do fagossomo (Hood and Skaar, 2012).

A levedura *C. neoformans* desenvolveu, assim como *C. albicans*, formas para sequestrar ou expulsar o zinco de células e tecidos do hospedeiro em processos análogos para se ligar ao zinco por sideróforos secretados. Enquanto *C. albicans* secreta a proteína antigênica Pra1, uma proteína ligadora de zinco que é capaz de expulsar zinco dos tecidos invadidos por fungo e também participar da colonização endotelial de *C. albicans*, estando associada com invasão de células imunes, em *C. neoformans* e *C. gattii* não se observou a presença de ortólogos (Staats et al., 2013). Os genes sequestradores de zinco são geralmente ligados com ortólogos Zrt1 nesse fungo, representando um mecanismo conservado de para aquisição de zinco durante a interação fungo-hospedeiro (Citiulo et al., 2012)

### 1.3.3 Cobre

Cobre é um metal essencial para a vida aeróbica e é amplamente conhecido por suas propriedades antimicrobianas, o que foi utilizado pra fins industriais e médicos (Hood and Skaar, 2012). É um cofator essencial para uma grande variedade de enzimas que são importantes para o crescimento, diferenciação, sobrevivência e demais processos biológicos em organismos desde bactérias até mamíferos. Por ser um íon metal redox ativo, existente nos estados reduzido ( $\text{Cu}^+$ ) ou oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ), o que providencia um ambiente quimicamente rico para diversos ligantes biológicos que desenvolvem função estrutural e catalítica, também aumenta seu potencial como toxina celular, já que o excesso de cobre pode tornar-se tóxico (Samanovic et al., 2012). O acúmulo de cobre em sítios de infecção com a intenção de eliminar microrganismos invasores foi primeiramente demonstrado em infecções pulmonares por *M. tuberculosis*, onde observou-se que resistência ao cobre é necessário para a virulência dessa bactéria (Wolschendorf et al., 2011). A tolerância ao cobre na maioria das bactérias envolve a expressão de proteínas ATPases exportadoras de cobre e que são necessárias para a sobrevivência dessas bactérias à resposta imune inata durante a infecção (Hodgkinson and Petris, 2012). Dentre outros mecanismos utilizados por bactérias para evitar a toxicidade por cobre estão a exportação do cobre através do plasma da membrana até o espaço periplasmático, sequestro do cobre do citoplasma ou periplasma por proteínas ligadoras de cobre ou oxidação do cobre  $\text{Cu}^+$  para gerar íon menos tóxico  $\text{Cu}^{2+}$ .

Em fungos, o estudo da homeostase de cobre foi melhor caracterizado em *S. cerevisiae*, o que facilitou a compreensão da aquisição de cobre e sua utilização por fungos patogênicos do ser humano, como *C. neoformans* (Ding et al., 2014). A obtenção de cobre se dá por meio de sua forma reduzida. Entretanto, a forma mais encontrada no ambiente é  $\text{Cu}^{2+}$ , que é reduzido para  $\text{Cu}^+$  pela ação de reductases férrica/cúprica presentes na superfície da célula (Silva et al., 2011). Após sua redução, o cobre é transportado por transportadores da família CTR, caracterizados pela porção amino-terminal rica em histidina e metionina, que propiciam a ligação ao cobre (Zhou and Gitschier, 1997).

Em *C. neoformans*, estudos prévios demonstraram que metais como ferro e cobre desenvolvem papéis importantes da virulência desse fungo. As funções do cobre incluem a formação do pigmento melanina que é sintetizada por *C. neoformans* via enzima laccase cobre-dependente, na qual é sintetizada e carregada com cobre em compartimentos secretores; co-fator essencial em oxidases multi-cobre envolvidas na captação de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ )

de alta afinidade (aquisição de ferro é um fator de virulência); detoxificação de oxigênios reativos e respiração (Ding et al., 2011). O fator de transcrição Cuf1 metarregulador de cobre em *C.neoformans* mostrou-se ser importante para a virulência desse fungo (Waterman et al., 2007), já que Cuf1 ativa a transcrição de genes que codificam a maquinaria de aquisição de cobre CTR4 e CTR1 ou genes que codificam para a maquinaria de detoxificação por metalotioneínas, CMT1 e CMT2, sob limitação e excesso de cobre, respectivamente (Ding et al., 2013). Além disso, foi visto que o crescimento em condições de cultura típicas *in vitro*, *C.neoformans* sequestram mais cobre que outros fungos como *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, ele é capaz de crescer e manter um nível mínimo de cobre em condições de severa depleção deste metal e essa aquisição de cobre foi observada também *in vivo* em hospedeiros mamíferos (fungos isolados de cérebros de ratos infectados) (Raja et al., 2013). Em contradição, outros estudos da literatura apontam que *C. neoformans* desenvolveu uma maquinaria de desintoxicação de cobre envolvendo proteínas ligadoras de cobre metalotioneínas, que desloca esse metal para fora da célula (Ding et al., 2013).

Em *C. albicans*, verificou-se que o cobre desempenha um papel deteriorante no estresse oxidativo por esse fungo e que concentrações fisiológicas de cobre podem ser tóxicas para esse fungo em condições anaeróbicas ácidas como no trato gastrointestinal. Além disso, reduzindo-se as concentrações de cobre livre no ambiente intracelular, facilita-se a sobrevivência de *C.albicans* nesse ambiente (Ding et al., 2014). Contudo, viu-se que os níveis de cobre do hospedeiro tipicamente aumentam no fagolisossomo em resposta à infecção e inflamação, em um indício para tentar erradicar os patógenos. Dois genes foram identificados em *C. albicans*, CaCUP1 e CaCRP1, que conferem ao fungo uma incomum resistência ao cobre (Marvin et al., 2003). Verificou-se que quando há a deleção de *CTR1* em *C. albicans*, ocorrem defeitos no crescimento celular sob condições de deficiência de ferro e cobre, dando origem à defeitos respiratórios mitocondriais, e também interfere na formação de hifas, levando a uma hiperfilamentação ou não indução de hifas (Ding et al., 2014).

Em hospedeiros mamíferos, bactérias são expostas ao cobre dentro dos fagolisossomos dos macrófagos que, como já citado anteriormente, apresenta um ambiente hostil (Ding et al., 2013; Hood and Skaar, 2012). Enquanto células fagocíticas sequestram esses metais de transição de alguns patógenos invasores, macrófagos infectados por espécies de *Mycobacterium* acumulam cobre no compartimento fagossomal (Ding et al., 2013). Além disso, linhagens celulares de macrófagos estimuladas por fatores pró-inflamatórios como lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) parecem estimular a captação de cobre em

linhagem de macrófago RAW 267 pelo aumento da expressão do importador de cobre CTR1 (Hodgkinson and Petris, 2012). Além disso, aumentam o estímulo do tráfego de cobre pela maior expressão do transportador de cobre ATP7A do complexo de Golgi para vesículas citoplasmáticas que surgem com o compartimento fagossomal (White et al., 2009).

Em resposta à infecção por *C. neoformans*, ocorre uma mobilização de cobre pelos macrófagos do hospedeiro, já que os níveis séricos desse metal aumentaram significativamente no período da infecção. Adicionalmente, verificou-se que após 14 dias de infecção, houve um aumento nos níveis do importador de cobre de alta afinidade CTR1 e da subunidade Cox IV do citocromo oxidase mitocondrial em células de lavado broquioalveolar. Concomitantemente, foi observada também uma diminuição da expressão do transportador de cobre ATP7A, compartimentalizador do cobre fagossomal (Ding et al., 2013). Coletivamente, estes dados sugerem que em resposta à infecção por *C. neoformans* via rota respiratória, o hospedeiro mobiliza cobre para dentro da circulação e células alveolares do pulmão podem reorientar esse cobre para fora dos compartimentos vesiculares (Ding et al., 2013). Em contrapartida, para se adaptar às elevadas concentrações de cobre vindas do hospedeiro dentro do fagossomo durante a infecção pulmonar, *C. neoformans* induzem a expressão de genes codificadores para metalotioneínas (MTs), proteínas ligadoras de metal rica em cisteína que sequestram o excesso tóxico de cobre (Potrykus et al., 2014). Todavia, outros estudos indicam que cobre é limitado ao fungo pela célula hospedeira durante a infecção no cérebro, já que observou-se que a expressão de CTR4 Cryptococcal pareceu ser altamente induzida após sua interação com macrófagos, sugerindo que a disponibilidade de cobre para o patógeno intracelular é limitada ou insuficiente para o requerido metabolismo durante infecção neurológica (Waterman et al., 2007).

De fato, os mecanismos pelos quais hospedeiros mamíferos regulam a homeostase de cobre durante infecções fúngicas ainda são pouco esclarecidos. O metal de transição cobre é requerido tanto para o crescimento fúngico, como também é altamente sequestrado por diversos fluidos biológicos e proteínas de hospedeiros mamíferos e, portanto, entende-se que existe uma competição entre o patógeno e o hospedeiro para a aquisição deste metal, no qual há o envolvimento do transportador de cobre de alta afinidade CTR1.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente projeto objetiva avaliar o perfil de expressão da proteína transportadora de cobre CTR1 em macrófagos infectados com *C. neoformans* ou *C. albicans*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quantitativamente a expressão do transportador CTR1 nas células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans* ou *C. albicans* em diferentes condições;
- Quantificar a expressão de CTR1 na membrana celular de células de macrófagos com células de *C. neoformans* ou *C. albicans* internalizadas;
- Correlacionar a expressão do transportador CTR1 em macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  com as células fúngicas de *C. neoformans* internalizadas;

## ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Avaliação da expressão do transportador de cobre CTR1 na interação fungo patogênicos-hospedeiro” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *BIOMETALS*. Para facilitar as análises, as figuras e suas respectivas legendas são apresentadas junto ao corpo do texto.

## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE COBRE CTR1 NA INTERAÇÃO FUNGOS PATOGÊNICOS-HOSPEDEIRO**

*Evaluation of the expression of copper transporter CTR1 in Host- Fungal Pathogen Interaction*

Nicole Sartori Ribeiro<sup>1</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>1</sup>, Karoline Flach<sup>1</sup>, Lívia Kmetzsch<sup>1,2a</sup>, Augusto Schrank<sup>1,2</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>1,2</sup>, Charley C. Staats<sup>1,2,\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia e <sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

(\*) Correspondência: Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 220. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Telefone +55 51 3308 6091; Fax +55 51 3308 7309.

