UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

PRISCILA CRISTINA CORRÊA

Isolamento de uma α -manosidase de *Paracoccidioides brasiliensis* e
determinação de seu papel na relação fungo-hospedeiro

Ribeirão Preto-SP
2021

PRISCILA CRISTINA CORRÊA

Isolamento de uma α -manosidase de *Paracoccidioides brasiliensis* e
determinação de seu papel na relação fungo-hospedeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo

Ribeirão Preto-SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Corrêa, Priscila Cristina

Isolamento de uma α -manosidase de *Paracoccidioides brasiliensis* e determinação de seu papel na relação fungo-hospedeiro / Priscila Cristina Corrêa; orientador, Ademilson Panunto Castelo – 2021

91p.: il; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021

1. *Paracoccidioides* 2. Hidrolase glicolítica 3. Glicosidase. 4. α -Manosidase 5. I. Panunto-Castelo, Ademilson, orient. II. Título.

CORRÊA, P. C. Isolamento de uma α -manosidase de *Paracoccidioides brasiliensis* e determinação de seu papel na relação fungo-hospedeiro 2021. 91f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos professores Dr. Roberto Martinez (FMRP-USP) e Dr. João Santana da Silva (FMRP-USP), que gentilmente cederam as cepas de *P. brasiliensis* utilizadas no presente estudo.

Aos alunos e técnicos do laboratório de genômica e imunobiologia (EERP-USP) e também do laboratório de inflamação e dor (FMRP-USP), pelo suporte de materiais.

Aos alunos e técnicos do laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia por todo auxílio e materiais cedidos. Em especial à técnica Sandra pelo suporte e toda amabilidade com que sempre nos tratou.

À Prof.a Dr.a Maria Eugenia Guazzaroni e á todos os alunos do laboratório de metagenômica funcional (FFCLRP-USP) pelo imensurável apoio ao projeto por cederem gentilmente equipamentos e materiais necessários.

À técnica e amiga Thalita Aparecida Riul Prado que sempre atendeu com prontidão a todas as minhas solicitações e urgências. Obrigada pela amizade, boas conversas e por toda gentileza que trata a todos.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo minha eterna gratidão pela excelente orientação, paciência, humildade e dedicação em cada etapa do projeto desenvolvido e também minha admiração por tudo o que ensina como professor, pesquisador e ser humano. Muito obrigada por ter sido sempre gentil.

A toda equipe que em algum momento fez parte do nosso laboratório, pelos ensinamentos por me ensinarem todas as técnicas e métodos disponíveis. Em especial ao Dr. Fabrício Freitas Fernandes, que contribuiu para que esse trabalho acontecesse.

Às minhas amigas biólogas e companheiras de pós-graduação Amanda, Giovana e Franciene pelas infinitas risadas, pelos abraços, almoços e apoio.

Aos meus amigos imunologistas, companheiros de programa, Alexander, Djulio Elidiane, João, Stela e Valter, não tenho como agradecer todo apoio emocional que recebi de vocês. Obrigada por todo encorajamento, por tudo o que aprendemos juntos em sala de aula e fora dela.

À minha família espiritual, Igreja de Cristo internacional de Ribeirão Preto, que me acolheu no momento que eu mais precisei, perseverando em oração pela minha vida e para que esse trabalho acontecesse. Amo cada um de forma especial.

À minha amiga Valéria, que dividiu não só o “teto” como os melhores e piores momentos. Obrigada pelas conversas e risadas.

Às minhas amigas na fé Pamela e Ana que suportaram com paciência e amor minhas dúvidas e questionamentos. Sem vocês não chegaria tão longe.

À minha amiga Paula pelas incontáveis conversas, pelo apoio emocional, espiritual e pelo encorajamento diário.

Ao meu melhor amigo e namorado Caio, obrigada por ter sido tão presente nessa jornada, me ouvindo e se esforçando para compreender cada etapa. Com você sou melhor a cada dia, profissionalmente e espiritualmente, te amo.

À toda minha família, pelo apoio, interesse e respeito ao meu trabalho. Principalmente aos meus tios Moisés e Elen, pelo acolhimento, servidão e por sempre estarem presentes. Ao meu tio Daniel, pelo respeito, paciência e sabedoria. Às minhas tias paternas, Cris, por sempre me ouvir e a minha tia Angela, obrigada pelo apoio e pelas orações constantes.

Aos meus Avós, Noca e Cecília, meu anjos que mesmo de longe me alegram e oram tanto por mim, não há palavras para agradecer tudo o que fizeram e fazem. À minha avó Cida, tão querida e tão guerreira que não está mais aqui, mas sempre serei grata por tudo o que me ensinou a ser. Amo infinitamente vocês três.

Ao meu pai Donizete, por sempre me ouvir, confiar e acreditar no meu trabalho e nas minhas escolhas. Amo você.

Ao meu padrasto Jefferson por toda dedicação, ajuda nos momentos que mais precisei e cuidado com as pessoas que mais amo.

À minha mãe e melhor amiga Rosimeire, pelo suporte e apoio durante toda minha vida. Por toda preocupação e incentivo a persistir e buscar meus sonhos. Tenho orgulho da mulher que você é e se torna a cada dia. Amo-te.

Todo meu agradecimento a Deus, meu paizinho, que me colocou para desenvolver essa pesquisa, me guiou em cada passo e proveu nos momentos mais difíceis. Se cheguei até aqui foi pela sua permissão, bondade, amor, misericórdia e graça sustentadora. Seu amor e cuidado me constroem cada dia mais.

“Eu poderia falar todas as línguas que são faladas na terra e até no céu, mas, se não tivesse amor, as minhas palavras seriam como o som de um gongo ou como o barulho de um sino. Poderia ter o dom de anunciar mensagens de Deus, ter todo o conhecimento, entender todos os segredos e ter tanta fé, que até poderia tirar as montanhas do seu lugar, mas, se não

tivesse amor, eu não seria nada. Poderia dar tudo o que tenho e até mesmo entregar o meu corpo para ser queimado, mas, se eu não tivesse amor, isso não me adiantaria nada.”

1 Coríntios 13:1-3, Bíblia Sagrada

RESUMO

CORRÊA, Priscila Cristina. **Isolamento de uma α -manosidase de *Paracoccidioides brasiliensis* e determinação de seu papel na relação fungo-hospedeiro.** 2021. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* causam a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica em países da América do Sul, incluindo o Brasil, que detém cerca de 85% dos casos de PCM. À temperatura ambiente, os fungos se apresentam na forma filamentosa (hifa), que quando inalada por seres humanos na forma de propágulos ambientais do fungo, a temperatura corpórea (37°C) induz a transformação do fungo para levedura, a forma de resistência e patogênica do fungo, levando a uma inflamação crônica, principalmente nos pulmões. Em estudos preliminares, identificou-se no sobrenadante de culturas do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* a presença de uma α -manosidase vacuolar. Ao se avaliar a expressão gênica desta α -manosidase observou-se uma correlação positiva entre a expressão gênica da proteína e a virulência de *P. brasiliensis*, uma vez que se mostrou-se significativamente maior nos transcritos obtidos em leveduras do que em micélio em isolados com diferentes graus de virulência, mantendo-se elevada em leveduras da linhagem virulenta cultivada em diferentes meios de cultura. No presente trabalho foi realizado o isolamento da proteína do sobrenadante de cultura de leveduras de Pb18 utilizando cromatografia de troca aniônica, em pH 8,0, em que a enzima manteve suas propriedades catalíticas após eluição com aumento da força iônica em um gradiente de NaCl nas concentrações entre 0,2 e 0,5M. Para aprimorar o estudo, foi obtida uma α -manosidase recombinante em bactérias *Escherichia coli* da linhagem Rosetta transformada com o vetor pET15b clonado com o gene da α -manosidase vacuolar de *P. brasiliensis*, sendo padronizadas as condições de expressão. Determinou-se que a melhor condição para induzir a proteína recombinante nessas bactérias transformadas era em culturas com densidade óptica a 600nm de 0,7, à temperatura ambiente, por 30 horas, sob agitação constante. A proteína contendo uma etiqueta de seis histidina na região N-terminal foi purificada utilizando-se cromatografias de afinidade em coluna de níquel imobilizado e de troca iônica em coluna HiTrap Q XL pH 9,0, tendo os maiores valores de atividade enzimática relativa na eluição entre 0,2 e 0,5M de NaCl. A análise da proteína recombinante por cromatografia em coluna Superdex 200 revelou que a atividade enzimática é recuperada em uma massa molecular aparente de 128kDa. Essa atividade da enzima recombinante foi analisada após isolamento em cromatografias de afinidade em coluna de níquel imobilizado e de troca iônica, mostrando condições ótimas para hidrólise do substrato em pH 6,0 e temperatura de 45°C, evidenciado uma alta estabilidade da enzima após incubação em temperatura ótima, e manutenção da catálise na ausência de cátions divalentes. Os ensaios de fagocitose realizados *in vitro* mostraram que macrófagos pré-tratados com a molécula recombinante apresentaram maiores taxas fagocíticas de *P. brasiliensis* em relação

aos controles não tratados ou estimulados com albumina bovina, sugerindo que essa enzima pode ter um papel significativo na interação do fungo com o hospedeiro.

Palavras-chave:Fungo. *Paracoccidioides*. Hidrolase glicosídica. Glicosidase. α -Manosidase.

ABSTRACT

CORREIA, P. C. **Isolation of α -mannosidase from *Paracoccidioides brasiliensis* and determination of its role in the fungus-host relationship.** 2021. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Paracoccidioides is a genus of fungi that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in South American countries, including Brazil, which accounts for approximately 85% of PCM cases. These dimorphic fungi grow with a filamentous form (hypha) at environmental temperature and a yeast one at human body temperature. Yeasts are the pathogenic and resistance forms of *Paracoccidioides*, causing chronic inflammation, especially in the lungs. In preliminary studies, our group identified a vacuolar α -mannosidase from the supernatants of *P. brasiliensis* isolate Pb18 cultures. When we evaluated the differential expression of α -mannosidase messenger RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction of three *P. brasiliensis* strains with different degrees of virulence, we detected higher gene expression in virulent strain yeasts than in less virulent or avirulent ones. Besides, virulent *P. brasiliensis* yeasts showed higher gene expression when compared with hyphae. These results suggest that there is a positive correlation between α -mannosidase gene expression and virulence of *P. brasiliensis*. In the present study, we initiated the process of purification of the α -mannosidase from the supernatant of the Pb18 yeast culture by an anion exchange chromatography on HiTap Q column at pH 8,0. The enzyme activity was detected in the bound proteins that were eluted in a constant gradient of ionic strength in concentrations between 0.2 and 0.5 M NaCl. The small amount of natural enzyme in culture supernatants motivate us to produce a recombinant α -mannosidase, which was obtained from Rosetta strain of *Escherichia coli* transformed with the vector pET15b cloned with the gene of the vacuolar α -mannosidase from *P. brasiliensis*. The best condition to induce the recombinant protein was obtained in transformed bacteria cultures with an optical density at 600nm of 0.7, at room temperature, for 30 hours, under constant agitation. The six-histidine-tagged recombinant protein was isolated by using affinity chromatography on an immobilized nickel affinity column, and ion-exchange chromatography on a HiTrap Q column, pH 9,0. Enzyme active material from affinity chromatography bound on a HiTrap Q column was eluted in concentrations between 0.2 and 0.5 M NaCl in a constant gradient of ionic strength, similarly to elution of natural protein from *P. brasiliensis*. Analysis of the recombinant protein by gel filtration chromatography on a Superdex 200 column revealed that the enzymatic activity is recovered at an apparent molecular mass of 128kDa. This activity of the recombinant enzyme was isolated sequentially on affinity and ion-exchange chromatography, showing optimal conditions for substrate hydrolysis at pH 6.0 and temperature of 45°C. The recombinant enzyme had high stability after incubation at the optimal temperature, and it maintains catalysis in the absence of divalent cations. *In vitro* phagocytosis assays showed that macrophages pretreated with the recombinant molecule showed higher phagocytic rates of *P. brasiliensis* compared to controls untreated or stimulated with bovine albumin, suggesting that this enzyme may have a significant role in the fungus interaction with the host.

Keywords: *Paracoccidioides*. Glycosidic hydrolase. Glycosidase. α -Mannosidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise eletroforética das frações obtidas da cromatografia de troca aniônica de sobrenadante de cultura de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	40
Figura 2 - (A) Eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do gene da α -manosidase em <i>E. coli</i> das linhagens pLysS transformadas com pET15b-AMS.....	41
(B) Eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do gene da α -manosidase em <i>E. coli</i> das linhagens Rosetta transformadas com pET15b-AMS.....	40
Figura 3 - Análise eletroforética das proteínas expressas por <i>E. coli</i> das linhagens pLysS e Rosetta transformadas com pET15b-AMS cultivadas na ausência ou presença de IPTG.....	42
Figura 4 - (A) Análise eletroforética das proteínas expressas por bactérias Rosetta transformadas com pET15b-AMS.....	44
(B) <i>Western blotting</i> do lisado de bactérias Rosetta transformadas com pET15b-AMS.....	44
Figura 5 - Supressão da expressão basal de proteínas recombinantes por meio da adição de glicose a 1%.....	45
Figura 6 - (A) Análise do perfil de expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> após rompimento celular em água ou tampão de lise.....	46
(B) Análise das proteínas eluídas de uma cromatografia de afinidade em coluna co níquel imobilizado dos lisados descritos em (A).....	46
Figura 7 - (A) Análise do perfil de proteínas expressas por bactérias <i>E. coli</i> Rosetta não transformadas com pET15b-AMS em diferentes temperaturas de indução da proteína recombinante.....	47
(B) Análise do perfil de proteínas expressas por bactérias <i>E. coli</i> Rosetta transformadas com pET15b-AMS em diferentes temperaturas de indução da proteína recombinante.....	48
Figura 8 - Lisados de bactérias transformadas com pET15b-AMS e induzidas com IPTG a 25°C apresentam atividade α -manosidase.....	48
Figura 9 - A α -manosidase recombinante de <i>P. brasiliensis</i> com atividade enzimática preservada é produzida por bactérias transformadas com pET15b-AMS e cultivadas à 25°C (LT), sendo essa enzima isolada em coluna de HisTrap.....	49
Figura 10 -O uso de glicose como redutor de expressão basal de proteínas recombinantes também reduziu a produção induzida por IPTG da α -manosidase recombinante, determinada pela atividade enzimática.....	51
Figura 11 - Cultura de bactérias transformadas com pET15b-AMS e induzidas com IPTG quando DO a 600nm atingiu 0,7 apresentou a melhor condição para expressão da proteína recombinante com atividade enzimática.....	51

Figura 12 -Análise eletroforética de amostras da obtidas de bactérias <i>E. coli</i> Rosetta transformadas com pET15b-AMS induzidas em culturas com D.O a 600nm de 0,7 submetidas à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado.....	52
Figura 13 -Influência do tempo de indução com IPTG em culturas de bactérias <i>E coli</i> transformadas pET15b-AMS na atividade enzimática de amostras de proteínas somáticas obtidas dessas culturas.....	53
Figura 14 -Análise eletroforética das proteínas somáticas obtidas de culturas de bactérias <i>E. coli</i> Rosetta transformadas com pET15b-AMS e induzidas com IPTG, por 30 horas.....	54
Figura 15 - Análise do perfil de proteínas de lisados de bactérias induzidas à expressão de α -manosidase recombinante que foram adsorvidas à coluna HisTrap equilibrada com diferentes concentrações de imidazol.....	55
Figura 16 -Análise eletroforética de proteínas recombinante eluídas após cromatografia de troca aniônica de amostra purificada em coluna HisTrap.....	56
Figura 17 -Filtração em gel em coluna Superdex 200 10/300 GL do material com atividade α -manosidase obtido de <i>E. coli</i> da Rosetta transformadas com pET15b-AMS e induzidas passado por cromatografias de afinidade em níquel imobilizado e de troca aniônica.....	57
Figura 18 -Análise eletroforética de amostras com atividade obtidas durante o processo de isolamento da enzima recombinante.....	58
Figura 19 - Efeito do pH na atividade enzimática da α -manosidase recombinante.....	59
Figura 20 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da α -manosidase recombinante.....	60
Figura 21 - Termoestabilidade da α -manosidase recombinante na temperatura de 45°C.....	61
Figura 22 - Ensaio cinético utilizando pNP- α -D-Man a 3mM, realizado em diferentes intervalos de catálise.....	62
Figura 23 - Interferência do EDTA na atividade enzimática da α -manosidase.....	63
Figura 24 - (A) TLC após catálise utilizando manobioses α 1-2, α 1-3 e α 1-6, como substratos, em diferentes intervalos de tempo.....	64
(B) TLC após catálise utilizando os dissacarídeos α 1-2 e α 1-3 como substratos.....	64
Figura 25 - Interferência a α -manosidase recombinante na atividade fagocítica de macrófagos.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Ams1p – α -manosidase vacuolar de *S. cerevisiae*

AMS – Gene codificante da proteína α -manosidase vacuolar de *P. brasiliensis*

Artin M – Lectina ligante de manose extraída de sementes de *Artocarpus heterophyllus*

BHI – Infusão de cérebro e coração (do inglês, *Brain Heart Infusion*)

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CAP – Proteína ativadora de catabólito (do inglês, *catabolite activator protein*)

CD1a – Proteína de superfície estruturalmente relacionadas às proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I

DAB – 3,3'-Diaminobenzidina

DCs – Células dendríticas (do inglês, *dendritic cells*)

DC-SIGN – Receptor de lectina do tipo-C com especificidade para ICAM-3, presente na superfície de células dendríticas e macrófagos

DLD – Diidrolipoil desidrogenase

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DO – Densidade óptica

ECM – Matriz extracelular (do inglês, *Extracellular matrix*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ESAgS – Exoantígenos totais secretados/excretados

GH38 – Família 38 de glicosil hidrolases

GH47 – Família 47 de glicosil hidrolases

gp43 – Glicoproteína de 43kDa

GXM – Glucuronoxilomanana

HSP70 – Proteína de choque térmico de 70kDa (do inglês, *Heat shock protein*)

IFN- γ - Interferon- γ

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

J774 – Linhagem celular de monócito/macrófago obtida de ascite de sarcoma de camundongo BALB / c

LAMP-1 – Proteína 1 associada a membrana lisossômica

LB – Luria-Bertani (meio de cultura)

M1 – Macrófago de perfil pró-inflamatório proveniente da ativação da via clássica

M2 – Macrófago de perfil anti-inflamatório proveniente da ativação da via alternativa

MM – Massa Molecular

NGTA – Neopeptona, glicose, tiamina e asparagina (meio de cultura)

NK – Células exterminadoras naturais (do inglês, *natural-killer*)

P10 – Peptídeos sintético derivado da proteína gp43

p53 – Proteína de tumor de 53kDa

Pb27 – Proteína de 27kDa de *P. brasiliensis*

Pb40 – Proteína de *P. brasiliensis* como similaridade à calcineurina B de *Neurospora crassa*

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBMC – Células mononucleares provenientes de sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cell*)

PBS – Solução salina tamponada em com fosfato (do inglês, *Phosphate buffered saline*)

PCM – Paracoccidioidomicose

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase chain reaction*)

pET15b-AMS – Plasmídeo de expressão contendo o gene de α -manosidase vacuolar de *P. brasiliensis*.

