



Universidade de Brasília

**Laboratório de Estudo de Fungos Patogênicos
Departamento de Biologia Celular**

**PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DA LACASE 1 RECOMBINANTE DE
Cryptococcus neoformans NO SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA *Pichia
Pastoris***

Aluna: Larissa Verginia do Nascimento Miranda

Orientador: Patrícia Albuquerque Nicola

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana
Brasília, 2023

AGRADECIMENTOS

“Ninguém é relevante sozinho.”, essa é uma frase que me acompanha desde 2019 e, com toda a certeza, não estaria entregando essa dissertação se não fossem por pessoas muito especiais que me apoiaram e não me deixaram desistir ao longo dessa jornada.

Meu primeiro agradecimento não podia deixar de ser para minha família, por terem me guiado, me incentivado e me deixado livre para seguir o caminho que decidisse independente do que acreditavam. Obrigada por serem a base de tudo.

Obrigada aos meus professores, por me motivarem a perseguir o conhecimento e o estudo com afinco e me mostrarem a como conhecer o mundo em suas diversas peculiaridades e pontos de vista. Deixo aqui registrado a minha profunda gratidão aos meus orientadores, Patrícia Albuquerque Nicola e Hugo Costa Paes, pelo voto de confiança e por terem me concedido essa oportunidade. Obrigada, professor Hugo, por ter me proporcionado o prazer de ser sua aluna, por ter aberto a porta do seu laboratório, me mostrado, em primeira mão, o que é ser apaixonado por aquilo que faz e me inspirado todos esses anos a ser uma ávida questionadora e buscadora do conhecimento. Obrigada, orientadores, por terem me motivado a chegar aqui, vocês foram uma das minhas principais motivações nesses últimos anos.

Agradeço a professora Janice, por estar sempre disponível quando precisei e por ter me incentivado mesmo quando todos os experimentos não estavam indo como planejado. E agradeço a Nadielle, por ter simplesmente me apoiado, mesmo sem me conhecer. Obrigada por todas as fermentações, disponibilidade, conversas e incentivos que você me deu, de todo o meu coração.

Não poderia deixar de agradecer à professora Ildinete por ter cedido um espacinho em seu laboratório para mim e a todos os meus colegas de laboratório: Jhones, Estefânia, Lara, Fabian, João e Kissia, obrigada por fazerem cada dia no lab3 ser cheio de conversa, risadas, conhecimento, reservas de fluxo, reposição de estoque e repiques etc., sem vocês os dias não teriam sido tão divertidos, motivadores e com toda certeza não teria aprendido tanto nos meus anos de laboratório.

À família Rodrigues e Costa (todos, sem exceção), deixo aqui a gratidão por terem aberto a porta da casa de vocês para me receber. Este mestrado não teria saído se não

fosse pelo apoio de vocês quando precisei, acordando cedo para me levar na católica e me buscando tarde, comprometendo horas do fim de semana de vocês para que eu pudesse conquistar esse título.

Obrigada Danielle Rodrigues, Catharine Graziani, Leandra Andrade e Luísa Farinon, por me escutarem, de coração aberto, e mesmo sem entender nada terem me ajudado nos últimos anos. Obrigada por segurarem minha mão em cada choro, por me derem broncas e por estarem aqui por mim, independentemente de qualquer coisa, o companheirismo faz com que a caminhada seja prazerosa.

Por fim, obrigada à Deus, provedor da vida, por ter a oportunidade de conquistar essa realização. A jornada pode ter sido longa e difícil, contudo, quando caminhamos de mão dadas com pessoas certas, cada passo é mais leve.

RESUMO

A meningoencefalite causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans* em pacientes imunocomprometidos, principalmente em pacientes com HIV, tem causado aproximadamente 122 mil mortes por ano. Os mecanismos de infecção e sua virulência são objeto de intensa investigação. A melanização do fungo é um dos fatores que aumenta sua virulência, e é catalisada por uma enzima chamada lacase 1 (Lac1). Além da atividade descrita, constatou-se que essa enzima pode ser um dos fatores que permite a sobrevivência do fungo no próprio líquido cefalorraquidiano (LCR), contribuindo para sua permanência no encéfalo. A levedura, *Pichia pastoris*, é um bom modelo para produção de proteínas, a cepa X-33 dessa levedura foi transformada por um plasmídeo contendo a sequência codante de Lac1, com o objetivo de produção de lacase recombinante. A expressão da enzima nos transformantes foi testada por ABTS, otimizada por testes de produção temporal e foi visto que, em frasco, diferentes tempos de indução não causam diferença significativas na produção da proteína. Além disso, entendeu-se que a Lac1 possui sensibilidade a alterações de pH, com atividade entre as faixas de 5,1 - 6,1 e que o aumento de escala para 1,5 litros de cultura leva a uma necessidade de aumento da frequência do fluxo de alimentação com o indutor metanol.

ABSTRACT

Meningoencephalitis caused by the fungus *Cryptococcus neoformans* in immunocompromised patients, especially in those with HIV, has resulted in approximately 122,000 deaths per year. The mechanisms of infection and its virulence are the subject of intense investigation. Fungal melanization is one of the factors that enhance its virulence and is catalyzed by an enzyme called laccase 1 (Lac1). Furthermore, beyond the described activity, it has been observed that this enzyme might be one of the factors enabling the fungus to survive within the cerebrospinal fluid (CSF), contributing to its persistence in the brain. The yeast *Pichia pastoris* serves as a suitable model for protein production. The X-33 strain of this yeast was genetically transformed with a plasmid containing the coding sequence of Lac1, aiming to produce recombinant laccase. The expression of the enzyme in the transformed strains was assessed using ABTS, and optimization was achieved through temporal production tests. It was noted that, in flask cultures, varying induction times did not result in significant differences in protein production. Additionally, it was established that Lac1 exhibits sensitivity to pH changes, with optimal activity within the pH range of 5.1 - 6.1. Moreover, as the scale of production increased, it was observed that there was a need for an increased feeding rate with the inducer methanol.

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. **Ciclo de infecção humana do *C. neoformans***. Infecção corporal via aspiração fúngica e disseminação no hospedeiro pela via linfática com a passagem da barreira hemato-encefálica e contaminação do sistema nervoso central. ADAPTADO de Idnurm, et al., 2005 11

Figura 2. **Mecanismos de evasão do *C. neoformans* do sistema de imunitário (resumo)**. (a) – Opsonização com proteína surfactante D (SPD). (b) – Inibição de receptor do complemento CR2 e CR3 pela proteína antifagocítica 1 (APP1); (c) – Diminuição de fagocitose por meio de CR3 e CR4; (d) – Silenciamento de receptores de reconhecimento padrão (PRR) por meio da GXM e indução de IL-10. (e) – Silenciamento do receptor EP2 por meio da expressão de Lacase 1 (LAC1) e aquisição de ácido araquidônico (AA) para a ativação da Prostaglandina E2. (f) – Neutralização de espécies reativas de oxigênio induzidos pela NADPH oxidase (PHOX); (g) – Neutralização de óxido nítrico (NO) induzida pela óxido nítrico sintase (iNOS); ADAPTADO de Olszewski, et al., 2010..... 13

Figura 3. **Vias de ativação (clássica e alternativa) do macrófago durante a resposta imune de células T CD4**. (A) Macrófagos ativados classicamente durante uma resposta Th1 contra *C. neoformans*, com estimulação de Interferon gama (INF-gama) e Interleucina (IL-12). Por meio dessa resposta, há a eliminação do fungo presente no interior da célula. (B) Indução da resposta Th2, ativada pela via alternativa com a metabolização da L-arginina para ureia e a produção de IL-10 e quimosinas MDC e TARC. ADAPTADO de Olszewski, et al., 2010 14

Figura 4. **Meios de ultrapassagem da barreira hematoencefálica (BHE) pelo *C. neoformans*. (A) Cavalos de Tróia**. Células fagocíticas podem carregar *C. neoformans* intracelularmente pela barreira BHE. (B) Transcitose. Interação com diversos mecanismos e componentes celulares faz com que a barreira seja modulada para permitir a passagem do fungo por meio do citoplasma das células endoteliais. (C) Difusão Paracelular. A matriz celular da BHE pode ser afetada pela infecção fúngica e se tornar mais permeável a passagem de células e substâncias, além disso o *C. Neoformans* possui mecanismos de adesão nas junções célula-célula, isso facilita a passagem da corrente sanguínea para o parênquima cerebral. Tradução dos títulos: (A) Trojan Horse – Cavalos de Tróia; (B) Transcytosis – Transcitose; (C) Paracellular Crossing – difusão paracelular; ADAPTADO de Chen, et al., 2022. 16

Figura 5. **Árvore filogenética de fungos que expressam alguma forma de lacase e sua aplicação em biorremediação**. Os alinhamentos e relações filogenéticas foram feitas utilizando MEGA X suíte. ADAPTADO Arregui, et al., 2019..... 18

Figura 6. **Esquema dos modos de operação de fermentação**. (A) Descontínuo; (B)Semi contínuo; (C) Contínuo. Sendo X a quantidade de biomassa no reator, S o substrato inicial, e V o volume do meio de cultura. (ADAPTADO Bolomanis, et al, 2023..... 25

Figura 7. **Esquema do plasmídeo pPICZcom o gene LAC1 de *C. neoformans***. Inserção da sequência genética de poli- histidina para que a proteína tenha a cauda na extremidade N

terminal e C terminal. Sequência do fator alfa para a secreção da enzima para o sobrenadante. 29

Figura 8. **Birreator TEC-BIO-FLO/CelliGen 115 New-Brunswick.** Utilizado para os experimentos de batelada e batelada alimentada, nas dependências da Universidade Católica de Brasília ... 32

Figura 9. **Absorbância de 419 nm de ABTS em sobrenadante da transformante H6 com indução de Lacase 1 em diferentes tempos.** Os experimentos foram realizados nos tempos de indução 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes ($k=3$; $n=9$) e induzidos em 100 mL e utilizado 200 μ L para o teste com ABTS na concentração de 1 mM. O ensaio foi submetido a um teste de ANOVA conferindo o nível de significância entre os testes, $p = 0,6861$ e $F = 0,4015$, concluindo a diferença não significativa entre os testes. n.s representa não significativo. 35

Figura 10. **Fluxo de produção com processo de otimização do protocolo.** Demonstração da concentração do sobrenadante nas fases subsequentes à produção. 41

Figura 11. **Gel SDS-PAGE para visualização da Lac 1.** O peso molecular previsto para Lac 1 incluindo Poli-His é de 71 KDa. Linha 1 - Marcador molecular; Linha 2 - Sobrenadante de indução de 48 horas em 1000 mL de X-33, concentrado. Linha 3 - Sobrenadante de indução por 48 horas em 500 mL de H6, concentrado. Linha 4 - Sobrenadante de indução por 48 horas em 1000 mL de H6, concentrado. Coloração por Coomassie Blue. Todas as linhas são 10 microlitros da amostra. Seta verde indica a possibilidade da presença de Lac 1. 42]

Figura 12. **Absorbância de 600 nm da biomassa no reator no T0 da indução por metanol.** Com os dados absolutos, o índice de crescimento utilizando BMM como meio de cultura foi maior do que o índice de crescimento quando UAB foi utilizado. T0 de indução tem como média 30 horas de crescimento fúngico com 2% de glicerol como fonte de carbono. 43

Figura 13. **Fluxos de produção de Lacase 1 recombinante de *C. neoformans* em *K. phaffii* via batelada “simples” e batelada alimentada.** Os fluxos são parecidos nas fases de pré-inóculo, inóculo e crescimento celular com o consumo total de glicerol. Na batelada simples há uma alimentação pontual de 1% de metanol a cada 24 horas, seguindo o protocolo trabalhado nos testes feitos em frascos. Já na batelada alimentada, há uma fase de adaptação da levedura à nova fonte de carbono, metanol. Após há a indução com uma alimentação frequente e com uma concentração maior de metanol. 44

Figura 14. **Absorbância de 419 nm do sobrenadante de H6 concentrado 100X após indução de 48 horas e realização de teste enzimático com ABTS.** Com os dados absolutos, o índice de atividade da enzima com sua produção via batelada alimentada pode ter sido aumentado e, conseqüentemente, a sua concentração no sobrenadante. 45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
1.2. Infecção e Virulência	12
1.3. Sistema Nervoso Central (SNC)	15
1.4. Lacase de <i>C. neoformans</i>	17
1.5. Lacase.....	18
1.6. Tratamentos.....	22
1.7. Proteína Recombinante e <i>Komagataella phaffii</i>	23
1.8. Processos fermentativos de produção	24
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.2. Seleção de recombinantes	30
4.3. Produção em frasco e otimização dos parâmetros	30
4.4. Aumento de escala de produção e otimização de parâmetros	31
4.4.1. Meio UAB.....	32
4.4.2. Meios BMGY e BMM	33
4.5. Presença e purificação enzimática	33
4.5.1. Cromatografia de afinidade	33
4.5.2. Cromatografia de troca iônica	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	46
7. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Cryptococcus neoformans*

O gênero *Cryptococcus* inclui mais de 50 espécies de leveduras encapsuladas do Filo Basidiomycota. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as espécies de maior relevância por serem agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica que ocorre no homem e em animais, saudáveis ou imunossuprimidos (Casadevall & Perfect, 1998; Ma & May, 2009).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1894, em uma mulher de 31 anos que apresentava uma lesão na tíbia, tratando-se de uma enfermidade relativamente rara. Anos após a descrição inicial do *C. neoformans*, classificou-se a existência de duas espécies distintas no gênero *Cryptococcus*, *C. gattii* e *C. neoformans* por apresentarem diferenças filogenéticas e moleculares, bem como sua relação quanto ao nicho, distribuição geográfica, epidemiologia, patologia e sintomatologia clínica (Bovers, *et al.*, 2008).

