

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE EM MACRÓFAGOS
DURANTE A INTERAÇÃO COM PATÓGENOS FÚNGICOS”**

Dissertação de Mestrado

Karoline Flach

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE EM MACRÓFAGOS
DURANTE A INTERAÇÃO COM PATÓGENOS FÚNGICOS”**

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

Karoline Flach

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Charley Christian Staats, pela oportunidade, ensinamentos e, principalmente, pela confiança e apoio que dedicou a mim durante toda a trajetória do mestrado e que com certeza foram essenciais;

Aos professores Dr^a. Marilene H. Vainstein e Dr. Augusto Schrank, pelo acolhimento no laboratório;

Aos professores Dr. Guido Lenz e Dr. Itabajara S. Vaz Junior, membros da comissão científica e, em especial, ao Prof. Dr. Itabajara pela revisão da redação científica;

À Prof. Dr^a. Livia Kmetzsch, por estar sempre disponível para ajudar e transmitir seu conhecimento com muita clareza e precisão, assim como pela amizade;

À bolsista de iniciação científica Natully Fogaça e ao doutorando Rafael Schneider, pelo acolhimento e companheirismo durante este período, pela disponibilidade em dividir seus conhecimentos e pelos momentos de descontração;

À Dr^a. Carolina Pereira, Dr^a. Franciele Maboni, doutoranda Vanessa Barcellos e aos demais colegas dos laboratórios 220, 217 e 222, que de alguma forma contribuíram para este estudo e pela possibilidade de conviver e aprender muito, tanto no âmbito profissional quanto pessoal;

Aos meus pais, Olavo Luiz Flach e Regina Helena Flach, que sempre acreditaram no meu potencial e estiveram ao meu lado, me apoiando e me incentivando a conquistar meus objetivos;

À minha irmã Katherine Flach, pelas conversas, amizade e amor incondicional, que sempre estiveram presentes na minha vida e que foram essenciais durante este percurso;

Às minhas amigas, por me proporcionarem momentos divertidos e também de acolhimento e compreensão, fazendo-se presentes tanto nos momentos alegres quanto nos difíceis e, em

especial, à Danielle de Aguiar Soares por me apresentar a possibilidade de ingressar no laboratório 220;

Ao Centro de Biotecnologia e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro de incentivo à pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1. COMPLEXO <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP.....	13
1.1.1. A CRIPTOCOCOSE	15
1.1.2. ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO.....	18
1.1.3. INTERAÇÃO COM CÉLULAS FAGOCÍTIAS DO HOSPEDEIRO.....	19
1.1.4. DISSEMINAÇÃO.....	20
1.1.5. FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS COM <i>CRYPTOCOCCUS</i>.....	22
1.1.5.1. A CÁPSULA	24
1.1.5.2. PRODUÇÃO DE MELANINA.....	24
1.1.5.3. ALTERAÇÕES METABÓLICAS	25
1.1.5.4. SECREÇÃO DE ENZIMAS	26
1.1.5.5. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	27
1.1.6. MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	28
1.2. <i>CANDIDA ALBICANS</i>.....	31
1.2.1. COLONIZAÇÃO <i>VERSUS</i> INFECÇÃO.....	32
1.2.2. FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS COM <i>CANDIDA ALBICANS</i>	33
1.2.3. DIMORFISMO	34
1.2.4. ADESINAS E INVASINAS	35
1.2.5. FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	35
1.2.6. CONTATO SENSORIAL E TIGMOTROPISMO.....	36
1.2.7. SECREÇÃO DE HIDROLASES.....	36
1.2.8. INTERAÇÃO COM CÉLULAS DO HOSPEDEIRO.....	38
1.3. AQUISIÇÃO DE METAIS: COMPETIÇÃO ENTRE PATÓGENO E HOSPEDEIRO	41
1.3.1. COBRE.....	41
1.3.2. MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE COBRE.....	42
2. OBJETIVOS.....	48
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3. RESULTADOS.....	49
4. DISCUSSÃO GERAL.....	87
5. CONCLUSÕES	96
6. PERSPECTIVAS.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXO I	110

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µM	micromolar
µm	micrometro
AA	absorção atômica
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida, de <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ALS	sequência similar à aglutinina, de <i>agglutinin-like sequence</i>
ATP	adenosina trifosfato
ATP7A	ATPase transportadora de cobre tipo P A
BCS	quelante de cobre, de <i>bathocupreinedisulfonic acid</i>
BHE	barreira hemato-encefálica
BMECs	células endoteliais do cérebro, de <i>Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
CFU	unidade formadora de colônia, de <i>colony-forming unit</i>
CLR	receptor de lectina tipo C, de <i>C-type lectin Receptor</i>
CMT	metalotioneína, de <i>cryptococcal metallothionein</i>
CO ₂	dióxido de carbono
CP	ceruloplasmina
CR3	receptor do complemento, de <i>complement receptor3</i>
CTR	transportador de cobre, de <i>copper transporter receptor</i>
Cu	cobre
Cuf1	fator de transcrição responsável a cobre, de <i>copper sensing transcription factor 1</i>
Cup	metalotioneína de cobre
CuSO ₄	sulfato de cobre
DMEM	meio de cultura de células, de <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico, de <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, de <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Fe	ferro
Fe-S	ferro-enxofre
FITC	isotiocianato de fluoresceína, de <i>fluorescein isothiocyanate</i>
GalXM	galactoxilomanana
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GXM	glucoroxilomanana
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HEPES	solução tampão, de <i>ácido 4 - (2-hidroxi-1-piperazino)etanosulfônico</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana, de <i>human immunodeficiency virus</i>
HSP	proteína de choque térmico, de <i>heat shock protein</i>
Hwp	proteína hifal, de <i>hyphal wall protein</i>

IFN- γ	interferon gama
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
I	imunoglobulina M
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-17	interleucina 17
LPS	lipopolissacarídeo
MA	macrófago alveolar
MEM	meio mínimo de cultura, de <i>minimum essential medium</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
Mn	manganês
MT	metalotioneína
MTT	metil-tiazolil-tetrazólio
N	nitrogênio
NH ₃	amônia
NO	óxido nítrico
NOS2	proteína responsável pela síntese de óxido nítrico, de <i>nitric oxide synthase 2</i>
NRAMP1	proteína de macrófago associada à resistência, de <i>natural resistance-associated macrophage protein 1</i>
PAMP	padrão molecular associado ao patógeno, de <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase, de <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PRR	receptor de reconhecimento padrão, de <i>pattern recognition receptor</i>
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativo, de <i>quantitative real time PCR</i>
RNA	ácido ribonucleico, de <i>ribonucleic acid</i>
Saps	proteínases, de <i>secreted aspartyl proteinases</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio, de <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SLC30A	proteína transportadora de zinco, de <i>solute carrier family 30</i>
SLC31A1	proteína transportadora de cobre, de <i>solute carrier family 31 member 1</i>
SLC31A2	proteína transportadora de cobre, de <i>solute carrier family 31 member 2</i>
SNC	sistema nervoso central
Sod	superóxido dismutase, de <i>superoxide dismutase</i>
SP-D	proteína surfactante D, de <i>surfactant protein D</i>
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta, de <i>transforming growth factor beta</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th17	<i>T-helper 17</i>
Th2	<i>T-helper 2</i>

TLR	receptor do tipo Toll, de <i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa, de <i>tumor necrosis receptor alfa</i>
Ure1	proteína urease, de <i>cryptococcal urease 1</i>
Yhb	proteína relacionada a flavohemoglobina, de <i>yeast flavohemoglobin</i>
YPD	meio de cultura para levedura, de <i>yeast peptone-dextrose</i>
Zn	zinco

RESUMO

Fungos patogênicos, como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, são uma das mais frequentes causas de infecções oportunistas em todo o mundo, sendo capazes de sobreviver, proliferar e escapar de macrófagos, células de primeira linha da resposta imune de hospedeiros mamíferos. Macrófagos geralmente expõem o patógeno intracelular a um ambiente tóxico, caracterizado por pH ácido, presença de espécies reativas, como também de peptídeos antimicrobianos. Neste contexto, há uma competição entre o patógeno intracelular e o hospedeiro mamífero por nutrientes essenciais, como por exemplo, metais de transição. Cobre é um metal de transição essencial para a vida aeróbica, porém pode ser tóxico em altas concentrações e, devido a isto, diversos organismos desenvolveram mecanismos regulatórios para controlar suas concentrações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da homeostase de cobre durante a interação entre macrófagos e células de *C. neoformans* ou *C. albicans*. Neste trabalho, foi possível demonstrar que a presença de cobre contribui para uma menor atividade fungicida de macrófagos infectados. Também, o pré-carregamento das células fúngicas com cobre alterou a sensibilidade de ambas leveduras patogênicas à atividade anti-fúngica. Além disso, foi demonstrado que a expressão de transportadores de cobre (CTR1 e ATP7A) e proteínas ligadoras de cobre (ceruloplasmina e metalotioneína 1) de macrófagos foram moduladas em resposta à infecção por estes fungos patogênicos. Entretanto, essa regulação pode envolver mecanismos mais complexos, como estratégias do patógeno para subverter a ação antimicrobiana de macrófagos.

Palavras-chave: fungos patogênicos, macrófagos, cobre, transportadores de cobre.

ABSTRACT

Pathogenic yeasts, such as *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, are one of the most frequent causes of the opportunistic infections worldwide, being able to survive, proliferate and escape from macrophages, the first line cells engaged in the immune defense of the mammalian host. Macrophages generally expose the intracellular pathogen to a toxic environment, which is characterized by acid pH, presence of reactive species, as well the presence of antimicrobial peptides. In this context, there is a competition between intracellular pathogen and mammalian host for essential nutrients, such as transition metals. Copper is an essential transition metal for aerobic life, but can be toxic at high concentrations and, therefore, many organisms have evolved highly regulated mechanisms for controlling its concentration. In this work, we aim to evaluate a modulation of copper homeostasis during interaction between macrophages and *C. neoformans* or *C. albicans* cells. This work demonstrated that the presence of copper resulted in a lower fungicidal activity of infected macrophages. Also, the pre-loading of fungal cells with copper can alter the sensitivity of both pathogenic yeasts to an antifungal activity. In addition, we showed that the expression of macrophage copper transporters (CTR1 and ATP7A) and copper-binding proteins (ceruloplasmin and metallothionein 1) are modulated in response to infection by pathogenic fungi. However, this regulation may involve more complex mechanisms, such as strategies of pathogen to subvert the antimicrobial action of macrophages.

Keywords: fungal pathogens, macrophages, copper, copper transporters.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que o número total de espécies eucarióticas na Terra é de aproximadamente 8,7 milhões e, dentre estas, cerca de 7% correspondem a fungos (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Apenas 600 espécies de fungos compreendem patógenos humanos, porém este relativamente pequeno grupo é responsável por uma ampla variedade de infecções cutâneas leves ou severas, bem como infecções sistêmicas graves e que apresentam risco de vida (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Destas espécies, destacam-se *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, caracterizadas por serem patógenos oportunistas, frequentemente associados com outras doenças que comprometem o sistema imune de indivíduos. Ambos podem ser encontrados como patógenos intracelulares e possuem diversos mecanismos para subverter a resposta imune do hospedeiro e assim garantir sua sobrevivência e disseminação. Entretanto, células hospedeiras desenvolveram mecanismos de defesa para conter a proliferação destes patógenos e, neste contexto, destaca-se a privação de micronutrientes, como metais de transição, essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Mayer, Wilson e Hube, 2013).

Esta dissertação visa avaliar os mecanismos pelos quais células de mamíferos hospedeiros modulam a homeostase do metal cobre durante a infecção por patógenos fúngicos, como *C. neoformans* e *C. albicans*. Estes mecanismos ainda são pouco descritos na literatura e, frente a isto, é importante entender as estratégias utilizadas por estes patógenos para burlar a defesa do hospedeiro e estabelecer a infecção, para assim melhor compreender este fenômeno.

1.1.COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS* SPP.

O gênero *Cryptococcus* é conhecido há mais de 100 anos e cerca de mais de 50 leveduras do gênero *Cryptococcus* já foram isoladas do ambiente, mas somente *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são conhecidos como patógenos humanos (Sabiiti e May, 2012). *C. neoformans* e *C. gattii* são os agentes etiológicos da criptococose e, apesar de no passado terem sido considerados pertencentes a mesma espécie, atualmente são classificados como duas espécies distintas, com base em numerosas diferenças como distribuição geográfica, epidemiologia, apresentação clínica e características moleculares (Cogliati, 2013). As leveduras podem ser encontradas em diversos nichos do ambiente, como solo, árvores e animais, principalmente em aves (Kronstad *et al.*, 2011; Coelho, Bocca e Casadevall, 2013).

O complexo *Cryptococcus* é dividido em 4 sorotipos, tendo como critério uma classificação baseada na reação imunológica produzida com componentes da sua cápsula polissacarídica. Os sorotipos A e D correspondem a *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, respectivamente, enquanto que sorotipos B e C são associados com *C. neoformans* var. *gattii*. Recentes estudos filogenéticos, empregando tipagem molecular e a ausência de recombinação genética entre isolados de cada espécie, tornaram possível o reconhecimento de *C. neoformans* var. *gattii* como uma espécie distinta, denominada *C. gattii*. As variedades foram então divididas em tipos moleculares: VNB, VNI, VNII correspondentes a *C. neoformans* var. *grubii*, VNIV a *C. neoformans* var. *neoformans*, VNIII a um tipo híbrido. Já os tipos VGI, VGII, VGIII e VGIV correspondem a *C. gattii* (Figura 1). Os tipos moleculares VNI e VNII de *C. neoformans* var. *grubii* possuem uma ocorrência global, sendo responsáveis por cerca de 95% das infecções criptococócicas no mundo todo e 98% em pacientes com HIV/AIDS. O tipo

molecular VNB é geograficamente restrito à África do Sul e *C. neoformans* var. *grubii* VNI e o sorotipo híbrido AD também são originários da África (Boekhout *et al.*, 1997; Ngamskulrunroj *et al.*, 2009; Sabiiti e May, 2012).

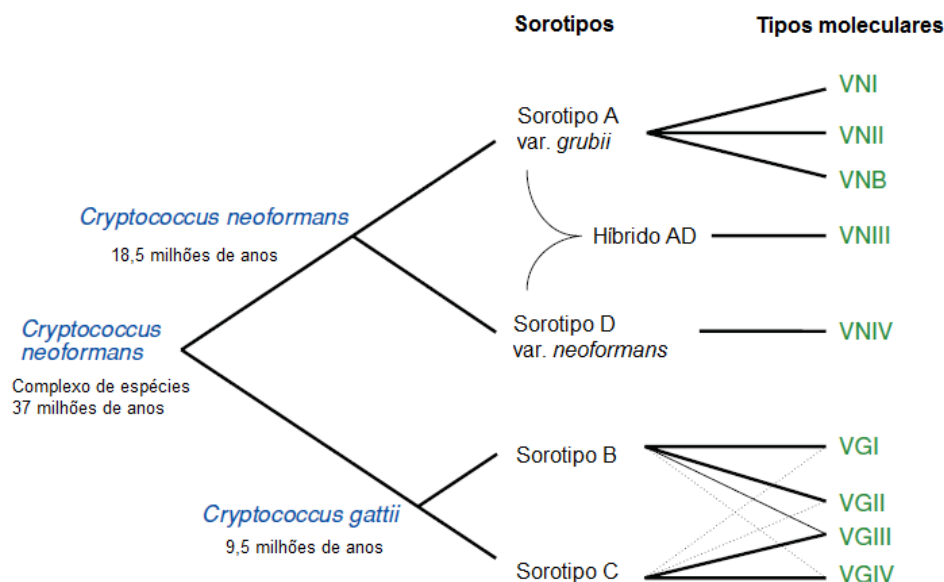


Figura 1: A evolução do complexo de espécies *Cryptococcus*. O complexo de espécies *Cryptococcus* possui duas subespécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, as quais ainda foram subdivididas em sorotipos e, pelo menos, 9 tipos moleculares. *C. neoformans* corresponde aos sorotipos A e D e *C. gattii* aos sorotipos B e C. Figura adaptada de (Lin e Heitman, 2006).

A levedura *C. gattii* destacou-se por ter sido responsável por um surto que ocorreu em 1999 nas ilhas de Vancouver, no Canadá, onde houve um aumento dramático na frequência de infecções em seres humanos e animais (Bartlett, Kidd e Kronstad, 2008). Desde então, *C. gattii* parece ter se espalhado além desta região, visto a ocorrência de cerca de 60 casos de infecção humana em Oregon e Washington, EUA, desde 2004 (Byrnes *et al.*, 2010). O genótipo VGII ainda pode ser subdividido em VGIIa, VGIIb e VGIIc, sendo que VGIIa foi predominante em pacientes e fontes ambientais durante este surto, mostrando elevado nível

de virulência (Kronstad *et al.*, 2011). Acreditava-se que esta espécie era restrita a regiões tropicais e subtropicais, entretanto após o surto nas ilhas de Vancouver e na costa oeste do Pacífico na América do Norte, este patógeno passou a ser considerado também presente em regiões temperadas (Cogliati, 2013).

Ambos, *C. neoformans* e *C. gattii*, utilizam mecanismos especializados para adaptarem-se no ambiente de hospedeiros mamíferos e podem ser classificados, ao invés de oportunistas, como patógenos que causam danos ao hospedeiro com resposta imune fraca ou normal, respectivamente (Casadevall e Pirofski, 2003; Kronstad *et al.*, 2011). Entretanto, a correlação entre *C. neoformans* e pacientes imunocomprometidos tem sido desafiada a medida que aumentam os casos de criptococose em pacientes imunocompetentes. Apesar da relação óbvia de *C. gattii* com indivíduos saudáveis e animais, após ter sido responsável pelo surto no oeste da América do Norte, *C. neoformans* também é capaz de causar doença em pacientes imunocompetentes, fato que pode ser comprovado pelos numerosos casos de criptococose descritos antes da epidemia da AIDS/HIV (Kronstad *et al.*, 2011).

1.1.1. A CRIPTOCOCOSE

Atualmente, a epidemia de AIDS/HIV tem crescido no mundo todo e estima-se que cerca de 2,7 milhões de pessoas são infectadas por ano, sendo que aproximadamente 1,8 milhões de mortes ocorrem devido a causas relacionadas com a AIDS, de acordo com os últimos dados publicados pelo programa de AIDS/HIV das Nações Unidas e Organização Mundial da Saúde (Cogliati, 2013). Neste contexto, a meningite criptococócica é a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central (SNC) e a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com AIDS (Cogliati, 2013). Cerca de 1 milhão de

casos de meningite criptococócica ocorrem por ano no mundo todo, com altas taxas de mortalidade, aproximadamente 60% após 3 meses de infecção (Park *et al.*, 2009). A meningite criptococócica associada ao HIV ocorre na maioria dos casos e tem maior prevalência na África sub-saariana, onde o número de casos fatais pode exceder as mortes por tuberculose em algumas áreas (Park *et al.*, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). Sua incidência e mortalidade permanece alta, mesmo com o aumento ao acesso a terapias anti-retrovirais (Jarvis *et al.*, 2009; Sibiiti e May, 2012). Além disso, a criptococose é também a terceira infecção fúngica mais frequente em pacientes transplantados de órgãos sólidos (Singh, Forrest e Practice, 2009; Sibiiti e May, 2012).

O primeiro caso de criptococose humana foi relatado em 1895 por cientistas alemães, que descreveram uma lesão na tíbia de uma mulher de 31 anos (Lin e Heitman, 2006; Coelho, Bocca e Casadevall, 2013). Vários casos de criptococose foram relatados a partir anos 1900, porém com prevalência baixa até os anos entre 1947 a 1968, quando um alto número de casos foi identificado na África. Este aumento no número de casos acreditou-se ter relação com o aumento no número de casos de AIDS no rio Congo durante o mesmo período. Desde os anos 1980 até hoje, os casos de criptococose humana têm crescido em paralelo com a epidemia global de AIDS/HIV (Sibiiti e May, 2012).

No Brasil são poucos os dados sobre a prevalência de micoses sistêmicas, pois não há obrigatoriedade de notificação destes casos. Entretanto, um estudo avaliou as taxas de mortalidade referentes às micoses sistêmicas mais importantes no Brasil e suas associações com condições ambientais e doenças imunossupressoras como a AIDS (Prado *et al.*, 2009). Entre os anos de 1996 a 2006 doenças parasitárias e infecciosas foram responsáveis por 517.057 mortes, sendo que foi possível observar um aumento da média anual de mortes causadas por criptococose (de 24,5% a 26,8%) e candidíase (de 12,2% a 16,3%) desde o

início até o final do estudo (Prado *et al.*, 2009). A criptococose teve prevalência predominante na região sul e sudeste, onde esteve principalmente relacionada a homens, embora o número de casos em mulheres tenha aumentado durante o período avaliado. Também foi a micose sistêmica mais mencionada (50,9%) em relatos de casos que tiveram como causa principal de morte a AIDS, seguido de candidíase (30,2%) (Prado *et al.*, 2009).

A infecção criptococócica pode ocorrer em qualquer parte do corpo humano e já foram relatados casos envolvendo pele, ossos, próstata, trato urinário, fígado, baço, linfonodos, pulmões e cérebro. Dentre estes, pulmões e cérebro são os órgãos mais frequentemente afetados (Sabiiti e May, 2012). Uma vez no cérebro, *C. neoformans* pode ocasionar meningoencefalite, doença que apresenta risco de morte, já que na ausência de tratamento adequado pode ser fatal. Mesmo com tratamento, a taxa de mortalidade é alta, variando de 30 a 100% em pacientes com HIV/AIDS (Kambugu *et al.*, 2008; Sabiiti e May, 2012). Os sintomas da meningoencefalite incluem dor de cabeça, febre, indisposição, alteração do estado mental, tendo o aumento da pressão intracraniana como complicação mais comum, podendo ainda ocasionar perda visual e auditiva (Bicanic e Harrison, 2004; Sabiiti e May, 2012). Dentre as opções para tratamento, frequentemente são utilizados anti-fúngicos como fluconazol e anfotericina B. Anfotericina B pode ser considerada mais efetiva atualmente, porém possui elevada toxicidade e, desta forma, necessita de procedimentos de administração adequados e que muitas vezes não estão disponíveis em regiões onde a criptococose tem maior prevalência (Sabiiti e May, 2012). Logo, torna-se cada vez mais necessário e relevante a descoberta de novos alvos e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento e controle da criptococose (Mcquiston e Williamson, 2012).