pNP- α -D-Man – 4-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo

PRR – Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês, *Pattern recognition receptors*)

PVDF – Membrana de difluoreto de polivinilideno (do inglês, *polyvinylidene difluoride*)

RE – Retículo endoplasmático

RE – Índice de retenção

RPMI – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SFB – Soro Fetal Bovino

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SP-D – Proteína surfactante D

TGF – Fator de crescimento transformador (do inglês, *Transforming growth factor*)

Th – T auxiliar (do inglês, *T helper*)

TLC – Técnica de cromatografia em camada delgada (do inglês, *Thin Layer Chromatography*)

TLR – Receptores semelhantes a Toll (do inglês, *Toll-like receptors*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TOPO-AMS – Plasmídeo pCR4-TOPO contendo o gene de uma α -manosidase vacuolar de *P. brasiliensis*

UFC – Unidades formadoras de colônias

YPD – Extrato de levedura, Peptona e Dextrose (do inglês, *Yeast extract – Peptone – Dextrose*)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS	15
PARACOCCIDIOIDOMICOSE	16
RESPOSTA IMUNOLÓGICA	17
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS	20
MANOSIDASES	22
OBJETIVOS	26
OBJETIVOS GERAIS	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
ISOLAMENTO DE UMA A-MANOSIDASE SECRETADA POR P. BRASILIENSIS	27
CULTIVO DO ISOLADO Pb18 DE P. BRASILIENSIS	27
OBTENÇÃO DE ESAGs	27
PURIFICAÇÃO DA A-MANOSIDASE SECRETADA POR LEVEDURAS DE P. BRASILIENSIS (Pb18)	28
ELETROFORESE E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	28
OBTENÇÃO DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE DE P. BRASILIENSIS	29
PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE DE UMA A-MANOSIDASE DE P. BRASILIENSIS (pET15B-AMS)	29
PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO	29
TRANSFORMAÇÃO DE E. COLI COM pET15B-AMS	29
EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	31
EXPRESSÃO DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	31
SUPRESSÃO DA EXPRESSÃO BASAL DE PROTEÍNA RECOMBINANTE POR CULTIVO MEIO SUPLEMENTADO COM GLICOSE	32
DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	32
TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA PVDF	33
WESTERN BLOTTING	33
PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	33
ISOLAMENTO EM CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA COM NÍQUEL IMOBILIZADO	33
ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	34
PURIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA POR FILTRAÇÃO EM GEL	34
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	35
ENSAIOS ENZIMÁTICOS	35
EFEITO DO pH	35
EFEITO DA TEMPERATURA	35
ENSAIOS CINÉTICOS	36
TAXA DE REAÇÃO	36
AValiação DA INTERFERÊNCIA DO EDTA NA ATIVIDADE DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE DE P. BRASILIENSIS	36
ESPECIFICIDADE HIDROLÍTICA	36
INFLUÊNCIA DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA E MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS INCUBADOS P. BRASILIENSIS	37

ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
RESULTADOS	38
PURIFICAÇÃO DA A-MANOSIDASE A PARTIR DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE LEVEDURAS DA LINHAGEM P18 DE E P. BRASILIENSIS	38
TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA COM VETOR pET15B-AMS E EXPRESSÃO DA A-MANOSIDASE DE P. BRASILIENSIS.	40
TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	40
INDUÇÃO DA EXPRESSÃO	41
RASTREAMENTO DAS A-MANOSIDASE RECOMBINANTE EM CULTURA	42
PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	45
CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA COM NÍQUEL IMOBILIZADO	45
PADRONIZAÇÃO DA TEMPERATURA	46
INTERFERÊNCIA DA VARIAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E NO PERFIL DE EXPRESSÃO.	50
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INDUÇÃO COM IPTG NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E NO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICO	52
REFINAMENTO DA PURIFICAÇÃO POR MEIO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IMIDAZOL NO PROCESSO DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ADSORVIDA À COLUNA COM NÍQUEL IMOBILIZADO.	54
CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	55
CROMATOGRAFIA POR FILTRAÇÃO EM GEL	51
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	58
DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO PARA ATIVIDADE DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	58
DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA PARA ATIVIDADE DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	59
DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA PARA ATIVIDADE DA A-MANOSIDASE RECOMBINANTE	60
ENSAIO CINÉTICO UTILIZANDO A CONCENTRAÇÃO DE 3mM	61
INTERFERÊNCIA DE AGENTE QUELANTE NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	62
ESPECIFICIDADE ENZIMÁTICA	63
FAGOCITOSE DE LEVEDURAS DE P. BRASILIENSIS POR MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774 É AUMENTADA NA PRESENÇA DE A-MANOSIDASE	65
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

P. brasiliensis é o mais estudado dos fungos termodimórficos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*, os quais são agentes causais da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica caracterizada por uma inflamação crônico-granulomatosa, que atinge principalmente os pulmões (MARTINES 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2009). O gênero *Paracoccidioides* está inserido no filo Ascomycota, Ordem Onygenales, formando o grupo monofilético da família Ajellomycetaceae juntamente com *Blastomyces*, *Emmonsia*, e *Histoplasma* (BAGAGLI *et al.*, 2008; UNTEREINER *et al.*, 2004).

Até o início dos anos 2000s, o gênero *Paracoccidioides* continha apenas uma espécie, *P. brasiliensis*. No entanto, análises filogenéticas e moleculares mostraram que o isolado Pb01 de *P. brasiliensis* era, na verdade, uma nova espécie, que foi denominada de *P. lutzii* (CARRERO *et al.*, 2008). Na mesma época, outros grupos descobriram que *P. brasiliensis* constitui um complexo formado por quatro espécies filogenéticas relacionadas, denominadas de S1, PS2, PS3 e PS4. A linhagem PS2 tem sido identificada apenas no Brasil e Venezuela, PS3 é composta por isolados encontrados apenas na Colômbia, S1 é amplamente distribuída pela América do Sul e PS4, restrita a Venezuela (CARRERO *et al.*, 2008; MATUTE *et al.*, 2006; SALGADO-SALAZAR *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2009; 2014). Em um estudo recente, o qual envolve a análise compilatória de dados nucleares e mitocondriais, bem como diferenças na morfologia de leveduras, Turissini *e cols.* (2017) propuseram que PS2, PS3 e PS4 sejam reconhecidas taxonomicamente como três novas espécies do gênero, nomeadas respectivamente como *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*. Desse modo, *P. brasiliensis* passou a restringir-se apenas a espécie S1.

Visto que são patógenos termodimórficos, esses fungos crescem na forma filamentosa ou miceliana (hifas) à temperatura ambiente (22 a 25°C), provavelmente no solo, ocupando nicho saprobiótico (ALBORNOZ, 1971) do qual propágulos infectantes (conídios) são liberados e inalados por seres humanos, dentre outros mamíferos. À temperatura por volta de 37°C induz a transformação do micélio em leveduras, a forma patogênica do fungo, produzindo uma infecção primária, geralmente pulmonar (BRUMMER *et al.*, 1993; GAUTHIER, 2017). Essas modificações de estrutura desses fungos parecem ser decorrente da composição da parede celular, principalmente a dos polissacarídeos, que variam de acordo com a morfologia assumida pelo fungo (KANETSUNA E CARBONELL, 1970). Diferenças no arranjo estrutural dos

polissacarídeos de parede celular de hifas e leveduras de *P. brasiliensis* sugerem que a conversão morfológica entre essas formas exija uma mudança estrutural das ligações glicosídicas (CARBONELL *et al.*, 1970; KANETSUNA *et al.*, 1969). As glucanas com ligações glicosídicas do tipo α -1,3 é o principal constituinte entre polissacarídeos neutros na parede celular da fase de levedura (SAN-BLAS *et al.*, 1987), enquanto a ligação encontrada nesses polissacarídeos da fase miceliana é o tipo β -1,3 (CARBONELL *et al.*, 1970), sendo observadas pequenas quantidades de galactose e manose (SAN-BLAS *et al.*, 1987). Além das glucanas, as formas de leveduras e micelianas apresentam a quitina como polissacarídeo estrutural comum (KANETSUNA *et al.*, 1969), sendo detectada uma quantidade maior em leveduras do que em micélio (SAN-BLAS E SAN-BLAS, 1977).

1.2. Paracoccidioidomicose

A doença causada por *Paracoccidioides*, a PCM, é autóctone da América Latina, com maior incidência no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. O Brasil tem maior número de ocorrências, o que corresponde a 85% de todos os casos relatados (VERLI *et al.*, 2005). Os pacientes com PCM podem apresentar manifestações clínicas bastante diversas. No entanto, a classificação é restrita basicamente a duas formas principais: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto). Tais formas estão associadas a extensas lesões decorrentes da infecção sistêmica e de resposta imunitária celular incapaz de controlar a infecção. A forma crônica é relatada geralmente em homens adultos, geralmente relacionada ao comprometimento pulmonar com lenta progressão e lesões restritas a um único órgão (focal) ou com a disseminação para mucosa orais e nasais, pele e glândulas adrenais (multifocal), compreendendo a aproximadamente 90% dos casos de PCM (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1987; MARQUES *et al.*, 2007; MESQUITA-DA-COSTA e MARQUES-DA-SILVA, 2014). A forma aguda, por sua vez, está relacionada a progressão rápida da doença ao sistema mononuclear fagocitário, tais como baço, fígado, linfonodos, ossos e medula óssea, com manifestações gastrointestinais, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e também lesões cutâneas (MESQUITA-DA-COSTA e MARQUES-DA-SILVA, 2014; FORTES *et al.*, 2011). Além disso a forma juvenil é portanto caracterizada por se desenvolver, sobretudo, em crianças e adolescentes de ambos os gêneros, num tempo relativamente curto, sendo mais grave que forma crônica e levando a significativas taxas de mortalidade (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1987). A alta incidência de PCM em adultos masculinos sugere

que fatores hormonais possam desempenhar papel na patogênese da doença (SANO *et al.*, 1999). De fato, estudos mostraram que o hormônio feminino 17- β -estradiol é capaz de inibir a transição de micélio para levedura atuando na supressão de genes de proteínas relacionadas à adaptação a temperatura e remodelação da parede celular, como por exemplo a família de proteínas de estresse térmico (Hsp), tornando as mulheres mais resistentes à infecção (CALICH, 1998; KASHINO *et al.*, 2000; RESTREPO *et al.*, 1984; SANO *et al.*, 1999; SHANKAR *et al.*, 2011).

A PCM tem grande impacto médico e social nas áreas de alta endemicidade, devido ao número de casos crônicos, tratamento de longa duração e frequentes sequelas incapacitantes (MARTINEZ, 2015). A ação para o controle desse problema de saúde pública que causa bastante preocupação depende da obtenção de dados epidemiológicos confiáveis. Entretanto, a obtenção desses dados é dificultada pela impossibilidade de reconhecimento de uma infecção recentemente adquirida, ausência de epidemias, deficiência na capacidade de diagnóstico em áreas endêmicas, bem como a falta de notificação de casos (MARTINEZ, 2015).

1.3. Resposta Imunológica

O estabelecimento e disseminação da PCM no hospedeiro depende não somente de fatores de virulência relacionados ao fungo como também do desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva pelo hospedeiro. Os modelos animais e as diferentes linhagens fúngicas têm sido utilizados a fim de compreender o caminho percorrido pela infecção, permitindo a observação da interação fungo-hospedeiro, das fases iniciais ao desenvolvimento de estágios crônicos. Após inalação dos propágulos infectantes e conversão para morfologia leveduriforme, presume-se que no percurso da PCM, as células epiteliais pulmonares e os macrófagos alveolares sejam as células que participam do contato inicial e da defesa contra o *P. brasiliensis*. (MENDES-GIANINNI *et al.*, 2008). O fungo utiliza moléculas antigênicas que são liberadas ou estão presentes na superfície celular, as quais reconhecem e aderem a componentes como proteínas presentes na matriz extracelular (ECM), tal qual, a glicoproteína de 43kDa (gp43) de *P. brasiliensis*, a proteína mais estudada para esse fungo e que desempenha não só a adesão a matriz como também a proteólise de colágeno, elastina e caseína, sendo importante para instalação no tecido (MENDES-GIANINNI *et al.* 1990; MENDES-GIANINNI *et al.*, 2008; FORTES *et al.*, 2011). A infecção pode disseminar-se para outros tecidos por via linfática e hematogênica e o fungo *Paracoccidioides* utiliza de mecanismos de evasão do sistema de defesa do

hospedeiro provocando o estímulo de fagocitose não profissional por células não especializadas como as células epiteliais do pulmão e queratinócitos por meio do rearranjo de proteínas do citoesqueleto (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004; PERES-DA-SILVA *et al.*, 2011). Recentemente, Almeida *et cols.* (2020) demonstram que o mecanismo de adesão também está associado ao recrutamento das integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 5$ para o sítio de adesão, cujas expressões elevam-se após quatro horas de interação com o fungo. Vale salientar que a taxa de adesão aparentemente varia entre as espécies de *Paracoccidioides*. Experimentos *in vitro* mostraram que adesinas como a gp43 podem atuar promovendo a apoptose de células epiteliais pulmonares, pneumócitos e células mononucleares (PBMC) provenientes de pacientes com PCM. Tal fenômeno apresenta-se relacionado à carga fúngica, sendo desencadeado após o período de internalização do patógeno por meio da modulação de caspases e p53, auxiliando na evasão da digestão, sobrevivência e disseminação (CACERE *et al.*, 2002; MENDES-GIANINNI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2015).

Sabe-se que diferentes tipos de células estão envolvidos no mecanismo de defesa contra este patógeno fúngico, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), linfócitos T e células *natural-killer* (NK) (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Os macrófagos, os neutrófilos e as DCs possuem papéis fundamentais no controle do crescimento de organismos patogênicos (GONZALEZ *et al.*, 2003; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). As interações de *Paracoccidioides* spp. com o hospedeiro são mediadas pelo reconhecimento de estruturas fúngicas conservadas, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes na superfície de células do hospedeiro. Esses reconhecimento permite a geração de um processo inflamatório que restringe o crescimento fúngico (BROWN *et al.*, 2011). Porém, receptores como dectina-1, receptor de manose, receptores semelhantes a Toll (TLR), tais como TLR2 e TLR4, podem atuar auxiliando no controle da proliferação ou na exacerbação das respostas com consequentes danos tissulares (LOURES *et al.*, 2010; 2015). A resposta inflamatória contra o fungo tende a se tornar crônica com desenvolvimento de granulomas, que consistem em estruturas altamente organizadas, composta por macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos, responsáveis por impor limites à proliferação e disseminação das leveduras (BRUMMER *et al.*, 1989; FORTES *et al.*, 2011). A inflamação granulomatosa durante a PCM pode assumir padrões que se correlacionam com a resposta imunológica adaptativa do hospedeiro (DE-CAMARGO e DE-FRANCO, 2000; MARQUES *et al.*, 2007). Citocinas como interferon (IFN-) γ e fator de necrose tumoral (TNF), características de um padrão de

resposta produzido por linfócito T auxiliares do tipo 1 (Th1), ativam e induzem o aumento da capacidade fungicida de macrófagos, que restringem o crescimento de *P. brasiliensis* pela baixa disponibilidade de nutrientes e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos estágios iniciais de infecção (GONZALEZ *et al.*, 2000; HAAS, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007). Cabe ressaltar que o meio intracelular de fagócitos não primados com IFN- γ pode ser permissivo a sobrevivência e crescimento do *P. brasiliensis*. Ademais, o fungo possui mecanismos de evasão que envolvem o aumento na expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, tais como enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico e acumulação de fatores de virulência (BRUMMER *et al.*, 1989; CHAVES *et al.*, 2019; DE-ARRUDA-GROSSKLAUS *et al.*, 2013, MOSCARDI-BACHI *et al.*, 1994). Pina *e cols.* (2013) mostraram que as respostas pró-inflamatórias inatas excessivas são deletérias no desenvolvimento da resposta adaptativa contra a PCM pulmonar, sendo a imunoproteção alcançada quando as DCs induzem respostas pró- e anti-inflamatórias bem equilibradas. A ativação e desenvolvimento de DCs tem repercussões claras no desenvolvimento da PCM, devido a ao seu papel na diferenciação de células T auxiliares (Th, CD4⁺) e citotóxicas (CD8⁺) em células produtoras de IFN- γ , IL-4 ou IL-17, bem como no aumento de células T reguladoras (PINA *et al.*, 2013). De fato, as DCs que capturam antígenos de *Paracoccidioides* spp. migram para o linfonodo e iniciam a resposta imunológica adaptativa por apresentar antígenos para células Th. A depender da frequência das células Th que se diferenciam em razão de sinais desencadeados por citocinas do microambiente, decorre o desenvolvimento de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro ao fungo. A polarização em células Th1 leva a produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF, que ativam classicamente macrófagos (M1), os quais eliminam os fungos. As células Th17 secretam IL-17 e IL-22, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e monócitos, que fagocitam e destroem fungos através de mecanismos microbicidas. Já o desenvolvimento de um padrão Th2 correlaciona-se com a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, as quais ativa células B, desencadeia o recrutamento de eosinófilos e desativa macrófagos, respectivamente (GALDINO *et al.*, 2018). De um modo geral, o padrão de resposta Th1 está associado a infecções assintomáticas em seres humanos, ou seja, com proteção. Normalmente, pacientes com formas crônicas desenvolvem respostas mistas, com a diferenciação de células Th17 e uma variação na quantidade de citocinas de padrão Th1 ou Th2. A PCM desenvolvida de modo agudo, que é uma forma mais grave da doença, está mais correlacionada com o padrão de resposta Th2 (DE CASTRO *et al.*, 2013). Por sua vez, a

efetividade da imunidade humoral não é bem caracterizada entre os mecanismos para combate efetivo da PCM e um aumento na produção de anticorpos IgG4, IgA e IgE tem sido identificados em pacientes diagnosticados com a forma juvenil e crônica multifocal, associados a elevados níveis de TGF- β e eosinofilia (MAMONI *et al.*, 2002).

Na verdade, os estudos atuais mostram que a resposta imunológica contra patógenos fúngicos depende da cooperação entre os diferentes componentes do sistema imunológico, que desenvolvem os diferentes programas de ativação. Embora grandes avanços tenham sido obtidos nos últimos anos, ainda há necessidade de se conhecer todos os componentes envolvidos no processo de proteção ou suscetibilidade aos fungos e como esses se associam para a resultante do processo infeccioso.

1.4. Identificação e caracterização de antígenos

A identificação de antígenos tem auxiliado os estudos de busca de novos alvos terapêuticos que sejam efetivos no tratamento da PCM experimental, porém a pesquisa de moléculas de *P. brasiliensis* com esse potencial é, de certa forma, um campo ainda pouco explorado, tanto em relação à quantidade de estudos quanto à grande complexidade antigênica de *P. brasiliensis*. Vários estudos funcionais e moleculares (*in vitro* e *in vivo*) têm sido realizados para identificar e analisar o papel de genes e proteínas envolvidos na interação entre *Paracoccidioides* e o hospedeiro, bem como de antígenos desse fungo, principalmente de *P. brasiliensis* (revisto por GONZALEZ e HERNANDEZ, 2016).