Em estudos publicados por Hagen, *et al* (2015), demonstrou-se que há sete espécies patogênicas no gênero *Cryptococcus*: *C. neoformans* (VNI, VNII, VNII) e *C. deneoformans* (VNIV), além de *Cryptococcus gattii* (VGI), *Cryptococcus bacillisporus* (VGIII), *Cryptococcus deuterogattii* (VGII), *Cryptococcus tetragattii* (VGIV), *Cryptococcus decagattii* (VGIVj/VGIIIc)

C. neoformans é um fungo oportunista que pode ser isolado de fontes de matéria orgânica ao redor do mundo. Normalmente sua infecção ocorre pela inalação do organismo a partir de fontes ambientais, não sendo observado infecção via interação humano-humano ou animal-humano (Sabetta & Andriole, 1985, Idnurm, *et al.*, 2005).

A infecção por criptococose pode acontecer em qualquer órgão, contudo é normalmente manifestada no pulmão e no sistema nervoso central (SNC) (Sabiiti, *et al.*, 2014). A aspiração do fungo no ambiente é uma das formas de colonização do hospedeiro (Sabetta & Andriole, 1985, Idnurm, *et al.*, 2005) (Figura 1). Ao entrar em contato com o indivíduo, existem várias possibilidades: infecção assintomática, em que o fungo entra em latência e pode ser reativado em caso de baixa da imunidade (Spitzer, *et al.*, 1993; Kobayashi, *et al.*, 2004); ausência da infecção, em que o fungo é eliminado pelo sistema imunitário do hospedeiro (Spitzer, *et al.*, 1993; Kobayashi, *et al.*, 2004) e doença

pulmonar, em que há o processo de infecção do parênquima pulmonar (figura 1), que pode se disseminar sistemicamente (Spitzer, *et al.*, 1993; Kobayashi, *et al.*, 2004).

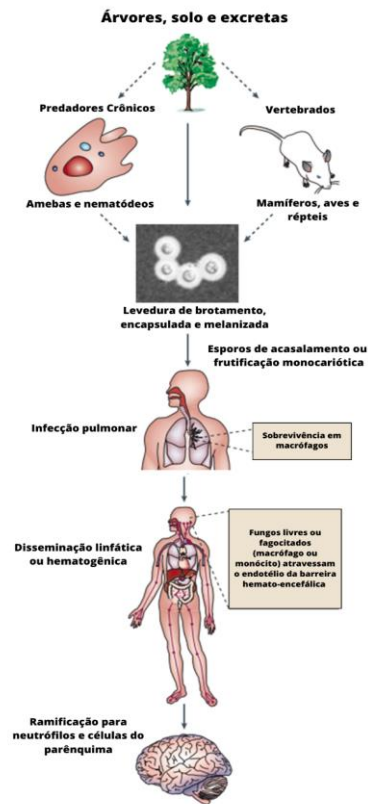


Figura 1. **Ciclo de infecção humana do *C. neoformans*.** Infecção corporal via aspiração fúngica e disseminação no hospedeiro pela via linfática com a passagem da barreira hemato-encefálica e contaminação do sistema nervoso central. ADAPTADO de Idnum, *et al.*, 2005

A meningoencefalite, infecção no SNC por *Cryptococcus*, é uma condição progressiva e fatal se não tratada, e quando tratada, pode deixar sequelas (Rajasingham *et al.*, 2022). Em um estudo com casos de relatos reais de infecção foi visto que após 1 ano do diagnóstico e tratamento 13-14% dos pacientes demonstraram vertigens constantes, 13-23% tiveram perda de visão, 3-16% demonstraram deficiência motora (Pasquier, *et al.*, 2017).

A maioria dos pacientes com imunidade intacta é capaz de combater a infecção, a preocupação com esse fungo começa com sua capacidade de causar doenças em pacientes imunocomprometidos, como pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência humana, a Aids (Jarvis & Harrison, 2005).

Com 152 mil casos anuais de neurocriptococose em pacientes com HIV e aproximadamente 122 mil mortes, tratamento e de prevenção têm sido estudadas contra essa espécie, pois, além da elevada letalidade, 19% das mortes relacionadas a pacientes com

Aids, aqueles que sobrevivem quase sempre convivem com sequelas (Rajasingham et al., 2022).

1.2. Infecção e Virulência

A virulência de um patógeno refere-se à capacidade dele de causar doença ou dano em seu hospedeiro. Ela é determinada por uma série de fatores, incluindo a habilidade do patógeno de invadir o hospedeiro, multiplicar-se dentro dele e evitar ou suprimir sua resposta imune. A virulência pode variar amplamente entre diferentes patógenos e pode ser afetada por fatores ambientais e do sistema do hospedeiro, bem como pela genética do agente infeccioso (Olszewski, *et al.*, 2010). Patógenos altamente virulentos têm maior probabilidade de causar doenças graves e potencialmente fatais em seus hospedeiros (Olszewski, *et al.*, 2010).

Células apresentadoras de antígenos são uma das primeiras linhas de defesa contra a infecção. Receptores do tipo Toll de reconhecimento de compostos como beta-glicana e manose são os mais comuns para um rápido reconhecimento do fungo, levando à ativação do processo de fagocitose e eliminação do organismo por meio dos macrófagos (Biondo, *et al.*, 2005; Dan et al., 2008). Contudo, as cepas de *C. neoformans* possuem mecanismos de virulência para que haja uma rápida adaptação e reprodução mesmo na presença da imunidade inata.

A falta do reconhecimento de sua presença pelo sistema é uma das principais formas de evasão das cepas virulentas de *C. neoformans*. Para que isso ocorra, há a formação de uma cápsula protetora e liberação de agentes antioxidantes (Figura 2d,e,f). Essa cápsula é capaz de mascarar os antígenos presentes na parede celular do fungo e evitar a identificação pelos receptores das células apresentadoras de antígeno, principalmente macrófagos (Olszewski, *et al.*, 2010). Além disso, ela inibe fortemente a ligação de componentes do sistema complemento (figura 2c), fazendo que a sinalização pós-fagocitose seja diminuída e o fungo consiga evadir aos mecanismos de lise presentes nos lisossomos do macrófago (Stano, *et al.*, 2009).

Essa cápsula é feita de polissacarídeos ricos em resíduos de glicuronoxilomana (GXM), que contribui para a estabilidade e permanência do *C. neoformans*, principalmente no sistema nervoso central (SNC) (Sabiiti et al., 2014). Entre as propriedades que favorecem o fungo, a inibição da atividade de linfócitos T, induzindo a produção de IL-10 e regulando negativamente a secreção de citocinas produzidas pelos neutrófilos e

macrófagos são umas das mais importantes (Vecchiarelli, *et al.*, 2003; Boulware, 2011) (Figura 2d).

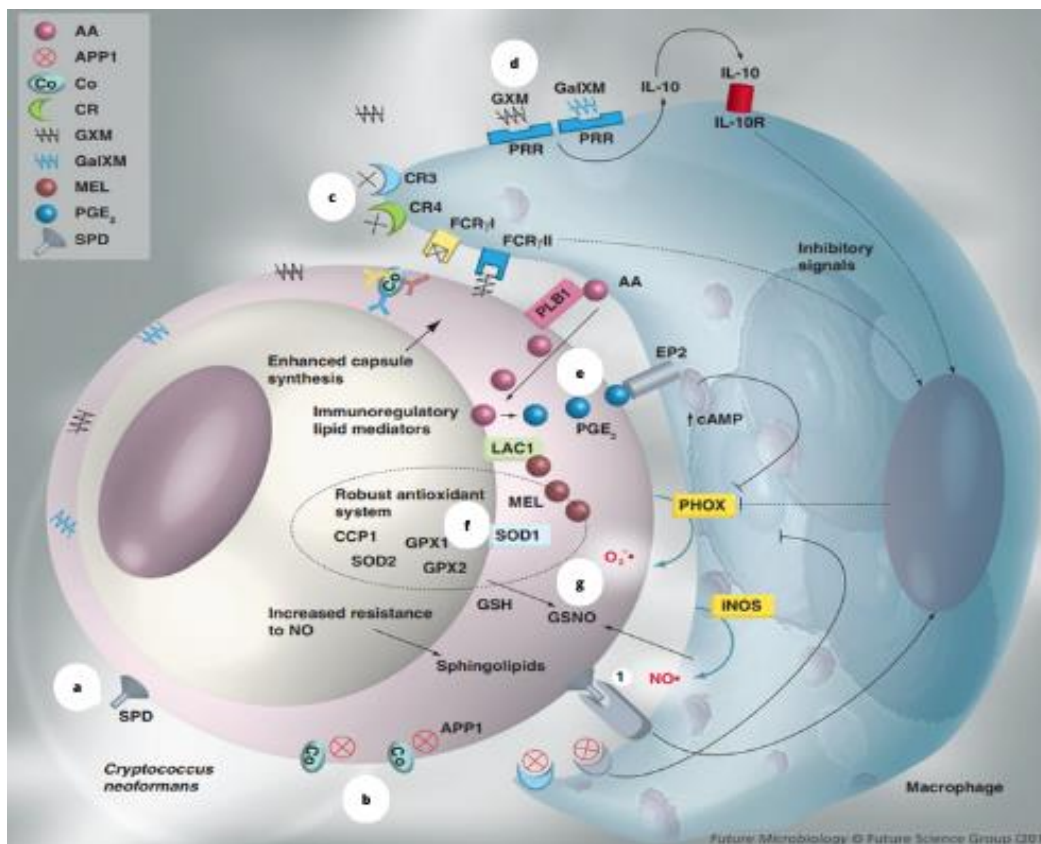


Figura 2. Mecanismos de evasão do *C. neoformans* do sistema de imunidade (resumo). (a) – Opsonização com proteína surfactante D (SPD). (b) – Inibição de receptor do complemento CR2 e CR3 pela proteína antifagocítica 1 (APP1); (c) – Diminuição de fagocitose por meio de CR3 e CR4; (d) – Silenciamento de receptores de reconhecimento padrão (PRR) por meio da GXM e indução de IL-10. (e) – Silenciamento do receptor EP2 por meio da expressão de Lacase 1 (LAC1) e aquisição de ácido araquidônico (AA) para a ativação da Prostaglandina E2. (f) – Neutralização de espécies reativas de oxigênio induzidos pela NADPH oxidase (PHOX); (g) – Neutralização de óxido nítrico (NO) induzida pela óxido nítrico sintase (iNOS); ADAPTADO de Olszewski, *et al.*, 2010

Outro fator que contribui para uma alta virulência é o processo de melanização (Sabiiti *et al.*, 2014). Ele é catalisado por uma enzima chamada lacase 1 (Lac 1) (figura 2d) e utiliza componentes aromáticos, como L-DOPA e dopamina (Boulware, 2011), que são abundantes no encéfalo. Apesar da melanização do fungo ter como consequência uma maior resistência às defesas do hospedeiro, observou-se que não é esse processo que mantém o fungo vivo no líquido cefalorraquidiano (LCR), e sim a atividade de Lac1 em si (Sabiiti *et al.*, 2014), indicando a importância da enzima independentemente da produção de melanina.

Além da cápsula e da melanização com a presença de Lac 1, existem outros fatores de virulência que contribuem para evasão e disseminação do *C. neoformans*. A

fosfolipase B1 (Plb1) tem o papel de catalisar a hidrólise de fosfolipídios em lipídios neutros e ácidos graxos livres encontrados no interior dos macrófagos (Boulware, 2011), por isso tem um papel importante na sobrevivência do fungo no interior do macrófago. Em conjunto com a Plb1, a urease é necessária para que o fungo consiga disseminar-se e ultrapassar a barreira hematoencefálica (Vu, et al., 2013).

Como visto nos parágrafos anteriores, os macrófagos desempenham um papel de suma importância no combate a infecção por *C. neoformans*. Ao fagocitar o fungo, ele dá o início a sinalização para a ativação da resposta do sistema imunitário adaptativo, que é mediado por células CD4.

Uma resposta celular mediada por linfócitos T desempenha um papel importante na eliminação do fungo pelo indivíduo. A composição de manoproteínas presentes na cápsula e parede celular são cruciais para ativar as células T CD4. Já foi visto que humanos com deficiência nesse tipo celular, como os pacientes com HIV, são mais predispostos a infecção causadas pelo fungo (Crowe, et al., 1991; Jarvis & Harrison, 2005)

Para uma remoção efetiva do *C. neoformans*, é necessária uma resposta CD4+ Th1 (Olszewski, et al., 2010) (Figura 3A). Contudo já se demonstrou que isolados altamente virulentos promovem uma resposta do tipo CD4+ Th2 (Olszewski, et al., 2010) (figura 3B), já que as citocinas liberadas causam a ativação alternativa de macrófagos e, portanto, promovem a proliferação intracelular do fungo (Hernandez, et al., 2005; Zhang, et al., 2009) (Figura 3B).