1.1.2. ESTABELECIDAMENTO DA INFECÇÃO

A infecção em humanos inicia-se através da inalação de propágulos infecciosos que estão amplamente dispersos no ambiente e, através da inalação, chegam ao trato respiratório (Kronstad *et al.*, 2011; Sabiiti e May, 2012). Estas partículas infecciosas possuem tamanho muito pequeno (cerca de 3 μm), comparado com células de levedura maduras (4-10 μm) e, desta maneira, conseguem se depositar em regiões profundas do trato respiratório humano (Velagapudi *et al.*, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). Células de levedura dessecadas e esporos podem ser considerados propágulos infecciosos, entretanto possuem algumas diferenças. Esporos estão presentes em maior quantidade no ar, além de serem revestidos por uma espessa parede celular e, por isso, apresentam maior resistência frente a diferentes temperaturas e estresse oxidativo. Porém, podem ser mais susceptíveis à resposta imune do hospedeiro durante a infecção, comparados às células de levedura e, desta forma, acredita-se que, para que se estabeleça a infecção, deve ocorrer uma rápida germinação do esporo até formar a célula de levedura no interior do hospedeiro (Kronstad *et al.*, 2011; Sabiiti e May, 2012). Além disso, no interior dos pulmões, o espaço alveolar é revestido por um fluido surfactante que possui propriedades tensoativas, facilitando a aderência das células da levedura às células epiteliais dos pulmões (Ganendren *et al.*, 2006; Sabiiti e May, 2012).

A colonização no hospedeiro pode resultar em (i) não desenvolvimento da doença, quando o fungo é eliminado pela resposta imune do hospedeiro; (ii) infecção assintomática, quando o fungo entra em um período de latência e pode ser ativado quando o hospedeiro encontra-se imunocomprometido; (iii) doença pulmonária, caracterizada por nódulos pulmonares e inflamação dos pulmões; e (iv) doença disseminada, que pode potencialmente ocorrer em todos os órgãos sistêmicos, mas mais frequentemente no

cérebro (Kronstad *et al.*, 2011; Sabiiti e May, 2012). Foi recentemente relatado que *C. neoformans* tem o cérebro, e *C. gattii* os pulmões, como destino preferencial para a infecção em modelos murino de infecção (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009).

1.1.3. INTERAÇÃO COM CÉLULAS FAGOCÍTICAS DO HOSPEDEIRO

Uma vez no espaço alveolar, as células da levedura podem sobreviver extracelularmente e ou transitar dentro do tecido pulmonar, através da internalização pelas células epiteliais dos pulmões ou internalização em macrófagos alveolares (Sabiiti e May, 2012). Macrófagos alveolares compõem cerca de 95% da população celular no lavado broncoalveolar e são considerados fagócitos de primeira linha na defesa do hospedeiro contra patógenos (Gordon e Read, 2002). A interação entre a levedura e macrófagos alveolares é determinante para o estabelecimento da infecção pulmonar e, posteriormente, para uma possível disseminação sistêmica (Gordon e Read, 2002; Sabiiti e May, 2012).

Nos alvéolos pulmonares, as partículas infecciosas encontram macrófagos alveolares ou células dendríticas e são rapidamente ingeridas através do processo denominado fagocitose, o qual desencadeia a resposta imune do hospedeiro. Em camundongos, a fagocitose de células de *C. neoformans* ocorre durante as primeiras 24 horas após a inalação, ocorrendo uma mudança de ambiente extracelular para intracelular (Feldmesser *et al.*, 2000). Frequentemente, este processo culmina na formação de granulomas contendo células fúngicas em seu interior, denominados “criptococomas”, que previnem, desta forma, a disseminação extrapulmonar (Coelho, Bocca e Casadevall, 2013). Estes granulomas são geralmente benignos e compostos por fagócitos mononucleares maduros, histiócitos e células multinucleadas gigantes que envolvem as células fúngicas (Coelho, Bocca e Casadevall, 2013). A capacidade de *C. neoformans* de residir dentro de

granulomas, como também de sobreviver e proliferar-se no interior de macrófagos, pode também explicar a criptococose latente em indivíduos imunocompetentes (Sabiiti e May, 2012). Macrófagos são importantes tanto para o controle quanto para a persistência no hospedeiro, visto que já foi relatado que a depleção de macrófagos diminui a disseminação da levedura para o cérebro em ratos, uma vez que para isto, um dos mecanismos utilizados é o transporte do fungo através da internalização em macrófagos (Coelho, Bocca e Casadevall, 2013).

1.1.4. DISSEMINAÇÃO

Para que as células de *Cryptococcus* consigam chegar a circulação sanguínea e assim, desencadear a disseminação, são utilizadas algumas estratégias já bem estabelecidas que permitem que as células fúngicas atravessem a barreira hemato-encefálica (BHE) e alcancem o cérebro, causando meningoencefalite (Weksler *et al.*, 2005; Sabiiti e May, 2012). Este processo pode ser facilitado pelo mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia” (Figura 2) em que, através do parasitismo no interior de fagócitos, como monócitos ou macrófagos, as células fúngicas conseguem atravessar a BHE, podendo ocorrer também a expulsão e transferência de células fúngicas entre células de macrófagos (Kronstad *et al.*, 2011). Já é bem estabelecido que *Cryptococcus* pode sobreviver e proliferar-se em macrófagos alveolares, resistindo também ao ambiente adverso encontrado no interior de fagossomos (Kronstad *et al.*, 2011). Além disso, as células das leveduras podem escapar de macrófagos por exocitose não-lítica, ou vomocitose, sem causar danos, tanto para a célula fúngica quanto para a célula fagocítica do hospedeiro. Estudos recentes evidenciaram que outros patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*

e *Toxoplasma gondii* também utilizam leucócitos do hospedeiro para acessar o cérebro (Sabiiti e May, 2012).

Cryptococcus também pode atravessar a BHE por um mecanismo denominado transcitose (Figura 2), no qual atravessa células endoteliais microvasculares (BMECs) que revestem os vasos sanguíneos do cérebro. Após a captação das células fúngicas pelas BMECs, ocorre a transmigração do fungo pelo citoplasma até alcançar o cérebro (Kronstad *et al.*, 2011). Tem sido relatado que várias bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*, *Streptococcus* grupo B, *L. monocytogenes* e o fungo patogênico *Candida albicans*, também utilizam este mecanismo para disseminar-se (Sabiiti e May, 2012). Este mecanismo tem sido amplamente estudado através de modelos *in vitro* da BHE, pelos quais têm sido demonstrado a importância da capacidade das células fúngicas de aderirem e serem internalizadas pelas BMECs, gerando mudanças no citoesqueleto que auxiliam a entrada da levedura no cérebro (Chen *et al.*, 2003). Alternativamente, o modelo paracelular envolve a travessia de *Cryptococcus* através de espaços intercelulares da BHE (Figura 2), onde o patógeno deve danificar e enfraquecer as junções entre as células endoteliais para acessar o cérebro (Kim, 2008; Sabiiti e May, 2012). Em pacientes com HIV/AIDS, a BHE fica mais danificada, inflamada e permeável, o que favorece a invasão do patógeno por este mecanismo (Kim *et al.*, 2003; Jong *et al.*, 2007; Sabiiti e May, 2012).

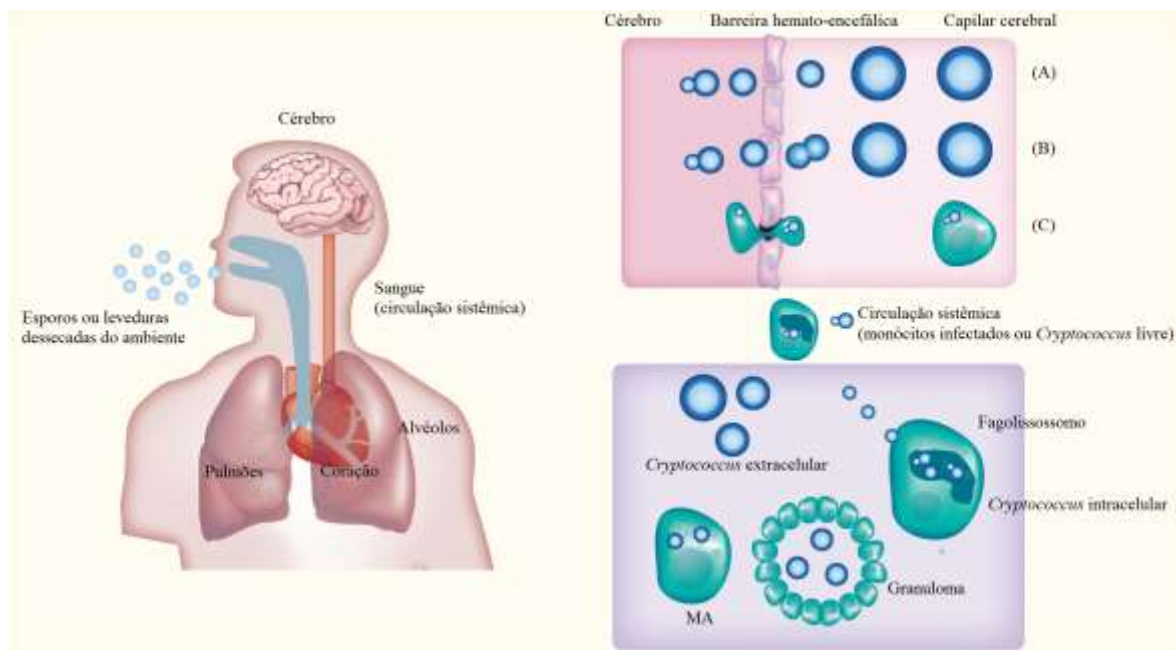


Figura 2: Modelo de disseminação de *C. neoformans*. Através da inalação, esporos ou leveduras dessecadas colonizam o espaço alveolar nos pulmões. Em indivíduos imunocompetentes, macrófagos alveolares ativados (MA) fagocitam e matam ou envolvem as células de *Cryptococcus* em granulomas. No interior de granulomas as células de *Cryptococcus* podem ficar em estágio de latência ou serem reativadas para causar infecção, dependendo do estado imune do indivíduo. As células de *Cryptococcus* podem sobreviver no interior de macrófagos, e através do mecanismo “Cavalo de Tróia”, podem desencadear a disseminação na circulação sistêmica. Na circulação sanguínea, *Cryptococcus* pode então penetrar a barreira hemato-encefálica (BHE) através do (A) mecanismo paracelular, onde as células fúngicas causam danos às células epiteliais, (B) por transcitose, onde as células fúngicas ligam-se ou são internalizadas por células endoteliais do cérebro ou (C) pelo mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”, onde as células fúngicas atravessam a BHE no interior de macrófagos ou monócitos. Figura adaptada de (Sabiiti e May, 2012).

1.1.5. FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS COM *CRYPTOCOCCUS*

O hospedeiro possui diversos mecanismos que têm a função de destruir microorganismos invasores intracelulares e extracelulares. Entretanto, para sobreviver e replicarem-se no hospedeiro, *C. neoformans* e *C. gattii* possuem diversas estratégias para evadir estes mecanismos antimicrobianos e modular a resposta imune (Sabiiti e May, 2012). Esta capacidade para influenciar o ambiente intracelular de macrófagos durante a

proliferação, expulsão e transferência da levedura entre as células hospedeiras é provavelmente dependente da exportação de alguns fatores de virulência fúngicos (Kronstad *et al.*, 2011). A liberação destes fatores de virulência por células fúngicas para o ambiente extracelular pode ocorrer através de vesículas ligadas à membrana que atravessam a parede celular, denominados “sacos de entrega de fatores de virulência”. Diversos estudos têm demonstrado que GXM, GalXM, pigmentos, proteínas e lipídeos são armazenados em vesículas que atravessam a parede celular e são biologicamente ativas, podendo estimular macrófagos (Rodrigues *et al.*, 2008; Casadevall *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010).

Foi recentemente demonstrado que vesículas presentes no sobrenadante de uma cultura de células fúngicas são internalizadas por macrófagos murinos da linhagem imortalizada RAW 264.7 e essas vesículas podem também induzir uma produção dose-dependente de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral TNF- α , interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento (TGF- β). Além disso, foi observado que vesículas de uma linhagem mutante acapsular de *C. neoformans* foi mais efetiva para estimular macrófagos, aumentando a atividade anti-fúngica, do que vesículas de linhagens encapsuladas (Oliveira *et al.*, 2010). Vesículas extracelulares também são produzidas por outros patógenos como *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* e também pela levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo que a secreção de vesículas extracelulares pode ser uma característica de células fúngicas (Oliveira *et al.*, 2010).

1.1.5.1. A CÁPSULA

Cryptococcus produz uma estrutura extracelular composta majoritariamente por dois polissacarídeos complexos, glucuronoxylomanana (GXM) e galactoxylomanana (GalXM), assim como por manoproteínas que formam uma cápsula, estrutura que reveste a superfície da célula da levedura e que também pode ser secretada para o meio extracelular (Zaragoza *et al.*, 2009). O acúmulo e extravasamento do material capsular no fagolisossomo permite a liberação pela levedura de fatores que inativam elementos antimicrobianos intracelulares, facilitam o influxo de nutrientes ou também servem como diluente do conteúdo lisossomal (García-Rodas e Zaragoza, 2012).

A produção da cápsula é o maior fator de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, pois confere ao fungo propriedades anti-fagocíticas, além de também ter envolvimento na modulação da resposta imune do hospedeiro. Linhagens altamente encapsuladas são menos fagocitadas por macrófagos, o que diminui a proliferação de células T e apresentação de antígenos pelos macrófagos, assim como também reduz a disseminação sistêmica (Zaragoza *et al.*, 2009). A expressão da cápsula também protege o fungo de estresse oxidativo quando internalizado na célula hospedeira (Zaragoza *et al.*, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que *C. neoformans* também possui estratégias antifagocíticas independentes da cápsula e envolvem a expressão de proteínas como App1, que inibe a fagocitose através da ligação à receptores do complemento CR2 e CR3, e do fator de transcrição GAT201, cuja deleção gera uma levedura hipocapsulada que é mais susceptível à fagocitose (Chun, Brown e Madhani, 2011).

1.1.5.2. PRODUÇÃO DE MELANINA

A melanina é um pigmento hidrofóbico negativamente carregado com alto peso molecular, produzido pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Casadevall,

Rosas e Nosanchuk, 2000). A produção de melanina, catalizada por uma enzima dependente de cobre denominada lacase, é realizada quando *Cryptococcus* se depara com substrato fenólicos (Casadevall, Rosas e Nosanchuk, 2000; Sibiiti e May, 2012).

A melanina confere ao fungo uma proteção adicional, pois possui propriedades antioxidantes, protegendo-o da morte oxidativa por fagócitos (Sibiiti e May, 2012). Foi demonstrado que células melanizadas foram resistentes à morte por fármacos oxidantes e anti-fúngicos, como Anfotericina B e Caspofungina, respectivamente (Van Duin, Casadevall e Nosanchuk, 2002; Sibiiti e May, 2012).

1.1.5.3. ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Cryptococcus desenvolve-se bem quando há um fornecimento de oxigênio normal e quando encontra-se em vida livre no meio ambiente. Também possui a capacidade de crescer à 37°C, temperatura do corpo humano, e adaptar-se à uma condição de hipóxia, comparado o seu ambiente de vida livre, quando está em ambiente intracelular (Sibiiti e May, 2012). Já foi demonstrado que linhagens mutantes com deficiência em enzimas envolvidas com a biosíntese de esterol, um dos principais componentes da membrana plasmática da maioria dos fungos, foram incapazes de crescer sob condições com pouco oxigênio e foram menos virulentos, já que desta forma o fungo fica mais vulnerável a danos e que a presença de oxigênio é essencial para síntese de ergosterol (Chang *et al.*, 2007). Além disso, é imprescindível que haja um fornecimento de energia adequado para a sobrevivência intracelular da levedura, fato comprovado por dados na literatura que, através de teste com linhagens mutantes com deficiência nos mecanismos de utilização de glicose (deleção de genes que codificam para proteínas com atividade de piruvato quinase

e/ou hexoquinase I e II), mostraram-se menos virulentas em modelo murino de criptococose por inalação (Price *et al.*, 2011).

1.1.5.4. SECREÇÃO DE ENZIMAS

C. neoformans e *C. gattii* produzem enzimas que têm como função degradar membranas e, conseqüentemente, comprometem a integridade da célula hospedeira, auxiliando a disseminação do fungo até o cérebro (Sabiiti e May, 2012). As fosfolipases são um grupo de enzimas capazes de hidrolizar um ou mais ésteres ligados à glicerofosfolipídeos (Wright *et al.*, 2004). A fosfolipase B de *C. neoformans* causa uma desestabilização de membranas e lise celular que estimula a infecção pulmonar e disseminação da levedura (Santangelo *et al.*, 2004). Através da clivagem da dipalmitoil fosfatidilcolina, um dos principais componentes do surfactante pulmonar, a fosfolipase B aumenta a aderência às células epiteliais dos pulmões, aumentando também a fagocitose criptocócica por macrófagos e sua sobrevivência intracelular (Santangelo *et al.*, 2004), assim como também contribui para o aumento na penetração da barreira hematoencefálica (BHE) (Maruvada *et al.*, 2012).

A expressão de proteinases confere a capacidade para degradar proteínas do hospedeiro, incluindo colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento (Chen, Blank e Casadevall, 1996). Juntamente com as fosfolipases, as proteinases causam dano à membrana fagossomal e assim, promovem a replicação de *C. neoformans* no interior de macrófagos, permitindo a levedura escapar da morte por enzimas fagocíticas (Tucker e Casadevall, 2002).

As ureases são enzimas que hidrolisam a uréia à amônia e carbamato e são consideradas um importante fator de virulência em algumas bactérias patogênicas

(Steenbergen e Casadevall, 2003). A urease criptocócica é um importante fator de virulência, pois acredita-se que é necessária durante o processo de invasão da levedura no SNC, que ocorre através da captação da própria levedura para o interior de microcapilares do cérebro (Olszewski *et al.*, 2004). Em estudo utilizando modelo murino de transmigração analisado por microscopia intravital, foi demonstrado que a urease criptocócica é responsável pelo aumento da transmigração da levedura até a BHE (Shi *et al.*, 2010). Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar o papel da urease na disseminação criptocócica.

1.1.5.5. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Em resposta a condições ambientais, as células de *Cryptococcus* podem sofrer diversas alterações morfológicas, como por exemplo a formação de filamentos durante o acasalamento, alargamento da cápsula em resposta a fatores do hospedeiro e expansão do tamanho da célula, formando células gigantes. As células gigantes possuem entre 40 a 50 µm de diâmetro e têm sido amplamente relatadas, podendo formar-se em resposta à alterações na temperatura, por exemplo (Love, Boyd e Greer, 1985). A formação de células gigantes, ou titãs, parece ter papel importante na virulência de *Cryptococcus*, já que a inibição da formação de células titãs resulta na redução da virulência e disseminação em modelo de criptococose em ratos (Crabtree *et al.*, 2012). Estas células também demonstraram ser mais resistentes à fagocitose e ainda são capazes de conferir resistência às células vizinhas de tamanho normal (Okagaki e Nielsen, 2012). O aumento da ploidia, resultante da endoreplicação e formação de células gigantes, sugere que devem ser considerados também mudanças no genoma criptocócico durante a infecção. Esta variabilidade pode influenciar a virulência por alterar a resistência à resposta imune,

progressão da doença, disseminação e latência. Mudanças na ploidia vêm sendo relatados em outros fungos também, influenciando crescimento, expressão gênica e resistência à fármacos anti-fúngicos (Kronstad *et al.*, 2011).

1.1.6. MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DO HOSPEDEIRO

Patógenos fúngicos intracelulares são capazes de alterar o estado do sistema imune do hospedeiro humano para estabelecer a doença, principalmente quando o hospedeiro é imunocomprometido, tendo como exemplo a levedura *C. neoformans* (Kronstad *et al.*, 2011). Entretanto, apesar desta elaborada capacidade da levedura para resistir à internalização por macrófagos, as células hospedeiras também dispõem de diversas estratégias para conter a ação destes microrganismos invasores (Sabiiti e May, 2012).

O reconhecimento inato de fungos por leucócitos é mediado por receptores presentes na superfície celular que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular, levando a indução da resposta protetora do hospedeiro contra o patógeno (Faro-Trindade *et al.*, 2012). Alguns receptores são responsáveis por este reconhecimento, como receptores fagocíticos, que podem ser divididos em opsônicos e não-opsônicos. Os receptores fagocíticos opsônicos são receptores da família Fc, que ligam-se a anticorpos dos macrófagos, como IgG, IgM ou IgA, ou da família de receptores do complemento. Receptores fagocíticos não-opsônicos são os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como Dectina-1 ou receptores de manose, receptores *toll-like* 2 (TLR2), receptores *Nod-like*, entre outros, que são capazes de reconhecer distintos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) na superfície da célula fúngica (Johnston e May, 2013). Componentes da parede celular fúngica, como α -glucanos, β -glucanos e quitinas podem ser reconhecidos por estes receptores. À exemplo disto, a ativação de Dectina-1 através de β -

glucanos da célula fúngica *in vitro* leva a um aumento na atividade fungicida de macrófagos, por mediar a produção de citocinas pró-inflamatórias (Coelho, Bocca e Casadevall, 2013).

Entretanto, a cápsula criptocócica possui propriedades altamente anti-fagocíticas e pode atuar como uma barreira física, escondendo ligantes à PRRs que estão presentes na parede celular fúngica e, desta forma, a opsonização torna-se essencial para que haja a ingestão das células fúngicas *in vitro*. Neste contexto, a presença de anticorpos específicos que agem como opsoninas, possibilitam uma captação mais eficiente de células criptocócicas por macrófagos. Receptores do complemento podem servir como alternativa na ausência de anticorpos específicos, uma vez que um estudo demonstrou que o receptor fagocítico do complemento CR3 pode também ligar-se diretamente à *Cryptococcus* (Taborda e Casadevall, 2002). Além disso, a proteína surfactante D (SP-D) pode agir como opsonina de células criptocócicas pouco encapsuladas, sendo este processo benéfico para o patógeno, já que a deleção de SP-D mostrou-se protetora para camundongos (Geunes-Boyer *et al.*, 2012). Apesar das propriedades anti-fagocíticas da cápsula demonstradas *in vitro*, a ingestão das células fúngicas *in vivo* ocorre rapidamente e ainda não foram definitivamente identificados as opsoninas ou receptores envolvidos (Coelho, Bocca e Casadevall, 2013).

Após a fagocitose, no interior de macrófagos forma-se uma vesícula com uma membrana única e na qual está contido o patógeno, denominada fagossomo, que sofre um processo de maturação, através da fusão de diversas vesículas endocíticas, a fim de produzir um ambiente adverso e antimicrobiano para o patógeno internalizado (Johnston e May, 2013). Para isto, no interior de fagossomos ocorrem algumas transformações, como a acidificação e adição de diversos peptídeos antimicrobianos, proteases e outras enzimas

degradativas, além da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Johnston e May, 2013). Seguido da maturação do fagossomo, ocorre uma fusão com lisossomos antimicrobianos que têm função de degradação, através de enzimas específicas (Johnston e May, 2013). Após, pode ocorrer a autofagia, que pode não ser considerada necessariamente parte do processo fagossomal, mas tem a função de degradar e reciclar componentes celulares no interior de lisossomos (Qin *et al.*, 2011). Para que *Cryptococcus* consiga sobreviver e proliferar no interior de fagossomos, necessita utilizar diversos mecanismos para proteger-se da formação de espécies reativas, como por exemplo através da atividade da proteína criptococócica superóxido dismutase Sod1 que possui atividade protetora contra a toxicidade de íons, como o ânion superóxido que pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Brown, Campbell e Lodge, 2007).