Em relação aos carboidratos, sabe-se que essas biomoléculas compõem uma parte significativa da estrutura da parede celular de *Paracoccidioides* e, portanto, podem ser determinantes para a resultante da infecção. Esse conteúdo rico em glicanas na parede de fungos permite sugerir que haja uma grande importância das hidrolases e transferases relacionadas à síntese, remodelação e degradação de polissacarídeos fúngicos (PUCCIA *et al.*, 2011). Inclusive, muitas enzimas que normalmente são encontradas intracelularmente estão presentes na parede do fungo, podendo ser secretadas para o meio por um modo não convencional (NOMBELA *et al.*, 2006).

Dentre os componentes glicídicos, os polissacarídeos tem recebido grande destaque, como é o caso das glucanas, quitinas e mananas, que são muito importantes para a manutenção da estrutura fúngica. A composição de glucanas da parede celular constitui-se em um assunto amplamente estudado e um dos primeiros a ser correlacionado com o grau de virulência, proposto pelo aumento da patogenicidade decorrente da indução da síntese de α -1,3-glucana (SAN-BLAS e VERNET, 1977). As glucanas da parede celular

podem estar ligadas a quitinas e manoproteínas para promover integridade e resistência mecânica à parede (KOLLÁR *et al.*, 1997). As moléculas de α -glucanos que compõem a parede celular demonstram interferir na diferenciação de DCs *in vitro*, conduzindo a uma supressão da resposta de linfócitos Th1, pela promoção de DCs que não expressam CD1a, potencialmente favorável a polarização para Th2 (SOUZA *et al.*, 2019).

Embora não haja estudos correlacionando manoproteínas de *Paracoccidioides* e patogenicidade, sabe-se que as manoproteínas que compõem a parede celular de um outro fungo patogênico, *Candida albicans*, parecem ser moléculas relevantes na candidíase por desempenhar papéis na adesão, antigenicidade, modulação da resposta imunológica do hospedeiro e reconhecimento deste fungo por células da imunidade inata (NELSON *et al.*, 1991; NETEA *et al.*, 2006). A adesão de *P. brasiliensis* a componentes do hospedeiro é um processo dependente da parede fúngica e um passo altamente relevante para a infecção e disseminação desses micro-organismos (PUCCIA *et al.*, 2011). Experimentos demonstraram que o processo de fagocitose de *P. brasiliensis* pode ser parcialmente ou totalmente inibido pela presença de mananas (DA-SILVA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007). Já *C. albicans* protege sua β -glucana, estimuladora de resposta imunológica, com um revestimento de manoproteína, tornando-se assim menos detectável pelo hospedeiro (SEIDER *et al.*, 2010).

Dos antígenos proteicos de *P. brasiliensis*, gp43 é indubitavelmente o mais estudado. Embora a gp43 induza uma resposta Th1 dependente de IFN- γ que é protetora contra infecção por *P. brasiliensis* (apud TRAVASSOS *et al.*, 2004), Ferreira e Almeida (2006) mostraram que a imunização de camundongos suscetíveis a infecção por *P. brasiliensis* com células dendríticas pulsadas com gp43 exacerba a PCM pulmonar. Uma explicação plausível para esse resultado seria a de que uma parte da estrutura de gp43 impede ou bloqueia uma resposta apropriada. Esse problema foi resolvido ao se obter um peptídeo imunogênico da gp43, peptídeo P10, por análise de epítomos possivelmente reconhecidos por células T, tornando-se um candidato promissor à vacina contra PCM (MARQUES *et al.*, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2014; TABORDA, 1998). P10 mostrou-se protetor ao ser administrado isolado (TABORDA *et al.*, 1998) e também em associação com antifúngicos (MARQUES *et al.*, 2006), produzindo redução na carga fúngica nos pulmões e na disseminação do fungo. Nas duas situações houve a indução de uma resposta mediada por IFN- γ , protetor na PCM. Outras proteínas de *P. brasiliensis*, como a Pb27 e Pb40, identificadas a partir de frações enriquecidas predominantemente com antígenos de superfície da parede celular, em suas versões recombinantes, também produziram

resultados promissores relacionados a melhor organização e compactação das lesões quando introduzidas no tratamento de PCM experimental em camundongos (DINIZ *et al.*, 1999; DINIZ *et al.*, 2003; GOES *et al.*, 2005; MCEWEN *et al.*, 1996). Ensaios realizados por Fernandes *et cols.* (2011) mostraram que o tratamento combinado entre Pb27 e Pb40 de *P. brasiliensis* recombinantes, simultâneo a terapia medicamentosa com fluconazol é efetivo após infecção de camundongos, redução da carga fúngica e resposta mediada por IFN- γ e TNF.

Resultados prévios do nosso grupo têm mostrado que *P. brasiliensis* cultivado em meio sintético, tais como DMEM e HAM's F12, liberam exoantígenos (ExoAgs) de forma menos variada (LANDGRAF *et al.*, 2017) do que a vista em meio complexo NGTA (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2003). Análise eletroforética de amostra de ExoAgs de culturas de *P. brasiliensis* em DMEM revelou três bandas principais com massas moleculares de aproximadamente 68, 85 e 90kDa. As bandas foram digeridas com tripsina e fragmentos trípticos analisados por espectrometria de massa (análise unidimensional por nano-LC-MS/MS). Busca no software Mascot, utilizando-se as massas dos peptídeos detectados revelaram que as proteínas de 85 e 90kDa correspondiam à proteína α -manosidase de *P. brasiliensis* (PADG_04148.1 alpha-mannosidase) enquanto os peptídeos da banda de 68kDa à diidrolipoil desidrogenase (PbDld) de *P. brasiliensis* (PADG_06494.1 dihydrolipoyl dehydrogenase) (LANDGRAF *et al.*, 2017). Análises *in silico* da α -manosidase revelaram alta identidade com α -manosidase do fungo *A. nidulans* (71%) e α -manosidase vacuolar de *Saccharomyces cerevisiae* (46%). Esses achados levaram a sugestão de que a α -manosidase identificada é uma enzima vacuolar que difere desses tipos de enzimas localizadas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi (CORRÊA, 2017). Em relação a PbDld, a imunolocalização realizada em leveduras e micélio de *P. brasiliensis* demonstrou localização na parede celular, nas mitocôndrias e no citoplasma do fungo. Em macrófagos estimulados com PbDld, houve um aumento na atividade fagocítica e microbicida, em comparação com as células não estimuladas sugerindo seu envolvimento na interação patógeno-hospedeiro (LANDGRAF *et al.*, 2017).

1.5. Manosidases

As manosidases estão agrupadas entre as hidrolases glicosídicas (EC 3.2.1), ou seja entre as enzimas que realizam a catalisação da hidrólise de resíduos terminais não redutores de α/β -D-manopiranosídeos. Portanto, estão envolvidas com o metabolismo de carboidratos participando de um amplo espectro de processos biológicos, podendo ser

encontradas nos três domínios da vida: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; DAVIES, 1997). As β -manosídeses são comumente distribuídas pelas famílias GH1, 2 e 5 e estão envolvidas no processo catabólico de degradação de oligossacarídeos de N-glicoproteínas que ocorre nos lisossomos (CANTAREL *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2005). Essas enzimas também são secretadas por organismos que realizam a degradação de hemicelulose e detêm de alta aplicabilidade biotecnológica, utilizada para realização da síntese química de glicosídeos e também em combinação com cellulases, β -glicosídeses, α -galactosídeses, para aprimorar a fermentação de fontes alternativas para produção de bioetanol (CANTAREL *et al.*, 2009; CHAUHAN; GUPTA, 2017; ENEYSKAYA *et al.*, 2009; JORGENSEN *et al.*, 2009). As β -manosídeses são amplamente distribuídas entre os organismos, sendo isolada de microrganismos como fungos *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *A. awamori* e bactérias *Bacillus* sp. (ADEMARK *et al.*, 1999; AKINO *et al.*, 1987; KULMINSKAYA *et al.*, 1999; KURAKATE; KUMAKI 2000).

As α -manosídeses geralmente, estão envolvidas na maturação (classe 1, família GH47) e catálise da degradação (classe 2; família GH38) de oligossacarídeos ligados covalentemente a resíduos de asparagina (N) de uma proteína; comumente descritos como oligossacarídeos N-ligados às glicoproteínas (GONZALEZ; JORDAN, 2000; HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; DAVIES, 1997). De forma geral, as α -manosídeses desempenham um papel fundamental no processo de glicosilação de proteínas (MOREMEN *et al.*, 1994). A primeira classe é composta de α -1,2-manosídeses de mamíferos e *leveduras* que participam da remoção de resíduos de manose ligados a oligossacarídeos N-ligados às glicoproteínas e, conseqüentemente, no remodelamento desses oligossacarídeos que são transferidos em bloco para a proteína nascente no retículo endoplasmático (ER) (MOREMEN *et al.*, 1994). A classe 2, por sua vez, tende a ser mais heterogênea, compreendendo enzimas com menor especificidade, podendo remover resíduos de manose com ligações α -1,2, α -1,3 de glicoproteínas distribuídas no citosol/ER, bem como em outras organelas, tais como o complexo de Golgi e lisossomos (DANIEL *et al.*, 1994; HERSCOVICS, 1999; MOREMEN *et al.*, 1994). Todas as manosídeses de classe 2 contêm uma região relativamente restrita de sequência conservada, predominantemente, correspondente aos resíduos do domínio catalítico na estrutura de α -manosídesase de processamento (VAN-DEN-ELSEN *et al.*, 2001). As enzimas desta classe são relativamente grandes (110 a 135kDa), podendo exigir ou não cátion divalentes para a atividade catalítica (DANIEL *et al.*, 1994).

A N-glicosilação de proteínas normalmente é realizada em algumas etapas que são evolutivamente mantidas em eucariotos (LOMBARD, 2016) e constitui-se em um fenômeno crucial para a elaboração de glicoproteínas biologicamente ativas (MOREMEN *et al.*, 1994). Há uma alta diversidade de proteínas glicosiladas com oligossacarídeos N-ligados, incluindo enzimas intra e extracelulares, receptores de superfície, proteínas secretadas, hormônios, imunoglobulinas e antígenos virais (CUMMING, 1991). As estruturas de oligossacarídeos podem influenciar não apenas na bioatividade, na localização e na imunogenicidade do polipeptídeo ligado (VARKI, 1993), mas também podem definir as características de adesão entre os glicoconjugados e outras proteínas, complexos de macromoléculas e células (MOREMEN, 2002). A biossíntese de oligossacarídeos N-ligados de glicoproteínas celulares é altamente compartimentada em células eucarióticas (DANIEL *et al.*, 1994), ocorrendo nas membranas da via secretora, incluindo o RE, o complexo de Golgi, a rede trans-Golgi e o transporte de vesículas entre esses compartimentos (MOREMEN, 2000). Geralmente as α -manosídeses atuam na remoção de resíduos de manose de oligossacarídeos, logo após serem transferidos em bloco a polipeptídeos recém-sintetizados no ER e também participam em conjunto com outras glicosídeses e glicosiltransferases do remodelamento de oligossacarídeos N-ligados às glicoproteínas no complexo de Golgi (MOREMEN *et al.*, 1994, 2002; VARKI, 1998). Diversos fungos filamentosos secretam manosídeses no meio extracelular, como *Aspergillus* spp. (INOUE *et al.*, 1995; KESKAR *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 1980), *Penicillium citrinum* (YOSHIDA *et al.*, 1993) e *T. reesei* (ENEYSKAYA *et al.* 1998). Entretanto, não está elucidada a participação dessas enzimas no processamento intracelular de N-glicanas. Com relação à relevância biológica dessas enzimas na patogênese fúngica, Mora-Montes *e cols.* (2007) mostraram, por mutação dos genes de glicosídeses de *C. albicans*, incluindo as α -manosídeses, que o processamento de oligossacarídeos N-ligados por essas enzimas é essencial para a interação fungo-hospedeiro, uma vez que os mutantes apresentaram numerosos defeitos na parede celular e diminuição da virulência. Experimentos de análise proteômica apontam elevada expressão do gene da proteína α -manosídesase em fungos recuperados de macrófagos não tratados com IFN- γ juntamente com os genes de outras proteínas envolvidas com os processos de N-glicosilação e remodelamento (CHAVES *et al.*, 2019). Esses achados sugerem que a proteína α -manosídesase possa ser importante nos processos de interação celular com o hospedeiro.

A identificação da enzima α -manosídesase, por análise proteômica, dentre as proteínas majoritárias encontradas no sobrenadante de culturas do isolado Pb18 de *P.*

brasiliensis e a detecção da atividade α -manosidase nesses sobrenadantes sugerem que essa proteína seja um exoantígeno liberado pelo fungo (CORRÊA, 2017). Embora o envolvimento das α -manosidases no processo de glicosilação de proteínas esteja muito bem descrito, não há na literatura trabalhos que descrevem o envolvimento de tais enzimas secretadas na síntese de glicoproteínas em *P. brasiliensis*, bem como trabalhos que demonstrem sua função biológica ou investiguem se há um papel relevante desempenhado por glicosidases na modulação imunológica do hospedeiro, contribuindo para o processo infeccioso, como visto em outros fungos como *C. albicans* (MORA-MONTES *et al.*, 2007). Estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que aparentemente há uma correlação positiva entre a expressão da proteína α -manosidase e a patogenicidade do fungo, uma vez que em culturas que mimetizam uma condição de privação nutricional, a expressão é maior em leveduras em comparação ao micélio em todos os isolados estudados, os quais diferiam em relação à virulência. Para Pb18, isolado virulento, o padrão elevado de expressão na morfologia patogênica se manteve também em meios de cultura complexos. Desse modo, além de ser significativamente mais expressa em leveduras, cabe ressaltar que um número considerável de antígenos estudados na PCM são moléculas liberadas da parede do fungo ou excretadas/secretadas para o meio de cultura, assim como a α -manosidase, e por serem, possivelmente, liberadas também no tecido do hospedeiro configuram-se como possíveis alvos da resposta imunitária. Portanto, esses fatos sugerem que a proteína em estudo seja um determinante putativo na interação do fungo com as células do hospedeiro e para o estabelecimento da infecção.

Também compete destacar, que estudos do secretoma de *P. brasiliensis* identificaram a presença da manosidase aqui tratada, no conteúdo de vesículas extracelulares em ambas as morfologias (VALLEJO *et al.*, 2012). Vesículas exocíticas são bem descritas na literatura em relação ao conteúdo, abrigando produtos fúngicos relacionados à patogênese e virulência em *C. neoformans* (RODRIGUES *et al.*, 2007) e *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). Estudos demonstram a influência do tratamento com conjuntos vesiculares derivados de *C. neoformans* na resposta imunológica do hospedeiro ao promoverem o aumento da capacidade microbicida de macrófagos e o estímulo de TNF, TGF- β e IL-10 (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, o conteúdo presente nas respectivas organelas liberadas por *P. brasiliensis* modulam a ativação de macrófagos pela via clássica e, conseqüentemente, a caracterização de macrófagos M1 *in vitro* (DA-SILVA *et al.*, 2016). A escassez de informações sobre essa α -manosidase de *P.*

brasiliensis associada à possibilidade de que ela tenha um papel importante na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro, motivou-nos a conduzir o presente estudo de caracterização bioquímica, o que possibilitará no futuro testá-la como novo alvo terapêutico da PCM, bem como para o entender seu papel na biologia do fungo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos o isolamento da proteína α -manosidase de *P. brasiliensis* a partir de sobrenadantes de culturas de leveduras de Pb18 por meio da técnica de cromatografia de troca iônica e a obtenção da proteína recombinante enzimaticamente ativa, produzida por bactérias *E. coli* transformadas com vetor plasmidial contendo o gene completo da enzima. Além disso, visou-se investigar a interferência da α -manosidase recombinante na atividade fagocítica e microbida de macrófagos de linhagem.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar a α -manosidase de *P. brasiliensis* a partir de sobrenadantes de culturas de leveduras de Pb18 por meio das técnicas de cromatografia de troca iônica, monitorando a eluição com a atividade enzimática com substrato cromogênico *pNP- α -D-Man*,
- Obter a α -manosidase recombinante com etiqueta de seis histidina e com atividade enzimática a partir de bactérias *E. coli* transformadas com vetor plasmidial contendo o gene completo da enzima,
- Isolar a proteína recombinante enzimaticamente ativa por cromatografia de afinidade em colunas de níquel imobilizado à matriz,
 - Técnicas cromatográficas adicionais, poderão ser usadas como cromatografia de troca iônica, caso se obtenha da cromatografia de afinidade uma enzima recombinante com contaminantes proteicos bacterianos,
- Caracterizar enzimaticamente a α -manosidase recombinante, utilizando-se o substrato cromogênico *pNP- α -D-Man*, para determinação das condições de pH e temperatura ótimos para catálise, propriedades cinéticas, termoestabilidade e a influência de cátions divalentes na atividade enzimática,

- Determinar a especificidade hidrolítica da α -manosidase por meio da técnica de cromatografia em camada delgada, utilizando diferentes manobioses e
- Investigar a influência da α -manosidase recombinante na fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos de linhagem, bem como na atividade microbicida dessas células.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento de uma α -manosidase secretada por *P. brasiliensis*

3.1.1. Cultivo do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*

Leveduras do isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) foram mantidas em meio YPD (1% de extrato levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar) suplementado com 4% de soro bovino fetal e ampicilina a 100 μ g/mL, por 7 dias, a 36°C. Pré-inóculos de aproximadamente 2×10^6 leveduras foram adicionados em 1 litro de meio de cultura líquido *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com L-glutamina (Vitrocell e Embriolife) com adição de ampicilina a 100 μ g/mL. As culturas foram mantidas por 15 dias, sob agitação constante, a 100 rpm, a 36°C. Após esse período adicionaram-se às culturas 0,2g/L de timerosal (Synth, Diadema, Brasil), a 4°C, por 24 horas para inativação dos fungos.

3.1.2. Obtenção de ESAGs

Os ESAGs foram obtidos por meio da centrifugação das culturas a $10.000 \times g$, por 10 minutos, à temperatura ambiente, sendo os sobrenadantes concentrados e dialisados contra água ultrapura em dispositivo Amicon (Merck-Millipore, Burlington, EUA) com membrana de exclusão de 10kDa.

3.1.3. Purificação da α -manosidase secretada por leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18)

Após diálise, as amostras de ESAGs totais foram purificadas utilizando cromatografia de troca aniônica, empregando coluna HiTrap Q XL (Sigma-Aldich) em sistema de *AKTA Purifier* (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, EUA). As cromatografias foram realizadas com fluxo constante de 1mL/minuto e monitoradas pela leitura *in-line* e simultânea de absorbâncias a 280nm e 420nm. A coluna foi equilibrada com cinco volumes de coluna do tampão Tris-HCl a 50mM, pH 8,0, carregada 10 volumes de coluna do mesmo tampão contendo 1M de NaCl e, subsequentemente, lavada com cinco volumes de coluna da solução de equilíbrio. Após aplicação da amostra, o material não

ligado foi eliminado com o efluente da coluna. As eluições das moléculas adsorvidas foram feitas de duas maneiras: (1) com um gradiente crescente da força iônica, cerca de 0,42mM de NaCl por segundo, até uma concentração máxima de 1M de NaCl (~40 minutos) e de um modo isocrático em estágios, ou seja, por vários aumentos bruscos de molaridade de 0,1 M cada, coletando-se 5 mL do efluente em cada estágio, até atingir 1M de NaCl. O material não retido à coluna (*flow through*) e os picos eluídos foram coletados, agrupados, concentrados e dialisados contra água ultrapura em dispositivo Amicon (Merck-Millipore) com membrana de exclusão de 10kDa. Essas amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes (SDS-PAGE) e à detecção de atividade enzimática.