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

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* são leveduras e agentes etiológicos de duas importantes infecções fúngicas oportunistas que acometem o ser humano, a Criptococose e Candidíase, respectivamente. A Criptococose ocorre após a inalação de esporos ou células de leveduras dessecadas presentes no meio ambiente em excretas de pombos, no solo ou em eucaliptos e podem acometer pele ou ir até os pulmões, onde se alojam nos alvéolos e causam pneumonia ou ainda se disseminar através da corrente sanguínea e atingir o sistema nervoso central, causando a meningoencefalite ou meningite. Já a Candidíase convive de forma comensal com o hospedeiro na pele e sistemas respiratório, reprodutor e digestório, mas que com a queda da imunidade do indivíduo, torna-se invasiva e causa infecção. Ambos os microrganismos infectam principalmente indivíduos imunocomprometidos e desenvolveram mecanismos para sobreviver dentro de células de fagocíticas. Uma vez fagocitadas por macrófagos, as células do microrganismo se deparam com um ambiente hostil, tóxico e com baixo pH, gerado no interior do fagolisossomo. Nesse contexto, metais de transição desempenham importante papel. O cobre é essencial para a vida aeróbica, mas em grandes concentrações ele pode tornar-se tóxico. Por isso tanto a sua limitação, denominada imunidade nutricional, quanto o seu excesso, que gera espécies reativas e um potencial tóxico para o patógeno, podem ser utilizados como estratégia antifúngica pelos macrófagos. O transportador de cobre de alta afinidade CTR1 é um dos responsáveis pela modulação da homeostase desse metal, contudo esse mecanismo em macrófagos durante a infecção por fungos ainda está pouco elucidado. Portanto, o objetivo desse projeto foi avaliar a expressão de CTR1 de macrófagos durante sua infecção com *C. neoformans* ou *C. albicans* para melhor esclarecimento da homeostase de cobre nessa interação. Empregando métodos como *Western blot*, *in cell ELISA* e microscopia de imunofluorescência, foi possível observar que ocorre um aumento da expressão de CTR1 em macrófagos infectados com *C. neoformans* ou *C. albicans*. Estes dados sugerem que há um possível aumento de cobre e consequentemente de espécies reativas de oxigênio para limitar o desenvolvimento destas leveduras.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*. Macrófagos. Cobre. Transportadores de Cobre.

## ABSTRACT

The yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* are the ethiological agents of the most important opportunistic fungal pathogen that affects humans, Cryptococcosis and Candidiasis, respectively. Cryptococcosis occurs via inhalation of the yeast or spores present in environment in pigeons excreta, soil or eucalyptus and it can affect the skin or go to the lungs, where the fungal particles adhere in the alveoli and cause pneumonia or spread through the bloodstream and reach the central nervous system, causing meningoencephalitis or meningitis. Candidiasis is a commensal to the human respiratory, reproductive and digestive tract, as well to the skin. However, with the imbalance of human immunity it becomes invasive and cause infection. These two microorganisms are common causes of infections, especially in immunocompromised individuals, and also they developed important mechanisms to survive in phagocytic cells. When it faces the host immune system and are phagocytized by macrophages into phagolysosomes, the microorganisms are exposed to a hostile, toxic and low pH environment. In this context, transition metals develop an important role. Copper is an essential transition metal for aerobic life, but can be toxic in high concentrations due to the formation of reactive oxygen species. In this way, either its limitation (nutritional immunity) or its accumulation may constitute antifungal strategies used by macrophages. The high affinity copper transporter CTR1 is one of the responsible for the modulations of this metal homeostasis in macrophages. However, its role in macrophages during the infection with fungal cells is still poorly characterized. Hence, the aim of this work was evaluate the expression of CTR1 in macrophages during *C.neoformans* or *C.albicans* infection to improve the understanding of copper homeostasis during this interaction. In this project, we used *Western blot, in cell ELISA* and Immunofluorescence methods to evaluate CTR1 expression and we were able to observe an increased expression of it in macrophages infected by *C. neoformans* ou *C. albicans*. These results indicate that there is a possible copper uptake e consequently creation of reactive oxygen species (ROS) by macrophage to avoid fungal development.

**Keywords:** *Cryptococcus*. Macrophages. Copper. Copper Transporters.

## 1 INTRODUÇÃO

O grande avanço da medicina nos últimos anos vem acompanhado do aumento do número de transplantes, e conseqüentemente do uso de fármacos imunossupressores a fim de evitar a rejeição do órgão ou tecido transplantado. Associado a isto, o crescente número de casos de AIDS no mundo contribui para o aumento de infecções oportunistas (Voelz and May, 2010). Infecções fúngicas estão entre as maiores complicações em imunocomprometidos ou pacientes hospitalizados.

Uma destas infecções é a Criptococose, doença de origem fúngica que atinge mais de um milhão de pessoas por ano no mundo e seus principais agentes etiológicos são as leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Cogliati, 2013; Lin and Heitman, 2006). A levedura *C. neoformans* causa infecções oportunistas principalmente em pacientes imunocomprometidos devido a condições clínicas como HIV, leucemia e câncer ou uso de medicamentos corticosteroides (Voelz and May, 2010). Em contraste, *C. gattii* causa infecção em indivíduos imunocompetentes, sendo esse responsável por um surto que ocorreu em 1999 nas ilhas de Vancouver, no Canadá, causando muitas infecções em seres humanos e animais (Kronstad et al., 2011). É estimado que um milhão de pessoas no mundo sofram de meningite criptocócica e que mais de 60% morram nos primeiros três meses após o diagnóstico da doença (Sabiiti and May, 2012). Um dos fatores para isso é que a Criptococose é de difícil tratamento pela necessidade de se utilizar diversas drogas antifúngicas e muitas vezes essas possuem efeitos colaterais tóxicos, além do aumento da resistência à essas drogas nas últimas três décadas (Simm et al., 2011). Para ambas espécies, a infecção inicia-se através da inalação de esporos ou células de leveduras dessecadas presentes no meio-ambiente em excretas de pombos, no solo ou em eucaliptos, que podem acometer pele, ou ir até os pulmões, onde se alojam nos alvéolos e causam pneumonia, e ainda podem se disseminar até o sistema nervoso central, causando meningoencefalite ou meningite (Feldmesser et al., 2000; Sorrell, 2001). As espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus sp.* possuem alguns fatores de virulência clássicos os quais estimulam a infecção intracelular, sendo capaz de alterar o estado do sistema imune do hospedeiro humano para estabelecer a doença (Kronstad et al., 2011), como: (a) cápsula polissacarídea, que possui ação anti-fagocítica, majoritariamente composta pelo polímero glicuronoxilomanana (GXM) (Zaragoza et al., 2009); (b) produção de melanina, que possui

propriedades antioxidantes, protegendo-o da morte oxidativa por fagócitos (Hamilton and Goodley, 1996); (c) desenvolvimento à 37°C (Sabiiti and May, 2012) e (d) capacidade de desenvolvimento intrafagossômico (Coelho et al., 2014).

Outra infecção muito comum é a Candidíase, causada principalmente por *Candida albicans*. Esse fungo comumente coloniza os tratos gastrointestinal, reprodutivo e respiratório do ser humano, além da pele; contudo, múltiplos defeitos no sistema imune do hospedeiro estão associados com a transição da colonização para invasão e/ou disseminação da Candidíase (Cole et al., 1996). *C. albicans* é um fungo dimórfico que pode crescer como leveduras ovoides por brotamento ou em formas filamentosas como pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, sendo as duas formas importante para a patogenicidade (Mayer et al., 2013). Além disso, eles podem se aderir às superfícies inertes ou biológicas e formar biofilmes, comum em cateteres e superfícies de células mucosas, o que aumenta a resistência contra terapia antifúngica e a fagocitose e também pode promover uma fonte contínua de inóculo capaz de alastrar-se na corrente sanguínea (Miramón et al., 2013). Seus fatores de virulência incluem essa mudança de morfologia e também a secreção de hidrolases, o que possibilita ao fungo utilizar componentes do hospedeiro para sua nutrição e crescimento, fatores de adesão e atividade extracelular lipolítica ou proteolítica (Naglik et al., 2004).

A fagocitose parece ser o primeiro método de eliminação da infecção por *Cryptococcus sp.* e *Candida sp.*, sendo os macrófagos os fagócitos da primeira linha de defesa do hospedeiro (Mansour and Levitz, 2002). Além dos macrófagos, outros componentes do sistema imune inato que agem no combate à infecção são: neutrófilos, células dendríticas e componentes do sistema complemento (Shoham and Levitz, 2005). Contudo, estudos mostraram que ambos fungos possuem mecanismos de sobrevivência frente aos macrófagos do hospedeiro após a fagocitose, possibilitando sua proliferação intracelular apesar do ambiente hostil no interior dos macrófagos, que inclui acidificação e adição de peptídeos antimicrobianos, proteases, enzimas degenerativas, e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Shoham and Levitz, 2005) (Voelz and May, 2010). Além disso, essas células de defesa também apresentam mecanismos para evitar o crescimento dos microrganismos patógenos, incluindo a imunidade nutricional, que baseia-se na diminuição da biodisponibilidade de metais de transição, como ferro, zinco, cobre e manganês, já que esses estão envolvidos em processos biológicos importantes, sendo essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Cassat and Skaar, 2012; Kehl-Fie and Skaar, 2010),

ou ainda podem usar a estratégia de intoxicação por metais de transição como forma de defesa do hospedeiro para eliminar o microrganismo invasor (Hood and Skaar, 2012).