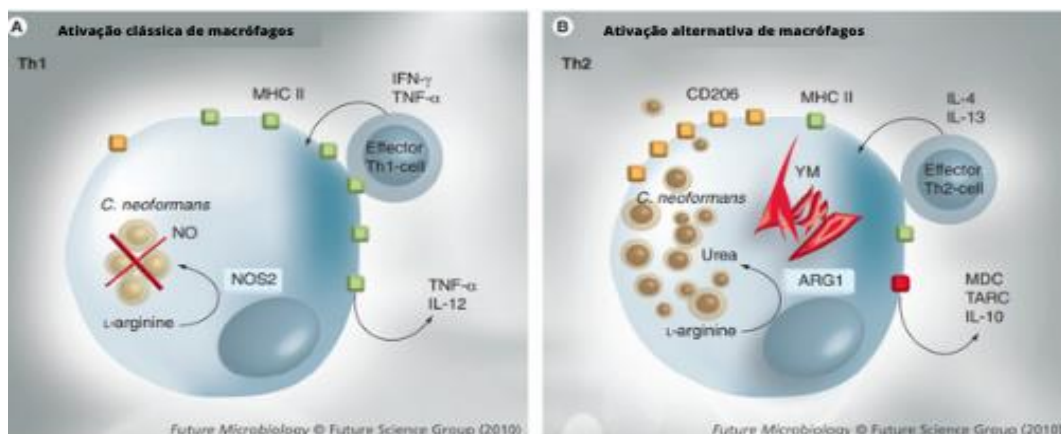


Figura 3. Vias de ativação (clássica e alternativa) do macrófago durante a resposta imune de células T CD4. (A) Macrófagos ativados classicamente durante uma resposta Th1 contra *C. neoformans*, com estimulação de Interferon gama (INF-gama) e Interleucina (IL-12). Por meio dessa resposta, há a eliminação do fungo presente no interior da célula. (B) Indução da resposta Th2, ativada pela via alternativa com a metabolização da L-arginina para ureia e a produção de IL-10 e quimosinas MDC e TARC. ADAPTADO de Olszewski, et al., 2010

Pudemos ver que o *C. neoformans* possui várias formas de se evadir à resposta imunitária do hospedeiro, principalmente quando há uma deficiência nesse mecanismo. Dentre as diversas formas, a formação de camadas protetoras, como a cápsula e a melanina, e modulação da resposta do sistema inato e adaptativo, leva a dispersão do patógeno para outros órgãos e a colonização dele até no SNC (Idnurm, et al., 2005, Sabiiti, et al., 2014).

1.3. Sistema Nervoso Central (SNC)

Existem dois sítios de entrada no SNC para patógenos considerados neurotrópicos: Pela barreira hematoencefálica (BHE) e pela barreira hemato-liquórica (BHL) (Dando, et al., 2010). As duas possuem a função de regular o transporte de substâncias entre o sangue e o líquido, contudo a BHL é formada por células endoteliais, células gliais e outras células especializadas que permitem o transporte de glicose, aminoácidos e hormônios para o cérebro (Chen, et al., 2022). Já a BHE é formada principalmente por células endoteliais e é mais seletiva com a passagem de substâncias e outras células. Por fim, BHE está localizada nos vasos sanguíneos do cérebro e da medula espinhal, enquanto a BHL está localizada nos vasos sanguíneos que irrigam o plexo coroide (Chen, et al., 2022).

Em camundongos, já foi visto que o *C. neoformans* possui dificuldade de atravessar as células presentes no plexo coróide, evidenciando que a rota provável de invasão do SNC é por meio da BHE (Chang, et al., 2004; Charlier, et al., 2014). Durante uma inflamação, leucócitos podem migrar por meio dessa barreira para o parênquima cerebral por meio das junções célula-célula ou por meio de endocitose mediada por células endoteliais. Existem três vias principais nas quais podem ser utilizadas para a entrada do fungo no SNC por meio da BHE: Cavalo de Tróia, Transcitose e Difusão Paracelular (Dando, et al., 2010).

A passagem pela BHE do *C. neoformans* dentro de células como neutrófilo ou macrófago pode ser considerado como uma entrada via cavalo de Tróia (Figura 4A). A condição de parasita intracelular do fungo dá suporte para essa hipótese, além disso foi visto que a remoção de macrófagos e células dendríticas alveolares diminuem a presença do patógeno no cérebro indicando o papel dessas células para a disseminação no SNC (Chang, et al., 2004; Charlier, et al., 2005)

O *C. neoformans* possui a capacidade de se aderir a células endoteliais pela expressão do gene da sintetase de ácido hialurônico (CPS1) (Jong, et al., 2007). A transcitose pode ser iniciada pela interação entre ácidos hialurônicos catalisados pela CPS1 e CD44 presentes nas células endoteliais. Camundongos deficientes em CD44 apresentaram uma presença menor do fungo no cérebro (Jong, et al., 2012). Existem outras formas de transcitoses entre o fungo e as células endoteliais para a colonização do fungo no líquido, como pela presença da fosfolipase B (Plb1) (Figura 4B).

Quando há uma inflamação, os tecidos ao redor sofrem dano pela presença de citocinas e quimiocinas utilizadas para combater a infecção. Nessas condições, as células ao redor tornam-se mais permeáveis e foi visto que o *C. neoformans* pode causar alterações nas interações célula-célula e no citoesqueleto das células endoteliais (Vu, et al., 2013). Ao se encontrar em um meio com essas condições, é possível que haja invasão do SNC pelo fungo por meio de difusão paracelular (Figura 4C).

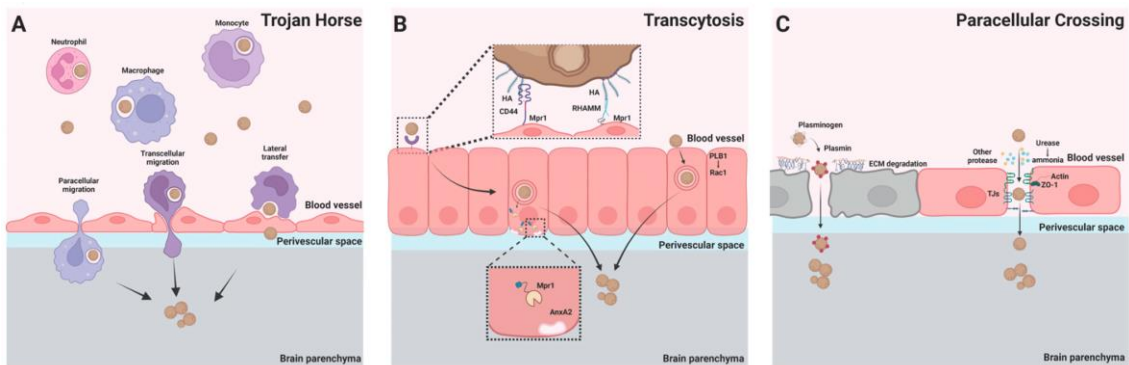


Figura 4. Meios de ultrapassagem da barreira hematoencefálica (BHE) pelo *C. neoformans*. (A) Cavalo de Tróia. Células fagocíticas podem carregar *C. neoformans* intracelularmente pela barreira BHE. (B) Transcitose. Interação com diversos mecanismos e componentes celulares faz com que a barreira seja modulada para permitir a passagem do fungo por meio do citoplasma das células endoteliais. (C) Difusão Paracelular. A matriz celular da BHE pode ser afetada pela infecção fúngica e se tornar mais permeável a passagem de células e substâncias, além disso o *C. Neoformans* possui mecanismos de adesão nas junções célula-célula, isso facilita a passagem da corrente sanguínea para o parênquima cerebral. Tradução dos títulos: (A) Trojan Horse – Cavalo de Tróia; (B) Transcytosis – Transcitose; (C) Paracellular Crossing – difusão paracelular; ADAPTADO de Chen, et al., 2022.

Ao passar a BHE o fungo encontra com o sistema de defesa do SNC, o que inclui células da micróglia, que são os monócitos/macrófagos residentes do encéfalo, além das células NK, citocinas, células T e anticorpos (Chen, et al., 2022). Como visto no tópico anterior, o fungo possui vários mecanismos de virulência para combater as defesas do hospedeiro.

A presença da Lac 1 é crucial por participar da via de biossíntese da melanina, por meio da oxidação de catecolaminas encontradas nos lisossomos (Casadeval, et al.,

2020), que se acumula na parede celular do fungo em conjunto com a cápsula. Em adição, a presença dessa enzima também é importante por diminuir respostas do tipo Th17 no recrutamento de neutrófilos cerebrais (Erb-Downward, *et al.*, 2008; Qiu, *et al.*, 2012). E em pacientes com HIV, foi visto que essa enzima age na interação macrófago-fungo no líquido, evitando com que haja a fagocitose do fungo (Sabiiti *et al.*, 2014). Todos esses papéis desempenhados pela enzima tem como consequência o aumento da virulência e a torna importante para a sobrevivência do fungo em humanos.

1.4. Lacase de *C. neoformans*

O *C. neoformans* possui dois genes que codificam lacases, *LAC1* e *LAC2*, regulados pelos estresses oxidativo e nitroativo. Eles são orientados em tandem, ou seja, um seguido do outro, e são muito similares em estrutura. Contudo, a enzima codificada pela *LAC1* é mais eficiente na produção de melanina, isso dá-se pela diferença do *splicing* dos genes durante a transcrição, resultando na produção de Lac 2 sem uma conformação funcional e pela presença da Lac 1 na parede celular do fungo, sofrendo uma maior exposição à L-DOPA, já que a Lac 2 se encontra na matriz citoplasmática (Zhu, *et al.*, 2004; Puk-kila-Worley *et al.*; Missall, *et al.*, 2002).

Além de participar de forma mais ativa na produção da melanina, a Lac 1 de *C. neoformans* também possui um papel na via de produção de prostaglandinas. Ela participa auxiliando a conversão de PGG2 em PGE2 (Erb-Downward *et al.*, 2008), que pode modular de forma negativa a produção de quimosinas e de TNF α , além da incentivar a proliferação celular, enquanto estimula a produção de IL-10, que inibe o desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo Th1 (Noverr *et al.*, 2001).

Em seu estudo da modulação imunitária promovida pela presença de Lac1, Qiu *et al.*, 2012 demonstrou que a Lac 1 polariza uma resposta Th2 no pulmão, levando a uma maior expressão de IL-17 e INF γ . Esta polarização faz que haja uma maior disseminação para o SNC, visto que camundongos infectados com fungos sem Lac 1 tiveram uma migração para o cérebro 2-3 vezes menor do que os que foram infectados com fungo nativo.

A Lac 1 de *C. neoformans* é uma enzima chave na virulência do patógeno, não só por participar da via de síntese da melanina, mas por fazer parte em diversos mecanismos de sobrevivência fúngica, mesmo que ainda seja necessário elucidar alguns aspectos, como o mecanismo da permanência do fungo no líquido e sua interação uma vez no SNC.

1.5. Lacase

Lacases, p-difenol:dioxigênio oxirredutase (EC 1.10.3.2), são fenol-oxidases com múltiplos átomos de cobre como grupos prostéticos. Elas são versáteis pela sua capacidade de catalisar a oxidação de diversos compostos fenólicos, e não-fenólicos, como lignina, polifenóis e aminas aromáticas, reduzindo os oxigênios desses compostos em água (Kim, *et al.*, 2001, Upadhyay, *et al.*, 2016).

Essas enzimas são encontradas amplamente em diversos grupos de organismos, como plantas, bactérias e fungos. Entre as espécies fúngicas (figura 5) podemos dizer que os basidiomicetos produzem diversas formas de lacases. Elas estão envolvidas em esporulação, produção de pigmentos, defesa contra estresses ambientais, degradação de lignina e relação hospedeiro-patógeno (Alcalde, 2007, Thurston, 1994). As lacases são alvo de diversas pesquisas, principalmente para biorremediação devido a sua versatilidade de catalisar grandes cadeias de hidrocarbonetos (figura 5) (Arregui, *et al.*, 2019).



Figura 5. *Árvore filogenética de fungos que expressam alguma forma de lacase e sua aplicação em biorremediação. Os alinhamentos e relações filogenéticas foram feitas utilizando MEGA X suíte. ADAPTADO Arregui, et al., 2019.*

Constatou-se que as lacases produzidas por *Talaromyces marneffe* podem desempenhar um papel na virulência do fungo em infecções em pacientes com AIDS (Sapmak, *et al.*, 2015, Sapmak, *et al.*, 2016, Williamson, 2016). Mutantes com deleções simples, duplas, triplas e quádruplas dos genes que codificam as lacases lacA, lacB, lacC e pbrB foram feitas e apenas o mutante quádruplo mostrou sensibilidade aumentada aos agentes antifúngicos e vulnerabilidade à fagocitose e morte pela linhagem celular de monócitos

THP-1 (Sapmak, *et al.*, 2016, Williamson, 2016). Estes resultados sugerem que a lacase do *T. marneffe* promove a resistência desse patógeno às defesas imunes do hospedeiro (Sapmak, *et al.*, 2015).

Já na indústria, uma das principais aplicações das lacases é na remoção de poluentes contaminantes na água, dentre eles estão presentes componentes fenólicos, tinturas, disruptores endócrinos, hidrocarbonetos aromáticos, antibióticos, Anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) e pesticidas (tabela 1).

Tabela 1. Aplicação e mecanismos de lacases fúngicas no processo de biorremediação de poluentes. ADAPTADO Arregui, *et al.*, 2019.