3.1.4. Eletroforese e identificação das proteínas

Análises eletroforéticas das amostras de ESAGs e de alíquotas recolhidas ao longo do isolamento cromatográfico foram realizadas em SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida a 8, 10 e 12% ou utilizando géis pré-fabricados com gradiente de 4 a 20% (Bio-Rad Laboratories) em sistema Mini Protean Tetra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Para isso foi feita a ressuspensão das amostras em tampão de amostra (Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5, contendo 2,5% de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol e 20% de glicerol), seguida por aquecimento em banho maria a ~100°C, por 5 minutos, e a aplicação no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 200V e corrente variando entre 80 e 120mA, por aproximadamente 1 hora. O gel corado com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250), a temperatura ambiente, por 15 minutos, seguido por descoloração com solução aquosa de ácido acético a 7,5%, ou pelo método da prata, conforme descrito por BLUM *et cols.* (1987).

3.2. Obtenção da α -manosidase recombinante de *P. brasiliensis*

3.2.1. Plasmídeo de expressão contendo o gene de uma α -manosidase de *P. brasiliensis* (pET15b-AMS)

O vetor de expressão pET15b contendo o gene de uma α -manosidase de *P. brasiliensis* (XP_010759743.1) foi sintetizado pela empresa GenScript (Edison, EUA). A sequência de nucleotídeos teve seus códons otimizados para expressão em *Escherichia coli*, sendo o gene flanqueado com os sítios das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Foram mantidas as características do vetor pET15b, tais com região de clonagem/expressão sob o controle do promotor T7, porção N-terminal

da proteína em fusão com seis histidinas (His-Tag) e gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

3.2.2. Preparação de células competentes para transformação

Foram realizados pré-inóculos de bactérias DH10b ou Rosetta em 10mL de caldo Luria Bertani (LB – extrato de levedura a 1% [m/v], peptona a 0,5% [m/v], NaCl a 1% [m/v], pH 7,0). Após o crescimento por toda a noite, a 37°C, sob agitação constante de 200rpm, o pré-inóculo foi adicionado a um volume maior de caldo LB; na proporção 1:100 (v/v). Após atingir a densidade óptica (DO) de 0,5, as culturas foram centrifugadas a $3.500 \times g$, por 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram então ressuspensos em água ultrapura (MilliQ, Merck-Millipore) gelada e estéril e, posteriormente, centrifugados na mesma velocidade e temperatura. O mesmo processo foi repetido duas vezes com solução estéril de CaCl_2 a 50mM gelada, com intervalos de 10 minutos, nos quais as amostras ficaram incubadas em gelo. Logo após a última centrifugação, as amostras foram ressuspensas em solução estéril de CaCl_2 a 50mM, gelada, suplementada com glicerol a 15% e estocadas em alíquotas de 100 μL a -70°C até o uso.

3.2.3. Transformação de *E. coli* com pET15b-AMS

Alíquotas de bactérias *E. coli* competentes da cepa DH10b foram descongeladas em gelo e a essas adicionados 200ng do plasmídeo pET15b-AMS. Após incubação por 2 minutos no gelo, as amostras foram submetidas ao choque térmico em banho-maria a 42°C, por 1 minuto, e novamente incubadas no gelo pelo período adicional de 2 minutos. Após o choque, adicionou-se 1 mL de caldo LB suplementado com 20% de glicose e 0,5M de MgCl_2 , para recuperação das células com posterior incubação a 37°C, sob agitação constante por 1 hora. Em seguida, as células foram centrifugadas a $5.000 \times g$ por 5 minutos, ressuspensas em 100 μL de LB e semeadas sobre placas de Petri contendo ágar LB suplementado com ampicilina (peptona a 1%, extrato de levedura a 0,5% (m/v), NaCl a 1% (m/v), ágar a 1,5% (m/v), ampicilina a 100mg/mL), pré-aquecidas a 37°C, para seleção dos clones transformados com plasmídeo e, consequentemente, com a presença do gene de resistência ao antibiótico. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por toda a noite em estufa bacteriológica (Marconi). As colônias foram selecionadas e analisadas quanto a presença de pET15b-AMS pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores previamente confeccionados (Tabela 1) para amplificação do fragmento gênico da α -manosidase. Para isso, as colônias foram diluídas em 20 μL de água MilliQ estéril. Tubos contendo 10 μL dessas amostras foram fervidas em banho

maria, por 15 minutos, para rompimento da parede e membrana celulares. Após fervura, as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$, por 5 minutos, e $5\mu\text{L}$ dos sobrenadantes foram utilizados como molde. Na reação, foram aplicados $2,5\mu\text{L}$ de tampão da reação (concentrado 10 vezes - *Taq DNA polymerase reaction buffer*, contendo 20 mM de MgCl_2 – Cellco Biotec, São Carlos, Brasil), $0,5\mu\text{L}$ dos respectivos iniciadores (Tabela 1), $0,25\mu\text{L}$ de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados - 0,1M, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e $0,1\mu\text{L}$ da enzima Taq DNA polymerase (Cellco Biotec). A reação foi realizada em termociclador C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad) e desenvolvida nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos, 35 ciclos com 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos dependendo dos iniciadores e a 72°C por 3 minutos e 30 segundos adicionais no final. Como molde controle positivo da reação foi utilizado $1\mu\text{L}$ do vetor pCR2.1-TOPO (Thermo Fisher Scientific) clonado com o gene *AMS* (TOPO-*AMS*), gentilmente cedido pela Dr^a Taise N. Landgraf. Posteriormente, a reação em cadeia, as amostras foram submetidas a análises eletroforéticas em gel de agarose a 1%. Após confirmação da transformação, as bactérias de colônias que apresentaram amplificação foram inoculadas em 5mL de caldo LB suplementado com 50 mg/mL de ampicilina, cultivadas a 37°C , por toda a noite, sob agitação constante (180rpm). Os plasmídeos foram então purificados com o kit *Fast-N-Easy Plamid Mini-prep* (Cellco Biotec) e dosados em nanodrop (Thermo Fisher Scientific). O pET15b-*AMS* purificado foi usado para transformar bactérias *E. coli* das linhagens Rosetta e pLysS de *E. coli*, para expressão da proteína heteróloga. Utilizou-se um protocolo idêntico ao descrito acima para transformação de *E. coli* da linhagem DH10b e análise dos transformantes.

Tabela 1. Descrição dos iniciadores para amplificação da α -manosidase.

Iniciadores	Sequência	Temp. ($^\circ\text{C}$) anelamento	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb ¹)
AMS ² -F ³	5' – CATATGGGCGGAACCAGCAAGCTT – 3'	62	3.273
AMS-R ⁴	5' – GGATCCCTAAAGCTGCAACCGATACG – 3'		
T7 term ⁵ -R	5' – GCTAGTTATTGCTCAGCGG – 3'	56	-

1. Pares de base, 2. α -manosidase, 3. iniciador direto (*forward primer*), 4. Iniciador reverso (*reverse primer*) e 5. Terminador T7.

3.2.4. Expressão e purificação da α -manosidase recombinante

3.2.4.1. Expressão da α -manosidase recombinante

Após a identificação das amostras em que houveram a amplificação correta do fragmento da α -manosidase, os clones das linhagens pLysS e Rosetta foram selecionados e inoculados em 5mL de caldo LB contendo 50 mg/mL de ampicilina, por 16h, a 37°C, sob agitação constante a 180rpm. Após incubação, os inóculos foram adicionados a volumes variados de caldo LB suplementado com 50 mg/mL de ampicilina, a 37°C, sob agitação constante, sendo feito o monitoramento do crescimento em espectrofotômetro Ultrospec 2 100 Pro (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). Após o alcance da densidade óptica entre 0,5 e 0,6 a 600nm, induziu-se a expressão da proteína recombinante pela adição de tiogalactopiranosídeo de isopropila (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo – IPTG) a 1 mM (SERVA, Heidelberg, Alemanha). Inicialmente, foram realizados intervalos de indução de 6 a 24 horas.

A melhor condição para produção da proteína recombinante foi avaliada com bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas, variando-se a temperatura de indução – (1) 37°C, (2) 30°C e (3) temperatura ambiente (25°C), período de indução – 3, 6, 24, 30 e 48 horas, e induções com IPTG em culturas com DOs a 600nm de 0,5, 0,7, 0,9 e 1,2.

Após o período de expressão, as culturas foram centrifugadas a $5.000 \times g$, por 5 minutos, a 4°C, e os tubos contendo os sedimentos foram ressuspensos em água ou tampão de lise (Tris-HCl a 25mM e NaCl a 0,5M, pH 7,0) e mantidos em banho de gelo. Para o rompimento celular, utilizou-se seis ciclos de vibração ultrassônica na potência de 60Hz, por 1 minuto, com 1 minuto de intervalo entre os ciclos. As amostras foram centrifugadas a $5.000 \times g$, por 10 minutos, a 4°C, e as frações solúveis foram submetidas à detecção da atividade enzimática e à análise por SDS-PAGE e *Western blotting*.

3.2.4.2. Supressão da expressão basal de proteína recombinante por cultivo meio suplementado com glicose

A fim de reduzir a expressão basal da proteína recombinante em bactérias transformadas com pET15b-AMS, ensaios de indução foram realizados com células cultivadas em meios de cultura suplementados ou não com 1% de glicose. A glicose interfere nos mecanismos de regulação do sistema de vetores pET que envolve componentes do *operon lac*, reduzindo a expressão basal das moléculas expressas. Para tanto, inóculos de bactérias da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram adicionados a caldo LB suplementado ou não com 1% de glicose, na proporção 1:100. As culturas foram mantidas a 37°C, sob agitação constante até atingir a DO de 0,5 a 600nm. A indução foi feita como

descrito acima, por 24 horas, a 37°C ou à temperatura ambiente (25°C), sob agitação constante. As culturas foram centrifugadas, os sedimentos ressuspendidos, e as bactérias lisadas por ultrassom como descrito acima. As frações solúveis foram submetidas à SDS-PAGE e detecção da atividade enzimática.

3.2.4.3. Detecção da atividade enzimática

As reações para caracterização foram preparadas por meio da adaptação de microtestes descritos por Chojnowska *et al.* (2014). Aliquotas de 10µL dos sobrenadantes obtidos após a sonicação das culturas foram incubadas com 40µL de tampão citrato a 0,1M, pH 5,6, e 30µL do substrato cromogênico *p*NP- α -D-Man (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 10mM, por 1 hora, à temperatura ambiente. O volume final da reação totalizou 100µL e a concentração dos elementos resultou em 40mM de tampão citrato e 3mM de substrato. Os ensaios foram incubados pelo período de 60 minutos, à temperatura ambiente (25°C) e após o término do momento de catálise, todas as reações foram interrompidas pela adição de 200µL de tampão borato a 0,2M, pH 9,0. Controles negativos das reações (brancos) foram obtidos pela adição da solução de finalização das reações (descrita acima – tampão borato) antes da inclusão da enzima α -manosidase na mistura, impedindo, portanto a formação de produto por meio da inativação. A atividade enzimática da α -manosidase de *P. brasiliensis* foi mensurada pela leitura da absorbância a 405nm do produto 4-nitrofenol liberado do substrato cromogênico, em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare Life Sciences). A atividade enzimática foi quantificada a partir de uma curva padrão de 4-nitrofenol livre. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produção de 1µmol de produto/minuto/mL.

3.2.4.4. Transferência para membrana PVDF

Após a indução da expressão, os sobrenadantes com proteínas totais foram submetidos à SDS-PAGE como descrito no item 4.1.4. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (Amersham Hybond P 0,45 PVDF – GE, Healthcare), anteriormente embebidas em tampão de transferência (1,9% de Tris, 9% de glicina e 10% de metanol). A transferência foi realizada por 1 hora e 30 minutos sob tensão fixa de 115V e corrente variável e máxima de 300mA. Posteriormente, a membrana foi corada com Ponceau (Ponceau S a 0,2%, ácido acético a 5%, por 10 minutos, a fim de observar as bandas transferidas e a eficiência do procedimento. O excesso do corante foi removido com lavagens em água destilada.

3.2.4.5. *Western blotting*

As amostras dos sobrenadantes obtidas após sonicação de culturas induzidas com IPTG foram transferidas para membrana PVDF (GE Healthcare Life Sciences) como descrito acima (item 4.2.4.2). Após transferência, as membranas foram lavadas rapidamente com solução salina isotônica tamponada com fosfato a 10mM (PBS) contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T) e incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado em pó a 10% (m/v) diluído em PBS-T), por 1 hora, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 5 vezes com lavagens subsequentes pelo período de 5 minutos cada, utilizando PBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas com 3μL de anticorpos contra *his-tag* (GE Healthcare Life Sciences) diluídos em 10mL de solução de diluição (leite desnatado em pó a 1% (m/v) em PBS-T), por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Logo após, as membranas foram lavadas como descrito acima e incubadas com 3μL de anticorpos secundários biotinizados (IgG de cabra contra IgG de camundongo – Thermo Fisher Scientific) diluídos em 10mL solução de diluição, por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente, foram adicionados 10μL do conjugado estreptavidina-peroxidase a 10μg/μL, diluído na proporção (1:1000) e realizada a incubação por 30 minutos. As membranas foram lavadas e as reações reveladas com peróxido de hidrogênio e o revelador 3'3-diaminobenzidina (DAB – Vector Laboratories Burlingame, EUA), durante 5 minutos no escuro, seguindo as instruções do fabricante.

3.2.5. Purificação da proteína recombinante

3.2.5.1. Isolamento em cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado

Para purificação da α -manosidase recombinante, amostras de obtidas da lise e sonicação de bactérias *E. coli* Rosetta transformadas com o pET15b-AMS e induzidas com IPTG (Serva) foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna com íon metálico imobilizado (níquel), HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences), utilizando sistema automatizado *AKTA Purifier* (GE Healthcare Life Sciences), com monitoramento contínuo por absorbância a 280nm. Para tanto, a coluna foi equilibrada com cinco volumes de coluna do tampão de lise (Tris-HCl a 25mM, NaCl a 0,5M) contendo 10mM de imidazol, pH 7,0. Em alguns experimentos de padronização de expressão, foram feitas cromatografias com tampão de equilíbrio na ausência ou presença de 10 ou 20mM de imidazol a fim de se obter o máximo de proteína recombinante com o mínimo de contaminantes. Após aplicação da amostra contendo proteínas bacterianas totais, o material não adsorvido foi coletado com o efluente da coluna (*flow-through*). As proteínas

adsorvidas na matriz foram eluídas com o tampão contendo 300mM de imidazol. Quando necessário, as frações coletadas foram dessalinizadas por cromatografia por filtração em gel (*Zeba Desalting Chromatography Cartridges*, 7K MWCO, Thermo Fisher Scientific). Os produtos obtidos nos processos cromatográficos foram analisados por SDS-PAGE como descrito no item 4.1.4.

3.2.5.2. Isolamento por cromatografia de troca iônica

Para refinamento da purificação da α -manosidase recombinante, os eluatos obtidos da cromatografia em coluna HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences) foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q XL (GE Healthcare Life Sciences), conforme o protocolo descrito no item 4.1.3. Neste caso, a diferença foi o tampão usado nessa cromatografia – Tris-HCl a 25mM, pH 9,0. A eluição do material adsorvido foi obtida com um gradiente crescente da força iônica, cerca de 0,42mM por segundo, até uma concentração máxima de 1M de NaCl (~40 minutos). As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e atividade enzimática.

3.2.5.3. Purificação em cromatografia por filtração em gel

As cromatografias por filtração em gel foram realizadas em coluna Superdex 200 (10/300 GL – GE Healthcare Life Sciences) em modo isocrático com o tampão Tris-HCl a 50mM, pH 9,0. As corridas foram realizadas com fluxo constante de 0,5mL/minuto, monitoradas pela leitura in-line de absorbância a 280nm e injeção manual de no máximo 1mL de amostra. A coluna foi previamente calibrada com as proteínas tiroglobulina (669kDa), ferritina (450kDa), catalase (232kDa) e aldolase (158kDa), possibilitando a confecção de uma curva padrão tendo como parâmetros as massas moleculares e os volumes de eluição. Nessa coluna foram separadas, por massa molecular, as proteínas presentes nas frações coletadas da cromatografia de troca catiônica que apresentavam atividade de α -manosidase e bandas com massas moleculares equivalentes a da α -manosidase de *P. brasiliensis*. As frações coletadas foram concentradas e dialisadas em dispositivo Amicon com membrana de exclusão de 10kDa (Merck-Millipore) e submetidas a análises eletroforéticas e enzimáticas.

3.3. Caracterização enzimática da α -manosidase recombinante

3.3.1. Ensaio enzimáticos

Após a purificação da α -manosidase recombinante, a atividade enzimática das amostras foi mensurada conforme descrito no item 4.2.4.1. Alterações sobre o volume dos componentes foram realizadas quando necessário, diluindo-se cada reagente 1:3. Os

controles negativos das reações (brancos) foram confeccionados para todos os pH, as temperaturas e as concentrações testadas. As reações foram realizadas em duplicata com posterior cálculo do desvio padrão.

3.3.2. Efeito do pH

Para determinação do pH adequado para a atividade da α -manosidase recombinante, alíquotas da proteína purificada e quantificada a 0,014 μ g/ μ L, foram incubadas em diferentes meios reacionais com variação do pH em intervalos de 0,5, à temperatura ambiente, durante 60 minutos. Os ensaios foram realizados entre os pHs 3,0 e 8, variando-se o pH do tampão citrato entre 3,5 e 6,5 e do tampão Tris-HCl, entre 7 e 8.

3.3.3. Efeito da temperatura

Para determinação da temperatura ótima para a atividade da α -manosidase, todas as reações de catálise enzimática foram realizadas em termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). A atividade α -manosidase do sobrenadante de cultura de leveduras de *P. brasiliensis* foram preparadas em pH ótimo, determinado como descrito no item acima (4.3.2) e incubadas por 60 minutos em temperaturas entre 25 e 70°C em intervalos de 5°C. Para a determinação da termoestabilidade da α -manosidase recombinante, alíquotas de 10 μ L da proteína a 0,014 μ g/ μ L foram incubadas a temperaturas de 45°C por 0, 5, 10, 15 e 30 minutos. Essa temperatura foi escolhida porque foi a única a conferir certa estabilidade para a atividade α -manosidase do sobrenadante de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*. Após o término de cada intervalo de exposição, as reações foram imersas imediatamente e mantidas a 0°C (banho de gelo) até a adição nos meios reacionais com posteriormente catálise em condições ótimas de pH e temperatura. A termoestabilidade foi determinada medindo-se a atividade residual da enzima e todas as reações foram efetuadas em duplicata.

3.3.4. Ensaios cinéticos

Para padronização do tempo de reação, foi realizada a catálise utilizando 3mM de substrato *p*NP- α -D-Man e 0,146 μ g de proteína recombinante em condições ótimas de temperatura e pH, variando-se o período de incubação de 5 a 120 minutos.