Dentre esses importantes metais de transição, figura o cobre que é essencial para a vida aeróbica e é conhecido amplamente pelas suas propriedades antibacterianas, além de possuir grande importância na resposta imune (Hood and Skaar, 2012). O cobre é necessário tanto para o crescimento fúngico quanto para proteínas do hospedeiro, sugerindo que há uma competição entre patógeno e hospedeiro pelas reservas de cobre (Waterman et al., 2007). A homeostase de cobre é importante para o patógeno fúngico *C. neoformans*, pois pelo menos duas de suas enzimas são cobre-dependente: superóxido desmutase Cu/Zn e a enzima laccase, as quais são importantes para sua virulência (Raja et al., 2013). Em hospedeiros mamíferos, o transporte de cobre é regulado principalmente por proteínas transportadoras de cobre com alta afinidade da família CTR, que possuem a sua porção amino-terminal rica em histidina e metionina, responsáveis pela ligação a cobre (Zhou and Gitschier, 1997). Esta família é composta principalmente pelas proteínas CTR1/SLC31A1, que importa cobre pela membrana plasmática, e CTR2/SLC31A2, que é principalmente expresso na membrana de vesículas intracelulares como endossomos e lisossomos tardios (Stafford et al., 2013; Zhou and Gitschier, 1997). Durante a infecção por *C. neoformans* ou *C. albicans*, há uma competição entre o patógeno e o hospedeiro pelo cobre disponível quando há a restrição deste metal, o que pode dificultar a sobrevivência do fungo no interior de macrófagos. Foi demonstrado que a limitação de cobre pode ser uma estratégia anti-fúngica de macrófagos para conter a infecção por *C. neoformans* e que proteínas transportadoras de cobre podem, em macrófagos contendo células fúngicas internalizadas, estar envolvidas na homeostase desse metal durante a infecção (Festa and Thiele, 2012; Waterman et al., 2007). Todavia, recentes estudos demonstraram que há ativação de duas metalotioneínas MT1 e MT2 em condições com altas concentrações de cobre, indicando que os caminhos de aquisição ou detoxificação podem variar de acordo com a disponibilidade de cobre para contribuir com a virulência do fungo (Ding et al., 2011; Festa and Thiele, 2012). Resultados gerados pelo nosso grupo de pesquisa (Flach et al., dados não publicados) revelaram que ocorre diminuição dos níveis de cobre em macrófagos infectados por *C. neoformans*, concomitante com a diminuição dos níveis de transcritos do gene CTR1. Em *C. albicans* os resultados não foram significativos. Contudo, os mecanismos pelos quais essa regulação da homeostase de cobre em

hospedeiros mamíferos durante infecções por fungos ocorre ainda encontra-se pouco elucidada. Adicionalmente, o estímulo com citocinas pró-inflamatória, incluindo IFN- $\gamma$ , modula os níveis das proteínas envolvidas na homeostase de cobre, principalmente de CTR1 e ATP7A, confirmando o papel destas proteínas na resposta imune inata (Hood and Skaar, 2012; White et al., 2009). Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão do transportador de cobre CTR1 em macrófagos infectados com células de *C.neoformans* ou *C.albicans* vivas ou mortas, após transcorridos duas horas de interação, para elucidar os mecanismos de desvio de cobre durante tal interação e verificar se o patógeno desenvolve algum mecanismo escapatório quando vivo no interior da célula de defesa.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens celulares e cultivo

Utilizaram-se as linhagens H99 de *C. neoformans* e ATCC 18804 de *C.albicans* para o desenvolvimento desse projeto. Essas linhagens foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura YPD (20 g/L glicose; 20 g/L peptona e 10 g/L extrato de levedura), incubada em plataforma giratória (200 rpm) na temperatura de 30°C. A linhagem celular J774.1A de macrófagos murinos foi cultivada em meio DMEM (Invitrogen) acrescido de soro fetal bovino (10%) e L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, HEPES 10 mM, MEM aminoácidos não-essenciais 1x, penicilina 20 U/mL e estreptomicina 20  $\mu$ g/mL, e incubadas a 37°C em ambiente umidificado contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2 Interação entre células de macrófagos e células de *C.neoformans* ou *C.albicans*

Macrófagos ( $5 \cdot 10^5$  células) foram cultivados em placa de 24 poços contendo meio DMEM e induzidos com 0.5  $\mu$ g/ml LPS, 100 U/ml IFN- $\gamma$  e 2mM/ml glutamina. Células de *C. neoformans* ou células de *C. albicans* foram incubadas em meio YPD para crescimento por até 20 h. Após este período, as células foram lavadas com PBS, *C.neoformans* foi opsonizado com anticorpo 18-B7 (10  $\mu$ g/ml) por uma hora à 37°C com agitação de 400 rpm. Uma alíquota de ambos fungos foi morta à 65°C por 30 minutos e agitação de 400 rpm. Tanto as células vivas

como as mortas por calor foram co-incubadas com macrófagos em uma concentração de 10:1 (para cada célula de macrófago incubou-se 10 células fúngicas) em meio DMEM com LPS, IFN- $\gamma$  e glutamina em um volume final de 0.5 mL para cada poço da placa de 24 poços. Adicionalmente, células de macrófagos foram tratadas somente com diferentes concentrações (0,1 $\mu$ g/ml 1  $\mu$ g/ml e 10  $\mu$ g/ml) do componente majoritário da cápsula polissacarídica - glucoroxilomanana (GXM) em mesmo volume durante duas horas de interação (Nicola and Casadevall, 2012). Ao fim do período de incubação, os poços foram lavados três vezes com solução de PBS e lisados com tampão de RIPA (50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10% SDS, 2mM EDTA, 10% Glicerol e 1% Triton X-100). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 13.000 rpm à 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e esse foi armazenado à -80°C. Após essa preparação, as proteínas das amostras foram quantificadas (Bradford, 1976) e precipitadas com ácido tricloroacético, lavadas com acetona 100%, centrifugadas à 13.000 rpm por 10 minutos à 10°C e por fim, o *pellet* suspenso em tampão de amostra 1% (BioRad). A partir dessa fase as amostras foram analisadas em três experimentos independentes.

### **2.3 Western blot**

Para avaliação da expressão do transportador de cobre CTR1 foi realizado Western blot. A técnica utilizada foi a transferência semi-seca (BioRad Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell), no qual, após as amostras serem migradas em SDS-PAGE à 100 V, as proteínas presentes nos géis foram transferidas para uma membrana PVDF. Após a transferência, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (5% leite em pó, 0,1% Tween 20 e PBS 1x), sendo então incubada a membrana com anticorpo primário FL-190 anti-CTR1 (Santa Cruz Biotechnology) por quatro horas em agitação. Lavou-se três vezes com PBS e tween 0,1% por 15 minutos e logo a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-rabbit IGG conjugado com peroxidase (Life Technologies) por uma hora. Lavou-se o sistema novamente três vezes com PBS e tween 0,1% por 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi tratada com substratos para a revelação subsequente. O experimento foi realizado conforme recomendações do sistema de revelação ECL Western Blotting (Pierce).

## 2.4 In cell ELISA

Macrófagos J774.1A foram cultivados em placa de 96 poços contendo DMEM suplementado com 10% de SFB, IFN- $\gamma$ , LPS e glutamina. Células de *C. neoformans* e de *C. albicans* foram cultivadas em YPD, lavadas com PBS, *C. neoformans* foi opsonizado com o anticorpo 18-B7, uma alíquota de ambos fungos patógenos foi morta por calor e todos inoculadas na proporção 10:1. A interação foi ainda realizada em DMEM contendo IFN- $\gamma$ , LPS, glutamina e também testou-se a resposta de macrófagos quanto à presença apenas de GXM (0,1  $\mu$ g/ml). Após duas horas de interação à 37°C e 7,5% de CO<sub>2</sub>, os poços foram lavados com PBS para remover os macrófagos não aderidos e as células de *C. neoformans* ou *C. albicans* não-fagocitadas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% com incubação de 30 minutos à 37°C, lavadas com PBS novamente e bloqueadas com tampão de bloqueio (5% leite em pó, 0,1% Tween 20 e PBS 1x) por uma hora à 4°C com agitação. Após três ciclos de lavagem, foi adicionado o anticorpo primário FL-190 anti-CTR1 (diluição 1:500 em blotto) por uma hora à 37°C, seguido de três ciclos de lavagem com PBS. Em seguida, os poços foram incubados com anticorpo secundário anti-rabbit IGG conjugado com peroxidase (diluição de 1:2000 em blotto) por mais uma hora à 37°C. O sistema então foi lavado três vezes com PBS e adicionou-se 100  $\mu$ L de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) em cada poço e em seguida foi determinada a absorbância em comprimento de onda específico ( $\lambda = 630$  nm) em leitor de microplacas. Utilizou-se como controle negativo apenas poços incubados com os anticorpos, sem células.

## 2.5 Imunofluorescência

Para avaliar se células de macrófagos contendo células de *C. neoformans* modulam diferentemente a quantidade de CTR1 na membrana plasmática em relação às células que não englobaram células de *C. neoformans*, realizou-se o teste imunofluorescência com base no protocolo previamente descrito (Silveira et al., 2013), partindo também do mesmo protocolo de experimentos de infecção de macrófagos, conforme previamente descrito (Kmetzsch et al., 2010) com os grupos: *C. neoformans* vivo e morto por calor. Após o tempo de interação de duas horas, removeu-se o meio de cultura e lavou-se cada poço dessa placa de 24 poços três vezes com

solução de PBS. Fixou-se as células com paraformaldeído 4% por 30 minutos à temperatura ambiente, lavou-se a placa novamente três vezes com PBS sob agitação e então as células foram bloqueadas com 1mL de PBS e 2% de BSA (Bovine Serum Albumin), deixando sob agitação por cinco minutos à 4°C. Após lavagens, foram adicionados 500 µL por poço de PBS, 1% de BSA e anticorpo primário FL-190 anti-CTR1 (1:200) e deixou-se incubar por uma hora à 4°C. Consecutivas lavagens com PBS foram realizadas e após adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) que emite uma fluorescência de cor verde, em contato por 30 minutos à temperatura ambiente. Células foram contra coradas com DAPI por 10 minutos sob mesmas condições e então capturou-se as imagens no microscópio de fluorescência (filtro GFP), sendo então a fluorescência mensurada empregando o método CTCF (Corrected Total Cell Fluorecence)(Burgess et al., 2010) para mensurar corretamente a fluorescência emitida pelas células analisadas. Como controle negativo, nós utilizamos células de macrófagos incubadas apenas com o anticorpo secundário.