Fonte de Lacase	Aplicação	Função (aplicação)	Principais mecanismos envolvidos (em pesquisa)	Referência
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCT-4518	Degradação de compostos farmacêuticos	Remoção de 17-alpha-ethynilestradiol (EE2)	A lacase é capaz de formar dímeros do EE2 por polimerização	[49]
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Degradação de compostos farmacêuticos	Degradação de estrogênios	Hidroxilação dos estrogênios	[56]
<i>Trametes versicolor</i>	Degradação de compostos Farmacêuticos	Degradação de PhAC: diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole	Não reportado	[50]
	Degradação de compostos Farmacêuticos	Degradação de Chlortetracycline (CTC)	Não reportado	[52]
	Degradação de compostos Farmacêuticos	Oxidação de fenol (in vitro)	Acoplamento oxidativo de radicais fenoxi como principal via de conversão de fenol	[43]
	Descoloração de corantes sintéticos	Biodegradação de corantes triphenylmethane	Oxidação do carbono metílico da estrutura do corante, proporcionando produtos estáveis	[57]

Fonte de Lacase	Aplicação	Função (aplicação)	Principais mecanismos envolvidos (em pesquisa)	Referência
<i>Trametes hirsuta</i>	Degradação de compostos farmacêuticos	Degradação de chloramphenicol (CAP)	Desalogenação e oxidação do CAP pela lacase para formar aldeído de clo-ranfenicol	[53]
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Degradação de compostos Farmacêuticos Plásticos, compostos de herbicida e de produtos de higiene pessoal	Degradação de produtos químicos desreguladores endócrinos (EDCs): nonylphenol and triclosan (a bio-cida) Degradação do disruptor endócrino emergente (bisphenol A)	Oxidação impulsio-nada por enzimas Provavelmente a degradação na formação terminal da 4-isopropenylphe-nol	[41] [42]
<i>Pleurotus ostrea-tus</i>	Degradação de compostos farmacêuticos	Degradação da ci-profloxacin (CIP)	Não reportado	[52]
<i>Anthraco-phyllum discolor</i>	Plásticos, compostos de herbicida e de produtos de higiene pessoal	Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)	Produtos de degradação: anthraqui-none, phthalic acid, 4-hydroxy-9-fluorenone, 9-fluorenone and 4,5-di-hydropyrene	[39]
<i>Trametes pubes-cens</i>	Plásticos, compostos de herbicida e de produtos de higiene pessoal	Biodegradação de uma mistura de 2-chlorophenol (CP), 2,4-dichlorophe-nol (DCP), 2,4,6-trichlorophenol (TCP), pentachlo-rophenol (PCP)	Não reportado	[44]
<i>Neosartorya fis-cheri</i>	Plásticos, compostos de herbicida e de produtos de higiene pessoal	Metabolização e mineralização de asfaltenos (fração recalcitrante de petróleo)	Geração de meta-bólitos oxidados, como: hydroxypyrenedione and	[40]

Fonte de Lacase	Aplicação	Função (aplicação)	Principais mecanismos envolvidos (em pesquisa)	Referência
			hydroxyphenylacetic acid	
<i>Coriolopsis rigida</i>	Plásticos, compostos de herbicida e de produtos de higiene pessoal	Desintoxicação da fração solúvel em água de "alpeorujó" (WSFA)	Oxidação de fenóis livres, resultando na formação de radicais, levando à polimerização e à desintoxicação	[208]
<i>Trametes villosa</i>	Plásticos, compostos de herbicida e de produtos de higiene pessoal	Bisphenol A (BPA) degradation	O BPA foi metabolizado em dois compostos: um de alto peso molecular devido à condensação oxidativa e outro identificado como 4-isopro-penylphenol	[54]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Poluentes à base de corantes	Corantes descolorantes utilizados na indústria têxtil	Não mencionado, contudo, resultados de fitotoxicidade mostraram que o processo não gerou produtos tóxicos detectáveis	[46]
<i>Ganoderma lucidum</i>	Poluentes à base de corantes	Descoloração de xanthene, azo and triarylmethane dyes	Não reportado	[47]
<i>Oudemansiella canarii</i>	Poluentes à base de corantes	Descoloração de congo red	A lacase atua não apenas no grupo cromóforo do corante, mas também cliva diferentes ligações covalentes, causando uma fragmentação efetiva da molécula	[48]
<i>Trametes trogii</i>	Poluentes à base de corantes	Descoloração de corantes sintéticos	Oxidação direta de certos corantes e/ou pelo sistema mediador de lacase	[58]

A expressão heteróloga de diversas lacases fúngicas já foi reportada em sistemas de expressão como *E. coli*, *Komagataella phaffii* e *Yarrowia lipolytica* para aumento da proteína obtida e o seu uso para potencial aplicações em biorremediação (Colao, *et al.*, 2006, Madzak, *et al.*, 2005). Leveduras e fungos filamentosos possuem um maior atrativo para produção heteróloga devido a seu crescimento rápido, edição genética facilitada, produtividade alta e habilidade de performar modificações pós-traducionais (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013) como explanado no tópico Proteína Recombinante e *Komagataella phaffii* dessa introdução.

1.6. Tratamentos

Os antifúngicos são a principal classe de medicamentos usados no tratamento da criptococose. Os mais comumente utilizados incluem o fluconazol, a anfotericina B e a flucitosina (Alan, *et al.*, 1987, Marra & Camargo, 2002). O tratamento com antifúngicos geralmente duram várias semanas e pode ser prolongado em casos graves ou em pacientes com sistemas imunológicos comprometidos. O tratamento com antifúngicos deve ser monitorado cuidadosamente, pois pode ser tóxico para o fígado e outros órgãos.

A anfotericina B é frequentemente utilizada como tratamento de primeira linha para pacientes com criptococose grave, especialmente aqueles com comprometimento do sistema nervoso central (Alan, *et al.*, 1987). Já o fluconazol é um antifúngico oral que é frequentemente utilizado como tratamento de primeira linha para pacientes com criptococose menos grave. O fluconazol é menos tóxico do que a anfotericina B, mas é menos eficaz em casos mais graves (Marra & Camargo, 2002).

O tratamento da criptococose pode ser desafiador, especialmente em pacientes com sistemas imunológicos comprometidos. O uso de antifúngicos pode ser limitado pela toxicidade e resistência aos medicamentos, como demonstrado no estudo feito por Vieira Júnior, 2015 (mestrado fiocruz – medicina tropical) onde foi observado perda visual, alteração cognitiva e convulsões frequentes pós-tratamento.

Tratamentos alternativos aos protocolados para infecções fúngicas têm sido estudados. Khan, *et al.*, 2021 e Azam, *et al.*, 2022, demonstram que em *in silico* e *in vitro* o composto fenólico ácido elágico (EA) aumentou a taxa de sobrevivência em 70% dos

camundongos infectados com *C. neoformans* em comparação a 20% de sobrevivência quando tratados com fluconazol. Nesses mesmos estudos viu-se que o composto inibe a ação da lacase, mais uma vez ressaltando a importância desta enzima para virulência fúngica.

Outra forma é a utilização de peptídeos microbianos para o combate à infecção. Peptídeos sintéticos, como Mo-CBP3-PepII, RcAlb-PepII, RcAlb-PepIII, PepGAT, que degradam a membrana celular, estão sendo estudados devido ao seu potencial de inibição de crescimento fúngico para serem utilizados como em conjunto com terapias já existentes de combate à infecção fúngica (Aguiar, *et al.*, 2022).

Como falado no tópico do SNC, a BHE é muito seletiva para passagem de substâncias através dela, de modo que nem todos os compostos estudados possuem a capacidade de atingir de forma farmacologicamente relevante o sítio da meningoencefalite. Uma das estratégias para a ultrapassagem da barreira seria por meio de terapias feitas com anticorpos monoclonais (mAb). mAbs contra β -glicana e melanina, foram alvo de estudos. β -emitter, um mAb aplicado em camundongos, reduziu a carga de fungo no pulmão e cérebro sem toxicidade aparente (Antachopoulos & Walsh, 2011).

Tratamentos alternativos, como a utilização de peptídeos e mAbs, são opções para que os tratamentos antifúngicos possam ter mais eficiência, principalmente em pacientes imunocomprometidos. E que a utilização deles, em conjunto com já existentes, possam causar menos toxicidade e prolongar a vida desses pacientes infectados.

1.7. Proteína Recombinante e *Komagataella phaffii*

A levedura *Komagataella phaffii*, anteriormente era conhecida como *Pichia pastoris*, recebeu sua primeira descrição como *Zygosaccharomyces pastoris* pelo citologista e micologista francês Alexandre Guilliermond (Guilliermond, 1920). Em 1995, ocorreu a reclassificação da levedura como *Komagataella* (Yamada, *et al.*, 1995). Posteriormente, em 2009, após o sequenciamento e anotação do genoma, a espécie foi dividida em duas: *K. pastoris* (linhagens derivadas de CBS 704) e *K. phaffii* (linhagens derivadas de CBS 7435) (Kurtzman, 2009; Peña, *et al.*, 2018b).

GS115 e a X-33 são as linhagens mais utilizadas de *K. phaffii* para fins biotecnológicos. A GS115 é uma cepa auxotrófica para histidina enquanto a X-33 é prototrófica, ou

seja, é capaz de sintetizar todos os aminoácidos e outras substâncias necessárias para seu crescimento (Cregg & Cereghino, 2000).

K. phaffii possui uma capacidade distinta de crescer em metanol como única fonte de carbono (metilotrofia) para a formação de biomassa e síntese de produtos. Ela se tornou atraente para produção industrial de proteínas recombinantes e o sistema de expressão por causa dessa, entre outras, características vantajosas para expressão de proteínas.

A *K. phaffii* é facilmente cultivável devido ao fato de ser um organismo unicelular. Além disso, ela possui protocolos padronizados, secreta proteínas recombinantes com baixa concentração de proteínas endógenas, não precisa de suplementação de vitaminas complexas e gera altas concentrações de biomassa (Cregg & Cereghino, 2000). Em comparação com sistemas de expressão que utilizam cultura de células animais, a *K. phaffii* é mais econômica (Kang, *et al.*, 2017).

A utilização de promotores induzidos por metanol é comumente utilizada para expressão gênica e manipulação em *K. phaffii*. O promotor *AOXI* controla a expressão de genes na presença desta fonte de carbono (Cregg & Cereghino, 2000). A expressão de proteína recombinante por meio deste promotor acontece após uma fase de crescimento celular utilizando outras fontes de carbono. Após o acúmulo de biomassa, há a troca da fonte de carbono e a expressão da proteína desejada.

Observa-se que a estratégia de indução pelo promotor *AOXI* é amplamente utilizada na produção heteróloga, a fim de evitar a competição entre a formação de biomassa e a produção da proteína heteróloga desejada. No entanto, há algumas desvantagens no uso deste promotor, como a dificuldade de monitorar as concentrações de metanol durante o cultivo em biorreator (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Portanto, hoje, um sistema heterólogo de expressão comumente utilizado é a *K. phaffii* e ela demonstra muitas vantagens para produção de proteína recombinante, além de possuir status GRAS que a confere carta verde para uso em indústrias de alimentos e medicamentos (Ciofalo *et al.* 2006).

1.8. Processos fermentativos de produção

Existem duas classificações básicas para os processos fermentativos, que levam em conta a quantidade de água presente no meio de cultivo. Um tipo é chamado de

fermentação em estado sólido (FES), que se caracteriza pela ausência de água livre no meio, enquanto o outro é o processo submerso, em que há a presença de água livre no meio (Cannel & Moo-Young, 1980).

O processo submerso é a modalidade de processo fermentativo com o maior número de aplicações industriais. A fermentação acontece como consequência da liberação do dióxido de carbono ou etanol durante o catabolismo anaeróbico de carboidratos presentes nos extratos fermentativos e meios de culturas. O metabolismo de açúcares compreende no aumento de biomassa via crescimento celular, sendo ela na presença ou na ausência de oxigênio no meio.

Existem três tipos básicos de operação em biorreatores para que uma fermentação possa ocorrer: descontínuo, semi-contínuo e contínuo. (Figura 5).

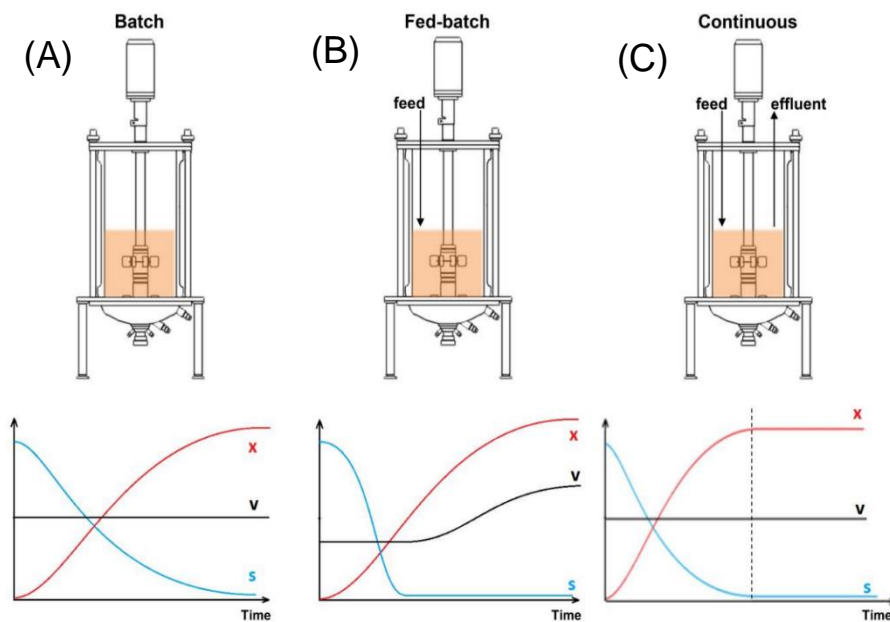


Figura 6. Esquema dos modos de operação de fermentação. (A) Descontínuo; (B) Semi contínuo; (C) Contínuo. Sendo X a quantidade de biomassa no reator, S o substrato inicial, e V o volume do meio de cultura. (ADAPTADO Bolomanis, et al, 2023)

O modo descontínuo, conhecido como batelada, é o modo operacional mais simples. Nele, é possível entender melhor sobre cinética de crescimento, como consumo de substrato, formação de produto, acidificação ou não do meio de cultivo (Schimidell *et al.*, 2001). Durante o processo fermentativo não são adicionados outros substratos, vitaminas

e outras substâncias que não sejam para manutenção do pH e oxigenação. (Weusthuis *et al.*, 1994)

O modo semi-contínuo, conhecido como batelada alimentada, é um modo utilizado onde o tempo de fermentação é estendido, há adição de substrato e a geração de produtos de secundários de forma contínua, com o objetivo de manter a suplementação basal para a sobrevivência do microrganismo e a indução da substância necessária e consequentemente, tenham uma maior produtividade (García-Ortega *et al.*, 2019). Nesse, o fluxo de entrada de substrato ocorre em múltiplos momentos e isso faz que seja possível o alcance de maiores densidades de biomassa e não haja repressão da geração de produto por meio da falta de substrato (Schmidell *et al.*, 2001).