3.3.5. Taxa de reação

Para determinação das taxas de reação, meios reacionais com diferentes concentrações de substrato, variando-se de 0,093 a 3mM de *p*NP- α -D-Man, foram incubados 0,146 μ g de proteína recombinante em condições ótimas de temperatura e pH, por 60 minutos.

3.3.6. Avaliação da interferência do EDTA na atividade da α -manosidase recombinante de *P. brasiliensis*

Para a avaliação dos possíveis efeitos do agente quelante EDTA sobre a catálise, meios reacionais foram preparados utilizando EDTA a 10mM juntamente com 0,14 μ g da α -manosidase e 3mM de substrato *p*NP- α -D-Man, os quais foram incubados em condições ótimas de pH, temperatura por 60 minutos.

3.3.7. Especificidade hidrolítica

A especificidade hidrolítica da α -manosidase em estudo foi determinada pela técnica de cromatografia em camada delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*), como descrito por Rangarajan, *et cols.*, (2013), com pequenas modificações. As reações foram preparadas com três manobioses: 2 α -manobiose (α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-manopiranoose), 3 α -manobiose (α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-D-manopiranoose) e 6 α -manobiose (α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-D-manopiranoose).

A primeira reação foi feita com 3mM de um dos dissacarídeos, tampão citrato a 13mM, pH 5,6, e 0,5 μ g da α -manosidase recombinante, em um volume total de 30 μ L. As reações foram incubadas em períodos diferentes de 0, 2 e 16 horas, a 25°C (temperatura ambiente), sendo imediatamente incubadas por 5 minutos em banho maria com água em ebulição para interrupção da catálise. As amostras foram aplicadas em cromatofolha de alumínio com camada de sílica gel G60 com indicador fluorescente F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Posteriormente à aplicação, o desenvolvimento cromatográfico foi realizado em cuba de vidro para TLC contendo 250mL de solvente n-butanol:ácido acético:água (50:50:30, v/v/v), até completa absorção por capilaridade. As placas foram colocadas em estufa a 37°C até evaporação completa da solução e a resolução dos *spots* foi feita pela pulverização de solução de metanol contendo 3% de ácido sulfúrico (revelador), seguida de aquecimento a 85°C em estufa bacteriológica (Marconi, Piracicaba, Brasil).

Novos ensaios foram realizados e as reações foram preparadas utilizando 3mM de uma das manobioses, 40 mM de tampão citrato, pH 5,6, e 1,5 μ g de α -manosidase recombinante, em um volume final de 30 μ L, os quais foram incubados por toda a noite, à temperatura ambiente. A inativação da enzima e o procedimento cromatográfico foi realizado como descrito acima. Após secagem, a revelação dos *spots* foi feita borrifando-se a placa com um aerossol de solução álcool-ácida de orcinol (180 mg orcinol, 5 mL de água, 75 mL de etanol e 10 mL de ácido sulfúrico), seguida de aquecimento a 85°C.

Em todas as TLCs, D-manose foi usada como padrão de migração dos monossacarídeos enquanto reações interrompidas no tempo zero como padrão de ausência de catálise. O índice de retenção (Rf) foi calculado, dividindo-se a distância percorrida pelo carboidrato pela distância percorrida pelo solvente. Monossacarídeo tem Rf maior do que dissacarídeo.

3.4. Influência da α -manosidase recombinante na capacidade fagocítica e microbida de macrófagos incubados *P. brasiliensis*

Para avaliação da atividade fagocíticas, 1×10^5 macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em lamínulas redondas estéreis acomodadas em placas de cultura de plástico de 24 poços (Falcon® 24-well Polystyrene, Corning Inc., Corning, EUA) Corning, EUA) contendo 500 μ L/poço de meio RPMI (Vitrocell e Embriolife) completo, suplementado com 10% soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 100U/mL de penicilina (Thermo Fisher Scientific) e 100 μ g/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). As culturas foram incubadas em estufa, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 2 horas. As monocamadas de células aderentes foram tratadas lavadas com PBS estéril e incubadas com 0,85 e 3,4 μ g/mL da α -manosidase recombinante, diluídas em 500 μ L de PBS estéril, por 1 hora, a 37°C. Como controle foi utilizado albumina sérica bovina, (BSA – Bio-Rad) diluída em PBS, nas mesmas concentrações usadas para α -manosidase recombinante. Depois de decorrido o tempo de tratamento, as células foram novamente lavadas e infectadas com suspensão de 3×10^5 leveduras de *P. brasiliensis* contidas em 400 μ L de meio RPMI completo. Para determinação da atividade fagocíticas, foi mantida a infecção das células J774 por 4 horas, em estufa a 37°C e após o tempo de infecção, as lamínulas foram lavadas com PBS estéril e fixadas com paraformaldeído 4%, por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente a fixação, as lamínulas foram incubadas com 400 μ L de corante Giemsa diluído em PBS por 20 minutos, à temperatura ambiente, com subsequente lavagens com água destilada. Cada lamínula foi observada em microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon) para contagem do número de fungos em 100 células/campo, em 3 campos distintos, determinando-se a porcentagem total de infecção em cada situação experimental.

Protocolo experimental muito semelhante ao descrito acima foi feito para determinação da atividade microbida. Esse diferiu nos seguintes aspectos: (1) as culturas foram feitas diretamente nos poços da placa, ou seja, sem a necessidade de lamínula, (2) as infecções das células J774 com leveduras de *P. brasiliensis* foram mantidas por 48 horas e

(3) o modo de detecção da atividade microbicida foi o cultivo de fungos. Para isso, após 48 horas de infecção, as culturas foram lavadas com PBS estéril e os macrófagos de linhagem lisados pela adição de 1 mL de água destilada aos poços da placa. As amostras coletadas dos poços foram diluídas em série, plaqueadas em ágar BHI suplementado com 1% de glicose e cultivadas por 10 dias, a 37°C para determinar a presença de unidades formadoras de colônia (UFC) de leveduras.

3.5. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre as médias dos testes (variantes) experimentais *in vitro* foram determinadas por análise de teste t de *Student* ou análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da α -manosidase a partir do sobrenadante de cultura de leveduras da linhagem P18 de *P. brasiliensis*

Previamente, nosso grupo de pesquisa identificou uma α -manosidase (PADG_04148.1 alpha-mannosidase) e a diidrolipoil desidrogenase (DLD) de *P. brasiliensis* (PADG_06494.1 dihydrolipoyl dehydrogenase) entre as proteínas majoritárias dos sobrenadantes de cultura de leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (CORRÊA, 2017; LANDGRAF *et al.*, 2017). Além disso, no caso da α -manosidase, também foi observada a atividade α -manosidase nesse sobrenadante (CORRÊA, 2017). A fim de se isolar a α -manosidase, no presente estudo, submeteu-se ESAs de sobrenadante de cultura de leveduras da linhagem P18 de *P. brasiliensis* à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q XL, com tampão de equilíbrio em pH 8. As frações correspondentes aos picos de absorbância a 280nm foram coletadas, reunidas, concentradas e dialisadas contra água. Primeiramente, analisou-se a atividade enzimática nas amostras obtidas de uma cromatografia cuja eluição foi feita com gradiente contínuo, de 0 até 1M de NaCl. Detectou-se atividade α -manosidase no material eluído nas concentrações entre 0,2 a 0,5M de NaCl (Tabela 2). A análise por SDS-PAGE a 10% revelou duas bandas principais com massas moleculares de 85 e 90kDa (Figura 1, raia 3) que eram minoritárias no sobrenadante de cultura (Figura 1, raia 2). O fato de a eluição da atividade α -manosidase ocorrer entre 0,2 a 0,5M de NaCl motivou-nos a eluir a atividade com aumentos bruscos de força iônica, ou seja, de modo isocrático com etapas de aumento de 0,1M de NaCl até

atingir 1M. Nessas condições, houve atividade enzimática apenas nas frações eluídas com 0,4 e 0,5M de NaCl (Tabela 2). É interessante notar a presença das bandas de 85 e 90kDa nessas frações positivas (Figura 1, raias 4 e 5), e não naquela eluída com 0,6M de NaCl, que não tinha atividade enzimática. Dessa forma, foi possível mostrar que a proteína permaneceu ativa após purificação em cromatografia de troca aniônica, em pH 8, e os resultados permitiram definir a concentração de 0,4M de NaCl como a mais adequada para eluição da α -manosidase, uma vez que apresentou atividade enzimática equivalente a 0,58U (Tabela 2) e um eficiente isolamento da molécula em comparação a amostra eluída com 0,5M de NaCl (Figura 1, raia 5).

Tabela 2 - Atividade enzimática detectada em amostras eluídas a partir da cromatografia do sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* em coluna HiTrap Q XL em pH 8.

Amostra eluída com	U/min/mL
Gradiente entre 0,2 a 0,5M de NaCl ¹	$0,658 \times 10^{-3}$
0,4M de NaCl (isocrático em estágios) ²	$0,580 \times 10^{-3}$
0,5M de NaCl (isocrático em estágios) ²	$0,555 \times 10^{-3}$

ESAgS foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q XL, equilibrada com tampão Tris-HCl a 50mM, pH 8,0 e carregada com Cl⁻. Amostras foram eluídas primeiramente em gradiente contínuo¹, e posteriormente de modo isocrático em etapas de aumento de força iônica, 0,1M cada². Todas as corridas foram monitoradas a 280nm. Para detecção da atividade enzimática, 30μL do eluato foi adicionado ao meio reacional composto por tampão citrato a 0,1mM, pH 5,6 e pNP- α -D-Man a 10mM, como substrato. As amostras foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente (25°C), com posterior leitura da absorbância a 405nm em espectrofotômetro.

Figura 1 - Análise eletroforética das frações obtidas da cromatografia de troca aniônica de sobrenadante de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*. ESAGs foram fracionados em cromatografia de troca iônica, conforme descrito na legenda da tabela 2. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE a 10%. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (em kDa) está mostrada na raia 1 da figura, os ESAGs na raia 2, o eluato obtido no gradiente entre 0,2-0,5M de NaCl da primeira cromatografia na raia 3, os materiais eluídos com 0,4, 0,5 e 0,6M de NaCl da segunda cromatografia nas raias 4, 5 e 6. As setas indicam bandas com MM de 85 e 90kDa, correspondentes a proteína identificada previamente como uma α -manosidase de *P. brasiliensis*.

4.2. Transformação bacteriana com vetor pET15b-AMS e expressão da α -manosidase de *P. brasiliensis*.

4.2.1. Transformação bacteriana

O vetor pET15b-AMS foi usado para transformação de *E. coli* das linhagens DH10b, para multiplicar o plasmídeo, e Rosetta e pLysS, para expressão da proteína recombinante. Colônias de bactérias Rosetta e pLysS transformadas que cresceram em meio seletivo com antibiótico foram analisadas por PCR quanto à presença do plasmídeo. Análise da eletroforese em gel de agarose possibilitou observar *amplicons* do gene da α -manosidase (3.303pb), tanto para pLysS (Figura 2A, raias de 3 a 6) quanto para Rosetta (Figura 2B, raias de 9 a 12), os quais apresentaram ampliações correspondentes aos controles positivos TOPO-AMS (Figura 2A e B, raias 2 e 8). Foram selecionados aleatoriamente um clone de cada linhagem (Figura 2A e B, raias 3 e 9).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do gene da α -manosidase em *E. coli* das linhagens pLysS (A) e Rosetta (B) transformadas com pET15b-AMS. Quatro clones de cada linhagem de *E. coli* transformada com pET15b-AMS foram isolados a partir de culturas em meio seletivo contendo ampicilina, os quais foram crescidos em meio LB líquido por 16 horas. Após extração dos plasmídeos, as *minipreps* foram submetidas à PCR para amplificação do gene da α -manosidase (3303pb). Como controle positivo da PCR, utilizou-se o TOPO-AMS. O marcador *DNA* λ /*HindIII* está mostrado na figura no lado esquerdo da figura, com os tamanhos dos fragmentos de DNA, em pb, apresentados. As amostras foram aplicadas na seguinte sequência: raias 1 e 7 – marcador *DNA* λ /*HindIII*, com os tamanhos dos fragmentos de DNA em pb descrito do lado esquerdo da figura, raias 2 e 8 – TOPO-AMS, raias 3 a 6 – amplificações a partir de clones selecionados de transformantes da linhagem pLysS e raias 9 a 12 – amplificações a partir de clones selecionados de transformantes da linhagem Rosetta. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% corado com SYBR Safe Gel Stain.

4.2.2. Indução da expressão

Os clones das bactérias pLysS e Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram crescidas na ausência ou presença de 1mM de IPTG, o indutor de expressão de proteína recombinante desse sistema. Lisados obtidos por aquecimento de suspensões bacterianas induzidas ou não com IPTG foram analisados por SDS-PAGE (Figura 3). Ao se comparar os clones das linhagens Rosetta e pLysS, foi identificado o aumento da quantidade de proteínas expressas pelo clone da Rosetta, em particular no que se refere a banda majoritária com massa molecular estimada em 74kDa (Figura 3, raia 5), quando compararam-se as situações de não indução e indução com IPTG. Contudo, o clone de pLysS não apresentou uma mudança clara no quadro de proteínas expressas e sim uma redução da banda predominante (Figura 3, raia 3). Considerando os resultados acima, foi feita a escolha do clone da linhagem Rosetta para dar seguimento aos processos de rastreamento, refinamento e isolamento da proteína recombinante.

Figura 3 - Análise eletroforética das proteínas expressas por *E. coli* das linhagens pLysS e Rosetta transformadas com pET15b-AMS cultivadas na ausência ou presença de IPTG. Os clones positivos previamente selecionados foram cultivados em caldo LB até atingir a DO de 0,5 a 600nm. Nesse momento, foi feita a indução com 1mM de IPTG, sendo mantidas as culturas, a 37°C, sob agitação constante. Após 6 horas, as culturas foram centrifugadas e os sedimentos ressuspensos em água para lise em banho maria com água em ebulição. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes ressuspensos em tampão de amostra para a análise por SDS-PAGE a 8%. O gel foi corado por impregnação de prata. Raia 1 – Migração eletroforética das proteínas com massas moleculares conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura. Raia 2 – pLysS não induzida. Raia 3 - pLysS induzida com IPTG. Raia 4 – Rosetta não induzida. Raia 5 – Rosetta induzida com IPTG. A seta indica a banda majoritária equivalente a aproximadamente 74kDa.

4.2.3. Rastreamento das α -manosidase recombinante em cultura

Embora exista diferença no perfil de expressão em culturas provenientes da linhagem Rosetta estimuladas com indutor comparadas às não estimuladas, experimentos adicionais mostraram ausência de atividade enzimática nos sobrenadantes extraídos (dados não mostrados). Quando expressa, a α -manosidase recombinante detém em sua porção N-terminal uma etiqueta de poli-histidina (*his-tag*), e portanto, para o rastreamento da proteína em cultura foi realizada a técnica de *Western blotting* com anticorpos específicos para a sequência de histidinas. Previamente, foi feita uma análise eletroforética das culturas de bactérias transformadas, submetidas ou não à indução com IPTG, bem como bactérias não transformadas e não estimuladas com indutor, como controle negativo. A análise eletroforética das proteínas de bactérias transformadas e induzidas revelou uma banda majoritária correspondente a massa molecular de aproximadamente 74kDa (Figura 4A, raia 4) e uma acima de 116kDa, as quais não foram visualizadas nas amostras de bactérias não

transformadas ou transformadas e não induzidas com IPTG (Figura 4A, raias 2 e 3, respectivamente). Outras bandas, compartilhadas entre todas as amostras, com massa de 56kDa e também situadas abaixo de 35kDa foram evidenciadas (Figura 4A). A análise dessas amostras por *Western blotting*, no qual foi utilizado anticorpos contra *his-tag*, revelou duas bandas delgadas de 79 e 89kDa no material obtido de bactérias transformadas e induzidas com IPTG (Figura 4B, raia 3), as quais não foram detectadas na análise eletroforética. Além disso, houve marcação de proteína de aproximadamente 40kDa, bem como do *front* da corrida (Figura 4B, raias de 1 a 3), provavelmente, por moléculas constitutivas de *E. coli*, haja vista que estavam expressas até mesmo nas bactérias não transformadas (Figura 4B, raia 1). Devido à baixa resolução na separação de proteínas que estão no limite de migração da SDS-PAGE com concentração fixa de gel, foi realizada a transferência para membrana de PVDF de proteínas separadas em gel com gradiente linear de 4 a 20% de acrilamida. A análise revelou uma banda principal com massa aproximada de 21kDa na amostra de bactérias transformadas e induzidas com IPTG (Figura 4B, raia 7), apesar de uma banda com a mesma massa e de menor intensidade ter sido observada nas amostras de bactérias não transformadas e de transformadas e não induzidas (Figura 4B, raia 5 e 6), respectivamente. É interessante notar que a banda principal de 74kDa do material oriundo de bactérias transformadas e induzidas com IPTG, visualizada por SDS-PAGE a 10% (Figura 4A, raia 4, marcada com uma pequena seta) não foi revelada com anticorpo contra *his-tag* (Figura 4B, raia). Esses resultados sugerem uma clivagem da proteína expressa em cultura em fragmentos menores, os quais carregam a sequência de histidinas e, conseqüentemente, são revelados após o tratamento com anticorpos.

Figura 4 - (A) Análise eletroforética das proteínas expressas por bactérias Rosetta transformadas com pET15b-AMS. Lisados bacterianos de um clone transformado com vetor pET15b-AMS foram obtidos como descrito na legenda da figura 3 e analisados por SDS-PAGE a 10%, com gel corado com azul de Coomassie. Raia 1 – Migração eletroforética das proteínas com massas moleculares conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura. Raia 2 – Bactérias não transformadas e não induzidas. Raia 3 – Bactérias transformadas e não induzidas. Raia 4 – Bactérias transformadas e induzidas com IPTG. Raia 5 – Proteína lutA recombinante com etiqueta de histidina, como controle da reação. A seta indica a banda com massa molecular correspondente a massa de 74kDa.

(B) Western blotting do lisado de bactérias Rosetta transformadas com pET15b-AMS. Proteínas do lisado de bactérias Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram separadas em SDS-PAGE a 10% (raias de 1 a 4) ou em gradiente linear de 4 a 20% de poliácridamida (raias 5 a 7) e transferidas para membranas PVDF. As membranas foram bloqueadas e incubadas com anticorpos de camundongos contra etiqueta de histidina e, posteriormente, com anticorpos biotinilados contra IgG de camundongo. As membranas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase. A revelação das reações foi feita com peróxido de hidrogênio e o revelador cromogênico diaminobenzidina (DAB). A migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) está indicada na figura. Raias 1 e 5 – Bactérias não transformadas e não induzidas. Raias 2 e 6 – Bactérias não transformadas e não induzidas, raias 3 e 7 – Bactérias transformadas e induzidas com IPTG. Raia 4 – Proteína lutA recombinante contendo etiqueta de histidina, como controle da reação. As setas indicam bandas com massas moleculares correspondentes a 79 e 89kDa.