## 2.6 Análises Estatísticas

Valores são expressos como as medias das replicatas  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística e os gráficos foram confeccionados com o software Graph Pad Prism 6. Para avaliação da significância entre os valores utilizou-se Student t-test ou One-way ANOVA (com Tukey post-test). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

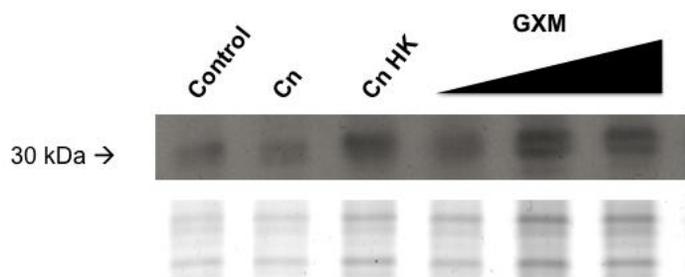
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Flach *et al.*, dados não publicados), observou-se que a presença de cobre influencia a atividade antimicrobiana em macrófagos, o que vai de encontro ao descrito na literatura, indicando que cobre em macrófagos é utilizado como defesa contra patógenos bacterianos (Achard *et al.*, 2012). Além disso, corrobora com o que foi visto em outro estudo, no qual foi detectado o aumento da expressão do transportador de cobre Ctr4 em *Cryptococcus neoformans* durante sua presença no interior de macrófagos na linhagem J774.1A, sugerindo que a disponibilidade de cobre para o patógeno intracelular era insuficiente para suprir suas atividades metabólicas (Waterman *et al.*, 2007). Essa redução de cobre por macrófagos indica um mecanismo de imunidade nutricional como forma de defesa, limitando um nutriente essencial para o patógeno. Nosso grupo de pesquisa também verificou que durante a infecção por *C. neoformans*, há uma diminuição dos níveis de transcritos do transportador de cobre CTR1 em células de macrófagos da linhagem J774.1A sugerindo uma situação de limitação do cobre no interior de células fagocíticas durante sua interação com o fungo. Desta forma, a estratégia de imunidade nutricional pode ser possivelmente utilizada por macrófagos para prejudicar a sobrevivência do fungo. Sendo assim, a adição de cobre exógeno reduziria o efeito antifúngico das células de macrófagos (Flach *et al.*, dados não publicados).

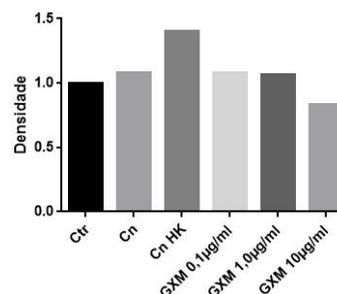
Tendo em vista estes dados, experimentos adicionais foram realizados para avaliar se ocorre modulação da homeostase de cobre em macrófagos expostos às condições de infecção por leveduras patogênicas. Para tanto, a expressão do transportador de cobre CTR1 foi avaliada frente a distintas condições, empregando interações por um período de duas horas entre células de macrófagos murinos da linhagem J774.1A com células da linhagem H99 de *C. neoformans* vivas ou mortas por calor, assim como com células da linhagem ATCC 18804 de *C. albicans* vivas ou mortas por calor. Adicionalmente, estas interações foram realizadas com concentrações crescentes de polissacarídeos extracelulares de *C. neoformans*, cujo componente majoritário é a glucoronoxilomanana (GXM). Foi detectada a expressão de CTR1 em macrófagos expostos a todas as condições (Figuras 1 e 2). Observou-se um aparente aumento da expressão do transportador CTR1 em macrófagos incubados com *C. neoformans* morto por calor (Figura 1A e 1B). Na interação com *C. albicans*, não foi possível verificar diferenças significativas na

expressão do transportador CTR1 em macrófagos interagindo com células vivas comparado com os grupos controle. Entretanto, uma aparente diminuição foi detectada após a interação com as células fúngicas mortas (Figura 2).

A

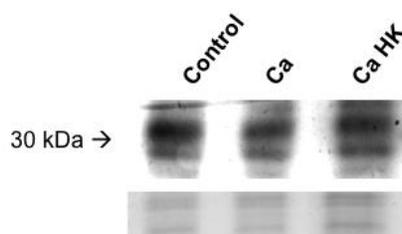


B

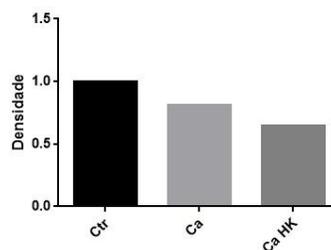


**Figura 1. A expressão do transportador de cobre CTR1 em células J774A é alterada com a presença de *C. neoformans*.** (A) Macrófagos ( $5.10^5$  células) e células vivas (Cn) ou mortas por calor (Cn HK) de *C. neoformans* ( $5.10^6$  células) ou concentrações crescentes de GXM (0,1, 1,0 ou 10 µg) foram incubadas em meio DMEM por duas horas. Os poços da placa de 24 poços foram lavados com solução de PBS e as proteínas extraídas com tampão de RIPA (50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10% SDS, 2mM EDTA, 10% Glicerol e 1% Triton X-100). As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE, transferidas para membrana PVDF e imunomarcadas com anticorpo primário anti-CTR1 FL-190 (Santa Cruz Biotechnology), seguido pela incubação com anticorpo secundário anti-rabbit IGG peroxidase-conjugated (imagem superior). Controle de amostra está indicado pelo gel de Comassie na imagem inferior. (B) Análise densitométrica do sinal da imunomarcção normalizada pela quantidade de proteína corada com Comassie.

A



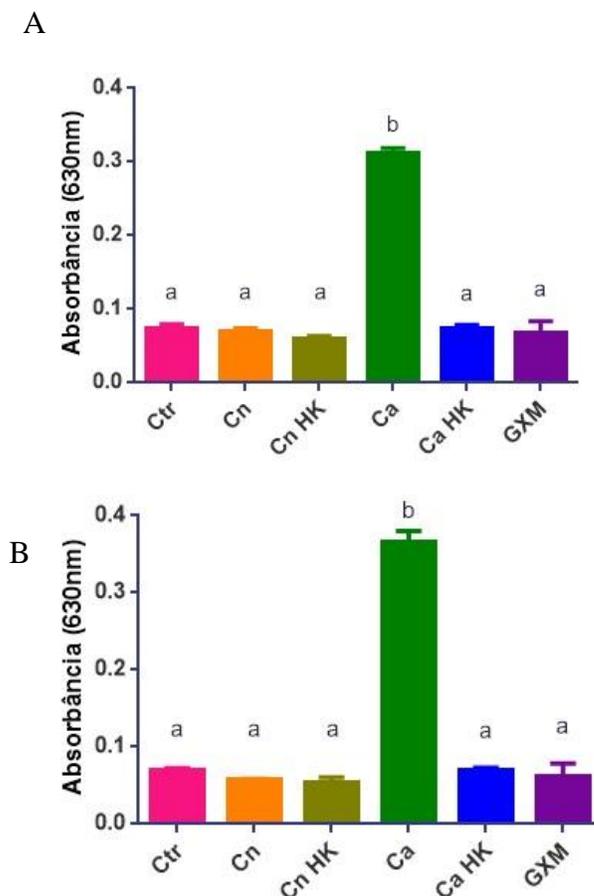
B



**Figura 2. A expressão do transportador de cobre Ctr1 expresso em células de macrófagos é alterada em resposta a *C.albicans*.** (A) Macrófagos ( $5.10^5$  células) e células vivas (Ca) ou mortas por calor (Ca HK) de *C. albicans* ( $5.10^6$  células) foram incubadas em meio de cultura DMEM por duas horas. Os poços da placa foram lavados com solução de PBS e as proteínas extraídas com tampão de RIPA (50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10%

SDS, 2mM EDTA, 10% Glicerol e 1% Triton X-100). As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE, transferidas para membrana PVDF e imunomarcadas com anticorpo primário anti-CTR1 FL-190 (Santa Cruz Biotechnology), seguido pela incubação com anticorpo secundário anti-rabbit IGG peroxidase-conjugated (imagem superior). Controle de amostra está indicado pelo gel de Comassie na imagem inferior. (B) Análise densitométrica do sinal da imunomarcção normalizada pela quantidade de proteína corada com Comassie.