Já o modo contínuo ocorre quando há entrada de substrato e saída constante de biomassa e produto do reator. Esse tipo de fermentação é mais indicado quando a geração do produto está atrelada com o crescimento celular, pois nesse modo, há uma prolongação da fase estacionária de crescimento de biomassa e, consequentemente, de geração de produto (Schmidell *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

A maior taxa de incidência e de mortalidade da criptococose é nos países da África subsaariana, onde vive a maioria dos portadores do HIV (Park, *et al.*, 2009), mas a doença também põe em risco pacientes com regime de imunossupressão iatrogênica, tais como transplantados e portadores de câncer em regime quimioterápico, e esses respondem por parte significativa dos casos no mundo desenvolvido (Pfaller & Diekema, 2010). Um melhor entendimento da doença pode permitir a descoberta de terapias mais eficazes para proposição de tratamentos alternativos, como anticorpos monoclonais capazes de inativar o sítio catalítico da Lac 1.

Baseado na hipótese que a Lac 1 tem um papel na sobrevivência do fungo no SNC (Sabiiti, *et al.*, 2014) além do seu papel na melanização, este estudo visa produzir Lac 1 recombinante de *C. neoformans* em alta escala com seleção e otimização da produção da enzima, com isso será possível sua utilização na geração de anticorpos monoclonais que bloqueiem o sítio catalítico da enzima no LCR, e que possam ter utilidade terapêutica em tratamentos ou no entendimento do papel da Lac 1 *in situ*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produção em alta escala de lacase 1 recombinante de *C. neoformans* em *K. phaffii*.

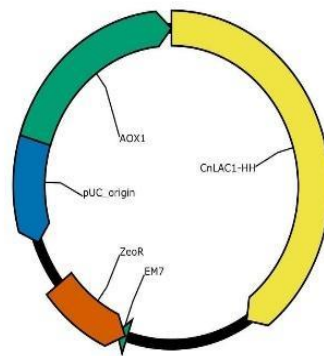
3.2. Objetivos Específicos

- Produção em frasco da lacase 1 de *C. neoformans*, com otimização de parâmetros de produção;
- Aumento de escala da produção passando de volumes de frascos para volumes em fermentadores, com otimização de parâmetros de produção e cultivo;
- Purificação da proteína recombinante por meio cromatografia líquida rápida de proteínas;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Transformação de *P. pastoris* com o gene Lacase 1 (LAC1; CNAG_03465) de *C. neoformans*

Para a transformação da *K. phaffii* com o gene da Lac1 foi sintetizado um plasmídeo de transformação pPICLAC1- HH (Figura 6), em que, ao gene LAC1 de *C. neoformans* da cepa H99, adicionaram-se sequências codantes de poli-histidina às porções C- e N-terminal da Lac1, com o objetivo de purificar a proteína. Também foi inserida uma sequência chamada fator alfa que sinaliza a secreção da proteína para o sobrenadante (Antošová & Sychrová, 2016).



pPICLac1-HH
5422bp

Figura 7. Esquema do plasmídeo pPICZ com o gene LAC1 de C. neoformans. Inserção da sequência genética de poli-histidina para que a proteína tenha a cauda na extremidade N terminal e C terminal. Sequência do fator alfa para a secreção da enzima para o sobrenadante.

O plasmídeo foi amplificado em *Escherichia coli*, cepa XL10-GOLD. A transformação em *E. coli* foi feita por choque térmico a 42 °C por 1 minuto e o crescimento dos transformantes foi feito em meio ágar Luria-Bertani com a adição de zeocina (LB - 1% extrato de levedura; 0,5% NaCl; 1% peptona bacteriológica; 1,8% ágar; 0,1 µg/mL zeocina) com crescimento overnight a 37 °C. Uma colônia transformante foi selecionada e crescida em caldo Terrific Broth Base (TB – Thermo Fisher Scientific) no shaker 37 °C em 200 rpm por 16 horas.

Para a mini-prep foi utilizado o Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), com o final de 15,7 ng/μl de DNA plasmidial, conforme quantificação espectrofotométrica. A linearização foi feita pela digestão do plasmídeo pela enzima de restrição PmeI overnight a 37 °C.

A eletroporação do pPIC-LAC1 linearizado para transformação de *K. phaffii*, cepa X-33, foi feita com um campo de 7500 V/cm em 10 ms (1500 V, 400 Ω, 25 μF). Após este processo plaquearam-se os transformantes em várias concentrações em ágar Yeast-Peptone-Dextrose suplementado por zeocina (YPD - 1% extrato de levedura, 2% dextrose, 2% peptona, 2% ágar, 0,1 μg/mL zeocina) e incubado por 72 horas a 30 °C.

4.2. Seleção de recombinantes

Fez-se a indução da expressão e um ensaio enzimático em placa deep-well de 96 poços, em três etapas. Na primeira etapa, fez-se um pré-inóculo de cada colônia transformada em 1 mL de YPD, seguido de crescimento de 24 horas a 30 °C e 200 rpm. Na segunda etapa, as células foram ressuspensas em meio Bufered minimal medium (BMM – 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6.0, 1,34% YNB, 4x10⁻⁵ % biotina, 0,5% metanol, e foi adicionado 0,3 mM de sulfato de cobre cúprico), o crescimento foi feito por 72 horas à 30 °C e 200 rpm, com suplementação de 0,5% de metanol em 24 em 24 horas. Após o processo de indução, na terceira etapa, foi feito um teste enzimático com L-DOPA, um substrato de lacases. Um controle negativo foi sobrenadante de X-33 não transformada cultivada nas mesmas condições, e um controle positivo, sobrenadante do *C. neoformans*, cepa H99. A concentração final de L-DOPA foi de 1 mM. A partir desse momento o inóculo que era feito em 5 mL passou a ser feito em 100 mL.

4.3. Produção em frasco e otimização dos parâmetros

Para produção, começou-se por um pré-inóculo em meio Buffered Glycerol-complex Medium (BMGY – 1% extrato de levedura, 2% peptona, 100 mM tampão fosfato de potássio, 1,34% Biotina, 1% glicerol, 4x10⁻⁵ % biotina) a 30 °C e 200 rpm até sua densidade óptica (OD) a 600 nm atingir 5,0. Após a normalização de densidade celular, o inóculo foi feito em BMM suplementado com cobre e incubado por 24 horas, 48 horas, 72 horas a 30 °C e 200 rpm. O teste enzimático foi feito com ABTS 1 mM com leitura de absorbância a 419 nm. O ABTS é sal derivado do ácido azinobenzenossulfônico e é conhecido por sua capacidade de formar um radical catiônico estável quando oxidado, ao

adicionar a lac 1 em um meio com ABTS há uma oxidação produzindo um cromóforo azul capaz de ser lido na absorvância de 419 nm pelo espectrofotômetro.

Após a produção, o processo de concentração das amostras foi feito através de 3 metodologias diferentes. Uma, por filtração em gel, com o poro de 10 kDa. Outra, pelo sistema de filtração tangencial da Amicon[®], em uma membrana de 30 kDa. Por último, filtração por centrifugação, pelo sistema Amicon[®], com o poro de 3k.

Para a otimização de parâmetros foram feitos os testes de tempo ideal de indução e sensibilidade enzimática à variação de pH. Para o primeiro teste foram feitas culturas em diferentes tempos de 24 a 72 horas. Para a realização desse teste a cultura foi feita com os parâmetros elucidados no primeiro parágrafo deste tópico nos diferentes tempos.

Para o teste de sensibilidade enzimática à variação de pH foi feita alteração do pH do sobrenadante pós-produção com variação de pH entre 5,1 até 7,4, com medição da atividade enzimática pelo protocolo de ABTS descrito no primeiro parágrafo deste tópico.

4.4. Aumento de escala de produção e otimização de parâmetros

O aumento de escala foi realizado utilizando biorreatores de modelo do tipo tanque agitado e aerado, TEC-BIO-FLO/CelliGen 115 New-Brunswick (Figura 7). Ao reator foram adicionados o medidor de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, agitação, antiespumante, bomba de alimentação de metanol puro e bomba de solução básica de hidróxido de pótassio (KOH) 3M. O volume total do biorreator é de 2,0 L, com o volume útil de 1,5 L.

Todos os experimentos em biorreator foram conduzidos a 30 °C, com cascata de agitação entre 400-900 rpm, uma concentração mínima de oxigênio dissolvido de 30% e com o pH médio de 5,0. As fermentações tiveram duração entre 72-92 horas.



Figura 8. Birreator TEC-BIO-FLO/CelliGen 115 New-Brunswick. Utilizado para os experimentos de batelada e batelada alimentada, nas dependências da Universidade Católica de Brasília

Após o cultivo, o caldo fermentado foi centrifugado por 5 minutos a 5.000 x g e o sobrenadante recuperado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado a vácuo com membrana de porosidade 0,25 μM .

4.4.1. Meio UAB

Para cultivo e expressão no biorreator, foi preparado meio definido UAB, descrito por Melo, et al., 2018. A composição do meio base é ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) a 9,4 mM; cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 136 μM ; fosfato de amônio dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) a 93,8 mM; sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 2 mM; e cloreto de potássio (KCl) a 12 mM. A esta base já estéril adicionam-se 4,35 mL/L da solução estoque de compostos designados como PTM1: sulfato cúprico penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 24 mM; iodeto de sódio (NaI) a 534 μM ; sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 17,7 mM; molibdato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 826 μM ; ácido bórico (H_3BO_3) a 323 μM ; cloreto de cobalto (CoCl_2) a 3,9 mM; cloreto de zinco (ZnCl_2) a 147 mM; sulfato férrico hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 234 mM e ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 92 mM e biotina a 819 nM. Para dissolução completa dos compostos e ajuste da acidez do meio, o pH foi ajustado para 5,0 com HCl a 25%.

Para o pré-inóculo foi utilizados 100 mL, de meio UAB com 20g/L de glicerol até atingir OD₆₀₀= 1,0. Para aplicação no biorreator, o pré-inóculo foi centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto e ressuspenso em 1 mL de meio UAB.

Para o cultivo e expressão, foi utilizado o meio UAB com 20 g/L de glicerol para cultivo de biomassa, e após o consumo do glicerol foi adicionado ao meio 1% de metanol puro de 24 em 24 horas para induzir a expressão da Lac1.

4.4.2. Meios BMGY e BMM

Para a segunda parte do cultivo em biorreator utilizaram-se os meios BMGY e BMM descritos anteriormente. O pré-inóculo foi em 100 mL de BMGY, com a modificação da concentração de glicerol para 40 g/L. Seu cultivo foi feito à 30 °C, 200 rpm até atingir a OD₆₀₀= 1,0. Para aplicação no biorreator, o pré-inoculo foi centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio BMGY.

Já para o cultivo de biomassa e expressão da proteína, utilizou-se 1,5 L do meio BMM com 20 g/L de glicerol e sem a adição de metanol de forma inicial. Para expressão da enzima, tentamos dois tipos de alimentação com metanol: pontual, com adição de 1% de metanol a cada 24 horas; e contínua, em que durante as primeiras 24 horas o reator era alimentado com 2,5 mL/L (1% de metanol por hora) e depois, com 4,28 mL/L (2% de metanol por hora).

4.5. Presença e purificação enzimática

Para o processo de purificação enzimática foram realizadas cromatografias de afinidade e cromatografia de troca iônica.

4.5.1. Cromatografia de afinidade

Para primeira tentativa de purificação foi utilizado a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) da GE AKTA Pure (GE Healthcare) por afinidade com eluição com gradiente de imidazol usando colunas de níquel e de cobre.

O sobrenadante da indução enzimática por 48 horas foi filtrado e desgaseificado antes da aplicação da amostra. A eluição começou um 0 mM de imidazol com o final de 550 mM de imidazol no tampão de 1,0 M de NaOH.

Já a segunda foi feita por afinidade com eluição por imidazol por coluna gravitacional de níquel. Dado o limite de capacidade volumétrica da coluna, concentramos a amostra 10 vezes pelo sistema concentrador Amicon®, em uma membrana de 30 kDa. Para a cromatografia, induziu-se a ionização dos resíduos de histidina da proteína com a elevação do pH do sobrenadante para 7,4. A amostra foi filtrada e aplicada na coluna, sendo eluída com a concentração de 500 mM de imidazol no tampão de 1 M de NaOH

4.5.2. Cromatografia de troca iônica

Para a purificação da enzima fez-se cromatografia de troca iônica na modalidade de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) num aparelho *GE AKTA Pure* (GE Healthcare) usando uma coluna *DEAE-Sepharose Fast Flow* equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de sódio (pH 5,5). As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão com um gradiente de concentração de NaCl (0-1M) à 1,5 ml por min⁻¹.

A purificação foi feita pela estratégia de purificação da Lac 1 segundo Guo (2008), onde se aplica 2 tipos de purificação, sendo o primeiro por troca iônica e o segundo por exclusão molecular.