A regulação do sistema de vetores pET envolve componentes do *operon lac*, o qual pode ser regulado positivamente pela ligação do indutor IPTG ao repressor e pelo complexo cAMP e seu receptor CAP (cAMP/CAP), que se ligam à montante do promotor, ou seja, tanto IPTG quanto cAMP/CAP estimulam a transcrição pela RNA polimerase. Na ausência de glicose, há o aumento e acúmulo de cAMP e, consequentemente, indução da transcrição dos insertos pela RNA polimerase, podendo ter uma expressão basal de proteínas, mesmo na ausência do indutor IPTG (NOVY e MORRIS). A fim de refinar a expressão de proteínas recombinantes aqui descritas e distingui-las das proteínas pertencentes as proteínas constitutivas das bactérias, foi adicionado glicose aos meios de cultura de bactérias submetidas ou não a indução para supressão da expressão basal. Após corrida eletroforética, verificou-se que a adição da glicose proporcionou uma redução da

expressão de inúmeras proteínas, inclusive da banda majoritária na faixa de 70kDa em culturas suplementadas com glicose (Figura 5).

Figura 5 - Supressão da expressão basal de proteínas recombinantes por meio da adição de glicose a 1%. Bactérias *E. coli* Rosetta transformadas com o pET15b-AMS foram cultivadas em caldo LB padrão (LB) ou suplementado com 1% de glicose (LB + 1% de glicose), a 37°C, sob agitação constante, até o crescimento equivalente a DO de 0,5 a 600nm. Algumas culturas não foram induzidas (NI) enquanto a outras foi adicionado IPTG (IPTG), numa concentração final de 1mM. Após 24 horas de cultivo, as bactérias rompidas com ultrassom em tampão de lise. Após centrifugação, os sobrenadantes foram ressuspensos em tampão de amostra, submetidos à SDS-PAGE a 10%. O gel foi corado com azul de Coomassie. MM – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura.

4.3. Padronização da expressão e purificação da α -manosidase recombinante

4.3.1. Cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado

Com a finalidade de se isolar e aumentar a concentração de α -manosidase recombinante a partir do lisado de bactérias transformadas e induzidas com IPTG e, consequentemente, detectar atividade enzimática, o protocolo de lise foi realizado em duas condições: em água, para minimizar a interferência de sais na atividade enzimática, e em tampão de lise. Os sobrenadantes das amostras lisadas, foram submetidos à purificação em cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado, utilizando coluna HisTrap HP para ligação da etiqueta de poli-histidinas presente na porção N-terminal da proteína. O perfil de expressão em ambas as etapas de lise e após a purificação foi analisado por SDS-PAGE (Figura 6). Os resultados mostraram que não houve diferença no padrão de bandas de proteínas extraídas pela ruptura bacteriana em água e solução de lise, contudo nota-se a presença da proteína majoritária de 74kDa em ambas as amostras (Figura 6A, raias 3 e 4). Nos sobrenadantes também não foi detectada atividade enzimática após lise.

De modo similar aos resultados nos experimentos de *Western blotting* (Figura 4B), a proteína na faixa de 70kDa não se ligou à coluna (Figura 6B, raias 5 e 6), ou seja, parece não apresentar a *his-tag*. É interessante notar que ligou-se a coluna uma banda de aproximadamente 121kDa dos dois lisados (Figura 6B, raias 5 e 6). Houve um contraste entre outras bandas, contendo bandas mais proeminentes na fração solúvel obtida após lise com água. Não foi detectada atividade enzimática em nenhuma das amostras.

Figura 6 - (A) Análise do perfil de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* após rompimento celular em água ou tampão de lise. Lisados de bactérias *E. coli* Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram obtidos como descrito na legenda da figura 3. Após indução com IPTG por 24 horas, as bactérias foram ressuspensas em água ou tampão de lise (Tris-HCl a 25mM e NaCl a 0,5M, pH 7,0) e rompidas por ultrassom. As frações solúveis analisadas por SDS-PAGE a 12%, com subsequente coloração com azul de Coomassie. Raia 1 – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura. Raia 2 – Bactérias ressuspensas diretamente no tampão de amostra. Raia 3 – Lisado com água. Raia 4 – Lisado com tampão de lise.

(B) Análise das proteínas eluídas de uma cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado dos lisados descritos em (A). Após cultivo, indução, rompimento das bactérias e centrifugação, os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado. A coluna foi equilibrada com tampão de lise com acréscimo de imidazol a 10mM e o *flow-through* coletado. Após a lavagem, foi feita a eluição do material adsorvido à coluna com tampão de lise contendo imidazol a 300mM. Raia 1 – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura. Raia 2 – Bactérias ressuspensas diretamente no tampão de amostra. Raia 3 – *Flow-through* da cromatografia do lisado com água. Raia 4 – *Flow-through* da cromatografia do lisado com tampão de lise. Raia 5 – Eluato da cromatografia do lisado com água. Raia 6 – Eluato da cromatografia do lisado com tampão de lise. A seta indica bandas correspondentes a massa molecular de 121kDa.

4.3.2. Padronização da temperatura

Os ensaios de padronização das condições de expressão foram realizados variando-se a temperatura de indução da proteína recombinante. A análise eletroforética

não revelou diferença entre os perfis de proteínas de lisados de bactérias não transformadas (Figura 7A) ou transformadas com pET15-*AMS* (Figura 7B) quando comparou-se as amostras obtidas de culturas em diferentes temperaturas de indução – a 25, 30 ou 37°C. Curiosamente, as frações provenientes de culturas de bactérias transformadas e induzidas a 25°C mostraram atividade enzimática, detectada pela catálise do substrato *pNP- α -D-Man*, estatisticamente significativa em relação ao controles e as demais temperaturas testadas (Figura 8).

Figura 7 - (A) Análise do perfil de proteínas expressas por bactérias *E. coli* Rosetta não transformadas ou (B) transformadas com pET15b-*AMS* em diferentes temperaturas de indução da proteína recombinante. Bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta não transformadas ou transformadas com pET15b-*AMS*, foram cultivadas caldo LB, a 37°C. Quando as culturas atingiram a DO de 0,5 a 600nm, adicionou-se IPTG nas culturas que se desejava induzir a proteína recombinante, na concentração final de 1mM, sendo as culturas induzidas ou não mantidas à temperatura de 25, 30 ou 37°C, por toda a noite, sob agitação constante. Os sobrenadantes foram coletados após rompimento celular por sonicação e centrifugação. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE a 12%, sendo o gel corado com azul de Coomassie. Raia 1 – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura. Raias 2, 3 e 4 – Amostras de culturas não induzidas e cultivadas após atingir DO de 0,5 a 600nm nas temperaturas de 25, 30 e 37°C, respectivamente. Raias 5, 6 e 7 – Amostras de culturas induzidas com IPTG e cultivadas nas temperaturas de 25, 30 e 37°C, respectivamente.

Figura 8 – Lisados de bactérias transformadas com pET15b-AMS e induzidas com IPTG a 25°C apresentam atividade α -manosidase. Bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas e induzidas como descrito na legenda da figura 7. Os sobrenadantes coletados após rompimento celular em aparelho ultrassônico foram submetidos à detecção da atividade enzimática, sendo adicionado o volume de 30 μ L aos meios reacionais compostos por tampão citrato a 0,1mM, pH 5,6 e pNP- α -D-Man a 10mM como substrato, totalizando 100 μ L de volume final da reação. As amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente (25°C), com posterior leitura da absorbância a 405nm. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação a todas as demais amostras, controles (não induzidos) e outras temperaturas de indução.

A amostra induzida a 25°C na qual houve a detecção de atividade enzimática (Figura 9, raia AS, induzida) foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna Histrap HP, utilizando-se como controle sobrenadante de lisados de bactérias cultivadas nas mesmas condições de temperatura e rotação, porém sem indução com IPTG (Figura 9, raia AS, não induzida). As alíquotas coletadas no processo de purificação foram analisadas em SDS-PAGE e proteínas com massas de aproximadamente 91, 87 e 79kDa foram eluídas a partir da amostra obtida de bactérias as quais realizou-se a indução da expressão (Figura 9, raia EL, Induzidas), juntamente com outras moléculas de menor massa molecular presentes em ambos os eluatos (Figura 9, raias EL, Não induzidas e Induzidas). No sobrenadante procedente da cultura em que não foi feita a adição de IPTG, observou-se a eluição de uma banda com 91kDa (Figura 9, raias EL, Não induzidas). Portanto, a presença de catálise, bem como a eluição de moléculas cuja massa se aproxima da α -manosidase de *P. brasiliensis*, denotam a temperatura de 25°C como a mais adequada para realização do processo de indução da expressão.

Figura 9 – A α -manosidase recombinante de *P. brasiliensis* com atividade enzimática preservada é produzida por bactérias transformadas com pET15b-AMS e cultivadas à 25°C (LT), sendo essa enzima isolada em coluna de HisTrap. Bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas e **não induzidas** ou **induzidas** com 1mM de IPTG a 25°C, como descrito na legenda da figura 7. Os antígenos somáticos solúveis (AS) obtidos após rompimento celular em aparelho ultrassônico e centrifugação foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado (HisTrap). Material não adsorvidas à coluna HisTrap (FT), bem como material adsorvido e eluído com o tampão de equilíbrio com 300mM de imidazol (EL) foram coletados separadamente, reunidos e concentrados. Tais amostras foram submetidas à SDS-PAGE a 12%, sendo o gel impregnado com prata. Raia MM – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura. As setas indicam proteínas correspondentes a 91, 87 e 79kDa. A ponta de seta indica uma banda equivalente a 91kDa.

Para redução da expressão basal em bactérias não expostas ao indutor, os meios de cultura foram suplementados com 1% de glicose anteriormente à adição de IPTG, e as culturas foram mantidas a 25°C durante o período de indução. Ao se submeter as proteínas somáticas solúveis, extraídas após rompimento celular, a reações de catálise do pNP- α -D-Man, a atividade enzimática foi significativamente reduzida na cultura estimulada na presença de glicose (Figura 10). Estes resultados conduziram ao descarte do uso da glicose para aprimorar as condições de expressão e identificação da presença da α -manosidase recombinante.

Figura 10 – O uso de glicose como redutor de expressão basal de proteínas recombinantes também reduziu a produção induzida por IPTG da α -manosidase recombinante, determinada pela atividade enzimática. Bactérias *E. coli* Rosetta transformadas com o pET15b-AMS foram cultivadas em caldo LB padrão (S/ Glicose) ou suplementado com 1% de glicose (glicose [1%]), a 37°C, sob agitação constante, até o crescimento equivalente a DO de 0,5 a 600nm. As bactérias foram induzidas a produzir a proteína recombinante com adição de IPTG ao meio, na concentração final de 1mM e cultivadas por 24 horas, a 25°C. Os sobrenadantes coletados após rompimento celular em aparelho ultrassônico e centrifugação foram submetidos à detecção da atividade enzimática, como descrito na legenda da figura 9. Asterisco indica que $p < 0,05$ em relação aos meios de cultura induzidos na presença de glicose.

4.3.3. Interferência da variação da densidade óptica na atividade enzimática e no perfil de expressão.

Nos ensaios posteriores para padronização das condições de expressão, foi realizada a indução com IPTG em culturas de bactérias crescidas a 37°C que atingiram DO a 600nm de 0,5, 0,7, 0,9 ou 1,2. As proteínas somáticas dessas bactérias foram submetidas à detecção da atividade enzimática, sendo observado um aumento significativo da atividade em todas as DOs testadas em comparação a bactérias não induzidas (controle), de modo que a DO de 0,7 a 600nm mostrou-se a melhor condição para se induzir a proteína com atividade enzimática (Figura 11).

Figura 11 – Cultura de bactérias transformadas com pET15b-AMS e induzidas com IPTG quando DO a 600nm atingiu 0,7 apresentou a melhor condição para expressão da proteína recombinante com atividade enzimática. Bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas em caldo LB, a 37°C, sob agitação constante, até atingir a DO a 600nm de 0,5, 0,7, 0,9 ou 1,2. A indução foi realizada posteriormente com IPTG a 1mM, nas temperatura de 25°C, por toda a noite, sob agitação constante. A cultura de bactérias sem a adição de IPTG (S/ ind.) cresceu até a DO a 600nm de 1,2, a 37°C, sendo cultivada a seguir a 25°C, por toda a noite, sob agitação constante. Os sobrenadantes obtidos após rompimento celular em aparelho ultrassônico e centrifugação foram submetidos à detecção da atividade enzimática, como descrito na legenda da figura 9. Asterisco indica que $p < 0,05$ em relação ao controle (S/ ind) enquanto cerquilha indica que $p < 0,05$ em relação a todas as amostras.

As culturas induzidas em D.O a 600nm de 0,7, que apresentaram elevada atividade enzimática (Figura 11), foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP juntamente com o controle, cultivados nas mesmas condições sem adição do indutor. O perfil de proteínas eluídas apresentou um menor número de bandas e com marcações evidenciadas na faixa de 60 kDa (Figura 12, raia EL, Induzidas) quando comparadas ao controle (Figura 12, raia EL, Não induzidas), que além de um número maior de marcações, apresenta bandas situadas acima desta faixas.

Figura 12 - Análise eletroforética de amostras da obtidas de bactérias *E. coli* Rosetta transformadas com pET15b-AMS induzidas em culturas com D.O a 600nm de 0,7 submetidas à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado. Bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas a 37°C até a DO a 600nm de 0,7 e induzidas com 1mM de IPTG por toda a noite, a 25°C (**Induzidas**). Cultura sem adição de IPTG foi usada como controle (**Não induzidas**). Amostras contendo proteínas somáticas obtidas por rompimento celular em aparelho ultrassônico e centrifugação (**AS**) foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado. O efluente contendo o material não adsorvido à coluna (**FT**) e o eluato do material adsorvido à coluna e eluído com tampão equilíbrio contendo imidazol a 300mM (**EL**) foram coletados, reunidos, dialisados, concentrados e submetidos à SDS-PAGE a 10%. O gel foi corado com azul de Coomassie. Raia MM – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura.

4.3.4. Influência do tempo de indução com IPTG na atividade enzimática e no perfil de expressão proteico

A fim de se determinar o melhor tempo de indução das proteínas recombinantes com maior atividade, realizou-se ensaios de atividade enzimáticas em amostras contendo proteínas somáticas obtidas de culturas de bactérias transformadas com pET15b-AMS, crescidas até atingir a DO a 600nm de 0,7, a 37°C, e induzidas por 3,5, 6,5, 24, 30 e 48 horas com IPTG, à temperatura ambiente. Houve detecção de atividade enzimática a partir de 24 horas de indução das culturas, mantendo-se positiva nos tempos de 30 e 48 horas. A atividade foi significativamente maior em culturas com 30 horas de indução quando comparado aos demais tempos de indução e à cultura não induzida (Figura 13).

Figura 13 - Influência do tempo de indução com IPTG em culturas de bactérias *E. coli* transformadas pET15b-AMS na atividade enzimática de amostras de proteínas somáticas obtidas dessas culturas. Bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas em caldo LB, a 37°C, até atingir a DO a 600nm de 0,7. Após indução com IPTG, na concentração final de 1mM, as culturas foram mantidas em diferentes intervalos de tempo, à temperatura ambiente. Após indução, as culturas foram lisadas em aparelho ultrassônico, centrifugadas e os sobrenadantes contendo proteínas somáticas foram submetidas ao teste de detecção da atividade enzimática, como descrito na legenda da figura 9. Asterisco indica $p < 0,05$ em relação ao controle sem indução (SI) enquanto cerquilha indica $p < 0,05$ em relação às demais as amostras.

As amostras induzidas à temperatura ambiente por 30 horas foram purificadas em cromatografia de afinidade, utilizando coluna HisTrap HP, juntamente com bactérias não transformadas submetidas à indução com IPTG nas mesmas condições. A análise eletroforética das amostras eluídas evidenciou que há um contraste entre os perfis de expressão obtidos nos eluatos, principalmente em relação a amostra proveniente de bactérias transformadas e induzidas, na qual o número de proteínas que interagiram com a coluna de níquel é reduzido, apresentando bandas destacadas entre as faixas de 116 e 66,2 kDa (Figura 14, raia Ind, EL). Portanto, a indução realizada sob as condições de DO a 600nm de 0,7, à temperatura ambiente, por 30 horas, demonstram menor quantidade de contaminantes proteicos que interagem com a matriz da coluna HisTrap, viabilizando o isolamento mais eficiente da proteína recombinante.

Figura 14 – Análise eletroforética das proteínas somáticas obtidas de culturas de bactérias *E. coli* Rosetta transformadas com pET15b-AMS e induzidas com IPTG, por 30 horas. Amostra de proteínas de bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas a 37°C até a DO a 600nm de 0,7 e induzidas com 1mM de IPTG, por 30 horas, a 25°C (**Ind**). Culturas de bactérias sem indução com IPTG (**NI**) foi usada como controle. Amostras contendo proteínas somáticas obtidas por rompimento celular em aparelho ultrassônico e centrifugação foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado. O efluente contendo o material não adsorvido à coluna (**FT**) e o material adsorvido à coluna e eluído com tampão equilíbrio contendo imidazol a 300mM (**EL**) foram coletados, reunidos, dialisados, concentrados e submetidos à SDS-PAGE a 10%. O gel foi corado com azul de Coomassie. Raia MM – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura.

4.3.5. Refinamento da purificação por meio da variação da concentração de imidazol no processo de eluição da proteína recombinante adsorvida à coluna com níquel imobilizado.

Uma vez que as condições de expressão foram estabelecidas, conduziram-se testes para aprimorar a purificação da proteína recombinante em colunas HisTrap. Para tanto, variou-se a quantidade de imidazol no tampão de equilíbrio, nas concentrações finais de 0, 10 ou 20mM, a fim de determinar a restrição da interação de proteínas inespecíficas com a coluna HisTrap. O material adsorvido à coluna HisTrap equilibrada com tampão desprovido de imidazol, quando eluído e testado, proporcionou uma atividade enzimática ligeiramente maior (5,74U/min/mL) que os materiais obtidos de cromatografia com colunas equilibradas com tampão contendo imidazol a 10 e 20mM (5,49 e 5,5U/min/mL, respectivamente). No entanto, quando analisadas por SDS-PAGE, como esperado, a ausência de imidazol aumentou a interação de um número elevado de proteínas inespecíficas com a matriz da coluna (Figura 15, raia 0). Tal fato, inviabilizou a escolha dessa condição cromatográfica. Entre as proteínas eluídas de corridas cromatográficas nas

quais a coluna foi equilibrada com 10 ou 20mM de imidazol, não foram identificadas diferenças significativas nos padrões das proteínas (Figura 15, raias 10 e 20). Assim, passou-se a isolar a α -manosidase recombinante em cromatografia de afinidade em coluna HisTrap equilibrada com tampão contendo 10mM de imidazol.

Figura 15 - Análise do perfil de proteínas de lisados de bactérias induzidas à expressão de α -manosidase recombinante que foram adsorvidas à coluna HisTrap equilibrada com diferentes concentrações de imidazol. Amostras contendo proteínas de bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta transformadas com pET15b-AMS foram cultivadas e induzidas como descrito na legenda da figura 14. Tais amostras foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado, utilizando tampão equilíbrio com três diferentes concentrações de imidazol (0, 10 e 20mM). O efluente contendo o material não adsorvido à coluna (FT) e os eluatos dos materiais adsorvidos à coluna e eluídos com tampão equilíbrio contendo imidazol a 300mM (**Eluatos de coluna equilibrada com imidazol a 0, 10 ou 20 mM**) foram coletados, reunidos, concentrados e submetidas à SDS-PAGE a 10%. O gel foi corado com azul de Coomassie. Raia MM – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura.