Por sua vez, após a fagocitose, macrófagos alveolares utilizam diversas ações para conter a infecção, tais como a produção de quimiocinas e citocinas, recrutamento de outras células do sistema imune e apresentação de antígenos, em uma combinação de esforços da resposta imune inata e adaptativa (Mcquiston e Williamson, 2012). Neste contexto, a resposta mediada por células Th1 é essencial para a eliminação do fungo nos pulmões. Citocinas associadas às células Th1, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon-*gamma* (IFN- γ) provocam uma ativação clássica em macrófagos, que regula a produção de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina através da enzima NOS2, o que confere ao macrófago elevado potencial fungicida (Olszewski, Zhang e Huffnagle, 2010; Mcquiston e Williamson, 2012). Entretanto, apesar da resposta do tipo Th1 ser predominante, a combinação com a resposta do tipo Th2 também mostra-se importante para uma resposta imune mais eficiente (Coelho, Bocca e Casadevall, 2013). A importância de células Th17 vem sendo estudada, tendo alguns indícios que citocinas associadas, como a interleucina

17 (IL-17) podem ativar macrófagos e limitar a proliferação de células fúngicas internalizadas (Müller *et al.*, 2007).

1.2. CANDIDA ALBICANS

Diversas espécies do gênero *Candida* são conhecidas por serem capazes de colonizar diferentes nichos no corpo humano, sendo colonizadores comuns das cavidades oral, vaginal e intestinal em indivíduos saudáveis (Miramón, Kasper e Hube, 2013). Entretanto, sob condições que favorecem seu crescimento excessivo, *Candida* spp. pode causar doenças que variam de infecções superficiais das mucosas, como candidíase orofaríngea ou vulvovaginal, a infecções que apresentam risco de vida como a candidíase disseminada ou invasiva (Miramón, Kasper e Hube, 2013). O gênero *Candida* spp. compreende cerca de 150 espécies, dentre estas mais de 20 espécies são capazes de colonizar humanos e apenas algumas são responsáveis pela maioria de infecções fúngicas, sendo *C. albicans* a espécie que apresenta maior relevância e virulência (Miramón, Kasper e Hube, 2013).

A levedura *C. albicans* é caracterizada por ter a capacidade de crescer sob a formas de levedura ou forma filamentosa, podendo ser pseudo-hifa ou hifa verdadeira, e também por aderir à superfícies biológicas ou inertes (Sudbery, Gow e Berman, 2004; Miramón, Kasper e Hube, 2013). Esta característica confere a este fungo a capacidade de formação de biofilme, composto tanto da forma levedura quanto filamentosa ligados à uma matriz extracelular e que pode causar alterações na imunidade do hospedeiro (Ganguly e Mitchell, 2011). A formação de biofilme em catéteres ou instrumentos médico-hospitalares pode aumentar a resistência à terapia anti-fúngica, bem como representar uma fonte contínua do

fungo, podendo assim espalhar-se na corrente sanguínea (Taff *et al.*, 2012; Miramón, Kasper e Hube, 2013).

1.2.1. COLONIZAÇÃO VERSUS INFECÇÃO

C. albicans pode colonizar a pele, mucosa genital ou intestinal de 30 a 70% de indivíduos saudáveis e, portanto, sob condições normais, não causa doença (Perlroth, Choi e Spellberg, 2007). Sob estas circunstâncias, *C. albicans* é um membro da microbiota de indivíduos saudáveis, vivendo comensalmente em superfícies mucosas, incluindo trato digestivo e cavidade oral (Dalle *et al.*, 2010). Neste contexto, há um equilíbrio entre a flora microbiana e o tecido epitelial hospedeiro, bem como no seu sistema de defesa imune e outras eventuais condições ambientais (Dalle *et al.*, 2010). Porém, algum distúrbio nesse balanço, ou incapacidade de controlar a sua colonização, pode causar um crescimento descontrolado do fungo e provocar a invasão de *C. albicans* no tecido da mucosa, podendo disseminar para outros órgãos (Pittet *et al.*, 1994; Dalle *et al.*, 2010; Gow *et al.*, 2012). Em consequência desse desequilíbrio, *C. albicans* pode comportar-se como um patógeno agressivo, responsável por infecções superficiais ou graves infecções sistêmicas (Dalle *et al.*, 2010). Em humanos, acredita-se que infecções sistêmicas originam-se predominantemente do trato gastrointestinal, já que podem ser encontradas grandes quantidades do fungo neste local (Nucci e Anaissie, 2001).

Algumas condições podem aumentar a predisposição à *C. albicans*, como infecção por HIV, diabetes, uso de antibióticos ou imunossupressores e pacientes com idades extremas. A candidíase oral pode ser ocasionada pelo uso ou falta de higiene em dentaduras e a candidíase vulvovaginal é considerada comum mesmo em mulheres saudáveis (Moyes e Naglik, 2011; Miramón, Kasper e Hube, 2013). No caso de candidíase

disseminada, os fatores de predisposição incluem colonização do intestino com *C. albicans*, quimioterapia, uso de fármacos imunossupressores, uso prolongado de antibióticos com amplo espectro de ação que alterem a composição normal da microflora intestinal, favorecendo o aumento do crescimento de *C. albicans* (Koh et al., 2008; Miramón, Kasper e Hube, 2013). Também pacientes hospitalizados por tempo prolongado e o uso de catéteres intravenosos aumentam o risco de infecção com *C. albicans*, assim como outras condições associadas a um comprometimento no número de leucócitos e, conseqüentemente, do sistema imune (Miramón, Kasper e Hube, 2013).

Infecções fúngicas estão entre as principais complicações em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados com doenças graves e *C. albicans* é uma das mais importantes e frequentes causas destas infecções oportunistas em todo o mundo, afetando principalmente pacientes com mais de 65 anos de idade (Flevari *et al.*, 2013). A candidemia e candidíase invasiva possuem uma incidência crescente em ambiente hospitalar, tendo uma taxa de mortalidade entre 36 a 63%, dependendo da população de pacientes (Flevari *et al.*, 2013).

1.2.2. FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS COM *CANDIDA*

ALBICANS

A capacidade de *C. albicans* de infectar diversos nichos no ambiente hospedeiro é somente possível devido a algumas características do fungo que agem como fatores de virulência e incluem a transição morfológica entre as formas levedura e hifa, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, formação de biofilme, alterações no fenótipo, secreção de hidrolases e tigmotropismo (Figura 3). Também pode ser considerada como fatores de virulência a capacidade de adaptação à diversas condições ambientais, ou *fitness*,

como alterações do pH, resposta ao estresse e sistema de aquisição de nutrientes (Figura 3) (Mayer, Wilson e Hube, 2013).

1.2.3. DIMORFISMO

C. albicans pode crescer sob forma de levedura, com formato ovóide, ou sob forma filamentosa, como células alongadas com restrições no septo, caracterizando pseudohifas, ou forma hifal (Mayer, Wilson e Hube, 2013). A transição entre a forma levedura para a forma filamentosa é denominada dimorfismo (Figura 3) e acredita-se que os dois tipos morfológicos são importantes para patogenicidade de *C. albicans*, pois embora a forma filamentosa seja amplamente descrita como mais invasiva, a forma de levedura está mais relacionada com disseminação do fungo (Berman e Sudbery, 2002; Saville *et al.*, 2003). Além disso, a formação de hifa pode estar relacionada com a expressão de genes específicos que não somente estão envolvidos com a formação de hifa como também codificam fatores de virulência (Mayer, Wilson e Hube, 2013).

Algumas condições ambientais podem influenciar a alteração da morfologia de *C. albicans*, como por exemplo mudanças no pH, onde em pH abaixo de 6 as células fúngicas crescem predominantemente em forma de levedura e em pH acima de 7 o crescimento hifal é induzido (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Outros fatores também podem estimular o crescimento filamentoso, como a presença de soro ou N-acetilglicosamina, temperatura fisiológica e presença de CO₂ (Sudbery, 2011). Também o *quorum sensing*, mecanismo de comunicação entre células microbianas, parece ter influência neste processo (Hornby *et al.*, 2001).

1.2.4. ADESINAS E INVASINAS

Adesinas são um conjunto de proteínas envolvidas na aderência de *C. albicans* a outros microorganismos, superfícies abióticas ou células do hospedeiro (Figura 3) (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Algumas proteínas associadas à morfologia hifal vêm sendo estudadas, como a família de proteínas com sequência tipo-aglutinina (ALS) cuja proteína Als3 é uma adesina associada à hifa e Hwp1, uma proteínas ligada à GPI associada a hifa, que parece ter papel relevante para aderência de *C. albicans* (Murciano et al., 2012).

Invasinas são um grupo de proteínas que estão relacionadas com o processo de endocitose. *C. albicans* expressa proteínas específicas que medeiam a sua ligação com ligantes do hospedeiro, como por exemplo E-caderina em células epiteliais e N-caderina em células endoteliais, que irão desencadear a internalização das células fúngicas pelas células do hospedeiro (Figura 3) (Dalle *et al.*, 2010; Mayer, Wilson e Hube, 2013). Foram identificadas algumas proteínas que estão envolvidas neste processo, como a proteína Als3, que também pode atuar como adesina (Phan *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010). Entretanto, acredita-se que a penetração direta, ou seja, com o uso de força física da forma hifal, seja determinante para que haja a invasão de *C. albicans* na célula hospedeira. Algumas proteases podem contribuir para esse tipo de invasão, como é o caso de proteases aspárticas secretadas (Saps) (Dalle *et al.*, 2010; Wächtler *et al.*, 2011; Mayer, Wilson e Hube, 2013).

1.2.5. FORMAÇÃO DE BIOFILME

A capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas é um importante fator de virulência de *C. albicans* (Figura 3). A formação de biofilme ocorre após a aderência das células de levedura em uma superfície, onde ocorre então a

proliferação destas células, formação de células hifais na parte superior do biofilme, acúmulo de material em uma matriz extracelular e, por fim, dispersão destas células (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Dentre as superfícies abióticas, as mais comuns são catéteres e dentaduras e as superfícies bióticas mais frequentes são a superfície de células da mucosa (Fanning e Mitchell, 2012). O biofilme confere à *C. albicans* maior resistência à agentes antimicrobianos e fatores da resposta imune do hospedeiro, assim como a dispersão de células a partir do biofilme contribui para a virulência, já que estas demonstraram ser mais virulentas em estudo recente (Uppuluri *et al.*, 2010).

1.2.6. CONTATO SENSORIAL E TIGMOTROPISMO

Para que o fungo tenha a capacidade de adaptação a diversos ambientes, ele dispõe de mecanismos que detectam e estimulam uma resposta a diferentes condições (Figura 3), como pouca disponibilidade de oxigênio, privação de nutrientes e estresse osmótico (Kumamoto, 2008). Para fungos patogênicos e, principalmente, para *C. albicans*, este mecanismo possui grande importância para sua virulência. O contato de *C. albicans* com superfícies bióticas ou abióticas leva a uma resposta ou sinais que desencadeiam uma comunicação entre as células fúngicas induzindo, por exemplo, a transição de levedura à hifa e a formação de biofilme. Em contato com alguns substratos como ágar e superfícies mucosas a hifa pode invadir este substrato, já em superfícies sólidas a formação de biofilme é induzida (Kumamoto, 2008; Mayer, Wilson e Hube, 2013).

1.2.7. SECREÇÃO DE HIDROLASES

Proteases, fosfolipases e lipases são enzimas que são secretadas por *C. albicans* para facilitar a penetração das células hifais do fungo em células do hospedeiro. Estas enzimas

são capazes de causar danos às membranas de células hospedeiras e assim favorecerem a adesão e penetração, aumentando a patogenicidade de *C. albicans*. A família de proteases aspárticas secretadas (Saps) demonstraram ter importância na virulência de *C. albicans* por causarem danos a células epiteliais em estudo *in vitro*. (Gácsér *et al.*, 2007; Mayer, Wilson e Hube, 2013).

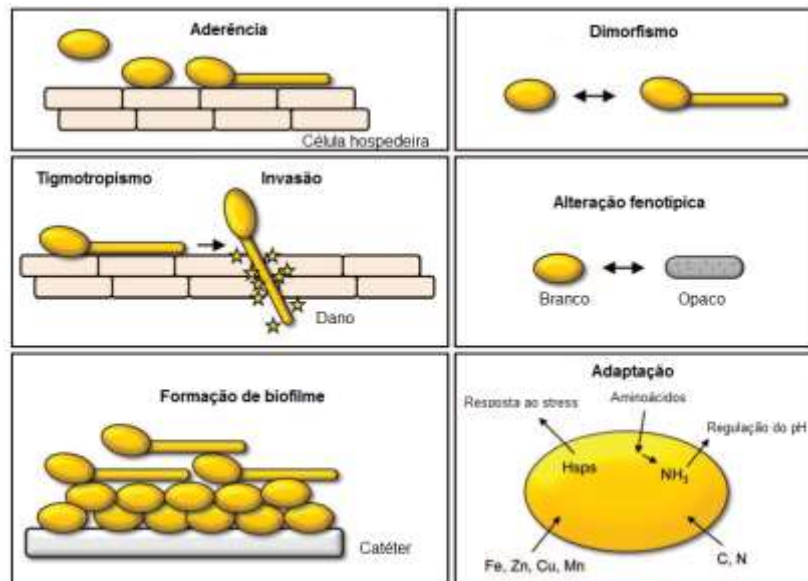


Figura 3. Mecanismos relacionados com a patogenicidade de *C. albicans*. As células de levedura podem aderir à superfície da célula hospedeira, através da expressão de adesinas. O contato com o hospedeiro desencadeia a transição levedura-hifa e o crescimento, através de tigmotropismo. Também a expressão de invasinas desencadeia a captação das células fúngicas pelas células do hospedeiro, através de uma endocitose induzida. Pode ocorrer a ligação das células de levedura a superfícies abióticas (ex. catéteres) e bióticas (ex. células hospedeiras), através da formação de biofilme, contendo células de levedura na parte inferior e células hifais na parte superior do biofilme. A plasticidade fenotípica pode influenciar a formação de biofilme. Além disso, vários mecanismos de adaptação podem influenciar a patogenicidade, como por exemplo a resposta ao estresse, mediada por proteínas *heat shock* (HSPs), auto-indução da formação de hifa, através da captação de aminoácidos e excreção de amônia (NH₃), alcalinizando o meio extracelular, assim como a captação de carbono (C), nitrogênio (N) e metais de transição essenciais, como ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn). Adaptação de (Mayer, Wilson e Hube, 2013).

1.2.8. INTERAÇÃO COM CÉLULAS DO HOSPEDEIRO

A parede celular de *C. albicans* é composta por carboidratos e proteínas que não estão presentes no corpo humano e, desta maneira, pode representar um alvo para o sistema imune. O reconhecimento de microorganismos não-opsonizados por fagócitos é mediado pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na superfície de células do sistema imune, ativando e modulando a resposta imune (Gow *et al.*, 2012; Miramón, Kasper e Hube, 2013). Diversas classes de PRRs têm sido descritas com capacidade de reconhecimento de PAMPs de *C. albicans* como receptores *Toll-like* (TLRs) como TLR2, TLR4 e TLR9, receptores de lectina tipo-C (CLRs) como Dectina-1, Dectina-2, receptor de macrófago de manose 1 (MMR), e receptores *Nod-like*, sendo responsáveis pelo reconhecimento de estruturas microbianas e desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Gow *et al.*, 2012; Miramón, Kasper e Hube, 2013)

A parede celular de *C. albicans* é formada principalmente por duas camadas: a camada interna, que é composta principalmente por polissacarídeos esqueléticos, como quitina e β -1,3-glucano, que conferem força e forma; e a camada externa, que é composta predominantemente por polímeros de manose que podem se associar covalentemente a proteínas, formando glicoproteínas (Gow *et al.*, 2012). A expressão de proteínas da parede celular são reguladas durante a transição levedura-hifa, na qual genes que codificam proteínas hifais específicas são superexpressos (Gow *et al.*, 2012). Apesar da semelhante composição da parede celular entre hifa e levedura, diferenças são importantes, pois podem modular a interação de *C. albicans* com o sistema imune do hospedeiro, impedindo o reconhecimento do fungo por monócitos (Mora-Montes *et al.*, 2011). A quantidade de PAMPs presentes em cada forma de *C. albicans* pode diferir bastante e, desta forma, estas

diferenças podem influenciar significativamente a resposta imune do hospedeiro (Gow *et al.*, 2012).

As células epiteliais da mucosa servem como barreira para patógenos, pois podem reconhecê-los e desencadear uma resposta imune através da produção de citocinas. Entretanto, indivíduos saudáveis são comumente colonizados por *C. albicans*, assim a doença ocorre somente quando o fungo atravessa essas células epiteliais, por endocitose, onde pode ser internalizado por essas células (Dalle *et al.*, 2010). Durante este processo, a morfologia hifal fornece maior eficiência, pois para penetrar em tecidos diretamente deve provocar dano a superfície epitelial (Gow *et al.*, 2012).

C. albicans interage permanentemente com células não-fagocíticas do hospedeiro, tanto no estágio comensal quanto no início da infecção e possui diversos mecanismos para sobreviver e proliferar-se no hospedeiro, sendo capaz de aderir, causar dano e invadir células epiteliais durante infecções orais (Dalle *et al.*, 2010). A invasão das células epiteliais do hospedeiro pode ocorrer através de dois mecanismos, um deles acontece através da força física produzida pela hifa e secreção de enzimas líticas, como proteases aspárticas secretadas (Saps) que podem digerir componentes da superfície de células epiteliais e assim facilitar a penetração da levedura na célula hospedeira, e também pela indução da endocitose das células epiteliais, através da indução da produção de pseudópodos pelas células hospedeiras, que internalizam as células fúngicas (Felk *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Dalle *et al.*, 2010). Além disso, as células do sistema imune, fagócitos como neutrófilos polimorfonucleares, monócitos ou macrófagos e células dendríticas, agem como primeira linha na defesa contra patógenos intracelulares e acredita-se que estas células possuam papel importante durante infecções por *C. albicans* (Miramón, Kasper e Hube, 2013).

Células fagocíticas podem facilmente internalizar *C. albicans* através do mecanismo da fagocitose e, portanto, são essenciais para a resposta imune do hospedeiro durante a infecção. Uma vez no interior destas células, o fungo é exposto à um ambiente desfavorável e antimicrobiano, que é criado através da formação de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos (Frohner *et al.*, 2009; Mayer, Wilson e Hube, 2013). A resposta protetora contra *C. albicans* ocorre principalmente por indução de citocinas Th1, embora um equilíbrio entre as respostas mediada por células T seja mais eficiente durante a infecção, assim como acontece durante a interação com *C. neoformans* (Diez-Orejas e Fernández-Arenas, 2008).

Neste contexto, também é restringido a disponibilidade de nutrientes, o que faz com que o fungo induza diversos mecanismos a fim de subverter estas condições adversas para sua sobrevivência. Em resposta à falta de nutrientes, *C. albicans* pode desencadear a gliconeogênese ao invés da glicólise, como também utilizar lipídeos e aminoácidos como fonte de nutrição (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Para adaptar-se às condições de estresse oxidativo, algumas proteínas agem na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, como as superóxido dismutases Sod1 e Sod5, que estão envolvidas na dismutação de superóxido à peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a catalase Cta1, que converte peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água, e também na detoxificação de espécies reativas de nitrogênio, como a proteína relacionada a flavohemoglobina, Yhb1 (Frohner *et al.*, 2009). Além disso, *C. albicans* pode escapar de macrófagos através da inibição da produção de efetores antimicrobianos e indução da formação de hifa que, pela força mecânica, pode facilitar o escape (Lorenz, Bender e Fink, 2004).

1.3.AQUISIÇÃO DE METAIS: COMPETIÇÃO ENTRE PATÓGENO E

HOSPEDEIRO

Metais de transição são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos, sendo ferro, zinco, cobre e manganês de extrema importância por serem necessários para a função de diversas proteínas e enzimas (Mayer, Wilson e Hube, 2013). Cerca de 30% de todas as proteínas interagem com um metal como cofator, portanto estes elementos possuem grande relevância para a fisiologia celular (Kehl-Fie e Skaar, 2010). A presença de metais é imprescindível para diversos processos celulares e também para a resposta imune de vertebrados porém, patógenos bacterianos e fúngicos também necessitam destes metais para sobreviver e causar doença. Assim hospedeiros vertebrados exploram esta condição, sequestrando estes elementos, em uma estratégia conhecida como imunidade nutricional (Kehl-Fie e Skaar, 2010). Logo, tanto células hospedeiras quanto microorganismos patogênicos evoluíram diversos mecanismos para a aquisição de metais e, assim, garantir sua sobrevivência.

1.3.1. COBRE

O cobre é um metal de transição essencial para a vida aeróbica e é conhecido amplamente pelas suas propriedades antibacterianas, sendo utilizado desde a existência das mais antigas civilizações, para esterilizar água e tratar infecções (Hodgkinson e Petris, 2012; Hood e Skaar, 2012). Mais recentemente, o cobre mostrou-se efetivo contra a contaminação microbiana em diversas superfícies sólidas, o que pode representar uma abordagem para conter a dispersão de infecções em ambientes hospitalares (Casey *et al.*, 2010).

O cobre é essencial para inúmeros processos metabólicos, porém pode ser tóxico em grandes concentrações (Stafford *et al.*, 2013). A tolerância ao cobre em bactérias envolve a expressão de proteínas transportadoras com domínios ATPases que exportam cobre e são necessárias para a sobrevivência destas bactérias à resposta imune inata durante a infecção (Hodgkinson e Petris, 2012). O cobre possui a capacidade de doar e receber elétrons e essa propriedade redox, através da reação de *Fenton*, gera a produção de radicais livres tóxicos, que são capazes de reagir com diversas macromoléculas e, assim, causam danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Hodgkinson e Petris, 2012). Também, o cobre pode romper a estrutura de proteínas, pois há a probabilidade de ligar-se a aminoácidos, propriedade que prejudica principalmente proteínas que contêm grupamentos de ferro-enxofre (Fe-S), pois o cobre pode ligar-se a enxofre na forma de tiolato (Hodgkinson e Petris, 2012). Devido a capacidade de ser tóxico, diversos organismos evoluíram mecanismos altamente regulados para controlar o transporte e concentrações intracelulares do cobre (White *et al.*, 2009).