Foi utilizado o gel SDS-PAGE com a concentração de 8%, no sistema Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, para verificar a presença e pureza da proteína.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima lacase 1 de *C. neoformans* pertence à classe das oxidoredutases, permitindo-lhe catalisar substâncias como a L-DOPA, encontrada no líquido do sistema nervoso central. Utilizamos este substrato para verificar a presença da produção da enzima nos organismos transformados de *K. phaffii*. Uma linhagem, denominada H6, foi selecionada para continuação das investigações e será empregada em todos os experimentos subsequentes.

Para determinar o intervalo ideal de produção enzimática durante a exposição ao indutor, realizamos culturas em diferentes períodos: 24 horas, 48 horas e 72 horas. Seguindo a sugestão de Antošová & Sychrová (2016), que indicaram 72 horas como um dos momentos mais propícios para uma produtividade enzimática otimizada, buscamos determinar o melhor momento para a produção da enzima Lac 1. Contudo, constatamos que a produção da enzima dentro das 72 horas não demonstrou diferenças estatisticamente significativas em comparação com os outros períodos analisados ($p > 0,05$). Isso sugere que, no contexto desta produção, a escolha do período de indução não exerceu influência na quantidade produzida (Figura 9).

Esta observação pode ser atribuída ao fato de que o meio utilizado para induzir a produção enzimática não contém fontes de glicose para sustentar o crescimento microbiano. Conseqüentemente, os nutrientes estavam disponíveis apenas para a expressão enzimática e para a sobrevivência celular básica, o que, com o passar do tempo, resultou em morte celular.

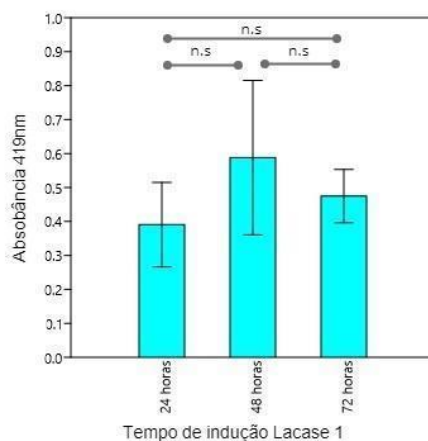


Figura 9. Absorbância de 419 nm de ABTS em sobrenadante da transformante H6 com indução de Lacase 1 em diferentes tempos. Os experimentos foram realizados nos tempos de indução 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os

experimentos foram repetidos em dias diferentes (k=3; n=9) e induzidos em 100 mL e utilizado 200 µL para o teste com ABTS na concentração de 1 mM. O ensaio foi submetido a um teste de ANOVA conferindo o nível de significância entre os testes, $p = 0,6861$ e $F = 0,4015$, concluindo a diferença não significativa entre os testes. n.s representa não significativo.

O processo de clonagem utilizado para a construção do plasmídeo pPICLac1-HH resultou na inserção de sequências de resíduos de poli-histidina tanto nas porções C- quanto N-terminais da proteína Lac 1. Esse acréscimo foi incorporado para facilitar a purificação da proteína por meio de cromatografia de afinidade e visto que houve uma tentativa não sucedida pelo pesquisador Peter Williamson de purificar a proteína com adição na porção c-terminar (comunicação pessoal). A cauda de histidina adicionada à proteína exibe afinidade com resíduos aniônicos presentes em colunas de cromatografia, tais como as colunas de níquel e cobalto.

No contexto da cromatografia de proteínas, o cobalto é um metal empregado para a purificação de proteínas que contenham resíduos com carga positiva em sua estrutura. Por meio de cromatografia líquida de alta performance (FPLC), utilizando o cobalto como agente de afinidade, conduzimos o teste de purificação da enzima Lac 1. Observou-se que a proteína apresentou uma afinidade relativamente baixa com a coluna (Tabela 2), pois o eluente (fração passada) e a primeira fração coletada apresentaram os maiores valores de absorvância. Vale notar que, nesse teste, o tampão de lavagem da coluna continha 20 mM de imidazol. A partir desses resultados, pode-se supor que a interação entre a enzima e a coluna foi fraca, visto que as frações de eluente e a primeira fração de coleta exibiram valores de absorvância mais elevados em comparação com as demais frações. Esses valores chegaram quase ao patamar do controle positivo, que consistia no sobrenadante não passado pela cromatografia.

Tabela 2. Absorbância a 419 nm do teste enzimático com ABTS em sobrenadante de H6 após a passagem pelo FPLC por coluna de cobalto com eluição por imidazol (0-500mM).

Frações	Absorbância 419 nm (ABTS)	Frações	Absorbância 419 nm (ABTS)
Passado	0,182	12	0,068
1	0,129	13	0,085
2	0,068	14	0,083
3	0,063	15	0,083
4	0,061	16	0,061
5	0,065	17	0,064
6	0,069	18	0,092
7	0,062	19	0,065
8	0,069	20	0,065
9	0,065	21	0,062
10	0,071	22	0,066
11	0,072	C+	0,355

Um dos metais mais comuns em cromatografia de afinidade por His-tag é o níquel. Por isso, a cromatografia por FPLC foi feita com coluna de níquel, tentando outro componente de afinidade, o tampão de lavagem não continha o solvente e a eluição começou de 0 mM de imidazol até 500 mM.

Pelo resultado da absorbância do teste enzimático, percebemos que atividade enzimática ainda aparecia na fração passada pela coluna e, além disso, houve uma atividade enzimática na fração 18 (Tabela 2). Contudo, a concentração de imidazol na fração referida era de 442 mM, o que indicaria uma forte interação com a coluna, contudo não justificaria a quantidade de atividade encontrada na solução passada pela coluna sem nenhuma eluição ou concentração de imidazol presente. Por causa destes resultados, o método de purificação da enzima passou a ser por coluna gravitacional de cobre, mas sem um gradiente de eluição.

Através da análise dos resultados de absorbância obtidos no teste enzimático, observamos que ainda havia atividade enzimática na fração que passou através da coluna sem gradiente de eluição (Tabela 2). Adicionalmente, identificamos atividade enzimática na fração 18 (Tabela 3). Entretanto, é importante ressaltar que a concentração de imidazol na fração em questão era de 442 mM. Embora essa concentração sugira uma interação forte com a coluna, ela não justificaria a quantidade de atividade enzimática detectada na solução que passou pela coluna, especialmente considerando a ausência de eluição ou concentração de imidazol nessa fração. Diante desses resultados, optou-se por modificar o método de purificação da enzima, optando pelo uso de uma coluna de cobre com fluxo gravitacional. Importante notar que essa

abordagem não envolvia a implementação de um gradiente de eluição, e responderia a hipótese se a presença dos sítios de His-Tags possuía afinidade para que este método de purificação ser o mais adequado.

Tabela 3. Absorbância a 419 nm do teste enzimático com ABTS em sobrenadante de H6 após a passagem pelo FPLC por coluna de níquel com eluição por imidazol (0-500mM).

Frações	Absorbância 419 nm (ABTS)	Frações	Absorbância 419 nm (ABTS)
Passado	0,101	12	0,07
1	0,074	13	0,062
2	0,061	14	0,069
3	0,066	15	0,082
4	0,07	16	0,057
5	0,087	17	0,055
6	0,081	18	0,157
7	0,061	19	0,056
8	0,066	20	0,06
9	0,084	21	0,059
10	0,068	22	0,055
11	0,083	C+	0,283

Para que a purificação por coluna gravitacional de cobre possa ocorrer os resíduos iônicos das histidinas precisam estar ionizados, ou seja, a histidina não pode possuir mais os resíduos catiônicos e precisa estar em seu ponto de equilíbrio. Para que isso ocorra, o pH da solução contendo a enzima foi elevado de 5,1 até 7,4.

Ao se alcalinizar o meio, a atividade enzimática foi perdida, o que não é vantajoso, já que após a purificação ela será utilizada para a produção de anticorpos que possam inibir seu sítio catalítico, necessitando-se da proteína ativa. Portanto, a enzima foi submetida à alcalinização seguida de re-acidificação (Tabela 4). Com o procedimento, podemos observar que com a retorno do pH para 5,1 a atividade enzimática é restabelecida, podendo-se prosseguir com a purificação por coluna gravitacional.

A sensibilidade da atividade enzimática em diferentes pHs já foi vista por Wang, *et al.* 2015, em que a lacase de *Laccaria bicolor* mostrou uma diminuição de atividade ao se alcalinizar o meio, chegando a ter sua atividade ótima entre os pHs 2,0 e 3,0 e a falta de atividade ocorrendo a partir do pH 5,5.

Tabela 4. Absorbância à 419 nm do teste enzimático com ABTS em sobrenadante de H6 com diferentes pHs.

pH reajustado	Absorbância 419 nm (ABTS)	pH sem reajuste	Absorbância 419 nm (ABTS)
7,4	0,099	C- pH 5,1	0,111
7,1	0,1638	C+ pH 5,1	0,603
6,8	0,275		
6,4	0,305		
6,2	0,331		
5,8	0,415		
5,4	0,261		
5,1	0,534		

A lacase purificada por coluna gravitacional, assim como a do cobalto e níquel no FPLC, ficou no sobrenadante passado pela coluna sem nenhum tipo de eluição, concluindo-se que a enzima não está interagindo com a coluna por meio da His-tag.

Essa falta de interação pode estar ocorrendo por diversos motivos. Existe a possibilidade de a proteína estar escondendo as His-tags em sua conformação nativa. Pode, também, estar eliminando as caudas ou, no processo de modificações ou, quando a proteína é transportada para fora do fungo. Além disso, a *K. phaffii* pode estar glicosilando a proteína de forma a esconder ou diminuir o contato e a afinidade das caudas presentes na enzima com a coluna.

Para validar qualquer uma das hipóteses acima seria necessário entender como está a estrutura da proteína após a sua secreção para o meio de cultura. Para isso, seria necessário aplicar métodos como Cristalografia de Raios X ou Espectroscopia de Infravermelho (IR), por exemplo. Contudo, Guo, et al; (2008) já tinha executado, com sucesso, uma estratégia de purificação de Lac 1 de *C. neoformans*.

Nesse estudo, a Lac 1 de *C. neoformans* foi purificada por meio de dois estágios: passagem do sobrenadante por uma coluna de troca iônica seguida por uma coluna de filtração em gel.

A cromatografia de troca iônica é baseada na interação de moléculas com cargas opostas. A matriz da coluna é carregada com íons positivos ou negativos, e as moléculas são separadas com base em sua afinidade pelos íons carregados na matriz da coluna, diferentemente da cromatografia de afinidade, que é baseada na interação específica entre uma molécula-alvo e uma ligante imobilizado na matriz da coluna. A

ligante é escolhida para se ligar seletivamente à molécula-alvo, e outras moléculas são eluídas. A molécula-alvo é então eluída da coluna com um eluente específico que interrompe a interação ligante-alvo.

A cromatografia por troca iônica, seguida por um teste enzimático por ABTS (Tabela 5) demonstrou que as frações de 8 a 12 possuíam atividade enzimática, indicando interação com a coluna apesar do efluente (passado) aparecer com uma atividade residual.

Tabela 5. Absorbância a 419 nm do teste enzimático com ABTS em sobrenadante de H6 após a passagem pela coluna de troca iônica, com eluição de NaCl. C+ sobrenadante de H6; Passado: efluente;

Frações	Absorbância		Frações	Absorbância	
	419 nm (ABTS)			419 nm (ABTS)	
Passado	0,29		10	0,446	
4	0,151		11	0,256	
5	0,09		12	0,129	
6	0,076		13	0,094	
7	0,086		14	0,17	
8	0,298		15	0,131	
9	0,619		C+ (não passado)	1,764	

O protocolo delineado por Guo et al. (2008) requer a realização de duas etapas distintas. No entanto, é importante observar que no estudo original, a produção da enzima lacase foi realizada diretamente por *C. neoformans*, enquanto este é por expressão heteróloga. Nesse contexto, optamos por investigar a viabilidade de empregar apenas a primeira etapa do protocolo para alcançar a purificação da enzima. Isto nos conduziu a prosseguir com a execução da eletroforese em gel de poliacrilamida.

Não houve visualização de proteínas no gel mesmo após concentrar o sobrenadante 100 vezes antes do processo de purificação. Para determinar a concentração de proteína nas amostras aplicadas no gel foi realizado o teste de Bradford, pois de acordo com o protocolo SDS-PAGE é necessário aplicar uma amostra contendo 50 a 100 µg de proteína para um resultado eficiente.

O teste de Bradford é um teste realizado para determinar a concentração de proteína de uma amostra segundo uma curva padrão com concentrações conhecidas. A amostra analisada, a mesma que foi aplicada no gel, resultou em uma concentração

total de proteína de 16 µg/mL, levando a conclusão de que não haveria proteína suficiente para que aparecessem bandas no gel. Devido a esse resultado, as estratégias traçadas foram o aumento da escala de produção, de 100 mL para 500 mL e a alteração no modo de produção para inclusão de uma etapa de concentração (Figura 10).

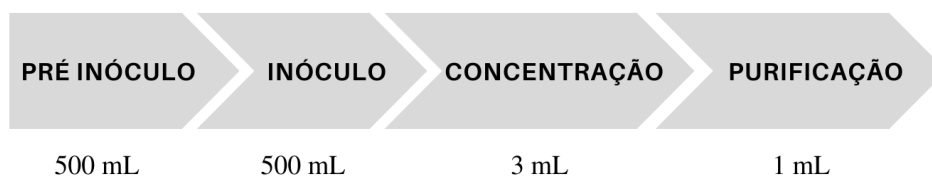


Figura 10. Fluxo de produção com processo de otimização do protocolo. Demonstração da concentração do sobrenadante nas fases subsequentes à produção.