4.3.6. Cromatografia de troca iônica

A fim de promover um melhor isolamento da α -manosidase recombinante, o material adsorvido à coluna HisTrap foram eluídas e submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q XL. A eluição foi realizada por um gradiente crescente e constante de NaCl até 1M. Identificou-se atividade enzimática no material em três faixas de eluição com NaCl, 0,1 a 0,2M, 0,2 a 0,3M e 0,3 e 0,4M, de 1,44, 1,41 e 0,7 x

10^{-3} U/min/mL, respectivamente. A análise eletroforética desses três eluatos revelaram uma banda de aproximadamente 123kDa (Figura 16, raia 5 e 6), massa molecular próxima daquela esperada para α -manosidase recombinante, qual seja, 124,2kDa. Coincidentemente, os eluatos com maior atividade enzimática apresenta banda de 123kDa mais intensas, possivelmente, com maior concentração da proteína, quando comparado com o eluato com menor atividade enzimática.

Figura 16 - Análise eletroforética de proteínas recombinante eluídas após cromatografia de troca aniônica de amostra purificada em coluna HisTrap. Material purificado em coluna HisTrap equilibrada com 10mM de imidazol (**His-Tap**), como descrito na legenda da figura 15, foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q XL. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl a 25mM, pH 9,0, e a eluição realizada por um gradiente crescente e contínuo na concentração de NaCl até 1M. Efluente contendo material não adsorvido (**FT**) e materiais adsorvidos à coluna que foram eluídos com NaCl, faixa de 0,1M, foram coletados separadamente, dialisados, concentrados e submetidos à detecção da atividade enzimática, como descrito na legenda da figura 9. A seta indica a banda majoritária correspondente a 123kDa. Raia MM – Migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (em kDa) cujos valores estão mostrados na figura.

4.3.7. Cromatografia por filtração em gel

Uma vez isolada a proteína recombinante no material eluído com 10 a 20% de NaCl da coluna de troca iônica, submeteu-se tal material para determinação da massa molecular aparente da α -manosidase à cromatografia por filtração em gel em coluna Superdex 200. Uma atividade enzimática de $0,57 \times 10^{-3}$ U/min/mL foi detectada no efluente referente ao maior pico de absorbância a 280nm, em 11,81mL. (Figura 17). Esse volume

corresponde a molécula eluída com massa molecular aparente de 128kDa, baseado na equação da reta de regressão linear determinada a partir dos volumes de eluições de proteínas com massas conhecidas na coluna utilizada, Superdex 200. A calibração da coluna foi realizada com as proteínas ferritina, catalase, aldolase e BSA, cujos volumes de eluição foram plotados em curva padrão (massa molecular vs. volume de eluição), para obtenção da equação da reta, $y = -5,777 \cdot x + 41,31$, e coeficiente de determinação de 0,98. A massa molecular aparente da proteína recombinante isolada nesta cromatografia, baseado no volume de eluição da atividade enzimática, é muito próxima da massa predita de 124,2kDa para α -manosidase vacuolar de *P. brasiliensis*.

Figura 17 - Filtração em gel em coluna Superdex 200 10/300 GL do material com atividade α -manosidase obtido de *E. coli* da Rosetta transformadas com pET15b-AMS e induzidas passado por cromatografias de afinidade em níquel imobilizado e de troca aniônica. A coluna equilibrada e a corrida realizada com Tris-HCl a 50mM, pH 9. A cromatografia foi monitorada pela absorbância a 280nm. Aliquotas de 1,5mL foram coletadas e submetidas à detecção da atividade como descrito na legenda da figura 8. As hachuras indicam as frações com atividade enzimática. A coluna foi previamente calibrada com marcadores com massas moleculares conhecidas: Fer – ferritina (440kDa), Cat – catalase (232kDa), Ald - aldolase (158kDa); BSA – albumina sérica bovina (67kDa), cujos volumes de eluição estão assinalados na figura. O volume morto da coluna (Void) foi obtido pela cromatografia da tiroglobulina (669kDa) enquanto o volume total (Vt), do imidazol (68,08Da).

Com o estabelecimento das condições de expressão e purificação, alíquotas foram coletadas em cada passo de isolamento e submetidas à análise eletroforética (Figura 18). Nota-se que um claro processo de isolamento de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 116kDa, coincidente com o aumento da atividade enzimática. A atividade enzimática da amostra contendo proteínas solúveis de bactérias transformadas foi de $0,81 \times 10^{-3} \text{U/min/mL}$, no material adsorvido e eluído da coluna HisTrap de $0,88 \times$

10^{-3} U/min/mL, enquanto na amostra eluída com 0,1 a 0,2M de NaCl do material adsorvido à coluna HiTrap Q de $1,4 \times 10^{-3}$ U/min/mL.

Figura 18 - Análise eletroforética de amostras com atividade obtidas durante o processo de isolamento da enzima recombinante. Os sobrenadantes foram coletados após rompimento celular em aparelho ultrassônico e centrifugação (**raia 2**) e submetidos à cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado (HisTrap) e subsequente cromatografia de troca aniônica (coluna HiTrap Q). As amostras com eluídas em cada etapa foram submetidas à detecção da atividade enzimática. As amostras com maior atividade α -manosidase recombinante eluída da coluna HisTrap (**raia 3**) e HiTrap Q (**raia 4**) for submetidas à SDS-PAGE a 10%. A migração eletroforética das proteínas com massa molecular conhecidas (**raia 1**) cujos valores (em kDa) estão mostrados na figura. A seta indica a banda sugerida como correspondente à α -manosidase recombinante.

4.4. Caracterização enzimática

4.4.1. Determinação do pH ótimo para atividade da α -manosidase recombinante

Os ensaios para caracterização do pH ótimo para hidrólise do substrato *p*NP- α -D-Man pela proteína recombinante mostraram que em pH de 3 a 4,5, a atividade relativa foi mantida e permaneceu em cerca de 30 a 37%, elevando-se consideravelmente a partir do pH 5,0 e atingindo os maiores valores entre 5,5 e 6,0. Em pH 6,5 a atividade voltou a decair, porém, se manteve na faixa de 70 a 80% em pH neutro e alcalinos (Figura 20).

Figura 19 - Efeito do pH na atividade enzimática da α -manosidase recombinante. Amostra de α -manosidase recombinante obtida pelo processo de isolamento cromatográfico foi quantificada em pelo método de *Bradford* e utilizada para caracterização enzimática. Diferentes meios reacionais foram confeccionados, contendo 1,7 μ g da α -manosidase recombinante, variando-se o pH dos tampões citrato a 0,1M, de 3,0 a 6,5, e do tampão Tris-HCl a 0,1M, de 7,0 a 8,0. Após adição do substrato *p*NP- α -D-Man a 3mM, totalizando 43 μ L em volume, as amostras foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, e as reações interrompidas pela adição de 67 μ L de tampão borato a 0,2M, pH 9,8. A absorbância foi lida a 405nm e utilizada para o cálculo da Unidade de atividade (U).

4.4.2. Determinação da temperatura ótima para atividade da α -manosidase recombinante

Posteriormente, ensaios foram realizados para caracterização da temperatura ótima para catálise do substrato *p*NP- α -D-Man pela proteína recombinante. Para isso, meios reacionais foram mantidos por 1 hora em diferentes temperaturas, as quais variaram de 25 a 70°C. Os resultados obtidos evidenciaram que nas temperaturas de 25 e 37°C, a atividade manteve-se aproximadamente em 50%, elevando-se para 100% a 45°C (Figura 20). A partir de 50°C, a atividade reduziu para 90% e decaiu significativamente para as faixas de 50 a 60% nas temperaturas de 55 e 60°C, sendo reduzida a 30% nas temperaturas mais elevadas (Figura 20).

Figura 20 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da α -manosidase recombinante. A α -manosidase recombinante foi isolada e quantificada como descrito anteriormente. Meios reacionais foram confeccionados, contendo 1,7 μ g da proteína recombinante, 13 μ L de tampão citrato a 0,1M, pH 6,0 e *p*NP- α -D-Man a 3mM, totalizando 43 μ L em volume final. As amostras foram incubadas por 1 hora em diferentes temperaturas, variando-se de 25 a 70°C e a catálise interrompida pela adição de 67 μ L de tampão borato a 0,2M, pH 9,8. A leitura da absorbância foi realizada a 405nm e utilizada para o cálculo da Unidade de atividade (U).

4.4.3. Determinação da estabilidade térmica para atividade da α -manosidase recombinante

Para os testes de termoestabilidade, alíquotas contendo 0,14 μ g/ μ L da proteína recombinante foram incubadas em diferentes intervalos de tempo, na temperatura ótima de 45°C, previamente à adição aos meios reacionais contendo 3mM de *p*NP- α -D-Man. As amostras foram submetidas à catálise na mesma temperatura por 1 hora e a atividade residual mensurada pelo cálculo da unidade de atividade (U) a partir da leitura da absorbância a 405nm. Após incubação, a α -manosidase recombinante apresentou elevadas atividades residuais relativas em todos os intervalos testados, mantendo-se 98% até 10 minutos após o aquecimento, reduzindo para 94% após 15 minutos, e 90% após 30 minutos (Figura 21).

Figura 21 - Termostabilidade da α -manosidase recombinante na temperatura de 45°C. A α -manosidase recombinante foi isolada e quantificada como descrito anteriormente. Inicialmente, a proteína recombinante foi incubada em diferentes intervalos de tempo na temperatura de 45°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao teste da atividade residual em meios reacionais compostos por 0,14 μ g da proteína α -manosidase, 13 μ L de tampão citrato a 0,1M, pH 6,0 e 10 μ L *p*NP- α -D-Man a 10mM, totalizando um volume final de 43 μ L. A catálise foi mantida por 1 hora na temperatura ótima de 45°C e interrompida pela adição de 67 μ L de tampão borato a 0,2M, pH 9,8. A leitura da absorbância foi realizada a 405nm e utilizada para o cálculo da Unidade de atividade (U).

4.4.4. Ensaio cinético utilizando a concentração de 3mM

Para análise da cinética da reação em condições ótimas de pH e temperatura, meios reacionais contendo a proteína recombinante a 3,2 μ g/mL e *p*NP- α -D-Man a 3mM foram diluídos em tampão citrato a 0,1M, pH 6,0 e incubados a 45°C em diferentes intervalos de tempo. Os resultados obtidos mostram que a atividade enzimática relativa, a qual apresenta-se em 75% nos primeiro 5 minutos de reação, eleva-se quase linearmente, em cerca de 5% nos intervalos iniciais de 5 a 20 minutos, e mais 5% ao atingir 40 minutos de reação (Figura 22A). Após um curto período estável no intervalo entre 40 e 60 minutos, o aumento volta a ser constante numa taxa de aproximadamente 5% a cada 10 minutos. Apesar do aumento da atividade enzimática relativa, pode-se observar que a taxa de reação reduz em função do tempo de forma significativa a partir dos primeiros 5 minutos, atingindo valores que se aproximam a zero após 60 minutos de catálise (Figura 22B).

Figura 22 - Ensaio cinético utilizando *p*NP- α -D-Man a 3mM, realizado em diferentes intervalos de catálise. A α -manosidase recombinante foi isolada e quantificada como descrito anteriormente. A catálise foi realizada variando-se o tempo de incubação dos meios reacionais, confeccionados como apresentado na legenda da figura 21, na temperatura de 45°C, de 5 a 90 minutos. A catálise foi interrompida pela adição de 67μL de tampão borato a 0,2M, pH 9,8. A leitura da absorbância foi realizada a 405nm e utilizada para o cálculo da Unidade de atividade (U).

4.4.5. Interferência de agente quelante na atividade enzimática

Para análise da necessidade de íons divalentes para a atividade da enzima, adicionou-se aos meios reacionais o quelante EDTA a 10mM juntamente com 0,14μg da proteína α -manosidase e *p*NP- α -D-Man a 3mM. As reações foram incubadas em duplicata em condições ótimas de pH e temperatura por 1 hora. Os resultados mostram que não houve interferência do EDTA na catálise quando comparado ao controle (Figura 23).

Figura 23 - Interferência do EDTA na atividade enzimática da α -manosidase. A α -manosidase recombinante foi isolada e quantificada como descrito anteriormente. A catálise foi realizada com a adição de EDTA a 10mM aos meios reacionais, confeccionados como descrito na legenda da figura 21, na temperatura de 45°C, por 1 hora. A leitura da absorbância foi realizada a 405nm e utilizada para o cálculo da Unidade de atividade (U).

4.4.6. Especificidade enzimática

A caracterização da especificidade enzimática da α -manosidase foi realizada por meio de TLC, utilizando-se as manobioses α 1-2, α 1-3 e α 1-6 como substratos para clivagem nos meios reacionais. Após diferentes intervalos de incubação, as reações foram corridas em cromatofolha de alumínio com camada de sílica gel G60, por capilaridade em solvente (N-butanol-ácido acético-água 2:1:1), e reveladas utilizando solução de metanol com adição de ácido sulfúrico a 3% (Figura 24A). Os índices de retenção referentes às reações nos diferentes períodos de incubação, tempo zero, 2 horas e por toda a noite, empregando o dissacarídeo α -1,6, foram equivalentes a 0,366, 0,358 e 0,366, respectivamente, e não corresponderam ao índice relativo a manose livre, cujo valor foi de 0,575 (Tabela 3A), além disso, também não diferiram dos valores obtidos nas reações controles (T0). As reações com manobioses α 1-2 e α 1-3 nos tempos de 16 horas (por toda a noite) não puderam ser analisadas porque a possível clivagem do substrato diminuiu a intensidade de marcação, o que foi visto parcialmente no tempo de 2 horas. Assim, novos ensaios foram realizados com uma quantidade maior dessas duas manobioses, 3mM, sendo as reações submetidas à incubação por toda a noite. Nesse novo experimento, as reações foram bem visíveis (Figura 24B). Os fatores de retenção obtidos após catálise por toda a noite, equivalentes a 0,433 para ambos os dissacarídeos (Tabela 3B), foram bastante

próximas à migração da D-manose, 0,45, diferindo significativamente quando comparados aos controles, realizados no tempo zero da reação, com índices correspondentes a 0,35. Portanto, a α -manosidase recombinante possui especificidade enzimática para as ligações glicosídicas α 1-2 e α 1-3, mas não α 1-6.

Figura 24 - α -Manosidase recombinante cliva manobioses α 1-2 e α 1-3, mas não manobiose α 1-6.

(A) TLC após catálise utilizando manobioses α 1-2, α 1-3 e α 1-6, como substratos, em diferentes intervalos de tempo. A α -manosidase recombinante foi isolada e quantificada como descrito anteriormente e submetida à catálise, sendo usados 28 μ L da proteína recombinante nos meios reacionais que eram compostos por tampão citrato a 0,1mM e dissacarídeos a 1mM. As reações foram bloqueadas imediatamente após montagem da reação (T0) ou incubadas por 2 horas (T2) e por toda a noite (ON). As reações foram bloqueadas em banho maria com água com ebulição e aplicadas em cromatofolha de TLC. A corrida foi realizada em cuba de vidro contendo como fase móvel N-butanol-ácido acético e água (2:1:1) até completa migração da fase móvel capilaridade. A placa foi seca, pulverizada com aerossol de uma solução de metanol e ácido sulfúrico a 3% e posteriormente incubada em estufa, a 80°C, por 16 horas.

(B) TLC após catálise utilizando os dissacarídeos α 1-2 e α 1-3 como substratos. Foi utilizada nessa reação a mesma amostra de α -manosidase recombinante, sendo adicionado 24 μ L de uma amostra da enzima nos meios reacionais compostos por tampão citrato a 0,1mM e dissacarídeos a 3mM. As reações foram

bloqueadas imediatamente após montagem da reação (T0) ou incubadas por toda a noite (ON). As reações foram bloqueadas e aplicadas na TLC como descrito em A. Dessa vez, a cromatofolha foi pulverizada com solução de orcinol a 0,89% metanol:ácido sulfúrico:água (15:2:1) e, posteriormente, incubada em estufa, a 80°C, por 16 horas.

Tabela 3 - Índices de retenção após cromatografia em camada delgada.

A			B		
Substrato e padrão (<i>spot</i>)	Tempo de reação (h)	Índice de retenção	Substrato e padrão (<i>spot</i>)	Tempo de reação (h)	Índice de retenção
Manose livre	—	0,575	Manose livre	—	0,45
6 α -manobiose	0	0,368	2 α -manobiose	2	0,35
	2	0,358		16	0,43
	16	0,366	3 α -manobiose	2	0,35
				16	0,43

4.5. Fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos da linhagem J774 é aumentada na presença de α -manosidase

Para verificar a interferência da α -manosidase na atividade fagocítica, macrófagos da linhagem J774 cultivados em lamínulas, foram previamente tratados com diferentes concentrações da proteína recombinante por uma hora e, posteriormente, cocultivados com células fúngicas de Pb18 (3×10^5 /poço), pelo período de quatro horas, a 37°C, em estufa de CO₂ a 5%. Como visto na figura 25, os estímulos realizados com a proteína recombinante induziram a um aumento significativo da fagocitose em relação ao controle tratado com PBS. A adição da α -manosidase recombinante nas concentrações de 0,85 μ g/mL e 3,4 μ g/mL proporcionou taxas fagocíticas duas vezes maiores do que a dos estímulos com as mesmas concentrações da proteína controle, BSA – de 20 para 40% e de 25 para 55%, respectivamente. Dessa forma, nas respectivas concentrações testadas, houve interferência estatisticamente significativa da α -manosidase no processo de fagocitose do fungo *P. brasiliensis* por macrófagos em cultura.

Em relação à atividade microbicida, os resultados são preliminares e não mostraram diferença significativa entre macrófagos tratados com BSA e α -manosidase recombinante, sugerindo que o aumento da fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos

propiciado pelo tratamento com α -manosidase não se converteu em aumento da destruição das leveduras.