1.3.2. MECANISMOS DE AQUISIÇÃO DE COBRE

Além de suas propriedades antimicrobianas, o cobre também possui grande importância na resposta imune (Hood e Skaar, 2012). A capacidade do cobre de gerar radicais livres tóxicos está relacionado com o sistema de defesa de células hospedeiras e, neste contexto, torna-se essencial a atividade de proteínas protetoras, como a enzima superóxido dismutase Cu/Zn, que tem o cobre como cofator e, a partir de superóxido, cataliza a formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio em neutrófilos e monócitos, desta forma diminuindo os danos a lipídeos, proteínas e ao DNA (Maggini *et al.*, 2007).

Em mamíferos, o transporte do 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 comumente encontradas em outras proteínas envolvidas na homeostase de cobre (Zhou e Gitschier, 1997). Esta família é composta pelas proteínas CTR1 (SLC31A1), que importa cobre da membrana plasmática para compartimentos endossomais quando há um aumento dos níveis de cobre extracelular, e CTR2 (SLC31A2), que é principalmente expressa na membrana de vesículas intracelulares como endossomos e lisossomos tardios (Zhou e Gitschier, 1997; Stafford *et al.*, 2013). Além disso, o estímulo com a citocina pró-inflamatória IFN- γ pode induzir a expressão destes transportadores (Hood e Skaar, 2012).

Outra proteína envolvida com o metabolismo do cobre é ATP7A, que é uma ATPase tipo P transportadora de cobre, normalmente localizada no complexo do Golgi, responsável por exportar cobre quando as células são expostas a altas concentrações deste íon, podendo também transportar o cobre para o interior de vesículas ou compartimentos intracelulares (Lutsenko, Leshane e Shinde, 2007; Stafford *et al.*, 2013). Acredita-se a ATP7B tenha função bastante semelhante à ATP7A e atue no transporte de cobre em membranas, porém sua expressão ainda não foi relatada em macrófagos primários murinos (Stafford *et al.*, 2013).

A ceruloplasmina (CP) é uma proteína oxidase multi-cobre capaz de ligar-se a 6 átomos de cobre e é amplamente encontrada em vertebrados, localizada predominantemente no plasma (Yang *et al.*, 1986). Mais de 95% do cobre presente no plasma está ligado à CP, logo esta proteína possui grande importância para a homeostase deste metal (Stafford *et al.*, 2013). Além da alta afinidade a cobre, CP também pode atuar como oxidase de ferro, catalizando a oxidação de Fe^{+2} a Fe^{+3} , tendo assim importante papel

na homeostase de ferro também (Osaki e Johnson, 1969). Além disso, vários estímulos pró-inflamatórios, incluindo IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α e lipopolissacarídeo (LPS), induzem a sua síntese (Stafford *et al.*, 2013).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que cobre pode regular a atividade antimicrobiana de macrófagos. Um acúmulo de cobre e ferro foi observado em macrófagos ativados com IFN- γ e TNF- α durante a infecção pela bactéria patogênica intracelular *Mycobacterium avium* (Wagner *et al.*, 2005). Em outro estudo recente, foi demonstrado que em macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com cobre e ativados com IFN- γ houve uma redução da sobrevivência bacteriana durante infecção por *E. coli*. A atividade bactericida foi ainda maior na presença peróxido de hidrogênio e cobre, sugerindo que este efeito pode ser dependente da ação de espécies reativas de oxigênio (White *et al.*, 2009). Este último estudo ainda demonstrou que o tratamento de macrófagos com IFN- γ e LPS induziu a uma maior captação de cobre, mediada pelo aumento da expressão de proteínas transportadoras de cobre CTR1 e ATP7A (White *et al.*, 2009).

Durante a infecção de macrófagos por *Salmonella*, a presença do quelante extracelular de cobre BCS (*bathocupreinedisulfonic acid*) aumentou a sobrevivência intracelular de *S. typhimurium* após 24 horas de infecção, sugerindo que cobre contribui para a defesa efetiva contra este patógeno bacteriano (Achard *et al.*, 2012). Este estudo mostrou também que, durante a infecção, os genes transportadores de cobre *Atp7a*, *Atp7b*, *Ctr1*, *Ctr2* e o gene da proteína ligadora de cobre *Cp* foram regulados positivamente em macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) (Achard *et al.*, 2012). Com base nestes estudos, foi possível elucidar o papel de transportadores e de proteínas ligadoras de cobre na resposta a bactérias (Figura 4).

Entretanto, os mecanismos pelos quais mamíferos regulam a homeostase de cobre durante infecções fúngicas ainda é pouco relatado. O cobre é necessário para o crescimento fúngico, como também é altamente sequestrado por diversos fluidos biológicos e proteínas de mamíferos e, portanto, entende-se que exista uma competição entre o patógeno e o hospedeiro para a aquisição deste metal. Pacientes com AIDS, por possuírem elevados níveis de cobre no soro, encontram-se em desvantagem neste contexto (Waterman *et al.*, 2007).

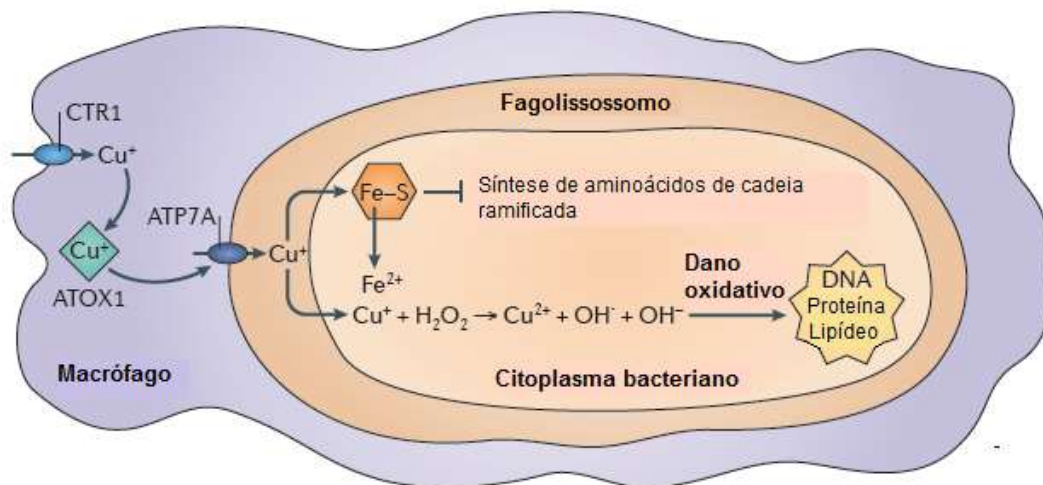


Figura 4: Mecanismos de intoxicação de Cu⁺ no interior de macrófagos infectados por patógeno bacteriano. Após a fagocitose da bactéria, IFN- γ induz a expressão do importador de cobre CTR1. Cu⁺ é ligado por ATOX1 e direcionado para o transportador de cobre fagossomal ATP7A. O acúmulo de Cu⁺ no interior de fagolisossomos contribui para a morte bacteriana, através de diversos mecanismos, incluindo a ruptura de proteínas bacterianas contendo grupamentos Fe-S e também pela produção de espécies reativas de oxigênio. Isto pode levar à inibição de processos metabólicos bacterianos e causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos. Adaptado de (Hood e Skaar, 2012).

Em fungos, a homeostase de cobre foi primeiramente estudada em *S. cerevisiae*, onde este metal pode ser transportado pelos transportadores de cobre de alta afinidade Ctr1p e Ctr3p, que embora possuam diferenças em suas sequências, exercem a mesma função. Esses transportadores estão localizados na membrana plasmática e são induzidos em condições de limitação de cobre. Também, Ctr2p representa um transportador de cobre alternativo, que atua no transporte deste metal na membrana de vacúolos para o citosol e, além disso, as metalotioneínas Cup1p e Cup2p podem participar na detoxificação de cobre em *S. cerevisiae* (Silva, M. G. et al., 2011).

A homeostase de cobre é essencial para o fungo patogênico *C. neoformans* porque este metal é um cofator para proteínas como a enzima dependente de cobre lacase e a superóxido dismutase Cu/Zn que, neste fungo, atuam como importantes fatores de virulência. Também, o cobre pode afetar a homeostase de ferro, pois é necessário para o transportador de ferro de alta afinidade Fet3 (Waterman *et al.*, 2007). Em recente estudo foi caracterizado o papel do fator de transição dependente de cobre Cuf1, através da homologia com Cuf1 de *S. cerevisiae*, que contém um domínio de ligação a cobre rico em cisteína na sua porção C-terminal (Waterman *et al.*, 2007). A deleção de Cuf1 em *C. neoformans* ocasionou defeitos no crescimento e em fatores de virulência do fungo. Ainda, o transportador CTR4 de *C. neoformans* mostrou-se ser altamente ativado por Cuf1 em condições de limitação deste metal e por isso foi utilizado como uma importante estratégia para verificar a disponibilidade de cobre para o fungo, quando internalizado em macrófagos (Waterman *et al.*, 2007). Além disso, foi recentemente caracterizado o transportador de cobre CTR2 de *C. neoformans* que, quando deletado, ocasionou um aumento na sensibilidade à privação de cobre, reduzida melanização e produção da cápsula e aumento da fagocitose por macrófagos (Chun e Madhani, 2010). Um quelante de cobre, a

microplusina, demonstrou ter atividade fungistática *in vitro* contra *C. neoformans*, diminuindo a disponibilidade de cobre para a levedura e, assim, afetando dois importantes fatores de virulência: a formação de cápsula e melanização. Embora possa apresentar potencial terapêutico contra criptococose, estudos *in vivo* são essenciais para corroborar a eficiência da microplusina, como também para determinar o efeito deste tratamento para o hospedeiro (Silva, F. D. *et al.*, 2011). Em *C. albicans*, ATPases tipo P, codificadas pelo gene CRD1, e metalotioneínas, codificadas pelo gene CUP1, estão relacionadas com a resistência à cobre, quando há um excesso deste metal, entretanto ainda existem poucos relatos de mecanismos pelos quais *C. albicans* mantém a homeostase de cobre (Riggle e Kumamoto, 2000). Entretanto, os mecanismos pelos quais hospedeiros mamíferos regulam a homeostase de cobre durante infecções fúngicas ainda é pouco descrito.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar a influência da disponibilidade do cobre na modulação da atividade antifúngica de macrófagos.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade anti-fúngica de macrófagos contra *C. neoformans* e *C. albicans* frente à disponibilidade de cobre;
- Avaliar a concentração de cobre em células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans* e *C. albicans*;
- Avaliar quantitativamente a expressão de transportadores de cobre em células de macrófagos contendo células internalizadas de *C. neoformans* e *C. albicans*.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos no período de mestrado encontram-se apresentados em manuscrito intitulado “*Modulation of copper homeostasis in macrophages infected by fungal pathogens*”, formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *BIOMETALS*. Para facilitar a análise, as figuras e suas respectivas legendas estão apresentadas junto ao corpo do texto.

Modulation of copper homeostasis in macrophages infected by fungal pathogens

Karoline Flach¹, Natully de Souza Süffert Fogaça¹, Rafael de Oliveira Schneider¹, Augusto Schrank^{1,2}, Marilene Henning Vainstein^{1,2}, Charley Christian Staats^{1,2,*}.

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

* Corresponding author: Charley Christian Staats (staats@cbiot.ufrgs.br). Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

ABSTRACT

Pathogenic yeasts, such as *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, are one of the most frequent causes of the opportunistic infections worldwide, being able to survive, proliferate and escape from macrophages, the first line cells engaged in the immune defense of the mammalian host. Macrophages generally expose the intracellular pathogen to a toxic environment, which is characterized by acid pH, presence of reactive species, as well the presence of antimicrobial peptides. In this context, there is a competition between intracellular pathogen and mammalian host for essential nutrients, such as transition metals. Copper is an essential transition metal for aerobic life, but can be toxic at high concentrations and, therefore, many organisms have evolved highly regulated mechanisms for controlling their concentrations. In this work, we aim to evaluate a modulation of copper homeostasis during interaction between macrophages and *C. neoformans* or *C. albicans* cells. This work demonstrated that the presence of copper resulted in a lower fungicidal activity of macrophages infected. Also, the pre-loading of fungal cells with copper can alter the sensitivity of both pathogenic yeasts to an antifungal activity. In addition, we showed that the expression of macrophage copper transporters (CTR1 and ATP7A) or copper-binding proteins, (ceruloplasmin and metallothionein 1) is modulated in response infection by pathogenic fungi. However, this regulation may involve more complex mechanisms, such as strategies of pathogen to subvert the antimicrobial action of macrophages.

Keywords: fungal pathogens, macrophages, copper, copper transporters.

INTRODUCTION

Fungal infections are among the major complications in immunocompromised or hospitalized patients, with *C. neoformans* and *C. albicans* the most important and frequent causes of these opportunistic infections worldwide (Cogliati, 2013; Flevari *et al.*, 2013). *C. neoformans* is the etiological agent of meningitis cryptococcosis, responsible disease for approximately 1 million cases each year worldwide, with high mortality rates and is often associated with HIV/AIDS (Park *et al.*, 2009). The human infection is initiated by the inhalation of infectious propagules that are widely dispersed in the environment to reach the respiratory tract, may cause respiratory disease, or can cross the blood brain barrier and spread to the brain, causing meningoencephalitis, the more severe form of the disease (Antinori, 2013). *C. albicans* can colonize the skin, genital and intestinal mucosa, from 30 to 70% of healthy individuals and therefore, under normal conditions, does not cause disease (Perlroth, Choi and Spellberg, 2007). However, under conditions favoring its overgrowth, *C. albicans* can cause disease, ranging from superficial infections of the mucous membranes, such as oropharyngeal or vulvovaginal candidiasis infections to life-threatening disease present as disseminated or invasive candidiasis (Miramón, Kasper and Hube, 2013). *C. albicans* is dimorphic yeast which has the ability of adhering to biological or inert surfaces by the biofilm formation and this feature may be responsible for contamination in catheters or medical and hospital instruments, can cause an increase resistance to anti-fungal therapy, as well as represent a continuous source of the fungus and, thus, can spread into the bloodstream (Sudbery, Gow and Berman, 2004; Taff *et al.*, 2012; Miramón, Kasper and Hube, 2013).

Despite some differences, *C. neoformans* and *C. albicans* are intracellular fungal pathogens that are able to survive, proliferate and escape from macrophages, the first line

cells engaged in the immune defense of the host during infection. After phagocytosis, a vesicle which is contained the pathogen is formed, named phagosome, which undergoes a process of maturation to produce an unfavorable and antimicrobial environment to the internalized pathogen. The phagosomal maturation process leads to the acidification and addition of various antimicrobial peptides, proteases and other degradative enzymes, beyond the production of reactive oxygen and nitrogen species (Frohner *et al.*, 2009; Johnston and May, 2013; Mayer, Wilson and Hube, 2013). Also, among the strategies used to hamper pathogen development, figure out the restriction of the availability of transition metals, as iron, zinc, copper and manganese, which are essential for the survival of all living organisms (Mayer, Wilson and Hube, 2013). Fungal pathogens have various mechanisms related to the transport and metabolism of these metals, due to the importance of these metals to various virulence factors and pathogenicity of fungi. However, host cells evolved several strategies to modulate the availability of these metals during infection and thus contain the proliferation and survival of intracellular pathogens, a mechanism known as nutritional immunity. In mammalian host, molecules such as hemoglobin, ferritin and transferrin, bind with high affinity and to make the availability of free iron is very low (Schaible and Kaufmann, 2004; Sabiti and May, 2012). Additionally, in murine macrophages, a protein carrier of protons and divalent metals, known as NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1), which is located in late endosomes or lysosomes and phagosomal membranes, plays the role of iron export, suggesting that phagocytes can use the deprivation of iron as a bactericidal mechanism (Botella *et al.*, 2012).

Copper is a transition metal essential for aerobic life and it is widely known for their antibacterial properties, being used, since the existence of the most ancient

civilizations, to sterilize water and treat infections (Hodgkinson e Petris, 2012; Hood and Skaar, 2012). This metal is important for many metabolic processes, but can be toxic at high concentrations, because it has the ability to donate and accept electrons and, consequently, the production of toxic free radicals, which are capable of reacting with various macromolecules and thus, cause damage to lipids, proteins and nucleic acids (Hodgkinson and Petris, 2012). Due to the ability to be toxic, many organisms have evolved highly regulated mechanisms for controlling the transport and intracellular copper concentrations (White *et al.*, 2009). Several studies have shown that copper regulate antimicrobial activity of macrophages. Macrophages pre-treated with copper led to a reduction in survival of phagocytized *Escherichia coli* (White *et al.*, 2009). During infection of macrophages to *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium, the presence of BCS (bathocupreinedisulfonic acid), an extracellular copper chelator, increased survival of bacteria 24 hours after infection, suggesting that the copper contributes to the effective defense against this bacterial pathogen (Achard *et al.*, 2012).

However, the mechanisms by which mammalian hosts regulate copper homeostasis during fungal infections are poorly described. In this context, this work aims to evaluate the influence of the availability of copper in the modulation of antifungal activity of macrophages against *C. neoformans* and *C. albicans*.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture media.

The *C. neoformans* H99 and *C. albicans* ATTC 18804 strains were used in this work. These strains were grown in YPD medium (20 g/L of glucose, 20 g/L peptone and 10 g/L yeast extract) and incubated in shaking (200 rpm) at 30 °C for at least 20 hours. The

cell line J774.1 of murine macrophages were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES buffer, MEM non-essential amino acids 1X, penicillin 20 U/ml, streptomycin 20/ml and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 7.5% of CO₂.

Evaluation of the viability of macrophages in the presence of copper or copper chelator.

The evaluation of living cells was performed by colorimetric measurement using the reduction of methyl-thiazolyl tetrazolium (MTT), according to previously described methodology (Morgan, 1998). Macrophages were cultured in 96-well plate containing DMEM with increasing concentrations of 1, 10, 50, 100, 500 and 1000 µM of CuSO₄, or copper chelator (BCS) and incubated for 24 hours at 37 °C and 7.5 % CO₂. In the control condition, the macrophage cells were incubated only in the culture medium without the addition of CuSO₄ or BCS. After incubation, the cells were washed with PBS and incubated with MTT (100 µg/mL in water) for 3 hours at 37 °C and 7.5 % CO₂. The MTT was removed and DMSO was added to dissolve the formazan crystals for determination of the absorbance in a plate spectrophotometer (Spectramax M5) at wavelengths of 560 nm and 670 nm (background).

Evaluation of antifungal activity of macrophages during infection with *C. neoformans* or *C. albicans* in the presence of copper and copper chelator.

To assess the effect of the presence of copper or BCS copper chelator on antifungal activity of macrophages, phagocytosis assays were performed according to previously described (Nicola and Casadevall, 2012) with some adaptations. J774.1 macrophages were

grown in 96-well plate containing DMEM and induced with 0.5 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml of interferon-gamma (IFN- γ) for 16 h. *C. neoformans* or *C. albicans* cells were grown in YPD medium for 16 h and washed with PBS. *C. neoformans* was opsonized with 18-B7 antibody (10 µg/ml) which recognizes GXM, the major component of the capsule polysaccharide, for 1 hour at 37 °C. After, yeast cells were independently added in a 10:1 ratio among with IFN- γ and LPS to the 96-well plate containing macrophages in DMEM medium. The interaction was performed containing concentrations of copper (CuSO₄) or/and copper chelator (BCS). After distinct times of interaction, the wells were washed with PBS to remove non-phagocytosed yeast cells and macrophages were lysed with ice cold water. The lysate was diluted and plated on solid YPD to determine the number of colony forming units (CFU).

Evaluation of the phagocytosis index of *C. neoformans* or *C. albicans* by macrophages in the presence of copper or copper chelator.

Macrophages cells were cultured in 96-well plate containing DMEM and induced with 0.5 µg/ml LPS and 100 U/ml IFN- γ). *C. neoformans* or *C. albicans* cells were grown in YPD medium, washed with PBS and *C. neoformans* was opsonized with 18-B7 antibody (10 µg/ml). After, the fungal cells were washed with PBS and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) 500 µg/mL in PBS and inoculated at a ratio 10:1 with macrophages cells. The interaction was performed in DMEM containing IFN-γ and LPS, according to previously described protocol (Nicola and Casadevall, 2012) with adaptations. After 2 hours of interaction, the wells were washed with PBS to remove non- phagocytosed *C. neoformans* or *C. albicans* cells. Trypan blue was added to the wells, at a final concentration of 400 mg/mL, to block the fluorescence emission from the fungal cells are

not internalized, given that the viable cells of macrophages containing fungal cells internalized are not permeable to this dye (White-Owen *et al.*, 1992). Reading and quantification of fluorescence of the wells with PBS or trypan blue were performed on the equipment Spectramax M5 (λ excitation of 494 nm and λ emission of 518 nm). The phagocytosis index was calculated from the ratio of the number of fungal cells phagocytosed on total number of fungal cells, according to previously described (Saleppico *et al.*, 1999).

Evaluation of the influence of pre-loading of fungal cells with copper in sensitivity of *C. neoformans* or *C. albicans* to antifungal activity of macrophages.

Macrophages cells were cultured in 96-well plate containing DMEM and induced with 0.5 mg/ml LPS and 100 U/ml IFN- γ . *C. neoformans* or *C. albicans* cells were pre-incubated in YPD medium containing concentrations of CuSO₄ or CuSO₄ and BCS. After, the interaction of macrophages cells with fungal cells occurred as described above. For evaluation of anti-fungal activity was determinate the number of colony forming units (CFU) and the phagocytosis index was calculated from the quantification of fluorescence of the cells with PBS or Trypan Blue, as previously described.

Quantitative evaluation of the expression of copper transporters and copper-binding proteins in macrophage cells containing fungal cells internalized.

The phagocytosis assays were performed as above described. After 2, 6 or 24 hours of interaction, RNA from macrophages was isolated with Trizol® reagent according to manufacturer's recommendations. After the cDNA synthesis, the real-time PCR was performed. The results were processed according to the $2^{-\Delta Ct}$ method (Livak and

Schmittgen, 2001). The expression of two copper transporters (CTR1 and ATP7A) and two copper-binding proteins (ceruloplasmin and metallothionein 1) were evaluated in macrophages cells, and their relative transcript levels were normalized with GAPDH transcript levels. The primers are described in Table 1.

Table 1. Primers used in qRT-PCR reactions

Primer	Sequence (5' - 3')	NCBI Gene ID
GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	14433
GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
CTR1-F	TGATGATGATGCCTATGACC	20529
CTR1-R	ATGCTGACTTGAGACTTTCG	
ATP7A-F	AAGAGGGCACCTAGTTTCC	11977
ATP7A-R	TTGTGTGGCTGTATATGTCC	
Metallothionein 1-F	AAGAGTGAGTTGGGACACCTT	17748
Metallothionein 1-R	CGAGACAATACAATGGCCTCC	
Ceruloplasmin-F	CTTAGCCTTGGCAAGAGATAAGC	12870
Ceruloplasmin-R	GGCCTAAAAACCCTAGCCAGG	

Evaluation of the influence of active metabolism of *C. neoformans* in the expression of copper transporters and copper-binding proteins in macrophages cells during infection.