Outra estratégia de aumento da produção enzimática foi entender se a quantidade de metanol adicionado no meio era um fator limitante para a produção de Lac 1, já que o promotor *AOX1* é induzido pela presença de metanol. Realizou-se a adição de metanol 1 vez por dia e 2 vezes ao dia.

O teste enzimático por ABTS demonstrou que a atividade da Lac 1 no sobrenadante com adição de apenas 1 vez ao dia, obteve absorvância de 2,247 enquanto o sobrenadante com a adição de 2 vezes ao dia obteve absorvância de 1,822, indicando que a adição de metanol diminui a produção ou a atividade da Lac 1. Uma das teorias dessa redução seria a propriedade tóxica que o metanol possui já que ao aumentar a concentração de metanol no meio pode aumentar a formação de formaldeído, que ao se acumular intracelularmente, impede a sobrevivência e o crescimento da levedura (Wakayama, et al., 2016).

Mesmo após o aumento para 500 mL de produção, ainda não foi alcançada a quantidade ideal para a visualização da proteína no gel, com teste de Bradford acusando a concentração de 40 µg/mL. Esse resultado nos levou a aumentar a escala de produção, saindo de frascos para biorreatores.

Antes de prosseguir para os reatores, foi realizada produção de 1 L em frasco seguido por concentração até 1 mL de sobrenadante. Logo em seguida, foi confirmada a possibilidade da presença da proteína em um gel SDS-PAGE (Figura 11). A amostra foi utilizada para uma cromatografia de troca iônica e logo em seguida foi corrido outro gel para confirmação, contudo o gel apareceu em branco, indicando que,

possivelmente, não haveria concentração de proteína o suficiente nas frações purificadas para serem demonstradas no gel.

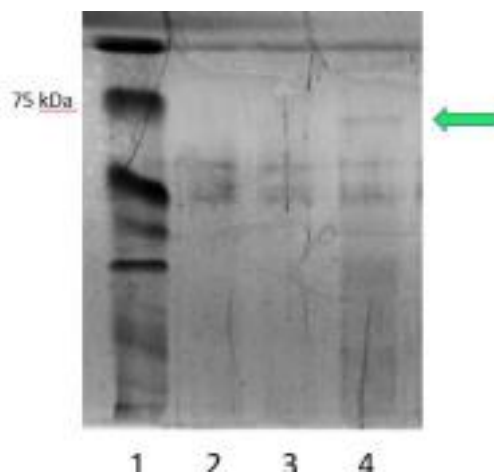


Figura 11. **Gel SDS-PAGE para visualização da Lac 1.** O peso molecular previsto para Lac 1 incluindo Poli-His é de 71 KDa. Linha 1 - Marcador molecular; Linha 2 - Sobrenadante de indução de 48 horas em 1000 mL de X-33, concentrado. Linha 3 - Sobrenadante de indução por 48 horas em 500 mL de H6, concentrado. Linha 4 - Sobrenadante de indução por 48 horas em 1000 mL de H6, concentrado. Coloração por Coomassie Blue. Todas as linhas são 10 microlitros da amostra. Seta verde indica a possibilidade da presença de Lac 1.

Visto que a produção de proteína em biorreatores com *K. phaffii* pode atingir rendimentos de até 0,85 g de proteína por g de fonte de carbono (Melo, *et al.*, 2020) com a utilização do meio definido UAB, foram realizados testes observando crescimento e produção de Lac 1 em biorreatores com esse meio. Fomos capazes de atingir crescimento com OD600 de 68 com 24 horas de inóculo em 1,5 L de produção. Apesar da alta quantidade de biomassa no reator, todas as fermentações não induziram a produção da proteína, como visto nos testes de reação enzimática com ABTS (Tabela 6).

Tabela 6. **Absorbância a 419 nm do teste enzimático com ABTS em sobrenadante de H6 após a 72 horas de produção de batelada em meio UAB com alimentação, após 30 horas de crescimento, de 1% de metanol a cada 24 horas.** Controle +: Sobrenadante de 48 horas de indução em frasco com meio BMGY. Controle -: Meio UAB estéril.

Frações	Absorbância 419 nm (ABTS)
Controle +	0,285
Produção 1	0,011
Produção 2	0,012
Produção 3	0,015
Controle -	0,009

O protocolo utilizado em frasco com os meios BMGY e BMM foi restaurado e os experimentos seguiram com a produção de 1,5 L em batelada com alimentação, após 30 horas de indução com Glicerol 2%, a cada 24 horas com 1% de metanol.

Surpreendentemente, a produção em BMM gerou um maior índice de densidade óptica de biomassa no biorreator quando comparado ao UAB (Figura 12). Foi confirmada a expressão de Lac 1 via teste enzimático, em que a absorbância a 419 nm do sobrenadante foi de 0,218, mesmo após a concentração de 100X. A baixa produtividade, mesmo após o aumento do volume de produção, melhor controle do pH e aeração do meio trouxe alguns questionamentos.

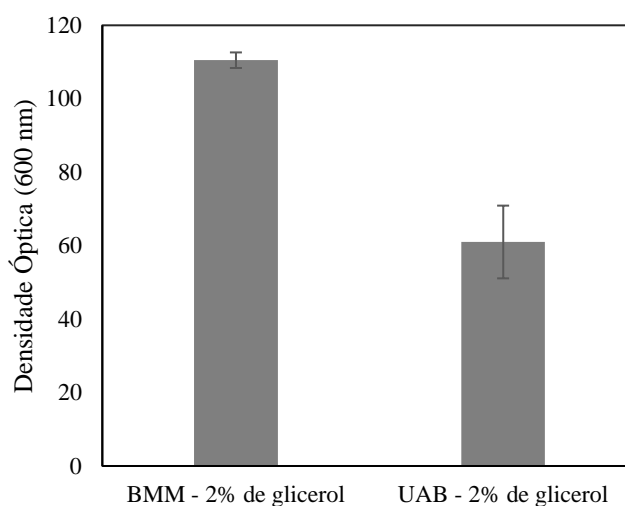


Figura 12. Absorbância de 600 nm da biomassa no reator no T0 da indução por metanol. Com os dados absolutos, o índice de crescimento utilizando BMM como meio de cultura foi maior do que o índice de crescimento quando UAB foi utilizado. T0 de indução tem como média 30 horas de crescimento fúngico com 2% de glicerol como fonte de carbono.

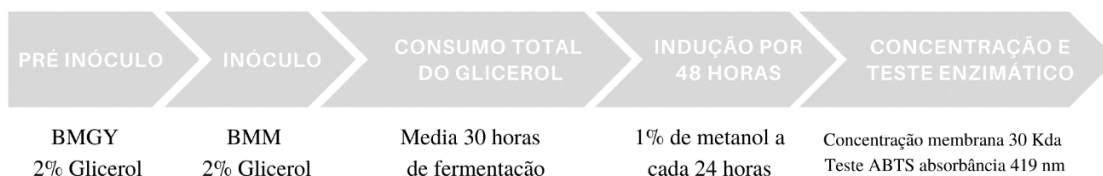
A ativação do promotor da enzima álcool oxidase, *AOX1*, faz parte da reprogramação genética pois a levedura passa para ativar a via de consumo do metanol quando este é a única fonte de carbono. O promotor *AOX1* é forte e o promotor *AOX2* é fraco em comparação ao *AOX1* (Cregg, *et al.*, 1989). Existem 3 fenótipos das cepas de *K. phaffii*: Mut+, em que os dois promotores estão ativos; MutS, em que o *AOX1* está desativado; Mut-, onde os dois promotores estão desativados e, consequentemente, a cepa não sobrevive em ambientes onde metanol é a fonte de carbono.

Um estudo realizado por Krainer, *et al*, 2012 demonstrou que cepas MutS possuem uma maior produtividade volumétrica, uma maior eficiência em expressar

proteína recombinante e consomem menos metanol. A cepa que utilizada é a x-33, que é Mut+.

Além disso, o protocolo de fermentação de *K. phaffii* MutS da Invitogen possui algumas observações. A primeira é que o oxigênio dissolvido durante a fermentação precisa estar sempre acima de 20%. A segunda é que para a produção começar a acontecer, a concentração de glicerol no meio de expressão precisa ser de 0. E, por último, a levedura precisa se adaptar à nova fonte de carbono antes de começar a produção da proteína recombinante. Com isso, modificamos o protocolo de produção (Figura 13).

Batelada Simples



Batelada Alimentada

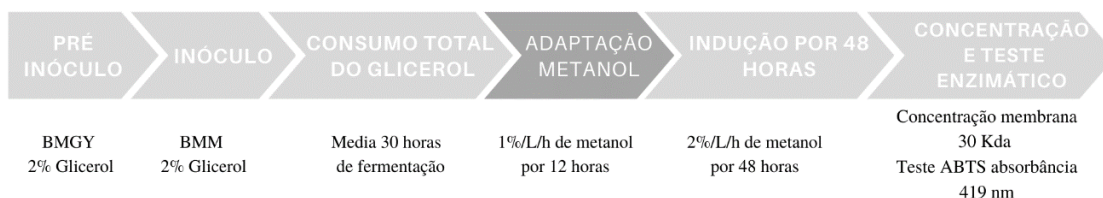


Figura 13. Fluxos de produção de Lacase 1 recombinante de *C. neoformans* em *K. phaffii* via batelada “simples” e batelada alimentada. Os fluxos são parecidos nas fases de pré-inoculo, inóculo e crescimento celular com o consumo total de glicerol. Na batelada simples há uma alimentação pontual de 1% de metanol a cada 24 horas, seguindo o protocolo trabalhado nos testes feitos em frascos. Já na batelada alimentada, há uma fase de adaptação da levedura à nova fonte de carbono, metanol. Após há a indução com uma alimentação frequente e com uma concentração maior de metanol.

A nova metodologia de produção (batelada alimentada) gerou uma expressão bruta com a absorbância maior que a feita com a metodologia anterior (batelada) (Figura 14). Isso demonstra que é uma possibilidade que com o aumento da biomassa e controle do oxigênio dissolvido no meio, há a possibilidade do aumento do consumo de metanol para a produção de Lac 1.

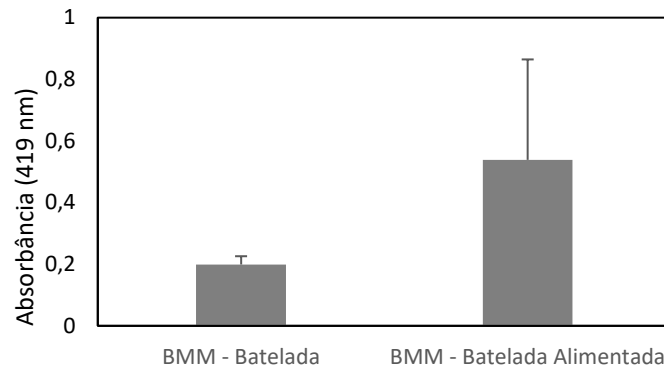


Figura 14. Absorbância de 419 nm do sobrenadante de H6 concentrado 100X após indução de 48 horas e realização de teste enzimático com ABTS. Com os dados absolutos, o índice de atividade da enzima com sua produção via batelada alimentada pode ter sido aumentado e, conseqüentemente, a sua concentração no sobrenadante.

Contudo, ainda são necessários mais refinamentos e otimização da produção para obter uma alta produtividade de Lac1, e conseqüentemente, maiores concentrações da proteína após purificação. Com isso, será possível avançar nos estudos relacionados ao bloqueio catalítico da Lac1 e seus efeitos na virulência e sobrevivência do *C. neoformans* no SNC.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo entendeu-se em maiores detalhes a produção de lacase 1 recombinante de *C. neoformans* em *K. phaffii*. Em frasco, pudemos demonstrar que o tempo de indução não é significativo para expressão e tradução da Lac 1, sendo uma das hipóteses a passagem da fase estacionária para o declínio celular e outra, a aeração do meio, já que em frasco não é possível ter o mesmo controle de aeração como em um biorreator. Além disso, constatou-se que a Lac 1 recombinante é sensível a alterações de pH, com atividade entre as faixas de 5,1 - 6,1.

Em relação à purificação, a cromatografia por troca iônica possui um grande potencial de ser a metodologia certa para obter a proteína recombinante em seu estado puro, levando em consideração a baixa concentração de proteína no sobrenadante de modo geral e a afinidade da Lac 1 à coluna de DEAE.

Já em reatores, pudemos padronizar a metodologia de produção da Lac 1. Obtivemos uma maior concentração de biomassa antes de induzir a produção enzimática, isso pode levar a uma alta produtividade futura. Também foi possível entender a influência do metanol na produção em maior escala, pois ao aumentar a concentração da alimentação, em frasco, não houve diferença na atividade enzimática, mas quando aumentamos a concentração do metanol no reator, houve um aumento da presença de Lac 1 no sobrenadante concentrado.

Esse trabalho é o primeiro passo para a produção da Lac1 de *C. neoformans* recombinante em *K. phaffii*. Para o prosseguimento será necessário a otimização dos parâmetros de produção em biorreatores, determinando produtividade, relação entre produção e biomassa, além da finalização do processo de purificação.

Com efeito, a produção e a pureza da Lac 1 podem ser utilizadas para estudos com o enfoque no bloqueio de seu centro catalítico, abrindo-se o leque de possibilidades para o tratamento da neurocriptococose, pois além de diminuir a virulência dentro do SNC, diminuir-se-ia a sobrevivência desse fungo, com possível impacto favorável nas taxas de mortalidade para essa doença.