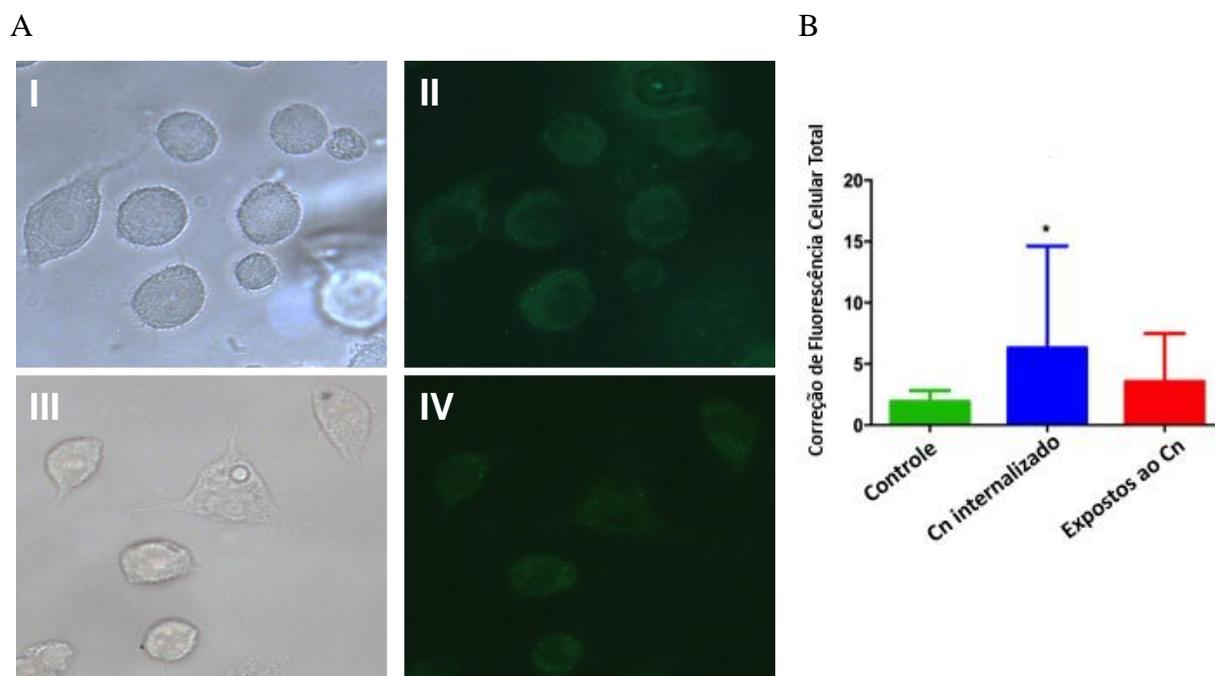
Seguindo os experimentos para verificar a expressão de CTR1 em macrófagos infectados por ambos fungos *C.neoformans* e *C.albicans*, executou-se um ensaio de *in cell* ELISA como uma alternativa para quantificar a expressão da proteína após duas horas de interação com fungos patogênicos. Esta estratégia foi utilizada devido ao fato de esta técnica detectar de forma quantitativa a proteína em sua forma nativa na superfície dos macrófagos, enquanto *Western blot* detecta a proteína após desnaturação. Estudos prévios indicam que CTR1 é encontrado predominantemente na membrana plasmática, mas durante a função normal da célula, esse transportador pode alterar sua localização entre a membrana plasmática e vesículas intracelulares (Wee et al., 2013). Em ocasiões de infecção por algumas bactérias e fungos, macrófagos regulam positivamente a produção transportadores de cobre, deslocando então uma maior quantidade CTR1 para a superfície de membrana (Wee et al., 2013). Adicionalmente, já foi sugerido que as concentrações de cobre são estimuladas e mostram-se elevadas em resposta à agentes proinflamatórios como IFN- $\gamma$  e LPS (White et al., 2009). Desta forma, pudemos quantificar CTR1 presente na superfície de macrófagos. Não foi possível, por esta metodologia, detectar diferenças significativas entre a expressão de CTR1 no tratamento controle ou naqueles macrófagos expostos a células vivas ou mortas de *C. neoformans*, assim como em células expostas a GXM. Entretanto, foi possível detectar um aumento significativo da expressão de CTR1 na presença de *C. albicans* vivas (Figura 3). Este mesmo aumento não foi observado em macrófagos incubados com células de *C. albicans* mortas.



**Figura 3. A expressão da proteína de superfície Ctr1 nas células de macrófagos é estimulada em resposta ao fungo *C.albicans*.** Macrófagos ( $5.10^5$  células) com células vivas (Cn) ou mortas por calor (Cn HK) de *C. neoformans* ( $5.10^6$  células), com células vivas (Ca) ou mortas por calor (Ca HK) de *C. albicans* ( $5.10^6$  células) ou ainda com 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de GXM foram incubadas em meio de cultura DMEM por duas horas. Os poços utilizados da placa de 96 poços foram lavados com solução de PBS e incubou-se as células com paraformaldeído 4%. Análises do teste foram conduzidas através da incubação com anticorpo anti-CTR1 FL-190 (Santa Cruz Biotechnology), seguido pela ligação com o anticorpo secundário anti-rabbit IGG conjugado com peroxidase e a leitura da absorbância feita após 15 minutos (A) e 30 minutos (B) após a adição de TBM (3,3',5,5' -tetrametilbenzidina), substrato para ELISA teste.

Com o intuito de verificar a imunolocalização da proteína de superfície de interesse, realizamos a análise de imagens da interação de *C.neoformans* com macrófagos da linhagem J774.1A através da técnica de microscopia de imunofluorescência (Figura 4). Esse teste revelou que CTR1 pode encontrar-se localizado de forma espalhada na membrana plasmática da célula de macrófago (Figura 4A). Podemos afirmar que esta localização refere-se somente ao que está presente na superfície celular, pois não foi realizada a permeabilização da mesma. Além disso,

análises de densitometria mostraram que a expressão de CTR1 na superfície de membrana aumentou após a incubação com *C.neoformans*, sugerindo que a presença de tal fungo vivo no interior das células de defesa leva à alteração da expressão de transportadores de cobre, sugerindo uma modulação complexa no padrão de expressão deste gene do macrófago em resposta ao fungo patogênico (Figura 4B). É importante destacar que foi possível observar uma maior expressão do transportador na superfície em macrófagos com fungo internalizado, comparado com os que não internalizaram *C. neoformans*, mas entraram apenas em contato; porém, ambos requereram uma maior atividade do transportador CTR1 do que o grupo controle, no qual são macrófagos que não interagiram com o patógeno.



**Figure 4: A expressão de Ctr1 é modulada em macrófagos contendo células de *C.neoformans* internalizadas.** Macrófagos ( $5.10^5$  células) e células vivas (Cn) ou mortas por calor (Cn HK) de *C. neoformans* ( $5.10^6$  células) foram incubadas em meio de cultura DMEM por duas horas em lâminas de vidro. Análises da imunofluorescência foram feitas após incubação da interação com anticorpo primário anti-CTR1 FL-190 (Santa Cruz Biotechnology), seguido por anticorpo secundário Alexa Fluor 488- conjugated (Invitrogen). As células foram analisadas por microscópio de imunofluorescência para mensurar a fluorescência associada com CTR1 em macrófagos (imagem A) e em seguida as análises das imagens geradas foram calculadas com correção da fluorescência celular total (CTCF – imagem B) que mostrou uma alteração na expressão de CTR1 quando as células foram expostas aos fungos patogênicos. A figura 4A mostra o grupo controle de macrófagos (I e II) e macrófagos tratados com *C. neoformans* (III e IV). Imagens captadas com aumento de 400 x.

Os resultados inicialmente obtidos tanto por outros estudos do nosso grupo de pesquisa quanto por outros dados presentes na literatura, convergiram para afirmações da hipótese de que a imunidade nutricional é praticada pelas células de defesa do hospedeiro para conter o microrganismo *C. neoformans*. Viu-se que o hospedeiro regula a rota de metais intercambiáveis através do sequestro desses metais via carregadores de proteínas ou os compartimentalizando em reservas intracelulares (Potrykus et al., 2014), e essa estratégia essencialmente impõe uma imunidade nutricional constitutiva por depletar o meio extracelular de metais, criando um ambiente limitante de micronutrientes para o patógeno (Waterman et al., 2007; Waterman et al., 2012). Com base nos resultados desse trabalho, não podemos reforçar tal teoria devido ao fato de não se ter observado redução da expressão de CTR1 durante e infecção de macrófagos com células vivas de *C. neoformans*, tanto no teste de Western blot quanto no teste de ELISA. Todavia, o aumento da expressão desse transportador na presença de células de *C. neoformans* mortas no primeiro experimento, poderia indicar uma possível modulação dessa interação por parte do patógeno, alterando a resposta original do macrófago; contudo, como os resultados do teste não apresentaram diferença estatística significativa, não podemos fazer tal afirmação.

Outros achados na literatura indicam que um componente importante para a defesa do hospedeiro é a intoxicação do fagossomo por metais de transição com fim de eliminar o microrganismo invasor, como ocorre na infecção com *C. albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *A. fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* (Douglas et al., 2012) e, devido a isso, esses patógenos desenvolveram diversas estratégias para subverter tal toxicidade, incluindo a inibição de seus transportadores de cobre como CTR1 e ativação de metalotioneínas e transportador de cobre ATPase tipo-P (Weissman et al., 2000). Baseando-se nesses estudos prévios, o resultado esperado seria um aumento de transportadores de cobre extracelular para capturar Cu e intoxicar o fagolisossomo com células fúngicas de *C. albicans* internalizadas. Apesar de isso não ter sido verificado na técnica de Western blot, foi indicado com o teste de ELISA, no qual o resultado mostra nitidamente um aumento significativo da expressão do transportador de cobre CTR1 em macrófagos infectados com células de *C. albicans* vivas. Isso nos leva a acreditar e reforçar que provavelmente essa seja a estratégia utilizada pelas células de defesa do hospedeiro para inibir a proliferação de *C. albicans*. Contudo, ainda há a possibilidade de esse aumento evidente do

transportador via teste de ELISA ser influenciado por ligações cruzadas, resultando num possível falso-positivo. Por essa razão, tais experimentos devem ser reforçados.

Por fim, os dados esperados ao se realizar a técnica de imunofluorescência visavam tentar confirmar alguma das informações geradas anteriormente. Todavia, os dados observados continuaram sendo divergentes aos coletados previamente em relação a homeostase de cobre durante a interação macrófago-*C. neoformans*. Nesse caso, os dados convergiram para estudos prévios que citam que a expressão do transportador de cobre CTR1 (importador de cobre) apresentou-se aumentado em células de macrófagos ativadas infectadas com *C. neoformans* e que níveis de exportador de cobre fagossomal ATP7A estavam diminuídos (Ding et al., 2013), sendo essa uma estratégia antifúngica, de intoxicação, para eliminar o fungo. Trabalhos na literatura indicam que *C. neoformans* desenvolveu estratégias para fazer uma destoxificação desse metal de transição: quando esse fungo percebe os altos níveis de cobre por exemplo, ativa a expressão de genes de metalotioneínas como *CMT1* e *CMT2* que agem como detoxificadores e são induzidos apenas quando há altos níveis desse metal (Hofer, 2013); ou inibem o acúmulo de cobre dentro do fagossomo via outras estratégias. Para sobreviver e replicar dentro do hospedeiro, esse fungo desenvolveu também a habilidade de alterar o ambiente intracelular dos fagócitos do hospedeiro durante a infecção, provavelmente via a exportação de alguns fatores de virulência (Kronstad et al., 2011). A liberação desses fatores durante sua presença no interior de células fagocíticas ocorre através de vesículas que atravessam a parede celular, que parecem conter diversas substâncias, incluindo GXM, GalXM, pigmentos, proteínas e lipídeos, que estão biologicamente ativos e podem estimular a resposta imune de macrófagos ou ainda modificar a função dessas células (Oliveira et al., 2010). Essa hipótese pode explicar o fato de um dos resultados adquiridos no primeiro experimento realizado por nós nesse trabalho ter apontado uma menor expressão da proteína CTR1 em macrófagos com células de *C. neoformans* vivas, mesmo que não estatisticamente significativos, comparado com essas células mortas. Isso pode indiciar o mecanismo de intoxicação com cobre como o utilizado pelas células do hospedeiro para eliminar o fungo, mas havendo também uma possível reação do patógeno contra essa estratégia de defesa.