To evaluate whether the basal metabolism of *C. neoformans* altered the expression of copper transporters and copper binding protein ceruloplasmin, the *C. neoformans* cells were killed at 55°C for 30 minutes before the interaction with macrophages cells. *C. neoformans* cells were grown in YPD medium and, after 20 hours, were washed with PBS and opsonized with 18-B7 antibody (10 g/ml) for 1 hour at 37 °C. After, the fungal cells were killed at 55°C for 30 minutes and then, inoculated at a ratio 10:1 with macrophages

cells. The heat-killed *C. neoformans* and macrophages cells was added to 0.5 mL for each well of a 24-well plate and co-incubated for 2 and 24 hours and the interaction was performed in DMEM containing IFN- γ and LPS, at 37 °C with 7.5 % CO₂, as described below. RNA from macrophages was isolated with Trizol®, as above described. The quantitative assessment of relative transcript levels were conducted by qRT-PCR, as above described.

Quantification of copper concentration in macrophages during infection with *C. neoformans* cells.

The phagocytosis assays were performed according to previously described protocol (Nicola and Casadevall, 2012) with adaptations. J774.1 macrophages were grown in 96-well plate containing DMEM and induced with 0.5 mg/mL of lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml of interferon-gamma (IFN- γ). *C. neoformans* cells were grown in YPD medium. After 20 hours, *C. neoformans* cells were opsonized with 18-B7 antibody (10 μ g/ml) for 1 hour at 37 °C and then killed at 55°C for 30 minutes. The heat-killed *C. neoformans* cells was co-incubated with macrophages in a ratio 10:1 (for each macrophage cell are inoculated 10 fungal cells) in DMEM medium with LPS and IFN- γ in 0.25 mL for each well of a 24-well plate for 2 and 24 hours. The wells were washed with PBS solution and lysed (62 mM Tris-HCl, 2% SDS and 1 mM EDTA). After, the extract was centrifuged at approximately 18000 g and 4°C for 10 minutes and the supernatant was transferred to a new tube. After preparation of the samples, they were, through providing service, sent to Instituto de Química-UFRGS in Porto Alegre, RS – Brasil. The samples were homogenized and diluted and then, the copper content was quantified in atomic absorption (AA) spectrometer with graphite furnace.

Statistical Analyses.

Values are expressed as mean \pm standard deviation of replicates. Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 6 software. The Student's *t*-test or One-way ANOVA (with Tukey post-test) was employed to test for significance between values. *P*-values \leq 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Previous reports emphasize the importance of copper in macrophage-pathogen interactions (Botella *et al.*, 2012; Hodgkinson and Petris, 2012; Stafford *et al.*, 2013). To verify whether the presence or depletion of copper could be affecting the macrophage antifungal activity, we first performed macrophage viability assays to determine if copper or the copper chelator BCS could be toxic to the mammalian cells. Through the metabolic activity of viable cells in the presence of concentrations of copper or BCS copper chelator, we could observed that only concentrations up 500 μ M of CuSO₄ or BCS resulted in a potent cytotoxic effect, suggesting that high concentrations of copper or copper chelator can lead to death of the macrophages (Fig.1). The control condition, with only macrophages cells in the culture medium, was considered having 100% of viability and conditions with added copper or BCS having viability relative to control. Although concentrations until 50 μ M of CuSO₄ have caused a slight decrease in the viability of macrophages, the effect was not so pronounced as that observed for higher concentrations (Fig. 1).

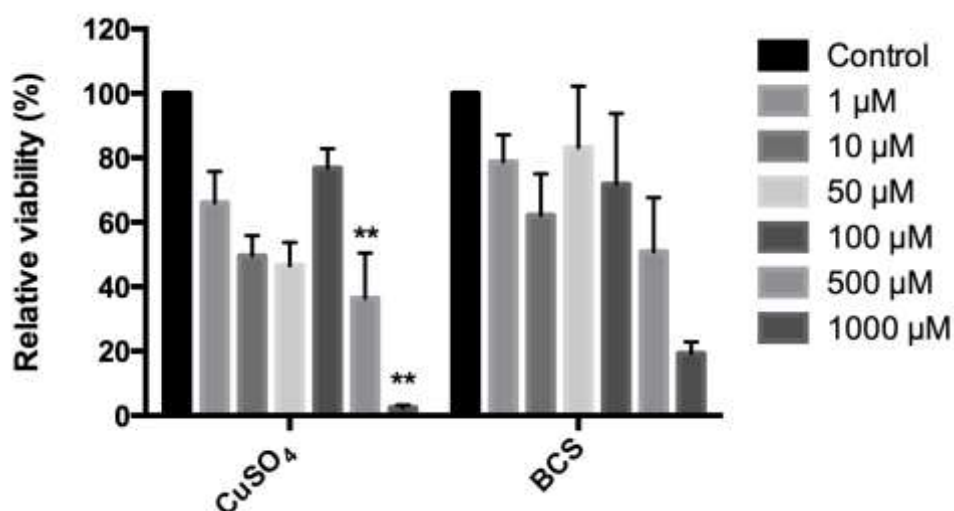


Fig. 1: Proper copper concentrations are necessary for cell viability.

Relative viability of macrophage cells by MTT reduction assay. Macrophages concentration was adjusted to 1.10^6 cells/ml and 100 μ l of the macrophage suspension was added to each well of a 96-well plate. After 20 hours, the macrophages were incubated with 1, 10, 50, 100, 500 and 1000 μ M of CuSO₄ or BCS and incubated for further 2 hours. Cells were washed with PBS solution and MTT reduction reagent was added. After 3 hours of incubation, the formazan crystals were dissolved in 200 μ L of DMSO and the A₅₆₀ determined. Results obtained from 3 biological replicates.

Some previous studies have demonstrated that copper influence the antimicrobial activity of macrophages, causing a bactericidal effect in macrophage infected by pathogenic bacteria *E. coli* or *S. enterica* (White *et al.*, 2009; Achard *et al.*, 2012). To evaluate whether the presence of copper may influence the antifungal activity of macrophage cells, an initial phagocytosis assay was performed with *C. neoformans* and J774.1 murine macrophages cells in the presence of copper or the copper chelator BCS. The presence of copper resulted in a lower fungicidal activity of macrophages, as a greater number of colony forming units (CFU) could be recovered from macrophages treated with 100 μ M of CuSO₄. This decrease in antifungal activity was reversed by the addition of BCS extracellular copper chelator (Fig. 2). These results suggest that the limitation of the

availability of copper in macrophages may contribute to hamper *C. neoformans* development inside macrophages.

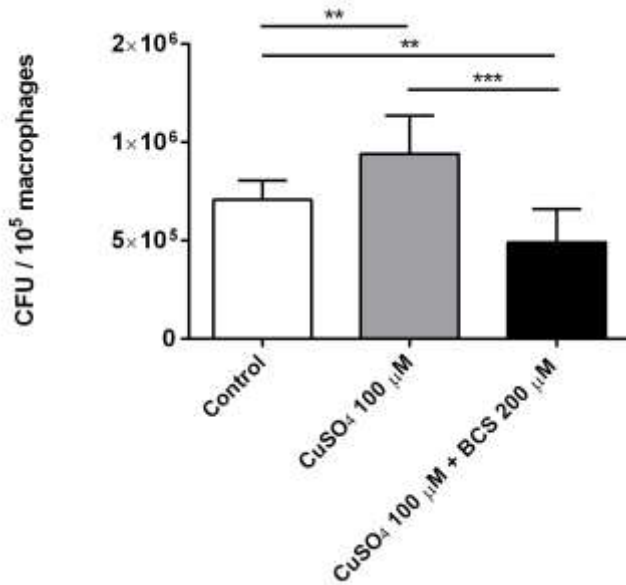


Fig. 2: The presence of copper influences the antifungal activity of macrophages. Macrophages concentration was adjusted to 1.10^6 cells/mL and 100 μ L of the macrophage suspension was added to each well of a 96-well plate. After 20 hours, 100 μ L of a suspension of *C. neoformans* 2.10^7 cells/mL were added to each well of plate. In addition, 100 μ L of the suspension with 100 μ M of CuSO₄ or with 100 μ M of CuSO₄ and 200 μ M of BCS were added. After 24 hours of interaction, the plate was washed with PBS solution, lysed with cold H₂O milliQ and plated in YPD solid medium for CFU determination. Statistical analysis by Student's *t*-test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Given that we found that the presence of copper reduce the antifungal activity of macrophages during interaction with *C. neoformans* cells, we investigated whether this effect also could occur during infection with other pathogenic fungus, such as *C. albicans*, and if even copper concentrations would produce the same effect. The antifungal activity of macrophages during interaction with cells of *C. neoformans* or *C. albicans* was reduced in concentrations of CuSO₄ as 1 μ M (Fig. 3a). This reduction of antifungal activity was most prominent during infection with *C. albicans*, an effect clearly reversible with the

addition of 1.5 μM of the copper chelator BCS (Fig. 3b). However, during the interaction with *C. neoformans*, 1.5 μM of BCS unexpectedly failed to reverse this effect, a fact which may be related with addition of a low concentration of BCS in this condition (Fig. 3b). The presence of 10 μM of CuSO_4 was more effective in reduction of the antifungal activity of macrophages during infection with both pathogenic yeasts and the addition of 15 μM of BCS clearly reversed this effect, suggesting that even low concentrations of copper may influence antifungal activity of macrophages during infection with *C. neoformans* or *C. albicans* (Fig. 3a and 3b).

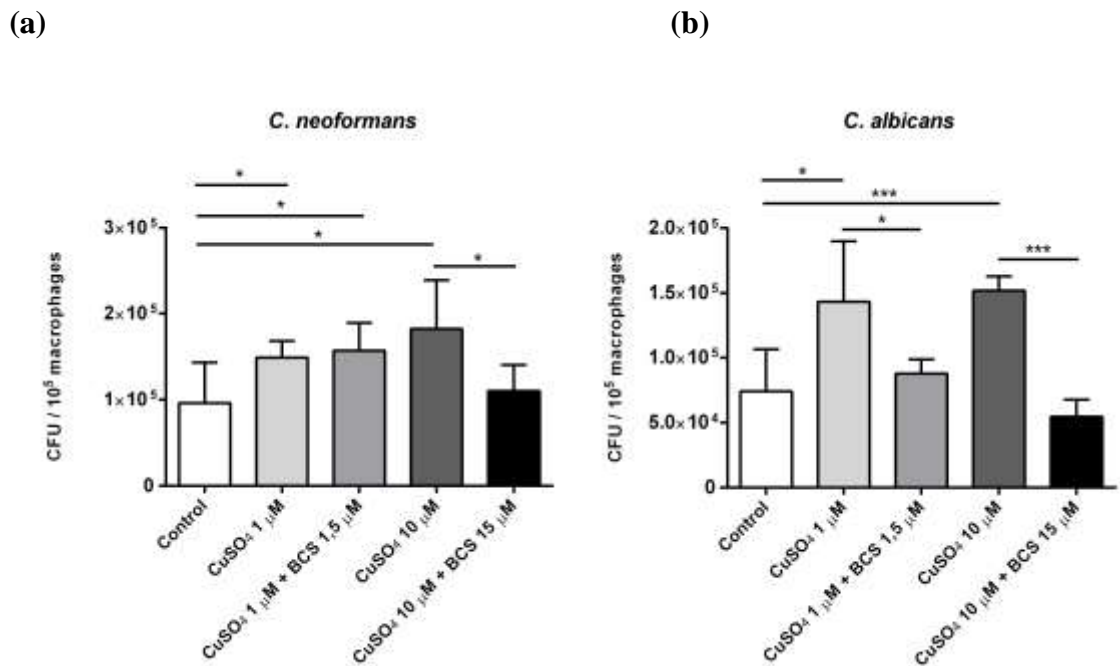


Fig. 3: The presence of a minimum amount of copper can influence the antifungal activity of macrophages. Macrophages concentration was adjusted to 1.10^6 cells/mL and 100 μL of the macrophage suspension was added to each well of a 96-well plate. After 20 hours, 100 μL of a suspension of (a) *C. neoformans* or (b) *C. albicans* with 2.10^7 cells/mL was added to each well of plate. In addition, 100 μL of 1 μM CuSO_4 , 1 μM CuSO_4 plus 1.5 μM of BCS, 10 μM of CuSO_4 or 10 μM of CuSO_4 plus 15 μM of BCS were added. After 2 hours of interaction, the plate was washed with PBS solution, lysed with cold H_2O milliQ and plated in YPD solid medium for CFU determination. Statistical analysis by *Student's t-test*. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

To verify if the increase in the number of fungal cells recovered by CFU from macrophages in the presence of copper during infection with *C. neoformans* and *C. albicans* was due to decreased antifungal activity of macrophages or whether was influenced by the number of phagocytosed cells, we determined the phagocytosis index in the presence of the same concentrations of CuSO₄ and BCS for 2 hours. The fluorescence of the internalized fungal cells, labeled with FITC, was quantified by the aid of the FITC quencher Trypan Blue, which blocked the fluorescence of fungal cells not internalized. The phagocytosis index was then determined by the ratio between the fluorescence of fungal cells internalized and the fluorescence of total yeasts cells. Only concentrations of 10 µM of CuSO₄ or 10 µM of CuSO₄ plus 15 µM of BCS caused an unexpected decrease in the phagocytosis index during the interaction with *C. neoformans* compared with control and other conditions (Fig. 4a). However, we could not observe any significant difference between the addition of only CuSO₄ and CuSO₄ plus BCS during interaction with both pathogenic yeasts, using 1 µM of CuSO₄ or 1 µM of CuSO₄ plus 1.5 µM of BCS, suggesting that the presence or limitation of copper does not cause a different influence on the phagocytosis index of fungal cells by macrophages during infection with *C. neoformans* and *C. albicans* and thus does not mask antifungal activity effect shown above (Fig. 4a and b).

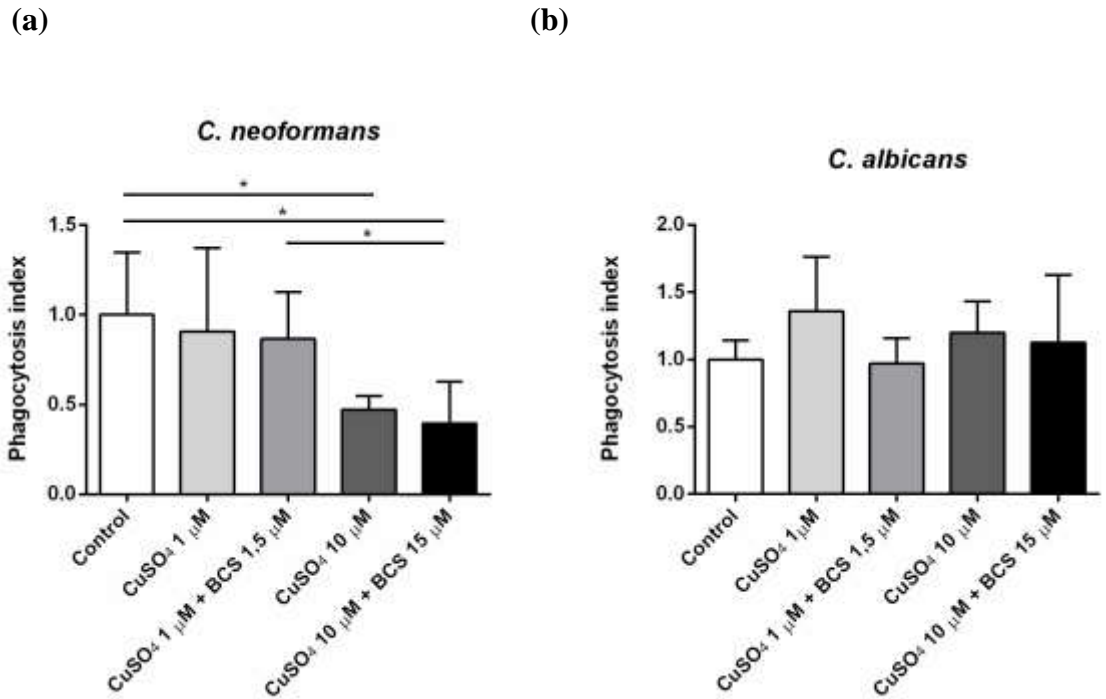


Fig. 4: Copper availability do not influence the phagocytosis index. *C. neoformans* or *C. albicans* cells were cultured in YPD medium and stained with 0.5 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC). Macrophages (1.10^5 cells) and (a) *C. neoformans* or (b) *C. albicans* (1.10^6 cells) per well were co-incubated for 2 h. To determine only intracellular yeast cells, fluorimetric analysis were conducted with Trypan Blue (0.1 mg/ml) at $\lambda_{em}=494$ nm and $\lambda_{ex}=518$ nm. Nine distinct fields were evaluated in each well. Bars represent the mean of three biological replicates. Statistical analysis by *Student's t-test*. * $P < 0.05$.

Although the excess of copper has caused a bactericidal effect in previous studies (White *et al.*, 2009; Achard *et al.*, 2012), the limitation of metals, in particular zinc, was shown to be used as a defense strategy by macrophages against the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* (Winters *et al.*, 2010). It is also known that the excess of copper may be toxic due to its redox properties to donate and receive electrons, producing free radicals which are capable of reacting with various macromolecules and cause damage lipids, proteins and nucleic acids (Hodgkinson and Petris, 2012). In addition, copper is very important for the pathogenicity of *C. neoformans*, as a cofactor for important virulence factors, such as copper-dependent enzyme laccase and superoxide dismutase

Cu/Zn. Copper also affect the iron homeostasis, being necessary for Fet3 the iron transporter of high affinity (Waterman *et al.*, 2007). Therefore, it is coherent to suppose that, during infection by *C. neoformans*, an environment of competition between the pathogen and the host for the availability of copper is created and that the restriction of copper can harm the survival of the fungus within macrophages. Consistent with our results, the regulatory system of copper in *C. neoformans* regulated by copper-dependent transcription factor 1 (Cuf1), activates the expression of the copper transporter CTR4 of *C. neoformans* in response to a condition of deprivation of this metal within macrophages infected by the fungus (Waterman *et al.*, 2007). These data support the hypothesis that, during infection with *C. neoformans*, in fact there is a limitation of copper within phagocytic cells to contain the survival of the fungus and thus, that supplementation with copper leads to a decrease of the antifungal activity of macrophages.

In addition to the importance of copper to the pathogenicity of *C. neoformans*, *C. albicans* also has a system of copper uptake, which is mainly mediated by CaCTR1, controlled by the transcription factor CaMac1p, which is required for copper uptake in *C. albicans* in response to low concentrations of copper in the medium (Marvin, Mason and Cashmore, 2004). The deletion of these genes led to slower growth of the yeast and a smaller production of hyphae, suggesting that the uptake of copper is important for the pathogenicity of *C. albicans* (Marvin, Mason and Cashmore, 2004). Therefore, it is possible to consider the limitation of copper may serve as a strategy to contain the spread of both *C. neoformans* and *C. albicans*.

The affinity of the BCS to copper may represent, at some point, a limitation in this context, since the ability to reverse the effect of adding copper in the medium can be influenced by the ability of chelating other metals and also by the importance of

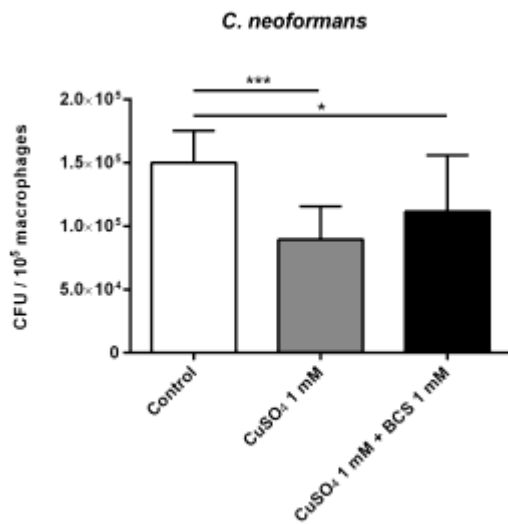
homeostasis of these other metals, such as iron, for antifungal activity during macrophage infection. However, BCS is an extracellular copper chelator that has been described as a high-affinity copper chelator in a wide range of pH in the environment, compared to the other copper chelators (Říha *et al.*, 2013). Thus, has been widely used in *in vitro* studies to evaluate copper homeostasis.

To rule out that the differences in copper concentrations could be causing a deregulation in the production of nitric oxide, a potent mediator of innate immunity, the production of nitric oxide (NO) by macrophages infected with *C. neoformans* or *C. albicans* and co-incubated with the same concentrations of copper and BCS was quantified. No significant differences could be observed among the conditions evaluated (result not shown).

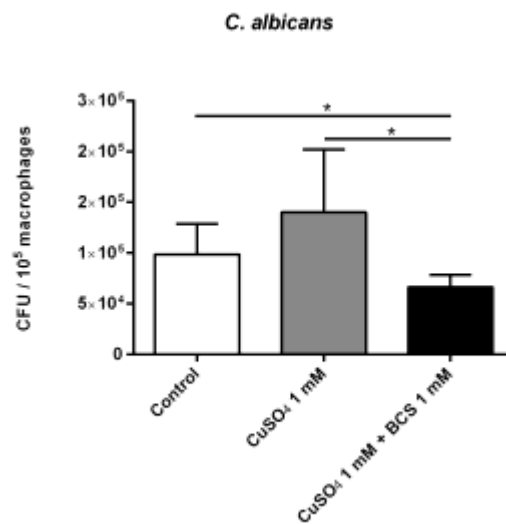
A recent study demonstrated that *C. neoformans* is able to maintain a basal level of copper within their cells during conditions of limitation of this metal, also known as the minimal copper quota, due to the importance of copper to metalloenzymes involved in its virulence and intracellular survival during infection, and accumulate much larger amounts of copper when it is added to the medium (Raja *et al.*, 2013). So, we evaluated whether pre-loading of fungal cells with copper, before interaction with phagocytic cells, could influence the sensitivity of *C. neoformans* or *C. albicans* to antifungal activity of macrophages. We observed that the *C. neoformans* fungal cells pre-treated with 1 mM of CuSO₄ showed decreased resistance to antifungal activity of macrophages (Fig. 5a). In contrast, *C. albicans* pre-treated with 1 mM of CuSO₄ were more resistance to the antifungal activity of macrophages (Fig. 5b). To further evaluate if the pre-loading of cryptococcal cells with copper could affect its sensibility to macrophages, we performed the same analysis with lower copper concentration to load fungal cells, as we hypothesized

that this amount of copper could have impaired the metabolic adaptation of pre-loaded cryptococcal cells to the toxic milieu of macrophages. Pretreatment of *C. neoformans* with 10 μM CuSO_4 showed a slight tendency for increased resistance to antifungal activity of macrophages, but the preload with higher concentrations of copper or copper plus BCS caused a greater resistance the antifungal activity of macrophages (Fig. 5c).