7. REFERÊNCIAS

1. Aguiar T.K.B, Neto N.A.S., Freitas C.D.T., Silva A.F.B, Bezerra L.P, Malveira E.A, Branco L.A.C, Mesquita F.P, Goldman G.H, Alencar L.M.R, Oliveira J.T.A, Santos-Oliveira R., Souza P.F.N. (2022). Antifungal Potential of Synthetic Peptides against *Cryptococcus neoformans*: Mechanism of Action Studies Reveal Synthetic Peptides Induce Membrane-Pore Formation, DNA Degradation, and Apoptosis. *Pharmaceutics*. Aug 12;14(8):1678. doi: 10.3390/pharmaceutics14081678. PMID: 36015304; PMCID: PMC9416200.
2. Alan M.S., Robert M.D., Diasio B., William M.D., Dismukes E., et al., (1987). Toxicity of Amphotericin B plus Flucytosine in I94 Patients with Cryptococcal Meningitis. *The American Journal of Medicine*, volume 83, 236-242.
3. Alcalde M. (2007). Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Polaina J, MacCabe A, editors. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Dordrecht: Springer; p. 461–76. ISBN 978-1-4020-5377-1.
4. Antořová, Z., & Sychrová, H. (2016). Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review. *Molecular Biotechnology*, 58(2), 93–116. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1>
5. Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X. et al. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact* 18, 200. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
6. Azam F., Khan M.A., Khan A., Ahmad S., Zofair S.F.F., (2022) Younus H. In Silico and in Vitro Studies on the Inhibition of Laccase Activity by Ellagic Acid: Implications in Drug Designing for the Treatment of Cryptococcal Infections. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022;209:642–654. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.060.
7. Biondo C., Midiri A., Messina L et al., (2005) MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Immunol.* 35(3), 870–878 (2005)
8. Bolmanis, E.; Dubencovs, K.; Suleiko, A.; Vanags, J. (2023). Model Predictive Control—A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement. *Fermentation*, 9, 206. Doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation9030206>
9. Bovers, M.; Hagen, F.; Boekhout, T. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans* *Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol*, 25: S4-12
10. Boulware, D. R. (2011). *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. *The Lancet Infectious Diseases* (Vol.11). Doi:10.1016/S1473-3099(11)70140-2
11. Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980). Solid-state fermentation systems. *Process Biochem.* 15(6), 24-8.

12. Casadevall, A. and Perfect, J.R. (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC.
13. Ciofalo V, Barton N, Kreps J, Coats I, Shanahan D., (2006). Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006 Jun;45(1):1-8. doi: 10.1016/j.yrtph.2006.02.001. Epub 2006 Mar 24. Erratum in: *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008 Jun;51(1):134. PMID: 16563586.
14. Chang, Y.C.; Stins, M.F.; McCaffery, M.J.; Miller, G.F.; Pare, D.R.; Dam, T.; Paul-Satyasee, M.; Kim, K.S.; Kwon-Chung, K.J. (2004). Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infect. Immun*. 72, 4985–4995. Doi:10.1128/IAI.72.9.4985-4995.2004
15. Charlier, C.; Chrétien, F.; Baudrimont, M.; Mordelet, E.; Lortholary, O.; Dromer, F., (2005). Capsule Structure Changes Associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the Blood-Brain Barrier. *Am. J. Pathol*. 166, 421–432.
16. Chen G.H., McNamara D.A., Hernandez Y., Huffnagle G.B., Toews G.B., Olszewski M.A., (2008). Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. *Infect. Immun*. 76(6), 2379–2391.
17. Chen, Y.; Shi, Z.W.; Strickland, A.B.; Shi, M., (2022). *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The Battle between Host and Pathogen. *J. Fungi*, 8, 1069. <https://doi.org/10.3390/jof8101069>
18. Colao M.C., Lupino S., Garzillo A.M., Buonocore V., Ruzzi M. (2006). Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb Cell Fact*. 5:31. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-31>
19. Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P., Stillman C.A., (1989). Functional-Characterization of the 2 Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia-Pastoris*. *Mol Cel Biol*, 9: 1316-1323.
20. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 13, n. 3, p. 45–66.
21. Crowe S.M., Carlin J.B., Stewart K.I., Lucas C.R., Hoy J.F., (1991). Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 4(8), 770–776.
22. Dan J.M., Wang J.P., Lee C.K., Levitz S.M. (2008). Cooperative stimulation of dendritic cells by *Cryptococcus neoformans* mannoproteins and CpG oligodeoxynucleotides. *PLoS One* 3(4), e2046.

23. Dando S.J., Mackay-Sim A., Norton R., Currie B.J., St John J.A., Ekberg J.A., Batzloff M., Ulett G.C., Beacham I.R. (2014) Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clin Microbiol Rev.* Oct;27(4):691-726. doi: 10.1128/CMR.00118-13. PMID: 25278572; PMCID: PMC4187632.
24. Erb-Downward, J.R.; Noggle, R.M.; Williamson, P.R.; Huffnagle, G.B., (2008). The Role of Laccase in Prostaglandin Production by *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 68, 1428–1437.
25. Guo, M., Lu, F., Liu, M., Li, T., Pu, J., Wang, N., ... Zhang, C. (2008). Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Biotechnology Letters*, 30(12), 2091–2096. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9817-z>
26. Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., ... Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 16–48. doi:10.1016/j.fgb.2015.02.009
27. Hernandez Y., Arora S., Erb-Downward J.R., McDonald R.A., Toews G.B., Huffnagle G.B., (2005). Distinct roles for IL-4 and IL-10 in regulating T2 immunity during allergic bronchopulmonary mycosis. *J. Immunol.* 174(2), 1027–1036.
28. Hong, Y. Z., Zhou, H. M., Tu, X. M., Li, J. F., & Xiao, Y. Z. (2007). Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology*, 54(4), 260–265. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0068-8>
29. Idnurm, A., Bahn, Y.-S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J. A., & Heitman, J. (2005). Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 753–764. doi:10.1038/nrmicro1245
30. Jarvis J.N., Harrison T.S., (2007). HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* 21(16), 2119–2129
31. Jong, A.; Wu, C.H.; Gonzales-Gomez, I.; Kwon-Chung, K.J.; Chang, Y.C.; Tseng, H.K.; Cho, W.L.; Huang, S.H., (2012). Hyaluronic Acid Receptor CD44 Deficiency Is Associated with Decreased *Cryptococcus neoformans* Brain Infection. *J. Biol. Chem.* 287, 15298–15306. Doi:10.1074/jbc.M112.35337]
32. Jong A., Wu C.H., Chen H.M., Luo F., Kwon-Chung K.J., Chang Y.C., Lamunyon C.W., Plaas A., Huang S.H. (2007). Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryot Cell.* Aug;6(8):1486-96. doi: 10.1128/EC.00120-07. Epub 2007 Jun 1. PMID: 17545316; PMCID: PMC1951127.
33. Kang, Z. et al. (2017). Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 1–8.

34. Khan M.A., Khan A., Azam M., Allemailem K.S., Alrumaihi F., Almatroudi A., Alhumaydhi F.A., Azam F., Khan S.H., Zofair S.F.F., et al. (2021) Liposomal Ellagic Acid Alleviates Cyclophosphamide-Induced Toxicity and Eliminates the Systemic Cryptococcus Neoformans Infection in Leukopenic Mice. *Pharmaceutics*. 13:882. doi: 10.3390/pharmaceutics13060882.
35. Kim C., Lorenz W.W., Hoopes J.T., Dean J.F. (2001) Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yacK gene. *J Bacteriol.* 183:4866–75. <https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4866-4875.2001>.
36. Kobayashi, M., Murata, K., Hiroshi H.O., Tokura Y., (2004). Cryptococcosis: long-lasting presence of fungi after successful treatment. *Acta Derm. Venereol.* 84(4), 320–321
37. Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T. et al. (2012). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* 11, 22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-22>
38. Kurtzman, C. P., (2009). Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 11, p. 1435–1438.
39. Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. (1984.) Epidemiologic differences between the varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.*, 120(6):123-130.
40. Ma, H.; May, R. C. (2009). Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol*, 67: 131-90.
41. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM., (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. Mar;22(4):249-70. doi: 10.1002/yea.1208. PMID: 15704221.
42. Madzak C., Otterbein L., Chamkha M., Moukha S., Asther M., Gaillardin C., Beckerich J.M. (2005) Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 5:635–46. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.009>.
43. Missall T.A., Moran J.M., Corbett J.A., Lodge J.K. (2005). Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryot Cell*. Jan;4(1):202-8. doi: 10.1128/EC.4.1.202-208.2005. PMID: 15643075; PMCID: PMC544170.
44. Olszewski, M. A., Zhang, Y., & Huffnagle, G. B. (2010). Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiology*, 5(8), 1269–1288. doi:10.2217/fmb.10.93
45. Park B.J., Wannemuehler K.A., Marston B.J., Govender N., Pappas P.G., Chiller T.M., (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis

- among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. Feb 20;23(4):525-30. doi: 10.1097/QAD.0b013e328322ffac. PMID: 19182676.
46. Pasquier E., Kunda J., De Beudrap P., Loyse A., Temfack E., Molloy S. F., Harrison T. S., Lortholary T.S. (2017) Long-term Mortality and Disability in Cryptococcal Meningitis: A Systematic Literature Review, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 66, Issue 7, Pages 1122–1132, <https://doi.org/10.1093/cid/cix870>
 47. Peña, D. A. et al., (2018b). Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, v. 50, n. April, p. 2–15.
 48. Pfaller M.A., Diekema D.J., (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 36(1):1-53. doi: 10.3109/10408410903241444. PMID: 20088682.
 49. Pukkila-Worley, R., Q. D. Gerrald, P. R. Kraus, M.-J. Boily, M. J. Davis, S. S. Giles, G. M. Cox, J. Heitman, and J. A. Alspaugh. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot. Cell* 4:190–201.
 50. Qiu, Y., Davis, M.J., Dayrit, J.K., Hadd, Z., Meister, D.L., Osterholzer, J.J., Williamson, P.R., Olszewski, M.A., (2012). Immune Modulation Mediated by Cryptococcal Laccase Promotes Pulmonary Growth and Brain Dissemination of Virulent *Cryptococcus neoformans* in Mice. *PLoS ONE*, 7, e47853.
 51. Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., ... Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
 52. Rivera-Hoyos C.M., Morales-Álvarez E.D., Poutou-Piñales R.A., Pedroza-Rodríguez A.M., Rodríguez-Vázquez R., Delgado-Boada J.M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biol Rev*. 27:67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
 53. Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>
 54. Sabetta, J. R., & Andriole, V. T. (1985). Cryptococcal infection of the central nervous system. *Medical Clinics of North America*, 69(2), 333–344. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)31046-X](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)31046-X)
 55. Sabiiti, W., Robertson, E., Beale, M. A., Johnston, S. A., Brouwer, A. E., Loyse, A., ... Bicanic, T. (2014). Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2000–2008. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI72950>
 56. Sapmak, A., Kaewmalakul, J., Nosanchuk, J.D., Vanittanakom, N., Andrianopoulos, A., Pruksaphon, K., Youngchim, S. (2016). *Talaromyces marneffei* laccase modifies THP-1 macrophage responses. *Virulence*, 7, 702–717. doi: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1193275>

57. Sapmak, A., Boyce, K.J., Andrianopoulos, A., Vanittanakom, N. (2015). The pbrB gene encodes a laccase required for DHN-melanin synthesis in conidia of *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffe*. *PLoS ONE*, 10. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122728>
58. Stano P, Williams V, Villani M, Cymbalyuk E.S, Qureshi A, Huang Y, Morace G, Luberto C, Tomlinson S, Del Poeta M. (2009). App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2. *J Immunol.* Jan 1;182(1):84-91. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.84. PMID: 19109138; PMCID: PMC5207224.
59. Spitzer E.D., Spitzer S.G., Freundlich L.F., Casadevall A., (1993). Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. *Lancet* 341(8845), 595–596.
60. Thurston C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140:19–26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>.
61. Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P.K. (2016) Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech.* 6:15. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>.
62. Vecchiarelli A., Pietrella D., Lupo P., Bistoni F., McFadden D.C., Casadevall A., (2003). The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J. Leukoc. Biol.* 74(3), 370–378.
63. VIEIRA JÚNIOR, José Noronha. (2015) Estudo clínico-epidemiológico da meningite criptocócica em pacientes HIV negativos em um centro de referência no Piauí. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Teresina.
64. Vu, K.; Eigenheer, R.A., Phinney, B.S., Gelli, A., (2013). *Cryptococcus neoformans* Promotes Its Transmigration into the Central Nervous System by Inducing Molecular and Cellular Changes in Brain Endothelial Cells. *Infect. Immun.* 81, 3139–3147. Doi:10.1128/IAI.00554-13
65. Wakayama, K., Yamaguchi, S., Takeuchi, A., Mizumura, T., Ozawa, S., Tomizuka, N., ... Nakagawa, T. (2016). Regulation of intracellular formaldehyde toxicity during methanol metabolism of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(5), 545–549. doi:10.1016/j.jbi-osc.2016.03.022
66. Williamson, P.R., (2016) Role of laccase in the virulence of *Talaromyces marneffe*: A common link between AIDS-related fungal pathogens? *Virulence* 2016, 7, 627–629.
67. Yamada, R., Wakita, K., Ogino, H., (2017). Global metabolic engineering of glycolytic pathway via multi-copy integration in *Saccharomyces cerevisiae*.
68. Zaragoza, O, Chrisman, C.J., Castelli, M.V., et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol.* 10(10), 2043–2057

69. Zhang Y., Wang F., Tompkins K.C et al., (2009). Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am. J. Pathol.* 175(6), 2489–2500.
70. Zhu X., Williamson P.R., Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* (2004) Oct;5(1):1-10. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.04.004. PMID: 15381117.
71. Noverr M.C., Phare S.M., Toews G.B., Coffey M.J., Huffnagle G.B. (2001). Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun*; 69(5): 2957-63