Como indicado anteriormente, as informações obtidas dos experimentos realizados se diferem em pontos específicos, indicando diferentes possíveis hipóteses do mecanismo de ação praticada pelas células de defesa do hospedeiro contra ambos os fungos *C. neoformans* e *C. albicans*. Alguns dos motivos que são capazes de explicar tal divergência podem ser relacionadas

primeiro com os erros envolvendo a sistemática do experimento de Western blot, como qualidade do gel SDS-PAGE, composição dos tampões utilizados, qualidade e diluição de anticorpos para a otimização e sinal de ruído (Aksamitiene et al., 2007). Segundo, pela célula lisada total dos macrófagos, após terem sido incubados e interagido com os fungos, ser utilizada para executar a análise por immunoblot da expressão protéica, podendo por isso haver interferentes ou ligações inespecíficas do anticorpo, que podem gerar um sinal aumentado ou diminuído da banda de interesse. Terceiro, o mesmo anticorpo primário, utilizado em todos os experimentos, é IgG de coelho policlonal, o que o aumenta sua chance de ligar-se em receptores inespecíficos.

Além disso, já foi descrito que *C. albicans* é completamente associado com monócitos/macrófagos em 20 minutos após o início da interação, não tendo mais células fúngicas livres detectáveis após esse período. Esse processo entre as células de defesa do hospedeiro com *C. neoformans* parece ser um processo mais lento e ineficiente comparado com a infecção com *C. albicans* (Chaka et al., 1995). Esses dados podem explicar o motivo pelo qual não foi possível observar o mesmo padrão de expressão proteica em macrófagos infectados com *C. neoformans* comparado com os infectados com *C. albicans* no experimento de *in cell* ELISA. A taxa de fagocitose pelos macrófagos com *C. albicans* é maior em duas horas de interação, indicando por isso um maior acionamento do transportador CTR1 em consequência do maior número de células com patógeno internalizado, padrão que pôde ser verificado na análise de imunofluorescência, no qual demonstrou que macrófagos com fungos patógenos internalizados apresentaram maior expressão de CTR1. Já as células de defesa em contato com *C. neoformans* acionam a proteína transportadora na membrana plasmática, contudo devido ao pouco tempo de interação, provavelmente não foi suficiente para ser detectado no teste colorimétrico.

Por fim, a disponibilidade de metais que *Cryptococcus neoformans* enfrenta quando em contato com as células de defesa do hospedeiro não estão claras e podem variar com o decorrer do processo infeccioso (Raja et al., 2013). Alguns trabalhos mostram que o papel protetor de Cuf1 durante períodos de exposição a altas concentrações de cobre é consistente com a ideia de que o patógeno pode enfrentar níveis elevados e possivelmente tóxicos desse metal durante a infecção (Chun and Madhani, 2010). Outros estudos apontam que a ativação da expressão do transportador Ctr4 de *C. neoformans* em fagolisossomos originados da interação com macrófagos da linhagem J774.16, se dá provavelmente devido à um ambiente limitante de cobre

(Waterman et al., 2007), ou seja, o patógeno comporta-se como se estivesse em um local com escassez de cobre durante a infecção (Raja et al., 2013). A única afirmação que podemos fazer até esse momento é que a disponibilidade de cobre durante a infecção hospedeiro-patógeno fúngico é disputada entre ambos para agirem de forma estrategicamente protetora à ação um do outro e que a homeostase de cobre é dependente do transportador de cobre de alta afinidade CTR1.

#### 4 REFERÊNCIAS

- Achard, M. E., S. L. Stafford, N. J. Bokil, J. Chartres, P. V. Bernhardt, M. A. Schembri, M. J. Sweet, and A. G. McEwan, 2012, Copper redistribution in murine macrophages in response to Salmonella infection: *Biochem J*, v. 444, p. 51-7.
- Aksamitiene, E., J. B. Hoek, B. Kholodenko, and A. Kiyatkin, 2007, Multistrip Western blotting to increase quantitative data output: *Electrophoresis*, v. 28, p. 3163-73.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54.
- Burgess, A., S. Vigneron, E. Brioude, J. C. Labbé, T. Lorca, and A. Castro, 2010, Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 12564-9.
- Cassat, J. E., and E. P. Skaar, 2012, Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity: *Semin Immunopathol*, v. 34, p. 215-35.
- Chaka, W., J. Scharringa, A. F. Verheul, J. Verhoef, A. G. Van Strijp, and I. M. Hoepelman, 1995, Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 2, p. 753-9.
- Chun, C. D., and H. D. Madhani, 2010, Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *PLoS One*, v. 5.
- Coelho, C., A. L. Bocca, and A. Casadevall, 2014, The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*: *Annu Rev Pathol*, v. 9, p. 219-38.
- Cogliati, M., 2013, Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types: *Scientifica (Cairo)*, v. 2013, p. 675213.
- Cole, G. T., A. A. Halawa, and E. J. Anaissie, 1996, The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside: *Clin Infect Dis*, v. 22 Suppl 2, p. S73-88.
- Ding, C., R. A. Festa, Y. L. Chen, A. Espart, Ò. Palacios, J. Espín, M. Capdevila, S. Atrian, J. Heitman, and D. J. Thiele, 2013, *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence: *Cell Host Microbe*, v. 13, p. 265-76.
- Ding, C., J. Yin, E. M. Tovar, D. A. Fitzpatrick, D. G. Higgins, and D. J. Thiele, 2011, The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99: *Mol Microbiol*, v. 81, p. 1560-76.
- Douglas, L. M., H. X. Wang, S. Keppler-Ross, N. Dean, and J. B. Konopka, 2012, Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*: *MBio*, v. 3.

- Feldmesser, M., Y. Kress, P. Novikoff, and A. Casadevall, 2000, *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection: *Infect Immun*, v. 68, p. 4225-37.
- Festa, R. A., and D. J. Thiele, 2012, Copper at the front line of the host-pathogen battle: *PLoS Pathog*, v. 8, p. e1002887.
- Flach, K., 2014, Modulation of copper homeostasis in macrophages infected by fungal pathogens: no published.
- Hamilton, A. J., and J. Goodley, 1996, Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*: *Curr Top Med Mycol*, v. 7, p. 19-42.
- Hofer, U., 2013, Fungal pathogenesis: good copper, bad copper: *Nat Rev Microbiol*, v. 11, p. 299.
- Hood, M. I., and E. P. Skaar, 2012, Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface: *Nat Rev Microbiol*, v. 10, p. 525-37.
- Kehl-Fie, T. E., and E. P. Skaar, 2010, Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc: *Curr Opin Chem Biol*, v. 14, p. 218-24.
- Kmetzsch, L., C. C. Staats, E. Simon, F. L. Fonseca, D. L. de Oliveira, L. Sobrino, J. Rodrigues, A. L. Leal, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, A. Schrank, and M. H. Vainstein, 2010, The vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger *Vcx1* is involved in calcineurin-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*: *Eukaryot Cell*, v. 9, p. 1798-805.
- Kronstad, J. W., R. Attarian, B. Cadieux, J. Choi, C. A. D'Souza, E. J. Griffiths, J. M. Geddes, G. Hu, W. H. Jung, M. Kretschmer, S. Saikia, and J. Wang, 2011, Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box: *Nat Rev Microbiol*, v. 9, p. 193-203.
- Lin, X., and J. Heitman, 2006, The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex: *Annu Rev Microbiol*, v. 60, p. 69-105.
- Mansour, M. K., and S. M. Levitz, 2002, Interactions of fungi with phagocytes: *Curr Opin Microbiol*, v. 5, p. 359-65.
- Mayer, F. L., D. Wilson, and B. Hube, 2013, *Candida albicans* pathogenicity mechanisms: *Virulence*, v. 4, p. 119-28.
- Miramón, P., L. Kasper, and B. Hube, 2013, Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells: *Med Microbiol Immunol*, v. 202, p. 183-95.
- Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader, and B. Hube, 2004, *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions: *Cell Microbiol*, v. 6, p. 915-26.
- Nicola, A. M., and A. Casadevall, 2012, In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages: *Methods Mol Biol*, v. 844, p. 189-97.
- Oliveira, D. L., C. G. Freire-de-Lima, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, M. L. Rodrigues, and L. Nimrichter, 2010, Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions: *Infect Immun*, v. 78, p. 1601-9.
- Petris, M. J., K. Smith, J. Lee, and D. J. Thiele, 2003, Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, *hCtr1*: *J Biol Chem*, v. 278, p. 9639-46.
- Potrykus, J., E. R. Ballou, D. S. Childers, and A. J. Brown, 2014, Conflicting interests in the pathogen-host tug of war: fungal micronutrient scavenging versus mammalian nutritional immunity: *PLoS Pathog*, v. 10, p. e1003910.
- Raja, M. R., S. R. Waterman, J. Qiu, R. Bleher, P. R. Williamson, and T. V. O'Halloran, 2013, A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*: *Metallomics*, v. 5, p. 363-71.