(a)



(b)



(c)

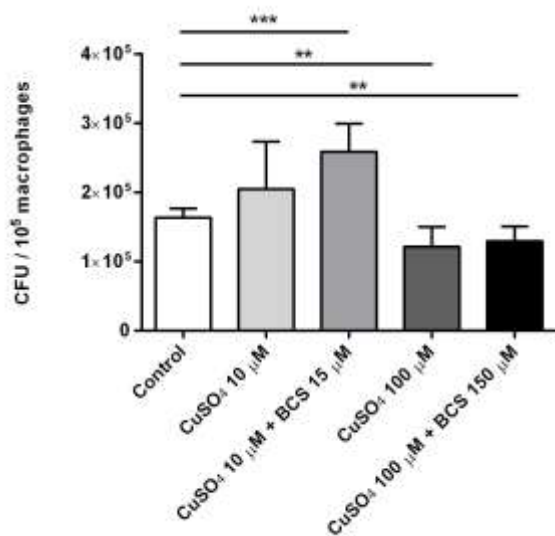


Fig. 5: Pre-loading of fungal cells with copper can affect the sensibility of *C. neoformans* and *C.*

***albicans* to antifungal activity of macrophages.** Macrophages concentration was adjusted to 1.10^6 cells/mL and 100 μ L of the macrophage suspension was added to each well of a 96-well plate. (a) *C. neoformans* and (b) *C. albicans* cells were cultured in YPD medium with 1 mM CuSO₄ or 1 mM CuSO₄ and 1 mM BCS. (c) *C. neoformans* cells were cultured in YPD medium with 10 μ M CuSO₄, 10 μ M CuSO₄ plus 15 μ M, 100 μ M CuSO₄ and 100 μ M CuSO₄ plus 150 μ M BCS. After 20 hours, 100 μ L of a suspension of *C. neoformans* or *C. albicans* 1.10^7 cells/mL were added to each well of plate. After 2 hours of interaction, the plate was washed with PBS solution, lysed with cold H₂O milliQ and plated in YPD solid medium for CFU determination. Statistical analysis by *Student's t-test*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

It is well known that *C. neoformans* acquire a minimal copper quota under conditions of limitation of this metal (Raja *et al.*, 2013), situation created by the addition of the copper chelator BCS, which may explain an increased number of fungal cells recovered by CFU (Fig. 5c). Furthermore, *C. albicans* has the ability to resist to high extracellular concentrations of copper, being able to grow at concentrations up to 20 mM of CuSO₄. This system, which confers resistance to *C. albicans* at high copper concentrations, is mediated by copper-transporting P-type ATPase CaCRP1 and the metallothionein CaCUP1, whose expression is induced by high concentrations of extracellular copper, acting in the detoxification of copper in *C. albicans* (Weissman *et al.*, 2000). Therefore, this resistance to high concentrations of copper of *C. albicans* cells could explain the decreased antifungal activity of macrophages with cells of *C. albicans* preloaded with 1 mM of CuSO₄ before the interaction, as seen in Fig. 5b. *C. neoformans* also has metallothioneins that are involved in detoxification of copper, responsive to extracellular levels of copper, as CMT1 and CMT2. These proteins are critical for resistance to copper of *C. neoformans* *in vitro* and in a murine model of infection, but were tested in response to adding concentrations up to 1 mM of copper (Ding *et al.*, 2013).

To rule out the possibility that such differences observed in the viability of copper pre-loaded fungal cells to the macrophagosomal antifungic activity were due to differential

phagocytosis, we evaluated the quantification of phagocytosis index of these fungal cells pre-loaded with copper, through of the fluorescence of the internalized fungal cells labeled with FITC and quantified by the aid of the FITC quencher trypan blue, which blocked the fluorescence of fungal cells not internalized. The phagocytosis index was then determined by the ratio between the fluorescence of fungal cells internalized and the fluorescence of total yeasts cells. Pre-loading of *C. neoformans* cells with copper did not affect the phagocytosis index by macrophage cells. However, an increase of phagocytosed cryptococcal cells could be observed when both copper and BCS were added to the culture medium of the yeast cells before the interaction (Fig. 6a). During interaction with *C. albicans*, in contrast, the effect of pre-treatment of fungal cells with copper and BCS resulted in a lower phagocytosis index, compared with the control (Fig. 6b). These results suggest that the sensitivity of cells of *C. neoformans* and *C. albicans* to phagocytosis index by macrophages is altered by pre-loading with copper or copper chelator BCS.

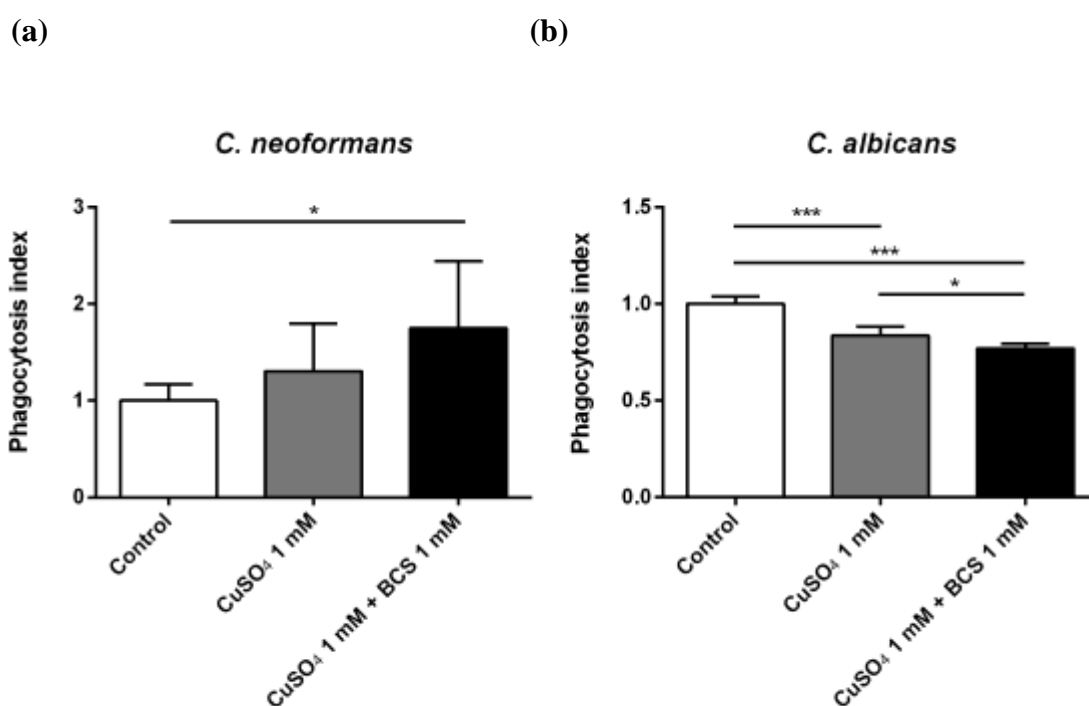


Fig. 6: Pre-loading of fungal cells with copper can affect the sensibility of *C. neoformans* and *C. albicans* to phagocytosis index of macrophages. (a) *C. neoformans* or (b) *C. albicans* cells were cultured in YPD medium with 1 mM CuSO₄ or 1 mM CuSO₄ and 1 mM BCS. Fungal cells were stained with 0.5 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC). Macrophages (1.10⁵ cells) and (a) *C. neoformans* or (b) *C. albicans* (1.10⁶ cells) per well were co-incubated for 2h. To determine only intracellular yeast cells, fluorimetric analysis were conducted with Trypan Blue (0.1mg/ml) $\lambda_{em}=494$ nm and $\lambda_{ex}=518$ nm. Nine distinct fields were evaluated in each well. Statistical analysis by *Student's t-test*. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

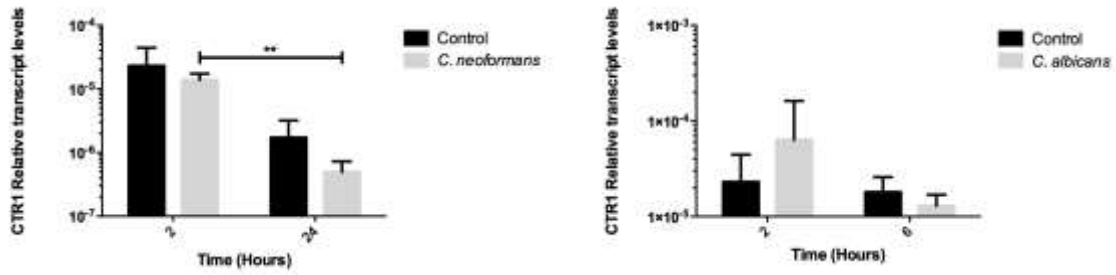
Inside of phagocytic cells, during infection with intracellular pathogens, there is a competition between pathogen and host for essential nutrients, such as transition metals, because they are involved in the defense and survival of both. In mammalian hosts, the transport of copper is mainly regulated by copper transport proteins with high affinity as CTR1 (SLC31A1), that transports copper from the extracellular space through the plasma membrane to cytoplasm, and CTR2 (SLC31A2), which is mainly expressed in the membrane of intracellular vesicles and late endosomes and lysosomes (Zhou and Gitschier, 1997; Stafford *et al.*, 2013). Another protein involved in the metabolism of copper is ATP7A, which is a P-type ATPase, commonly located in the Golgi complex, responsible for exporting copper, when cells are exposed to higher concentrations of this metal, and also can transport this metal into vesicles or intracellular compartments (Lutsenko, Leshane and Shinde, 2007; Stafford *et al.*, 2013). Additionally, ceruloplasmin (CP) is a multi-copper oxidase protein which is able to bind to six atoms of copper and is widely found in vertebrates predominantly localized in the plasma (Yang *et al.*, 1986). Due to its high affinity with copper, this protein has great importance for homeostasis of this metal and moreover also act as iron oxidase, also taking importance for iron homeostasis (Osaki and Johnson, 1969). Furthermore, metallothioneins (MT) are metals-binding proteins rich in cysteine, which have been identified in a wide range of prokaryotic and eukaryotic organisms in different tissues and cell types (Hamer, 1986; Ding *et al.*, 2013). The binding

of the metal and MT occurs through thiol groups and its function is related to the metabolism and detoxification of metal, induced in the presence of these metals (Hamer, 1986).

To investigate whether the deprivation of copper alters the sensitivity of *C. neoformans* and *C. albicans* to the antifungal activity of macrophages, we evaluated the influence of infection with *C. neoformans* or *C. albicans* in the expression of copper transporters CTR1 (SLC31A1) and ATP7A, and copper-binding proteins ceruloplasmin (CP) and metallothionein 1 (MT 1). We performed quantitative analysis of transcript levels of these genes, after 2 and 24 hours of interaction with *C. neoformans* and after 2 and 6 hours of interaction with *C. albicans*. The transcript levels of CTR1, ATP7A, CP and MT 1 were normalized with the transcripts levels of GAPDH constitutive gene (Fig. 7 and 8).

It was observed that during the interaction with both pathogenic fungi, macrophages showed a similar profile of relative transcript levels of genes encoding the copper transporters proteins CTR1 (Fig. 7a) and ATP7A (Fig. 7b) showed a decreased expression of these genes in macrophages, after 24 hours of infection with *C. neoformans*, although for *C. albicans*, they not shown significant difference between the times tested. The expression of gene encoding the multi-copper oxidase ceruloplasmin (Fig. 8a) and the metallothionein 1 (Fig. 8b) showed decreased expression during infection with *C. neoformans* after 24 hours of infection, having statistically significant difference between the control and infected conditions after 24 hours of infections with both fungal pathogenic. These results may suggest that during infection by pathogenic fungi, the limitation of the availability of copper occurs and this effect may be mediated by copper transporters as CTR1 and ATP7A (Fig. 7) or copper-binding proteins as CP and MT 1 of macrophages (Fig. 8).

(a)



(b)

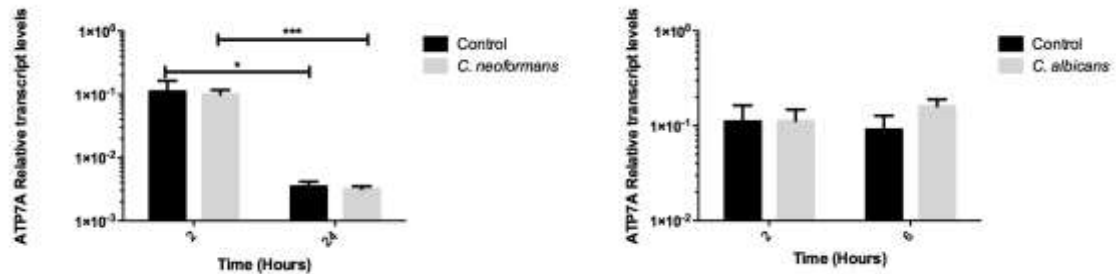
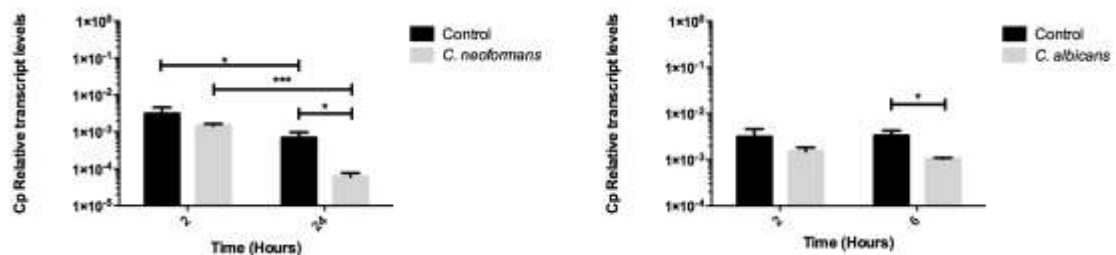


Fig. 7: The expression of copper transporters CTR1 (SLC31A1) and ATP7A is modulated in macrophages cells during interaction with pathogenic yeasts. Macrophages (2.10^5 cells) and *C. neoformans* or *C. albicans* (2.10^6 cells) was added to 0,25 mL for each well of a 24-well plate and co-incubated for 2, 6 and 24 hours. The plates were washed with PBS solution, lysed with Trizol Reagent (Invitrogen) for a RNA extraction. The cDNA synthesis was performed with 800 ng of RNA with Imprim-II reverse transcriptase enzyme. The relative transcript levels of copper transporters (a) CTR1 and (b) ATP7A were measured by RT-qPCR, normalized with GAPDH transcript levels. Statistical analysis by *Student's t-test*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

(a)



(b)

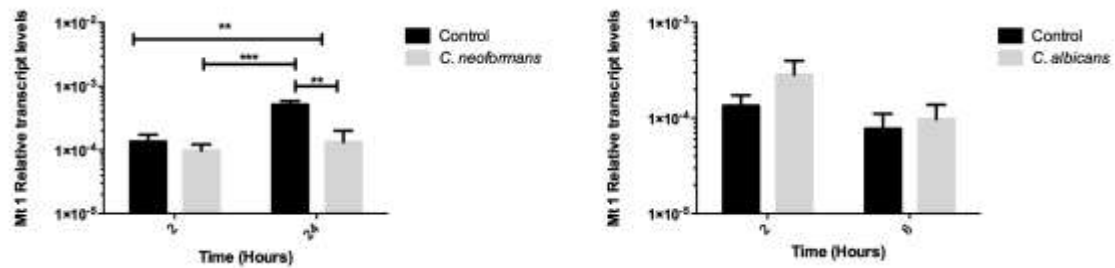


Fig. 8: The expression of copper-binding proteins ceruloplasmin and metallothionein 1 is modulated in macrophages cells during interaction with pathogenic yeasts. Macrophages (2.10^5 cells) and *C. neoformans* or *C. albicans* (2.10^6 cells) was added to 0,25 mL for each well of a 24-well plate and co-incubated for 2, 6 and 24 hours. The plates were washed with PBS solution, lysed with Trizol Reagent (Invitrogen) for a RNA extraction. The cDNA synthesis was performed with 800 ng of RNA with Imprim-II reverse transcriptase enzyme. The relative transcript levels of copper-binding proteins (a) ceruloplasmin and (b) metallothionein 1 were measured by RT-qPCR, normalized with GAPDH transcript levels. Statistical analysis by *Student's t-test*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

It is known that macrophages infected with *Mycobacterium* species accumulate copper in phagosomal compartment and that the activation of these macrophages with LPS induces the expression of ATP7A and CTR1 (Wagner *et al.*, 2005; White *et al.*, 2009). It has also been shown the microbicidal role of ATP7A in macrophages infected with *E. coli* (White *et al.*, 2009).

To survive and replicate in the host, *C. neoformans* have several strategies to subvert these antimicrobial mechanisms and modulate immune response (Sabiiti and May, 2012). This ability to influence the intracellular environment of phagocytic host cells during infection is probably dependent on the export of some fungal virulence factors (Kronstad *et al.*, 2011). The release of these virulence factors of the fungal cells into the cell host environment occurs through membrane-bound vesicles that cross the cell wall, called "delivery bags of virulence factors". Several studies have shown that the content stored in these vesicles, as GXM, GalXM, pigments, proteins and lipids, are biologically active and

can stimulate the immune response of macrophages (Nosanchuk *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Casadevall *et al.*, 2009; De Jesus *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012). Also, a recent study demonstrated that these virulence factors can induce a dose-dependent production of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor TNF- α , interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor (TGF- β) (Oliveira *et al.*, 2010). Moreover, it was recently demonstrated that *C. neoformans*-derived microvesicles enhancing the crossing of pathogen through the BMEC cells and accumulate at the sites of lesions in the brain in an *in vitro* study with a blood-brain barrier model, contributing for transcytosis and brain invasion (Huang *et al.*, 2012).

Then, it was hypothesized that the immune response of macrophages during infection with *C. neoformans* could be modulated by the action of mechanisms associated with basal metabolism of *C. neoformans*. To evaluate this hypothesis, a quantitative analysis of transcript levels referring to the same genes previously tested was performed during the interaction of macrophages with live cells of *C. neoformans* cells or with heat-killed *C. neoformans* cells (Fig. 9).

It was observed that during interaction with living cells of *C. neoformans* relative levels of transcripts of genes which encoding copper transport proteins CTR1 and ATP7A was a tendency to lower compared to control conditions and interaction with heat-killed cells of *C. neoformans*, after 24 hours of infection (Fig. 9a and b). However, comparing the interaction between living and dead cells of *C. neoformans* there was a significant changes in the expression of these genes (Fig. 9a and 9b). A tendency to decrease compared to control and interaction with heat-killed *C. neoformans* cells, was observed in the expression of the gene encoding the multi-copper oxidase ceruloplasmin, however there was no significant difference (Fig. 9c). These results may suggest that the mechanisms

associated with basal metabolism of *C. neoformans* can alter the expression of CTR1 and ATP7A copper transporters and ceruloplasmin copper-binding protein with high affinity.

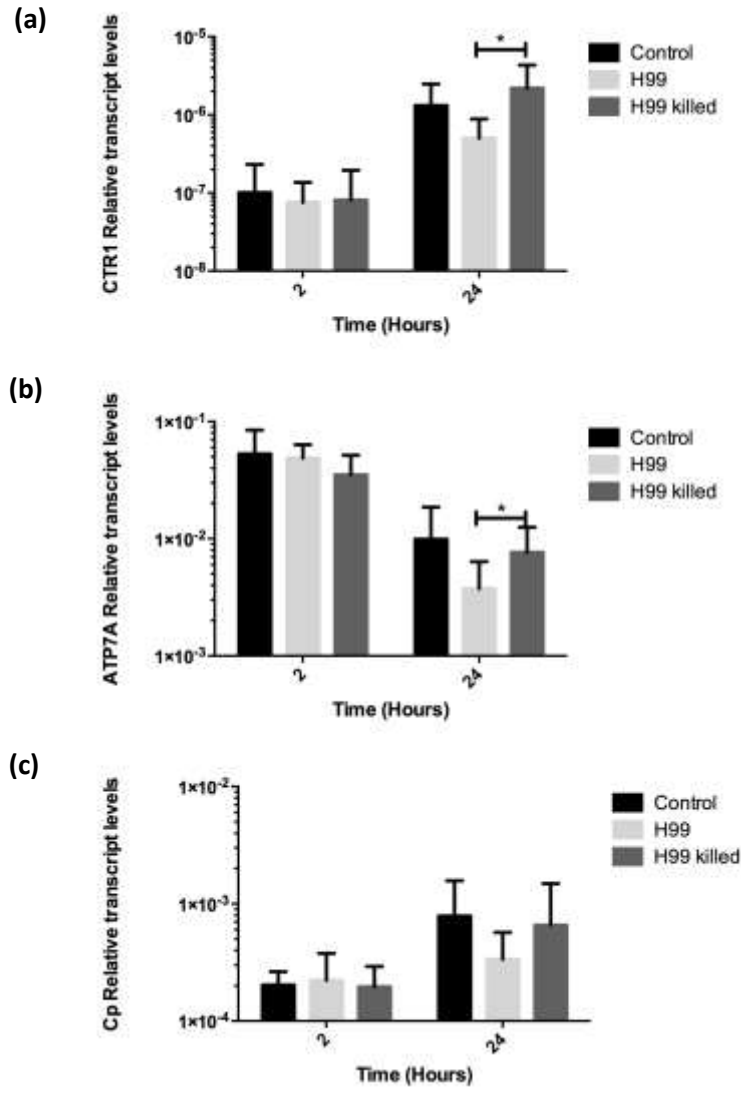


Fig. 9: The pathogenicity of *C. neoformans* can alter the expression of copper transporters CTR1 (SLC31A1), ATP7A and a multi-copper oxidase Ceruloplasmin in macrophages cells during infection. *C. neoformans* cells were killed at 55°C for 30 minutes. Macrophages ($4 \cdot 10^5$ cells) and *C. neoformans* ($4 \cdot 10^6$ cells) was added to 0,5 mL for each well of a 24-well plate and co-incubated for 2 and 24 hours. The plates were washed with PBS solution, lysed with Trizol Reagent (Invitrogen) for a RNA extraction. The cDNA synthesis was performed with Improm-II reverse transcriptase enzyme. The relative transcript levels of copper transporters (a) CRT1, (b) ATP7A and (c) Ceruloplasmin were measured by RT-qPCR, normalized with GAPDH transcript levels. Statistical analysis by Student's t-test. * $P < 0.05$.

Furthermore, extracellular vesicles are also produced by other pathogens, such as *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, and also by *Saccharomyces cerevisiae* yeast model, suggesting that secretion of extracellular vesicles may be characteristic of yeast cells (Oliveira *et al.*, 2010). Together, these results may suggest that *C. neoformans* may modulate the antifungal activity of host cells and alter the gene expression of the genes encoding copper-binding proteins involved in homeostasis of this metal during infection.