- Sabiiti, W., and R. C. May, 2012, Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *Future Microbiol*, v. 7, p. 1297-313.
- Shoham, S., and S. M. Levitz, 2005, The immune response to fungal infections: *Br J Haematol*, v. 129, p. 569-82.
- Silveira, C. P., A. C. Piffer, L. Kmetzsch, F. L. Fonseca, D. A. Soares, C. C. Staats, M. L. Rodrigues, A. Schrank, and M. H. Vainstein, 2013, The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells: *Fungal Genet Biol*, v. 60, p. 53-63.
- Simm, C., C. H. Luan, E. Weiss, and T. O'Halloran, 2011, High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis: *PLoS One*, v. 6, p. e25136.
- Sorrell, T. C., 2001, *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*: *Med Mycol*, v. 39, p. 155-68.
- Stafford, S. L., N. J. Bokil, M. E. Achard, R. Kapetanovic, M. A. Schembri, A. G. McEwan, and M. J. Sweet, 2013, Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper: *Biosci Rep*, v. 33.
- Voelz, K., and R. C. May, 2010, Cryptococcal interactions with the host immune system: *Eukaryot Cell*, v. 9, p. 835-46.
- Waterman, S. R., M. Hacham, G. Hu, X. Zhu, Y. D. Park, S. Shin, J. Panepinto, T. Valyi-Nagy, C. Beam, S. Husain, N. Singh, and P. R. Williamson, 2007, Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*: *J Clin Invest*, v. 117, p. 794-802.
- Waterman, S. R., Y. D. Park, M. Raja, J. Qiu, D. A. Hammoud, T. V. O'Halloran, and P. R. Williamson, 2012, Role of CTR4 in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*: *MBio*, v. 3.
- Wee, N. K., D. C. Weinstein, S. T. Fraser, and S. J. Assinder, 2013, The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease: *Int J Biochem Cell Biol*, v. 45, p. 960-3.
- Weissman, Z., I. Berdicevsky, B. Z. Cavari, and D. Kornitzer, 2000, The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 3520-5.
- White, C., J. Lee, T. Kambe, K. Fritsche, and M. J. Petris, 2009, A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity: *J Biol Chem*, v. 284, p. 33949-56.
- Zaragoza, O., M. L. Rodrigues, M. De Jesus, S. Frases, E. Dadachova, and A. Casadevall, 2009, The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *Adv Appl Microbiol*, v. 68, p. 133-216.
- Zhou, B., and J. Gitschier, 1997, hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 7481-6.

## 5 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos pelos nossos experimentos neste trabalho podemos sugerir a rota mais provavelmente utilizada pelas células de defesa do hospedeiro, mais especificamente pelos macrófagos, como tentativa de eliminar o fungo *Cryptococcus neoformans* do. Ao utilizar mudanças na homeostase de cobre como estratégia antifúngica, observamos que dentre os ensaios realizados após duas horas de incubação, o mais sensível apontou uma maior expressão do transportador de alta afinidade por cobre CTR1, condizendo com a teoria existente para essa interação, sendo essa a intoxicação por metal de transição.

As mesmas ressalvas são consideradas para a infecção com o fungo *Candida albicans*, havendo um grande indício de que a estratégia de intoxicação por cobre durante a interação com esse fungo é utilizada, devido ao aumento quantitativo do transportador CTR1 observado. Contudo, os testes devem ser repetidos para confirmar esse mecanismo de interação com células fagocíticas.

O método pelo qual hospedeiros mamíferos regulam a homeostase de cobre durante a infecção fúngica ainda não está bem esclarecida, mas sabe-se que esse metal tem grande importância durante a interação patógeno-hospedeiro. Para melhor compreendermos a sistemática que ocorre durante a infecção de macrófagos com os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, mais estudos são necessários.

## 6 PERSPECTIVAS

Repetir os experimentos já realizados – Western blot, ELISA e Imunofluorescência - incluindo outros tempos de interação entre fungo e macrófagos, além de incluir outros métodos como a Citometria de Fluxo.

Quantificar a expressão de outros transportadores de cobre para melhor elucidar o desvio da homeostase de cobre durante a infecção por *C.neoformans* e *C.albicans*.

Confirmar a distribuição do transportador CTR1 na membrana plasmática de macrófagos através da técnica de Microscopia Confocal.

Investigar outros mecanismos que possam estar envolvidos na modulação da homeostase de cobre em macrófagos durante a interação com *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*.

## 7 REFERÊNCIAS

- Achard, M. E., S. L. Stafford, N. J. Bokil, J. Chartres, P. V. Bernhardt, M. A. Schembri, M. J. Sweet, and A. G. McEwan, 2012, Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection: *Biochem J*, v. 444, p. 51-7.
- Aksamitiene, E., J. B. Hoek, B. Kholodenko, and A. Kiyatkin, 2007, Multistrip Western blotting to increase quantitative data output: *Electrophoresis*, v. 28, p. 3163-73.
- Almeida, R. S., D. Wilson, and B. Hube, 2009, *Candida albicans* iron acquisition within the host: *FEMS Yeast Res*, v. 9, p. 1000-12.
- Andreini, C., I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday, and J. M. Thornton, 2008, Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles: *J Biol Inorg Chem*, v. 13, p. 1205-18.
- Antinori, S., 2013, New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis: *ISRN AIDS*, v. 2013, p. 471363.
- Botella, H., P. Peyron, F. Levillain, R. Poincloux, Y. Poquet, I. Brandli, C. Wang, L. Tailleux, S. Tilleul, G. M. Charrière, S. J. Waddell, M. Foti, G. Lugo-Villarino, Q. Gao, I. Maridonneau-Parini, P. D. Butcher, P. R. Castagnoli, B. Gicquel, C. de Chastellier, and O. Neyrolles, 2011, Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages: *Cell Host Microbe*, v. 10, p. 248-59.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54.
- Cassat, J. E., and E. P. Skaar, 2012, Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity: *Semin Immunopathol*, v. 34, p. 215-35.
- Caza, M., and J. W. Kronstad, 2013, Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans: *Front Cell Infect Microbiol*, v. 3, p. 80.
- Chaka, W., J. Scharringa, A. F. Verheul, J. Verhoef, A. G. Van Strijp, and I. M. Hoepelman, 1995, Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry: *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 2, p. 753-9.
- Charlier, C., K. Nielsen, S. Daou, M. Brigitte, F. Chretien, and F. Dromer, 2009, Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*: *Infect Immun*, v. 77, p. 120-7.
- Chimienti, F., M. Aouffen, A. Favier, and M. Seve, 2003, Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate: *Curr Drug Targets*, v. 4, p. 323-38.
- Chun, C. D., and H. D. Madhani, 2010, Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *PLoS One*, v. 5.
- Citiulo, F., I. D. Jacobsen, P. Miramón, L. Schild, S. Brunke, P. Zipfel, M. Brock, B. Hube, and D. Wilson, 2012, *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion: *PLoS Pathog*, v. 8, p. e1002777.
- Coelho, C., A. L. Bocca, and A. Casadevall, 2014, The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*: *Annu Rev Pathol*, v. 9, p. 219-38.

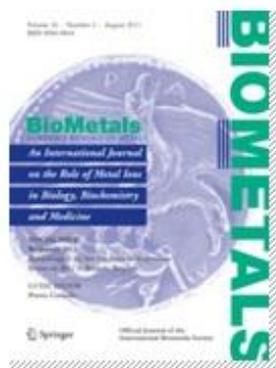
- Cogliati, M., 2013, Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types: Scientifica (Cairo), v. 2013, p. 675213.
- Cole, G. T., A. A. Halawa, and E. J. Anaissie, 1996, The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside: *Clin Infect Dis*, v. 22 Suppl 2, p. S73-88.
- Cox, G. M., T. S. Harrison, H. C. McDade, C. P. Taborda, G. Heinrich, A. Casadevall, and J. R. Perfect, 2003, Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages: *Infect Immun*, v. 71, p. 173-80.
- Ding, C., R. A. Festa, Y. L. Chen, A. Espart, Ò. Palacios, J. Espín, M. Capdevila, S. Atrian, J. Heitman, and D. J. Thiele, 2013, *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence: *Cell Host Microbe*, v. 13, p. 265-76.
- Ding, C., R. A. Festa, T. S. Sun, and Z. Y. Wang, 2014, Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens: *Mol Microbiol*, v. 93, p. 10-23.
- Ding, C., J. Yin, E. M. Tovar, D. A. Fitzpatrick, D. G. Higgins, and D. J. Thiele, 2011, The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99: *Mol Microbiol*, v. 81, p. 1560-76.
- Douglas, L. M., H. X. Wang, S. Keppler-Ross, N. Dean, and J. B. Konopka, 2012, Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*: *MBio*, v. 3.
- Feldmesser, M., Y. Kress, P. Novikoff, and A. Casadevall, 2000, *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection: *Infect Immun*, v. 68, p. 4225-37.
- Feretzi, M., S. E. Hardison, F. L. Wormley, and J. Heitman, 2014, *Cryptococcus neoformans* hyperfilamentous strain is hypervirulent in a murine model of cryptococcal meningoencephalitis: *PLoS One*, v. 9, p. e104432.
- Festa, R. A., and D. J. Thiele, 2012, Copper at the front line of the host-pathogen battle: *PLoS Pathog*, v. 8, p. e1002887.
- García-Rodas, R., and O. Zaragoza, 2012, Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 64, p. 147-61.
- Hamilton, A. J., and J. Goodley, 1996, Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*: *Curr Top Med Mycol*, v. 7, p. 19-42.
- Hodgkinson, V., and M. J. Petris, 2012, Copper homeostasis at the host-pathogen interface: *J Biol Chem*, v. 287, p. 13549-55.
- Hofer, U., 2013, Fungal pathogenesis: good copper, bad copper: *Nat Rev Microbiol*, v. 11, p. 299.
- Hood, M. I., and E. P. Skaar, 2012, Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface: *Nat Rev Microbiol*, v. 10, p. 525-37.
- Kehl-Fie, T. E., and E. P. Skaar, 2010, Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc: *Curr Opin Chem Biol*, v. 14, p. 218-24.
- Kmetzsch, L., C. C. Staats, E. Simon, F. L. Fonseca, D. L. de Oliveira, L. Sobrino, J. Rodrigues, A. L. Leal, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, A. Schrank, and M. H. Vainstein, 2010, The vacuolar Ca<sup>2+</sup> exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca<sup>2+</sup> tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*: *Eukaryot Cell*, v. 9, p. 1798-805.