Then, considering that during infection with *C. neoformans*, macrophages cells can limit the availability of copper as an antifungal strategy in order to contain the spread of the pathogen and that, in turn, this pathogen can modulate the antifungal activity of macrophages, it was verified the concentration of copper within these phagocytic cells during infection. For this purpose, after interacting with living or heat-killed *C. neoformans* cells, was analyzed intracellular content of copper in macrophage cells by atomic absorption spectrometry. The copper concentration in macrophages cells was reduced after 2 hours of infection with living cells of *C. neoformans*, confirming the hypothesis that there is a restriction of the availability of metal in this condition (Fig. 10). During infection with heat-killed *C. neoformans* cells, the copper concentration was even lower in macrophages after 2 hours of interaction (Fig. 10).

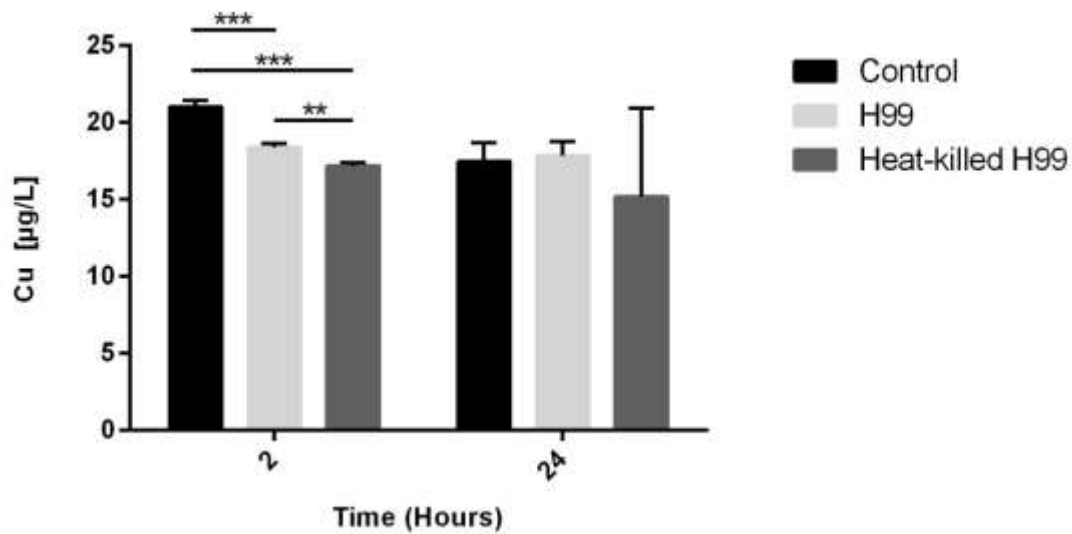


Fig. 10: Macrophage cells infected with *C. neoformans* have a copper concentration altered. *C. neoformans* cells were killed at 55°C for 30 minutes. Macrophages (5.10^5 cells) and *C. neoformans* (5.10^6 cells) was added to 0,5 mL for each well of a 24-well plate and co-incubated for 2 and 24 hours. The plates were washed with PBS solution and lysed with lysis buffer (62 mM Tris-HCl, 2% SDS and 1 mM EDTA). After lysis, the extract was centrifuged at 14000 rpm and 4°C for 10 minutes and the supernatant was transferred to a new tube. The samples were homogenized and diluted and then, the copper content was quantified in atomic absorption (AA) spectrometer with graphite furnace. Statistical analysis by *Student's t-test*. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

These results suggest that, during infection with *C. neoformans*, macrophages cells may restrict the availability of copper as an antifungal mechanism. It must be considered that there is a difference between stimuli given between interactions with living cells and heat-killed cells of *C. neoformans*, where the living cells remain multiplying within macrophages and modulating the immune response of these cells already dead cells only serve as initial stimulus, but are not able to keep that modulation of antifungal activity of macrophages.

Also it has been described that several enzymes are involved in the formation of capsular polysaccharide of *C. neoformans* and deprived of copper by chelating agents can harm these process, because the copper serves as a cofactor for these enzymes and this may

influence the virulence of this fungus during infection (Silva *et al.* 2011). A study demonstrated that the divalent metals can promote the aggregation of GXM fibers on the surface of *C. neoformans* and contributes to the capsule assembly (Nimrichter *et al.*, 2007). These data can support the influence of the availability of copper with *C. neoformans* virulence during infection, but further studies are needed to elucidate exactly how the presence of copper is important during this process.

CONCLUSIONS

The mechanisms by which mammalian hosts regulate copper homeostasis during fungal infections are not well described, although it is known that this metal has great importance for many metabolic processes to the host as well as to the factors related to the virulence of pathogenic fungi, such as *C. neoformans* and *C. albicans*. In this work we found that the limitation of copper may be an antifungal strategy of macrophages infected by these yeasts. It was also observed that transporters and copper-binding proteins in macrophages may be involved in copper homeostasis during infection. Although this study may have contributed to better elucidate the copper homeostasis during fungal infections, this regulation may involve more complex mechanisms, such as strategies of pathogens to subvert the antimicrobial action of macrophages. Therefore, further studies should be conducted to a better investigation of these processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). KF and ROS are recipients of

scholarships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Achard ME, Stafford SL, Bokil NJ, Chartres J, Bernhardt PV, Schembri MA, Sweet MJ, McEwan AG (2012) Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J.* doi:10.1042/bj20112180
- Antinori S (2013) New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *Isrn Aids* 2013:471363. doi:10.1155/2013/471363
- Botella H, Stadthagen G, Lugo-Villarino G, de Chastellier C, Neyrolles O (2012) Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends in microbiology* 20 (3):106-112. doi:10.1016/j.tim.2012.01.005
- Casadevall A, Nosanchuk JD, Williamson P, Rodrigues ML (2009) Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol* 17(4):158-162. doi:10.1016/j.tim.2008.12.005
- Cogliati M (2013) Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica* (Cairo) 2013:675213. doi: 10.1155/2013/675213
- De Jesus M, Nicola AM, Rodrigues ML, Janbon G, Casadevall A (2009) Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryot. Cell* 8:96-103. doi: 10.1128/EC.00331-08
- Ding C, Festa RA, Chen YL, Espart A, Palacios Ò, Espín J, Capdevila M, Atrian S, Heitman J, Thiele DJ (2013) *Cryptococcus neoformans* copper detoxification

- machinery is critical for fungal virulence. *Cell Host Microbe* 13 (3):265-276.
doi:10.1016/j.chom.2013.02.002
- Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G (2013) Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging* 8:1199-1208. doi:10.2147/CIA.S39120
- Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K (2009) *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular microbiology* 71 (1):240-252.
doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06528.x
- Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55:913-951.
doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.004405
- Hodgkinson V, Petris MJ (2012) Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem* 287 (17):13549-13555. doi:10.1074/jbc.R111.316406
- Hood MI, Skaar EP (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10 (8):525-537. doi:10.1038/nrmicro2836
- Huang SH, Wu CH, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Brown RJ, Jong A (2012) *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *Plos One* 7(11):e48570. doi:10.1371/journal.pone.0048570
- Johnston SA, May RC (2013) *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cell Microbiol* 15 (3):403-411. doi:10.1111/cmi.12067
- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J (2011) Expanding fungal pathogenesis:

- Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. Nat Rev Microbiol 9 (3):193-203. doi:nrmicro2522 [pii] 10.1038/nrmicro2522
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25 (4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U (2007) Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. Arch Biochem Biophys 463 (2):134-148. doi:10.1016/j.abb.2007.04.013
- Marvin ME, Mason RP, Cashmore AM (2004) The CaCTR1 gene is required for high-affinity iron uptake and is transcriptionally controlled by a copper-sensing transactivator encoded by CaMAC1. Microbiology 150 (Pt 7):2197-2208. doi:10.1099/mic.0.27004-0
- Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 4 (2):119-128. doi:10.4161/viru.22913
- Miramón P, Kasper L, Hube B (2013) Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. Med Microbiol Immunol 202 (3):183-195. doi:10.1007/s00430-013-0288-z
- Morgan DM (1998) Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. Methods Mol Biol 79:179-183
- Nicola AM, Casadevall A (2012) In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. Methods in molecular biology (Clifton, NJ) 844:189-197. doi:10.1007/978-1-61779-527-5_14

- Nimrichter L, Frases S, Cinelli LP, Viana NB, Travassos LR, Casadevall A, Rodrigues ML (2007) Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot Cell* 6(8):1400-10. doi:10.1128/EC.00122-07
- Nosanchuk JD, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML (2008) A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Commun Integr Biol* 1:37–39
- Oliveira DL, Nimrichter L, Miranda K, Frases S, Faull KF, Casadevall A (2009) *Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan. *Fungal Genet Biol* 46:956-963. doi: 10.1016/j.fgb.2009.09.001
- Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD, Casadevall A, Rodrigues ML, Nimrichter L (2010) Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* 78 (4):1601-1609. doi:10.1128/IAI.01171-09
- Osaki S, Johnson DA (1969) Mobilization of liver iron by ferroxidase (ceruloplasmin). *J Biol Chem* 244 (20):5757-5758
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23 (4):525-530. doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac
- Perlroth J, Choi B, Spellberg B (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45 (4):321-346. doi:10.1080/13693780701218689

- Raja MR, Waterman SR, Qiu J, Bleher R, Williamson PR, O'Halloran TV (2013) A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics* 5 (4):363-371. doi:10.1039/c3mt20220h
- Říha M, Karlíčková J, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P (2013) Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J Inorg Biochem* 123:80-87. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.02.011
- Rodrigues ML, Nakayasu DL, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A (2008) . Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7:58–67. doi:10.1128/EC.00370-07
- Sabiiti W, May RC (2012) Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiology*:1297–1313
- Saleppico S, Boelaert JR, Omodeo Salè F, Mazzolla R, Morucci P, Bistoni F, Blasi E (1999) Differential effects of iron load on basal and interferon-gamma plus lipopolysaccharide enhance anticryptococcal activity by the murine microglial cell line BV-2. *J Neuroimmunol* 93 (1-2):102-107
- Schaible UE, Kaufmann SH (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2 (12):946-953. doi:10.1038/nrmicro1046
- Silva FD, Rossi DCP, Martinez LR, Frases S, Fonseca FL, Campos CBL, Rodrigues ML, Nosanchuk JD, Daffre S (2011) Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett* 324:64–72. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02386.x

- Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, Sweet MJ (2013) Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: Emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep*. doi:10.1042/BSR20130014
- Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12 (7):317-324. doi:10.1016/j.tim.2004.05.008
- Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, Hamaker J, Mitchell AP, Andes DR (2012) A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog* 8 (8):e1002848. doi:10.1371/journal.ppat.1002848
- Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, Höner Zu Bentrup K, Russell DG, Bermudez LE (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol* 174 (3):1491-1500
- Waterman SR, Hacham M, Hu G, Zhu X, Park YD, Shin S, Panepinto J, Valyi-Nagy T, Beam C, Husain S, Singh N, Williamson PR (2007) Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 117 (3):794-802. doi:10.1172/jci30006
- Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ, Kornitzer D (2000) The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7):3520-3525
- White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K, Petris MJ (2009) A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* 284 (49):33949-33956. doi:10.1074/jbc.M109.070201

- White-Owen C, Alexander JW, Sramkoski RM, Babcock GF (1992) Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J Clin Microbiol* 30 (8):2071-2076
- Winters MS, Chan Q, Caruso JA, Deepe GS, Jr. (2010) Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *J Infect Dis* 202 (7):1136-1145. doi:10.1086/656191
- Yang F, Naylor SL, Lum JB, Cutshaw S, McCombs JL, Naberhaus KH, McGill JR, Adrian GS, Moore CM, Barnett DR (1986) Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (10):3257-3261
- Zhou B, Gitschier J (1997) hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (14):7481-7486

4. DISCUSSÃO GERAL

Considerando a importância do metal cobre, tanto para diversos processos celulares em hospedeiros vertebrados, quanto para a patogênese de bactérias e fungos, este trabalho avaliou os mecanismos pelos quais macrófagos modulam a homeostase de cobre durante a infecção com *C. neoformans* ou *C. albicans*. Primeiramente, através de um teste de viabilidade, foram determinadas as concentrações de cobre e do quelante de cobre BCS ideais para a realização dos experimentos, com as quais as células de macrófagos permaneceriam viáveis. Somente concentrações acima de 500 μM de CuSO_4 ou BCS causaram um efeito citotóxico potente. Após esta análise inicial da influência de cobre nas células de macrófagos, foi verificado o efeito deste metal em macrófagos durante a infecção com *C. neoformans*. Alguns estudos anteriores demonstraram que a presença de cobre influencia a atividade antimicrobiana de macrófagos, causando um efeito bactericida em macrófagos infectados pelas bactérias patogênicas *E. coli* e *S. enterica* (White *et al.*, 2009; Achard *et al.*, 2012). Então, foi avaliado se a presença de cobre poderia influenciar a atividade anti-fúngica das células de macrófagos. Através do ensaio de fagocitose entre células de macrófagos e células de *C. neoformans* na presença de 100 μM of CuSO_4 por 24 horas, foi possível verificar uma redução da atividade anti-fúngica de macrófagos, sugerindo que a limitação da disponibilidade de cobre em macrófagos pode contribuir para conter a infecção por *C. neoformans*.

Embora o excesso de cobre tenha causado um efeito bactericida em estudos prévios, durante a infecção com o fungo patogênico *Histoplasma capsulatum*, a limitação de zinco em macrófagos foi utilizada como uma estratégia de defesa pelo hospedeiro (Winters *et al.*, 2010). Também, sabe-se que o excesso de cobre pode ser tóxico devido a sua modulação redox, produzindo radicais livres que causam danos a lipídeos, proteínas e

ácidos nucleicos (Hodgkinson e Petris, 2012). Além disso, o cobre também possui grande importância para a patogenicidade de *C. neoformans*, pois é um importante cofator para fatores de virulência, como a enzima lacase dependente de cobre e a superóxido dismutase Cu/Zn. O cobre ainda pode afetar a homeostase de ferro, pois é necessário para a ação do transportador de ferro de alta afinidade Fet3 (Waterman *et al.*, 2007). Além disso foi demonstrado que o sistema regulatório de cobre em *C. neoformans*, regulado pelo fator de transcrição dependente de cobre Cuf1, ativa a expressão do transportador de cobre CTR4 de *C. neoformans* em resposta à privação deste metal no interior de macrófagos durante a infecção (Waterman *et al.*, 2007). Estes dados da literatura corroboram nossa hipótese de que, durante a infecção com *C. neoformans*, de fato, há uma situação de limitação de cobre no interior de células fagocíticas, que serve como uma estratégia para conter a sobrevivência do patógeno e, portanto, a adição de cobre pode contribuir para uma diminuição da atividade anti-fúngica de macrófagos. Logo, é possível afirmar que, durante a infecção por *C. neoformans*, há uma competição entre o patógeno e o hospedeiro pela disponibilidade de cobre e que a restrição deste metal pode dificultar a sobrevivência do fungo no interior de macrófagos. Também foi observado que apenas 1 μM de CuSO_4 já mostrou-se suficiente para reduzir a atividade anti-fúngica de macrófagos durante duas horas de interação com *C. neoformans*, como também com *C. albicans*. A adição de 10 μM de CuSO_4 mostrou-se ainda mais eficaz na redução da atividade anti-fúngica, sendo que a adição de 15 μM de BCS foi capaz de reverter este efeito.

Além da importância do metal cobre para a patogenicidade de *C. neoformans*, em *C. albicans* também há um sistema responsável pela regulação da homeostase de cobre, mediado por CaCTR1, cuja a expressão é regulada pelo fator de transcrição CaMac1p em resposta à baixas concentrações de cobre no meio (Marvin, Mason e Cashmore, 2004). A

deleção deste genes causou defeito no crescimento da levedura como também menor produção de hifa, sugerindo que a captação de cobre também tem grande importância para a patogenicidade de *C. albicans* (Marvin, Mason e Cashmore, 2004). Desta forma, é plausível considerar que a limitação de cobre pode servir como uma estratégia do hospedeiro para conter a sobrevivência de *C. neoformans* e *C. albicans*.

Além disso, foi demonstrado que o aumento do número de células recuperadas por UFC em macrófagos infectados com *C. neoformans* ou *C. albicans* na presença de concentrações de cobre ou BCS não teve influência da capacidade fagocítica dos macrófagos, uma vez que foi quantificada a taxa de fagocitose nas mesmas condições e não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento somente com cobre e o tratamento com adição de cobre e BCS. Logo, a diminuição da atividade anti-fúngica verificada anteriormente, foi devida somente à capacidade de sobrevivência do patógeno no interior das células fúngicas e não a uma maior capacidade fagocítica dos macrófagos.

C. neoformans também é capaz de manter um nível basal de cobre no interior de suas células durante condições de limitação deste metal, devido à importância deste metal para metaloenzimas envolvidas na sua virulência e sobrevivência intracelular durante a infecção, como também pode acumular grandes quantidade de cobre quando este é adicionado ao meio (Raja *et al.*, 2013). Então, foi avaliado se o pré-tratamento das células fúngicas com cobre, antes da interação com células fagocíticas, poderia influenciar a sensibilidade de *C. neoformans* ou *C. albicans* à atividade anti-fúngica de macrófagos. As células fúngicas pré-tratadas com 1 mM CuSO₄ mostraram um aumento da resistência à atividade anti-fúngica de macrófagos durante a interação com *C. albicans*, entretanto, foi observado um efeito oposto durante a interação com *C. neoformans*. Novas análises foram realizadas com concentrações menores de cobre e BCS, a fim de que não prejudicassem a

viabilidade das células fúngicas. Neste caso, foi verificado que o pré-carregamento das células de *C. neoformans* com 10 μM CuSO_4 levou a um aumento discreto na atividade anti-fúngica dos macrófagos, no entanto, o pré-tratamento com 10 μM CuSO_4 e 15 μM BCS causou uma maior resistência à atividade anti-fúngica de macrófagos. Este efeito pode ser, em parte, explicado devido à capacidade de *C. neoformans* de adquirir uma concentração de cobre mínima, a fim de suprir suas necessidades metabólicas em condição de privação deste metal (Raja *et al.*, 2013), situação que foi criada a partir da adição do quelante de cobre BCS. Já *C. albicans* possui um sistema que confere resistência a altas concentrações de cobre, mediado pela proteína ATPase tipo P CaCRP1 e pela metalotioneína CaCUP1, que atuam na detoxificação do fungo quando exposto à grande quantidade de cobre, podendo este crescer em meio contendo até 20 mM CuSO_4 (Weissman *et al.*, 2000). Esta maior resistência de *C. albicans* à cobre pode justificar o perfil oposto ao de *C. neoformans* no pré-carregamento das células fúngicas com 1 mM de CuSO_4 antes da interação com os macrófagos. Um estudo recente também identificou metalotioneínas em *C. neoformans*, CMT1 e CMT2, que são importantes para a detoxificação de cobre na célula fúngica durante a infecção, entretanto foram testadas durante a exposição de até 1 mM CuSO_4 , não sendo possível afirmar sua ação em concentrações maiores de cobre (Ding *et al.*, 2013).

Além disso, foi possível demonstrar que o pré-carregamento com 1 mM de CuSO_4 ou 1 mM de CuSO_4 e 1 mM de BCS, antes da interação com as células fagocíticas, afetou também a taxa de fagocitose de *C. neoformans* ou *C. albicans* pelos macrófagos. A adição de cobre com BCS no pré-cultivo das células fúngicas gerou um aumento da taxa de fagocitose pelos macrófagos, durante a interação com *C. neoformans*. Já o pré-tratamento das células de *C. albicans* com cobre e BCS levou a uma menor taxa de fagocitose pelos

macrófagos, comparada ao controle. Logo, foi possível observar que a sensibilidade das células fúngicas à taxa de fagocitose pelos macrófagos é alterada com o pré-carregamento com cobre ou cobre e BCS.

Considerando que foi observado que a presença de cobre pode influenciar a atividade anti-fúngica de macrófagos durante a interação com *C. neoformans* ou *C. albicans*, foi levantada a hipótese de que transportadores ou proteínas ligadoras de cobre de macrófagos poderiam modular a homeostase deste metal durante a infecção. Em células de hospedeiros mamíferos, o transporte de cobre é mediado principalmente por transportadores de alta afinidade, como CTR1 (SLC31A1), que atua no transporte de cobre na membrana plasmática para dentro da célula ou para compartimentos endossomais, quando há um aumento dos níveis de cobre extracelular, e CTR2 (SLC31A2), que é principalmente expresso na membrana de vesículas intracelulares e endossomos e lisossomos (Zhou e Gitschier, 1997; Stafford *et al.*, 2013). A proteína ATP7A, uma ATPase tipo P localizada primariamente no complexo do Golgi, também está envolvida no metabolismo de cobre e é responsável pela exportação de cobre quando as células são expostas a altas concentrações deste metal, também podendo transportar este metal em vesículas ou compartimentos intracelulares (Lutsenko, Leshane e Shinde, 2007; Stafford *et al.*, 2013). Além disso, algumas proteínas ligadoras de cobre podem ter importância na homeostase de cobre como metalotioneínas (MT), que são proteínas amplamente encontradas em organismos procarióticos e eucarióticos, atuando na detoxificação de metais (Hamer, 1986), e a oxidase multi-cobre ceruloplasmina (CP), que é capaz de se ligar à seis átomos de cobre e é amplamente encontrada em vertebrados, principalmente localizada no plasma (Yang *et al.*, 1986). Esta proteína também atua como oxidase de ferro, tendo grande importância na homeostase deste metal também (Osaki e Johnson,

1969). Foi avaliado então a influência dos transportadores de cobre CTR1 e ATP7A e das proteínas ligadoras de cobre CP e MT1 na modulação da homeostase de cobre em macrófagos durante a infecção por *C. neoformans* ou *C. albicans*. Através da análise quantitativa dos níveis de transcritos dos genes que codificam estas proteínas, após duas e 24 horas de interação com *C. neoformans* e após duas e seis horas de interação com *C. albicans*, foi possível demonstrar que, durante a infecção com ambos fungos patogênicos, os macrófagos demonstraram perfil similar dos níveis de transcritos dos genes que codificam as proteínas transportadoras de cobre CTR1 e ATP7A, havendo uma diminuição da expressão destes genes após 24 horas de infecção, embora durante a infecção por *C. albicans*, a expressão destes genes não tenha demonstrado diferença estatisticamente significativa entre os tempos testados. A expressão das proteínas ligadoras de cobre CP e MT 1 também reduziu após 24 horas de infecção por *C. neoformans*, demonstrando diferença estatisticamente significativa entre as condições controle e infectado por ambos fungos patogênicos. Estes resultados podem sugerir que durante a infecção por patógenos fúngicos, há uma limitação da disponibilidade de cobre e que esta estratégia das células hospedeiras pode ser mediada por transportadores de cobre como CTR1 e ATP7A ou por proteínas ligadoras de cobre como CP e MT 1 de macrófagos.