- Kretschmer, M., E. Reiner, G. Hu, N. Tam, D. L. Oliveira, M. Caza, J. H. Yeon, J. Kim, C. J. Kastrup, W. H. Jung, and J. W. Kronstad, 2014, Defects in phosphate acquisition and storage influence virulence of *Cryptococcus neoformans*: *Infect Immun*, v. 82, p. 2697-712.
- Kronstad, J., S. Saikia, E. D. Nielson, M. Kretschmer, W. Jung, G. Hu, J. M. Geddes, E. J. Griffiths, J. Choi, B. Cadieux, M. Caza, and R. Attarian, 2012, Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence: *Eukaryot Cell*, v. 11, p. 109-18.
- Kronstad, J. W., R. Attarian, B. Cadieux, J. Choi, C. A. D'Souza, E. J. Griffiths, J. M. Geddes, G. Hu, W. H. Jung, M. Kretschmer, S. Saikia, and J. Wang, 2011, Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box: *Nat Rev Microbiol*, v. 9, p. 193-203.
- Kronstad, J. W., G. Hu, and W. H. Jung, 2013, An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*: *Trends Microbiol*, v. 21, p. 457-65.
- Lin, X., and J. Heitman, 2006, The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex: *Annu Rev Microbiol*, v. 60, p. 69-105.
- Mansour, M. K., and S. M. Levitz, 2002, Interactions of fungi with phagocytes: *Curr Opin Microbiol*, v. 5, p. 359-65.
- Marvin, M. E., P. H. Williams, and A. M. Cashmore, 2003, The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter: *Microbiology*, v. 149, p. 1461-74.
- Mauch, R. M., V. e. O. Cunha, and A. L. Dias, 2013, The copper interference with the melanogenesis OF *Cryptococcus neoformans*: *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 55, p. 117-20.
- Mayer, F. L., D. Wilson, and B. Hube, 2013, *Candida albicans* pathogenicity mechanisms: *Virulence*, v. 4, p. 119-28.
- Mednick, A. J., J. D. Nosanchuk, and A. Casadevall, 2005, Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection: *Infect Immun*, v. 73, p. 2012-9.
- Miramón, P., L. Kasper, and B. Hube, 2013, Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells: *Med Microbiol Immunol*, v. 202, p. 183-95.
- Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader, and B. Hube, 2004, *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions: *Cell Microbiol*, v. 6, p. 915-26.
- Nicola, A. M., P. Albuquerque, L. R. Martinez, R. A. Dal-Rosso, C. Saylor, M. De Jesus, J. D. Nosanchuk, and A. Casadevall, 2012, Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*: *Infect Immun*, v. 80, p. 3065-76.
- Nicola, A. M., and A. Casadevall, 2012, In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages: *Methods Mol Biol*, v. 844, p. 189-97.
- Oliveira, D. L., C. G. Freire-de-Lima, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, M. L. Rodrigues, and L. Nimrichter, 2010, Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions: *Infect Immun*, v. 78, p. 1601-9.
- Park, B. J., K. A. Wannemuehler, B. J. Marston, N. Govender, P. G. Pappas, and T. M. Chiller, 2009, Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS: *AIDS*, v. 23, p. 525-30.
- Parkins, M. D., D. M. Sabuda, S. Elsayed, and K. B. Laupland, 2007, Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections: *J Antimicrob Chemother*, v. 60, p. 613-8.

- Perfect, J. R., 2012, The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host: *MBio*, v. 3.
- Petris, M. J., K. Smith, J. Lee, and D. J. Thiele, 2003, Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, *hCtr1*: *J Biol Chem*, v. 278, p. 9639-46.
- Potrykus, J., E. R. Ballou, D. S. Childers, and A. J. Brown, 2014, Conflicting interests in the pathogen-host tug of war: fungal micronutrient scavenging versus mammalian nutritional immunity: *PLoS Pathog*, v. 10, p. e1003910.
- Raja, M. R., S. R. Waterman, J. Qiu, R. Bleher, P. R. Williamson, and T. V. O'Halloran, 2013, A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*: *Metallomics*, v. 5, p. 363-71.
- Sabiiti, W., and R. C. May, 2012, Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *Future Microbiol*, v. 7, p. 1297-313.
- Saikia, S., D. Oliveira, G. Hu, and J. Kronstad, 2014, Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *Infect Immun*, v. 82, p. 839-50.
- Samanovic, M. I., C. Ding, D. J. Thiele, and K. H. Darwin, 2012, Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal: *Cell Host Microbe*, v. 11, p. 106-15.
- Shoham, S., and S. M. Levitz, 2005, The immune response to fungal infections: *Br J Haematol*, v. 129, p. 569-82.
- Siafakas, A. R., T. C. Sorrell, L. C. Wright, C. Wilson, M. Larsen, R. Boadle, P. R. Williamson, and J. T. Djordjevic, 2007, Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity: *J Biol Chem*, v. 282, p. 37508-14.
- Silva, M. G., A. Schrank, E. F. Bailão, A. M. Bailão, C. L. Borges, C. C. Staats, J. A. Parente, M. Pereira, S. M. Salem-Izacc, M. J. Mendes-Giannini, R. M. Oliveira, L. K. Silva, J. D. Nosanchuk, M. H. Vainstein, and C. M. de Almeida Soares, 2011, 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.
- Silveira, C. P., A. C. Piffer, L. Kmetzsch, F. L. Fonseca, D. A. Soares, C. C. Staats, M. L. Rodrigues, A. Schrank, and M. H. Vainstein, 2013, The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells: *Fungal Genet Biol*, v. 60, p. 53-63.
- Simm, C., C. H. Luan, E. Weiss, and T. O'Halloran, 2011, High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis: *PLoS One*, v. 6, p. e25136.
- Singh, A., R. J. Panting, A. Varma, T. Saijo, K. J. Waldron, A. Jong, P. Ngamskulrungrroj, Y. C. Chang, J. C. Rutherford, and K. J. Kwon-Chung, 2013, Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*: *MBio*, v. 4, p. e00220-13.
- Smith, R. M., A. Mba-Jonas, M. Tourdjman, T. Schimek, E. DeBess, N. Marsden-Haug, and J. R. Harris, 2014, Treatment and outcomes among patients with *Cryptococcus gattii* infections in the United States Pacific Northwest: *PLoS One*, v. 9, p. e88875.
- Sorrell, T. C., 2001, *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*: *Med Mycol*, v. 39, p. 155-68.
- Staats, C. C., L. Kmetzsch, A. Schrank, and M. H. Vainstein, 2013, Fungal zinc metabolism and its connections to virulence: *Front Cell Infect Microbiol*, v. 3, p. 65.

- Stafford, S. L., N. J. Bokil, M. E. Achard, R. Kapetanovic, M. A. Schembri, A. G. McEwan, and M. J. Sweet, 2013, Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper: *Biosci Rep*, v. 33.
- Sudbery, P., N. Gow, and J. Berman, 2004, The distinct morphogenic states of *Candida albicans*: *Trends Microbiol*, v. 12, p. 317-24.
- Sutak, R., E. Lesuisse, J. Tachezy, and D. R. Richardson, 2008, Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence: *Trends Microbiol*, v. 16, p. 261-8.
- Uppuluri, P., A. K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A. K. Ramasubramaniam, J. R. Köhler, D. Kadosh, and J. L. Lopez-Ribot, 2010, Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle: *PLoS Pathog*, v. 6, p. e1000828.
- van de Veerdonk, F. L., B. J. Kullberg, and M. G. Netea, 2010, Pathogenesis of invasive candidiasis: *Curr Opin Crit Care*, v. 16, p. 453-9.
- Voelz, K., and R. C. May, 2010, Cryptococcal interactions with the host immune system: *Eukaryot Cell*, v. 9, p. 835-46.
- Waterman, S. R., M. Hacham, G. Hu, X. Zhu, Y. D. Park, S. Shin, J. Panepinto, T. Valyi-Nagy, C. Beam, S. Husain, N. Singh, and P. R. Williamson, 2007, Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*: *J Clin Invest*, v. 117, p. 794-802.
- Waterman, S. R., Y. D. Park, M. Raja, J. Qiu, D. A. Hammoud, T. V. O'Halloran, and P. R. Williamson, 2012, Role of CTR4 in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*: *MBio*, v. 3.
- Wee, N. K., D. C. Weinstein, S. T. Fraser, and S. J. Assinder, 2013, The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease: *Int J Biochem Cell Biol*, v. 45, p. 960-3.
- Weissman, Z., I. Berdicevsky, B. Z. Cavari, and D. Kornitzer, 2000, The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 3520-5.
- White, C., J. Lee, T. Kambe, K. Fritsche, and M. J. Petris, 2009, A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity: *J Biol Chem*, v. 284, p. 33949-56.
- Winters, M. S., Q. Chan, J. A. Caruso, and G. S. Deepe, 2010, Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses: *J Infect Dis*, v. 202, p. 1136-45.
- Wolschendorf, F., D. Ackart, T. B. Shrestha, L. Hascall-Dove, S. Nolan, G. Lamichhane, Y. Wang, S. H. Bossmann, R. J. Basaraba, and M. Niederweis, 2011, Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 1621-6.
- Zaragoza, O., M. L. Rodrigues, M. De Jesus, S. Frases, E. Dadachova, and A. Casadevall, 2009, The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: *Adv Appl Microbiol*, v. 68, p. 133-216.
- Zhou, B., and J. Gitschier, 1997, hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 7481-6.
- Álvarez, F., M. Fernández-Ruiz, and J. M. Aguado, 2013, [Iron and invasive fungal infection]: *Rev Iberoam Micol*, v. 30, p. 217-25.

## 8 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO BIOMETALS



### BioMetals

An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology,  
Biochemistry and Medicine

Editor: Gunther Winkelmann

ISSN: 0966-0844 (print version)

ISSN: 1572-8773 (electronic version)

Journal no. 10534



RECOMMEND TO LIBRARIAN

#### MANUSCRIPT SUBMISSION

##### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## TITLE PAGE

**Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

**Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

**Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## TEXT

**Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- » LaTeX macro package (zip, 182 kB)

**Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

**Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

#### SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

#### SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

#### SCIENTIFIC STYLE

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

- Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
- Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
- Bold for vectors, tensors, and matrices.

## REFERENCES

**Citation**

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- ⌘ Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- ⌘ This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- ⌘ This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

**Reference list**

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

⌘ **Journal article**

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

⌘ **Article by DOI**

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

⌘ **Book**

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

⌘ **Book chapter**

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

⌘ **Online document**

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

⌘ **Dissertation**

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» EndNote style (zip, 2 kB)