Alguns dados na literatura mostram que durante a infecção com espécies de *Mycobacterium*, há um acúmulo de cobre no interior do compartimento fagossomal e que a ativação destes macrófagos com LPS induz a expressão de ATP7A e CTR1 (Wagner *et al.*, 2005; White *et al.*, 2009). Macrófagos infectados com *E. coli* também demonstraram que o aumento da expressão de ATP7A causou um efeito bactericida (White *et al.*, 2009). Entretanto, durante a infecção por *C. neoformans*, macrófagos ativados mostraram altos níveis de ATP7A e CTR1, porém em resposta à infecção, pode haver uma reorientação de

cobre no hospedeiro, sendo comprovado pelos altos níveis de cobre encontrados no soro de camundongos após 14 dias de infecção *in vivo* (Ding *et al.*, 2013). Este mesmo estudo ainda demonstrou que após dois dias de infecção há uma diminuição dos níveis de ATP7A, enquanto que os níveis de CTR1 permanecem altos após 14 dias de infecção (Ding *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que, em resposta à infecção por *C. neoformans*, macrófagos podem mobilizar cobre e redirecioná-lo para a circulação, limitando a concentração de cobre em compartimentos vesiculares (Ding *et al.*, 2013). Os resultados encontrados neste trabalho podem, de certa forma, corroborar estes dados da literatura, onde macrófagos ativados com LPS e IFN- γ e infectados com *C. neoformans*, em um primeiro momento, podem elevar os níveis de cobre intracelular, através das expressão de transportadores como CTR1 e ATP7A, mas em resposta à interação após um maior período de tempo, possa haver um ajuste por parte do hospedeiro, a fim de diminuir as concentrações deste metal no ambiente fagossomal para conter a sobrevivência do patógeno neste compartimento.

Também foi avaliado a possibilidade de *C. neoformans* modular a atividade anti-fúngica dos macrófagos, já que é bem estabelecido que esta levedura pode exportar alguns importantes fatores de virulência para a célula hospedeira através de vesículas (Nosanchuk *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Casadevall *et al.*, 2009; De Jesus *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012). Foi demonstrado recentemente que o conteúdo destas vesículas é capaz de modular a atividade anti-fúngica de macrófagos, estimulando a resposta imune através da indução da produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento (TGF- β) (Oliveira *et al.*, 2010). Além disso, em outro estudo que utilizou um modelo *in vitro* da BHE, foi relatado também que microvesículas derivadas de *C. neoformans* aumentam a

passagem do patógeno através de células BMECs e acumulam-se em sítios de lesões no cérebro, contribuindo para a transcitose e disseminação (Huang *et al.*, 2012).

Afim de investigar melhor esta hipótese, foi realizada a análise quantitativa dos níveis de transcritos dos genes que codificam as proteínas transportadoras de cobre CTR1 e ATP7A e da proteína ligadora de cobre CP, durante a interação de macrófagos com células de *C. neoformans* vivas ou mortas. Foi possível observar que o metabolismo basal de *C. neoformans* foi capaz de modular a atividade anti-fúngica de macrófagos, através da diminuição da expressão dos genes que codificam as proteínas transportadoras de cobre CTR1 e ATP7A, em relação à condição controle e a infecção com células fúngicas mortas. Houve também uma tendência a diminuição da expressão do gene que codifica a proteína ligadora de cobre CP em macrófagos durante a infecção com células vivas de *C. neoformans*, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as condições controle e interação com células fúngicas mortas.

Por fim, considerando que, durante a infecção por *C. neoformans*, macrófagos podem limitar a disponibilidade de cobre como uma estratégia para conter a sobrevivência do patógeno e que, por sua vez, o patógeno também é capaz de modular a atividade anti-fúngica das células fagocíticas, foi quantificado o conteúdo de cobre intracelular em macrófagos, por espectrometria de absorção atômica, durante interação com células de *C. neoformans* vivas ou mortas. Novamente, a abordagem de avaliação da interação de células de macrófagos com células fúngicas vivas ou mortas, representa um estímulo diferente, em que as células vivas do patógeno seriam capazes de continuar multiplicando-se e modulando a atividade anti-fúngica dos macrófagos e já as células mortas serviriam apenas como estímulo inicial, não sendo capazes de modular a resposta do hospedeiro por muito tempo. A concentração de cobre no interior de macrófagos reduziu após duas horas de

infecção com as células vivas de *C. neoformans* e foi ainda menor durante duas horas de infecção com as células fúngicas mortas. Estes resultados confirmam a hipótese de que, durante a infecção, macrófagos limitam a disponibilidade de cobre como um mecanismo anti-fúngico.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível demonstrar que a limitação de cobre pode ser uma estratégia anti-fúngica de macrófagos para conter a infecção por *C. neoformans* ou *C. albicans*. Também foi avaliado quantitativamente a expressão de proteínas transportadoras ou ligadoras de cobre em células de macrófagos contendo as células fúngicas internalizadas e foi observado que estas proteínas podem estar envolvidas na homeostase deste metal durante a infecção. Além disso, foi determinada a concentração de cobre no interior de macrófagos infectados, constatando que, de fato, há uma diminuição da concentração deste metal. Entretanto, esta regulação pode envolver mecanismos mais complexos, uma vez que o metabolismo de fungos patogênicos, como *C. neoformans*, pode alterar e modular a resposta imune do hospedeiro, para garantir sua sobrevivência no interior de células fagocíticas.

6. PERSPECTIVAS

Embora este estudo tenha contribuído para um melhor entendimento sobre a homeostase de cobre em macrófagos durante infecções fúngicas, mais esforços devem ser feitos para elucidar como estes mecanismos ocorrem, a fim de esclarecer por exemplo, como patógenos fúngicos conseguem subverter as estratégias de defesa do hospedeiro, bem como realizar estudos *in vivo* para avaliação da homeostase de cobre, à curto e médio prazo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARD, M.E. *et al.* Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J*, v. 444, n. 1, p. 51-7, May 2012b. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369063> >.

ANTINORI, S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS*, v. 2013, p. 471363, 2013. ISSN 2090-939X (Print)2090-939X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24052889> >.

BARTLETT, K. H.; KIDD, S. E.; KRONSTAD, J. W. The emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. *Curr Infect Dis Rep*, v. 10, n. 1, p. 58-65, Mar 2008. ISSN 1523-3847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18377817> >.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*, v. 3, n. 12, p. 918-30, Dec 2002. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459722> >.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull*, v. 72, p. 99-118, 2004. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838017> >.

BOEKHOUT, T. *et al.* Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int J Syst Bacteriol*, v. 47, n. 2, p. 432-42, Apr 1997. ISSN 0020-7713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103633> >.

BOTELLA, H. *et al.* Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol*, v. 20, n. 3, p. 106-12, Mar 2012. ISSN 1878-4380 (Electronic)0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305804> >.

BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Curr Opin Microbiol*, v. 10, n. 4, p. 320-5, Aug 2007. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707685> >.

BYRNES, E. J. *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942> >.

CASADEVALL, A. *et al.* Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol*, v. 17, n. 4, p. 158-62, Apr 2009. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299133> >.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, v. 1, n. 1, p. 17-24, Oct 2003. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040176> >.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*, v. 3, n. 4, p. 354-8, Aug 2000. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972493> >.

CASEY, A. L. *et al.* Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect*, v. 74, n. 1, p. 72-7, Jan 2010. ISSN 1532-2939. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931938> >.

CHANG, Y. C. *et al.* Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, v. 64, n. 3, p. 614-29, May 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462012> >.

CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 3, n. 5, p. 570-4, Sep 1996. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877137> >.

CHEN, S. H. *et al.* *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*, v. 52, n. Pt 11, p. 961-70, Nov 2003. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532340> >.

CHUN, C. D.; BROWN, J. C.; MADHANI, H. D. A major role for capsule-independent phagocytosis-inhibitory mechanisms in mammalian infection by *Cryptococcus neoformans*. *Cell Host Microbe*, v. 9, n. 3, p. 243-51, Mar 2011. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402362> >.

CHUN, C. D.; MADHANI, H. D. Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, v. 5, n. 9, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824073> >.

COELHO, C.; BOCCA, A.; CASADEVALL, A. The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Pathol*, Sep 2013. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050625> >.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo), v. 2013, p. 675213, 2013. ISSN 2090-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784> >.

CRABTREE, J. N. *et al.* Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, v. 80, n. 11, p. 3776-85, Nov 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890995> >.

DALLE, F. *et al.* Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. Cell Microbiol, v. 12, n. 2, p. 248-71, Feb 2010. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19863559> >.

DE JESUS, M. *et al.* Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. Eukaryot Cell, v. 8, n. 1, p. 96-103, Jan 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952901> >.

DIEZ-OREJAS, R.; FERNÁNDEZ-ARENAS, E. *Candida albicans*-macrophage interactions: genomic and proteomic insights. Future Microbiol, v. 3, n. 6, p. 661-81, Dec 2008. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19072183> >.

DING, C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. Cell Host Microbe, v. 13, n. 3, p. 265-76, Mar 2013. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498952> >.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. PLoS Pathog, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496639> >.

FARO-TRINDADE, I. *et al.* Characterisation of innate fungal recognition in the lung. PLoS One, v. 7, n. 4, p. e35675, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536422> >.

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

FELK, A. *et al.* *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. Infect Immun, v. 70, n. 7, p. 3689-700, Jul 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065511> >.

FLEVARI, A. *et al.* Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging*, v. 8, p. 1199-208, 2013. ISSN 1178-1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24043935> >.

FROHNER, I. E. *et al.* *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol*, v. 71, n. 1, p. 240-52, Jan 2009. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019164> >.

GANENDREN, R. *et al.* Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect*, v. 8, n. 4, p. 1006-15, Apr 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487740> >.

GANGULY, S.; MITCHELL, A. P. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, v. 14, n. 4, p. 380-5, Aug 2011. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741878> >.

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 64, n. 2, p. 147-61, Mar 2012. ISSN 1574-695X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029633> >.

GEUNES-BOYER, S. *et al.* Surfactant protein D facilitates *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*, v. 80, n. 7, p. 2444-53, Jul 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547543> >.

GORDON, S. B.; READ, R. C. Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br Med Bull*, v. 61, p. 45-61, 2002. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997298> >.

GOW, N. A. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*, v. 10, n. 2, p. 112-22, Feb 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158429> >.

GÁCSEER, A. *et al.* Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun*, v. 75, n. 10, p. 4710-8, Oct 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646357> >.

HAMER, D. H. Metallothionein. *Annu Rev Biochem*, v. 55, p. 913-51, 1986. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527054> >.

HODGKINSON, V.; PETRIS, M. J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem*, v. 287, n. 17, p. 13549-55, Apr 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389498> >.

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

HORNBY, J. M. *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, n. 7, p. 2982-92, Jul 2001. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425711> >.

HUANG, S. H. *et al.* *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e48570, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144903> >.

JARVIS, J. N. *et al.* High ongoing burden of cryptococcal disease in Africa despite antiretroviral roll out. *AIDS*, v. 23, n. 9, p. 1182-3, Jun 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451796> >.

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

JONG, A. Y. *et al.* HIV-1 gp41 ectodomain enhances *Cryptococcus neoformans* binding to HBMEC. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 356, n. 4, p. 899-905, May 2007. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400192> >.

KAMBUGU, A. *et al.* Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, v. 46, n. 11, p. 1694-701, Jun 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18433339> >.

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

KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 8, p. 625-34, Aug 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604221> >.

KIM, T. A. *et al.* HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J Immunol*, v. 170, n. 5, p. 2629-37, Mar 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594291> >.

KOH, A. Y. *et al.* Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*, v. 4, n. 2, p. e35, Feb 2008. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282097> >.

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

KUMAMOTO, C. A. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 9, p. 667-73, Sep 2008. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679170> >.

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

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

LOVE, G. L.; BOYD, G. D.; GREER, D. L. Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol*, v. 22, n. 6, p. 1068-70, Dec 1985. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905847> >.

LUTSENKO, S.; LESHANE, E. S.; SHINDE, U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys*, v. 463, n. 2, p. 134-48, Jul 2007. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562324> >.

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

MARUVADA, R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. *Cell Microbiol*, v. 14, n. 10, p. 1544-53, Oct 2012. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22646320> >.

MARVIN, M. E.; MASON, R. P.; CASHMORE, A. M. The CaCTR1 gene is required for high-affinity iron uptake and is transcriptionally controlled by a copper-sensing transactivator encoded by CaMAC1. *Microbiology*, v. 150, n. Pt 7, p. 2197-208, Jul 2004. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256562> >.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 119-28, Feb 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302789> >.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Chemother*, v. 18, n. 1, p. 1-9, Feb 2012. ISSN 1437-7780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045161> >.

MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. *Med Microbiol Immunol*, v. 202, n. 3, p. 183-95, Jun 2013. ISSN 1432-1831. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354731> >.

MORA-MONTES, H. M. *et al.* Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun*, v. 79, n. 5, p. 1961-70, May 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357722> >.

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

MOYES, D. L.; NAGLIK, J. R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*, v. 2011, p. 346307, 2011. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776285> >.

MURCIANO, C. *et al.* Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One*, v. 7, n. 3, p. e33362, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428031> >.

MÜLLER, U. *et al.* IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus*

neoformans. J Immunol, v. 179, n. 8, p. 5367-77, Oct 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911623> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. PLoS One, v. 4, n. 6, p. e5862, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517012> >.

NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A. *In vitro* measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. Methods Mol Biol, v. 844, p. 189-97, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic)1064-3745 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262444> >.

NOSANCHUK, J. D. *et al.* A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. Commun Integr Biol, v. 1, n. 1, p. 37-39, 2008. ISSN 1942-0889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169363> >.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? Clin Infect Dis, v. 33, n. 12, p. 1959-67, Dec 2001. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11702290> >.

OKAGAKI, L. H.; NIELSEN, K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. Eukaryot Cell, v. 11, n. 6, p. 820-6, Jun 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544904> >.

OLIVEIRA, D. L. *et al.* Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. Infect Immun, v. 78, n. 4, p. 1601-9, Apr 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145096> >.

OLIVEIRA, D. L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan. Fungal Genet Biol, v. 46, n. 12, p. 956-63, Dec 2009. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747978> >.

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. Am J Pathol, v. 164, n. 5, p. 1761-71, May 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111322> >.

OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. Future Microbiol, v. 5, n. 8, p. 1269-88, Aug 2010. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20722603> >.

OSAKI, S.; JOHNSON, D. A. Mobilization of liver iron by ferroxidase (ceruloplasmin). *J Biol Chem*, v. 244, n. 20, p. 5757-8, Oct 1969. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5360468> >.

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

PARK, H. *et al.* Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*, v. 7, n. 4, p. 499-510, Apr 2005. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760450> >.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*, v. 45, n. 4, p. 321-46, Jun 2007. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510856> >.

PHAN, Q. T. *et al.* Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*, v. 5, n. 3, p. e64, Mar 2007. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311474> >.

PITTET, D. *et al.* *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, v. 220, n. 6, p. 751-8, Dec 1994. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986142> >.

PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

PRICE, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. *MBio*, v. 2, n. 3, p. e00103-11, 2011. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21652778> >.

QIN, Q. M. *et al.* Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, v. 7, n. 6, p. e1002078, Jun 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698225> >.

RAJA, M. R. *et al.* A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics*, v. 5, n. 4, p. 363-71, Apr 2013. ISSN 1756-591X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23511945> >.

RIGGLE, P. J.; KUMAMOTO, C. A. Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. J Bacteriol, v. 182, n. 17, p. 4899-905, Sep 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940034> >.

RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. Eukaryot Cell, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039940> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Future Microbiology, p. 1297–1313, 2012.

SALEPPICO, S. et al. Differential effects of iron load on basal and interferon-gamma plus lipopolysaccharide enhance anticryptococcal activity by the murine microglial cell line BV-2. J Neuroimmunol, v. 93, n. 1-2, p. 102-7, Jan 1999. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10378873> >.

SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. Infect Immun, v. 72, n. 4, p. 2229-39, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039347> >.

SAVILLE, S. P. et al. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. Eukaryot Cell, v. 2, n. 5, p. 1053-60, Oct 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555488> >.

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

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

SILVA, F. D. et al. Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. FEMS Microbiol Lett, v. 324, n. 1, p. 64-72, Nov 2011. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092765> >.

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

SINGH, N.; FORREST, G.; PRACTICE, A. I. D. C. O. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, v. 9 Suppl 4, p. S192-8, Dec 2009. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070681> >.

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

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*, v. 5, n. 7, p. 667-75, Jun 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787743> >.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, v. 12, n. 7, p. 317-24, Jul 2004. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223059> >.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*, v. 9, n. 10, p. 737-48, Oct 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844880> >.

SUN, J. N. *et al.* Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 11, p. e1001181, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085601> >.

TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity*, v. 16, n. 6, p. 791-802, Jun 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121661> >.

TAFF, H. T. *et al.* A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 8, p. e1002848, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876186> >.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 5, p. 3165-70, Mar 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880650> >.

UPPULURI, P. *et al.* Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 3, p. e1000828, Mar 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360962> >.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 11, p. 3394-400, Nov 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384341> >.

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

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

WATERMAN, S. R. *et al.* Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*, v. 117, n. 3, p. 794-802, Mar 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290306> >.

WEISSMAN, Z. *et al.* The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 7, p. 3520-5, Mar 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737803> >.

WEKSLER, B. B. *et al.* Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*, v. 19, n. 13, p. 1872-4, Nov 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141364> >.

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

WHITE-OWEN, C. *et al.* Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J Clin Microbiol*, v. 30, n. 8, p. 2071-6, Aug 1992. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1500514> >.

WINTERS, M. S. *et al.* Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *J Infect Dis*, v. 202, n. 7, p. 1136-45, Oct 1 2010. ISSN 1537-6613 (Electronic)0022-1899 (Linking).

WRIGHT, L. C. *et al.* Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochem J*, v. 384, n. Pt 2, p. 377-84, Dec 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320865> >.

WÄCHTLER, B. *et al.* From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. PLoS One, v. 6, n. 2, p. e17046, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407800> >.

YANG, F. *et al.* Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 83, n. 10, p. 3257-61, May 1986. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3486416> >.

ZARAGOZA, O. *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. Cell Microbiol, v. 10, n. 10, p. 2043-57, Oct 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554313> >.

ZARAGOZA, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol, v. 68, p. 133-216, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426855> >.

ZHOU, B.; GITSCHIER, J. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 94, n. 14, p. 7481-6, Jul 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207117> >.

ŘÍHA, M. *et al.* Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. J Inorg Biochem, v. 123, p. 80-7, Jun 2013. ISSN 1873-3344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563391> >.

ANEXO I

CURRICULUM VITÆ resumido

FLACH, K.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Karoline Flach

Local e data de nascimento: Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 19/11/1988

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421. Lab 220. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Campus do Vale

Telefone profissional: 3308-7767 **E-mail:** karolflach@hotmail.com

2. FORMAÇÃO:

(2007-2011) Graduação em Farmácia na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Brasil.

Cursos de curta duração:

(2012) Análise *in silico* de proteínas. (Carga horária: 5h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

(2011) II Curso de Extensão Jovem Pesquisador. (Carga horária: 12h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

(2011) Farmacia Clínica: Alcances de la práctica farmac. (Carga horária: 12h).
Associação dos Farmacêuticos do Rio Grande do Sul.

(2011) Jornada de Análises Clínicas do Hospital São Lucas. (Carga horária: 6h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

(2011) Jornada Farmacêutica. (Carga horária: 4h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

(2010) Extensão universitária em Inovando na reciclagem de resíduos solventes.
(Carga horária: 1h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

(2007) Tópicos em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 14h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

(2007) Seminário de Integração das Áreas da Saúde - ENADE. (Carga horária: 3h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

3. ESTÁGIOS:

Iniciação científica:

(2009-2011) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – 20h – Orientação: Prof. Dr^a. Flavia Valladão Thiesen

Participação nos projetos:

(2009) “PET-Saúde” – Bolsista do Ministério da Saúde

(2010) “Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de Everolimo” – Bolsista BPA/PUCRS

(2011) “Monitoramento terapêutico de ácido micofenólico em pacientes transplantados renais” – Bolsista PIBIC/CNPq

Estágios curriculares:

(2011) Hospital São Lucas de Porto Alegre– 30h – Orientação: Me. Luciana Oliveira)

(2010) Fundação estadual de produção e pesquisa em saúde (FEPPS) – 20h - Orientação: Raquel Fiori de Souza e Jupira Pedroso de Souza

(2008 e 2010) Farmácia Universitária PANVEL/PUCRS

Estágio voluntário:

(2009-2010) Instituto de Toxicologia (INTOX-PUCRS)– 20h – Orientação: Prof. Dr^a. Flavia Valladão Thiesen

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

(2011) – Melhor apresentação oral da área de Toxicologia Clínica, XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia.

(2011) – Destaque no Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica da PUCRS

(2013) – Proficiência da Língua Inglesa – UFRGS

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. FLACH, K., FOGACA, N. S. S., SCHNEIDER, R. O., KMETZCH, L., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H., STAATS, C. C. Interaction of pathogenic yeast modulates copper homeostasis in macrophage cells In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal/RN. Anais do 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
2. SCHNEIDER, R. O., KULMANN, M. R., KMETZCH, L., FLACH, K., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A., STAATS, C. C. Functional characterization of genes involved in zinc metabolism in *Cryptococcus gattii* In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal/RN. Anais do 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
3. FLACH, K., FOGACA, N. S. S., SCHNEIDER, R. O., KMETZCH, L., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H., STAATS, C. C. Modulation of metal homeostasis in macrophages induced by the yeast *Cryptococcus gattii* In: 28ª

Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu/PR. Anais do 28ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2012.

4. FLACH, K., THIESEN, F.V. Monitoramento terapêutico de Ácido Micofenólico em células polimorfonucleares de pacientes transplantados renais. In: III Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica, 2011, Porto Alegre. Anais do III Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica. Edipucrs, 2011.
5. FLACH, K., FLECK, C., LIMA, S., OLIVEIRA, C.S.A., LEITE, C.E., D'ÁVILA, D.O., THIESEN, F.V. Avaliação da área sob a curva de micofenolato mofetil em paciente com diarreia In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto, SP. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011.
6. LIMA, S., FLACH, K., FLECK, C., OLIVEIRA, C.S.A., LEITE, C.E., D'ÁVILA, D.O., THIESEN, F.V. Avaliação da área sob a curva de Micofenolato Mofetila em paciente com efeito adverso gastrointestinal In: XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2010, Porto Alegre. Anais do XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2010.
7. FLACH, K., FLECK, C., LEITE, C.E., LIMA, S., OLIVEIRA, C.S.A., THIESEN, F.V., D'ÁVILA, D.O. Avaliação dos níveis de Ácido Micofenólico em pacientes transplantados renais In: XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2010, Porto Alegre, RS. Anais do XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2010.