Figura 25 - Interferência a α -manosidase recombinante na atividade fagocítica de macrófagos. Macrófagos da linhagem J774 aderidos em laminulas acomodadas em placas de 24 poços, foram previamente tratados por 1 hora com a proteína α -manosidase recombinante, nas concentrações de 0,85 µg/mL e 3,4 µg/mL, a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Como controle, as células foram tratadas com PBS e BSA nas mesmas proporções. Posteriormente, os macrófagos foram cocultivados com Pb18 (3×10^5 células/poço) em meio RPMI completo, pelo período de 4 horas a 37°C. Após cocultivo, as lâminas foram lavadas e fixadas com formaldeído a 3%, por 1 hora, com subsequente coloração com Giemsa. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, sendo realizadas contagens da quantidade de células fúngicas fagocitadas a cada 100 células/campo em 3 campos distintos. Asterisco indica que $p < 0,05$ em relação aos controles tratados com PBS e BSA.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, inicialmente, realizou-se o isolamento da proteína de uma α -manosidase de *P. brasiliensis*, previamente identificada no sobrenadante de cultura de leveduras de Pb18. A predição *in silico* baseado em dados de estrutura primária revelou que essa α -manosidase de 1.097 aminoácidos tem massa de 124.270Da e ponto isoelétrico (pI) de 6,36, sendo essa informação sobre pI usada para nortear os parâmetros para o isolamento por cromatografia de troca aniônica. Foi usada uma coluna HiTrap Q XL e

após algumas corridas cromatográficas com tampão de equilíbrio e de corrida com pHs diversos (dados não mostrados), determinou-se o pH 9 como o mais adequado para ligação da proteína à coluna e sua eluição em um gradiente crescente de NaCl, de 0 a 1 M. A capacidade de catálise do substrato foi mantida nos eluatos coletados entre 0,2 e 0,5M de NaCl, atingindo maior valor na amostra coletada a 0,4M. Nessas frações, foram detectadas proteínas proeminentes de 85 e 90kDa, porém, em concentrações abaixo do limiar para dosagem. Esses resultados levaram a sugestão de que a proteína obtida do sobrenadante estava predominantemente clivada, haja vista que se esperava banda proteica maior que 110kDa, restando, provavelmente, quantidade indetectável da proteína na SDS-PAGE. Esses nossos achados estão de acordo com estudos que mostram que outras α -manosidases de massa molecular acima de 110kDa aparecem clivadas quando isoladas (BICHOFF; KORNEFELD 1983; MIERENDORF *et al.*, 1983; YOSHIHISA *et al.*, 1988). Os problemas com o rendimento das preparações associados à detecção da proteína provavelmente clivada fez com que se buscasse imediatamente a segunda parte do estudo, qual seja, a produção da manosidase recombinante.

A inserção do gene *AMS* de *P. brasiliensis* em plasmídeo de clonagem pCR2.1-TOPO, já nos primeiros ensaios, foi bem sucedida (dados não mostrados). No entanto, as inúmeras tentativas de subclonagem no vetor de expressão pET28 foram infrutíferas, gerando recombinação do plasmídeo em duas ocasiões, tornando o gene inutilizável (dados não mostrados). Esses problemas fizeram com que se buscasse a síntese do gene alvo em um vetor plasmidial, no caso, o pET15b. Bactérias *E. coli* da linhagem *Rosetta* foram transformadas para indução da expressão da molécula em estudo e, inicialmente, a análise eletroforética em SDS-PAGE do material produzido foi dificultada pela baixa quantidade expressa e devido a ausência de detecção da atividade enzimática. Foi interessante notar que a banda majoritária de aproximadamente 70kDa foi obtida de bactérias transformadas com pET15b-*AMS* e induzidas com IPTG, o que não corresponde a massa molecular predita da α -manosidase. Análises pela técnica de *Western blotting*, usando-se anticorpos anti-tiqueta de histidina, revelaram bandas tênues com menor migração correspondentes a massas de 79 e 89kDa nas proteínas de bactérias transformadas com pET15b-*AMS* e induzidas com IPTG, mas não em bactérias não induzidas. Proteínas de 45kDa e do *front* da corrida eletroforética, embora tenha tido forte marcação, estava presente também nas bactérias transformadas que não foram induzidas, sugerindo se tratar de proteína bacteriana. Em um *Western blotting* com proteínas separadas por eletroforese com um gel de gradiente que permite uma melhor resolução de

proteínas de baixa massa molecular, foi possível observar proteína de 21kDa, principalmente, no material obtido de bactérias transformadas e induzidas. Esses resultados sugerem que há uma clivagem da proteína recombinante em fragmentos menores nos quais as etiquetas de histidinas estão presentes, enquanto o fragmento mais proeminente, de 70kDa, provavelmente, perdeu essa etiqueta após clivagem. Dois fatos chamaram a atenção, primeiro que existe uma possível clivagem similarmente ao que ocorre na proteína obtida de sobrenadante de cultura e, segundo, que, provavelmente, essa clivagem poderia interferir na atividade enzimática.

Ensaio de padronização das condições de expressão foram executados, nos quais a temperatura de 37°C mostrou-se desfavorável para a produção de α -manosidase de *P. brasiliensis* recombinante enzimaticamente ativa. Além disso, determinou-se que as melhores condições de indução da proteína recombinante com atividade enzimática nas culturas correspondem à temperatura ambiente (25°C) e à DO a 600 de 0,7. Curiosamente, o condicionamento das culturas em condições controladas de temperatura, com a manutenção constante de 25°C, durante o período de indução, não foi benéfico para obtenção das moléculas enzimaticamente ativas (dados não mostrados), sendo possível que as oscilações que decorrem em temperatura ambiente proporcionem bons resultados na produção de proteína recombinante com atividade enzimática. Consequentemente, a indução foi padronizada, sendo desenvolvida em culturas que atingiram, à 37°C, a DO a 600 de 0,7, sendo imediatamente colocadas à temperatura ambiente (25°C) e induzidas com IPTG 1mM, por 30 horas.

Uma vez determinadas as condições de expressão, experimentos para padronização da purificação da α -manosidase recombinante foram iniciados utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel, variando-se as quantidades de imidazol em tampão de equilíbrio a fim de restringir a interação de moléculas inespecíficas, as quais não diferiram na quantidade e proteínas eluídas (SCHÄFER *et al.*, 2002). O processo de isolamento foi dificultado pelas baixas concentrações da molécula e consequente falta de clareza na identificação dos perfis expressos pelos clones induzidos e pelos clones não induzidos, utilizados como controles, assim como bactérias não transformadas com o vetor plasmidial. Posteriormente, volumes maiores foram submetidos à coluna HisTrap. As proteínas adsorvidas à coluna e eluídas com imidazol a 300mM renderam fração com detecção de atividade enzimática, sendo, subsequentemente, submetida à cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q XL (GE-Healthcare). Assim como observado anteriormente para atividade enzimática das proteínas obtidas de sobrenadante de cultura

de *P. brasiliensis* e submetidas a esse tipo de cromatografia, a proteína recombinante com atividade enzimática foi desadsorvida da coluna com tampão de equilíbrio contendo NaCl na faixa 0,2 a 0,5M. Por fim, os eluatos analisados em catálise e SDS-PAGE apresentaram uma proteína correspondente a massa molecular próxima ao do marcador de 116kDa, a qual a concentração, visualizada pelas espessuras das bandas, se correlacionou proporcionalmente ao rastreamento da atividade enzimática nas faixas de 0,2 a 0,4M de NaCl. Curiosamente não observamos duas bandas distintas equivalentes a 85-90 kDa, mas uma única banda na faixa de 116kDa, sugerindo que esta seja a α -manosidase recombinante. O fato da análise da SDS-PAGE não permitir uma definição tão clara da massa molecular da proteína, haja vista que complexos proteicos se dissociam (LAEMMLI, 1970), levou a tentativa de determinação da massa da α -manosidase recombinante em condições não dissociantes. Assim, amostras obtidas de cromatografias subsequentes em colunas de níquel imobilizado e de troca aniônica, nas quais houve identificação de atividade enzimática, foram submetidas a cromatografia por filtração em gel em coluna Superdex 200. A atividade enzimática de $0,57 \times 10^{-3}$ U/min/mL foi detectada em um pico com aproximadamente 3mL, cuja absorbância a 280nm máxima foi de 91mAU no volume de 11,81mL. Quando esse volume foi aplicado à equação de regressão linear, construída com os volumes de eluições de proteínas com massas moleculares conhecidas, determinou-se que a α -manosidase tem massa molecular aparente de 128kDa, muito próxima a massa molecular predita de 124kDa.

Notavelmente, a α -manosidase de *P. brasiliensis* que é alvo deste estudo compartilha similaridades sequências com α -manosidasas pertencentes à família 38 das glicosil hidrolases como a Ams1p vacuolar de *S. cerevisiae*, com a qual também apresenta semelhança estrutural, tendo proporcionado um arcabouço para a construção hipotética da estrutura terciária da proteína em estudo (CORRÊA, 2017). Vale salientar que Ams1p de *S. cerevisiae* foi previamente isolada também utilizando cromatografia de troca iônica, de modo que a atividade enzimática foi similarmente eluída no decorrer do gradiente de NaCl, dando indícios de diferentes isoformas eluída em momentos distintos no curso na purificação, sendo detectada como um hetero-oligomero de 560kDa, que era constituído de três polipeptídeos, possivelmente, um molécula de 107kDa, seis de 73kDa e seis de 31kDa (YOSHIHISA *et al.*, 1988). Porém, posteriormente, foi descrito que essa proteína presente em frações de alta densidade em gradientes de glicerol apresentava correspondência com uma banda de 122kDa, sendo relacionada a uma forma oligomérica encontrada tanto no citosol quanto em vesículas subvacuolares não fusionadas. Esses resultados permitiram

sugerir que ela se mantinha em estado oligomérico durante a importação e que, provavelmente, pode formar um oligômero com 4 a 6 espécies (HUTCHINS E KLIIONDKY, 2001). Bischoff e Kornfeld (1986) detectaram em células de fígado de rato uma α -manosidase, localizada no RE, derivada da proteólise de uma molécula insolúvel ancorada à membrana da organela. Homóloga a glicosil hidrolase vacuolar de *S. cerevisiae* Ams1p (BICHOFF E KORNEFELD 1983), obtém-se uma isoforma solúvel de massa molecular de 350kDa, após clivagem composta por subunidades de 107kDa. Outro exemplo de manosidase composta por subunidades distintas foi identificado em *Dictyostelium discoideum*, no qual uma α -manosidase lisossômica de massa molecular correspondente a 140kDa, atua como precursor enzimaticamente ativo, responsável por 20% da atividade extracelular e origina após proteólise duas subunidades de 58 e 60kDa que compõem um oligômero de 120kDa (MIERENDORF *et al.*, 1983). Apesar da falta de clareza na visualização em SDS-PAGE das amostras eluídas durante os processos cromatográficos para a purificação da proteína α -manosidase recombinante, o fato de moléculas agregadas com massas moleculares distintas serem eluídas após a cromatografia de exclusão e também devido a eluição gradual da atividade enzimática durante a cromatografia de troca aniônica, sugere-se uma possível composição oligomérica de isoformas distintas e com capacidade hidrolítica, presumidamente pela ação de clivagem autóloga ou realizada por proteases.

Após o isolamento da proteína recombinante pelos processos cromatográficos em coluna de níquel e de troca iônica, os eluatos foram testados quanto às características da atividade enzimática. Para a catálise do substrato cromogênico pNP- α -D-Man, a proteína α -manosidase recombinante demonstrou melhor performance em condições ótimas de pH 6,0 e temperatura de 45°C, coincidindo com os resultados apresentados pela proteína presente no sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis*, com catálise ótima em pH 5,6 e temperatura de 45-50°C (CORRÊA, 2017). Porém, posteriormente a clonagem, a proteína demonstrou-se mais estável quando incubada em temperatura ótima previamente a realização da catálise, com baixa redução da atividade, mantendo 90% de eficiência mesmo após 30 minutos de incubação, diferentemente do que ocorreu com a proteína nativa, cuja atividade é perdida após o condicionamento pelo mesmo intervalo de tempo em temperatura ótima (CORRÊA, 2017). Os dados obtidos em ensaios cinéticos mostram o aumento linear da atividade mesmo após 90 minutos de reação de catálise do substrato pNP- α -D-Man a 3mM, porém com uma diminuição na taxa de reação, em cerca de 70% após 20 minutos de incubação. Não houve interferência do EDTA, agente quelante de

cátions divalentes, sugerindo que esses íons são dispensáveis na reação catalítica. De um modo semelhante, estudos realizados para a caracterização da proteína Ams1p de *S. cerevisiae* mostraram que a atividade enzimática é mantida na presença de EDTA (OPHEIM *et cols.* 1978) e que cátions divalentes como Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , não interferem na atividade, sendo fortemente inibida pelo acréscimo do íon Cu^{2+} (YOSHIHISA *et cols.*, 1988). Outra constatação interessante foi feita quando glicose foi adicionada ao meio de cultura na concentração final de 1%, gerando uma diminuição da atividade catalítica da α -manosidase, o que é corroborado pelos resultados obtidos por Opheim *et cols.* (1978), nos quais o acréscimo de 2% de glicose em meio de cultura durante e após crescimento exponencial, suprimiu a atividade da Ams1p de *S. cerevisiae*. Outras proteínas também classificadas dentro da família 38 de glicosil hidrolases, apresentaram resultados semelhantes em relação à clivagem do substrato pNP- α -D-Man, como a α -manosidase localizada no complexo de Golgi, descrita por Dewald e Touster (1973), dentre as hidrolases presentes nas células de fígado de rato envolvidas no metabolismo de glicoproteínas, a qual também foi medianamente estável quando aquecida a 55°C, mantendo 50% da atividade após 30 minutos de incubação, não sendo atividade catalítica afetada por EDTA. Bichoff e Kornfeld (1983) detectaram também em células de fígado de rato uma α -manosidase localizada no RE, a qual juntamente com α -manosidase de *P. brasiliensis*, compartilha homologia com a glicosil hidrolase vacuolar de *S. cerevisiae*. Essa α -manosidase de RE de fígado de rato participa do processo de N-glicosilação, apresentando pH ótimo de 6,5. Estudos posteriores detectaram uma isoforma solúvel que fora relatada na membrana do ER de células de fígado de rato, a qual deriva da proteólise da molécula descrita anteriormente e cujo pH ótimo variou-se entre 6,3 a 6,8 em meios reacionais compostos com o substrato pNP- α -D-Man (BICHOFF E KORNEFELD, 1986). Resultados similares ao presente estudo foram obtidos para a α -manosidase secretada pelo fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, que também realiza a clivagem de ligações glicosídicas α -1,2 e α -1,3, além de α -1,6, porém, em menores taxas, apresentando pH 6,5 como ótimo para clivagem do substrato pNP- α -D-Man (ENEYSKAYA *et al.*, 1998).

Parte das α -manosidases identificadas em fungos são classificadas como glicosil hidrolases de classe I (família 47), entre as quais pode-se destacar as hidrolases descritas no gênero *Aspergillus* em diferentes espécies que apresentam pH ótimos ácidos, como exemplo α -manosidase de *A. satoii* que apresenta pH 5,0 como ótimo e em *A. niger*, em que duas α -manosidases distintas foram identificadas, a primeira realiza a clivagem de manobioses α -1,2 em pH 4,8 (SWAMINATAM *et al.*, 1972) e a segunda a hidrólise de

ligações α -1,4 e 1,6 em pH 4,2 (MATTA *et al.*, 1972). Em *A. oryzae*, foi detectada uma proteína que efetua a clivagem de mananas e monoligômeros em pH ótimo de 4,9 a 5,3 (YAMAMOTO *et al.*, 1982) e posteriormente Akao *et cols* (2006) caracterizaram no mesmo organismo uma α -1,2-manosidase de classe I distinta, codificada pelo gene *fmanIB*, presente em vesículas intracelulares, cujas condições ótimas foram determinadas em pH 5,5 e temperatura de 45°C. No fungo *Penicillium citrinum* duas isoenzimas α -manosidasas com pesos moleculares correspondentes a 53 e 54kDa foram identificadas, tendo pH 5,0 como ótimo (YOSHIDA *et al.*, 1993) e *a posteriori* o gene *msdS* codificantes de umas das α -1,2-manosidasas foi clonado, de modo que similarmente a proteína em estudo de *P. brasiliensis*, a manosidase recombinante de *P. citrinum* apresentou altas taxas de atividade enzimática na presença de EDTA (YOSHIDA E ICHISHIMA, 1995). Uma α -manosidase localizada na membrana e no espaço lumial do RE foi identificada no fungo dimórfico *Sporotrix schenckii*, a molécula teve sua atividade inibida na presença dos ions Zn^{2+} e Co^{3+} . (MORA-MONTES *et al.*, 2010). Em *Trichoderma reesei* também identifica-se uma manosidase de classe I, codificada pelo gene *mdsI*, a qual é secretada, e desempenha alta taxas de afinidade em pH 5,0, participante do processamento de N-glicanos (MARAS *et al.*, 2000). Tabas e Kornfeld (1979) identificaram no complexo de Golgi de células de fígado de rato, uma α -manosidase envolvida no processamento de oligossacarídeos ligados a asparagina, com pH ótimo entre 6,0 e 6,5 e especificidade para ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,6. A enzima mostrou-se estável ao manter cerca de 58 a 71 % da atividade após aquecimento de 90 minutos a 50°C. Além disso, diferentemente da molécula em estudo, houve redução da catálise na presença do agente quelante EDTA.

Ao avaliar a interferência da proteína α -manosidase recombinante no processo fagocítico, através do cocultivo de leveduras do isolado Pb18 realizado com macrófagos da linhagem J774, verificou-se que nas concentrações de 0,85 e 3,4 μ g/mL, houve o aumento de aproximadamente 50% da taxa fagocítica em comparação aos controles cujos macrófagos não foram estimulados ou foram tratados com BSA. A elevação da taxa fagocítica pode ser benéfica ao fungo quando usada como mecanismo de evasão do sistema imunológico. No entanto, em algumas situações pode ser favorável ao hospedeiro, como mostrado por estudo prévio realizados do nosso grupo, onde macrófagos tratados *in vitro* com a proteína DLD de *P. brasiliensis* recombinante, também majoritária no sobrenadante de leveduras da linhagem Pb18, apresentaram um aumento das atividades fagocítica e microbicida, com aumento do número de células recuperadas após o período de internalização e redução das unidades formadoras de colônias (CFU) após 24 horas de

cocultivo quando comparado aos controles (LANDGRAF *et al.*, 2017). Dentre os exoantígenos liberados pelo fungo *P. brasiliensis* a proteína gp43, que é altamente manosilada e reconhecida como principal exoantígeno secretado pelo organismo em estudo, também interfere no processo fagocítico de macrófagos provenientes de camundongos resistentes ou suscetíveis a PCM. Porém, atua reduzindo o índice de fagocitose de células fúngicas aquecidas ou não, de modo dose dependente ao tratamento (POPI *et al.*, 2002). Na presença de gp43 também há a redução da produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos peritoneais e, portanto, propicia a sobrevivência do patógeno e, consequentemente, o desenvolvimento da PCM (POPI *et al.*, 2002). Não somente proteínas secretadas pelos patógenos podem influenciar no processo de defesa imunológica, mas também moléculas liberadas pelo próprio organismo do hospedeiro, como as proteínas surfactantes, mais especificamente a SP-D (proteína surfactante D). SP-D é uma colectina localizada no pulmão que participa da opsonização de micro-organismos, auxilia na fagocitose de *C. neoformans*, *in vitro*, principalmente de cepas mutantes não encapsuladas, bem como, reduz a capacidade microbicida de macrófagos murinos incubados com células selvagens ou mutantes (GEUNES-BOYER *et al.*, 2009). Apesar do aumento da taxa fagocítica, a ingestão exacerbada proporcionada pela presença da proteína SP-D também interfere no transporte do fungo para as vesículas lisossômicas, havendo a redução da colocalização da LAMP-1 (proteína 1 associada a membrana lisossômica) com células opsonizadas, permitindo então o crescimento intracelular do patógeno e consequente o aumento do CFU (GEUNES-BOYER *et al.*, 2009). Portanto, novas moléculas cujos ligantes venham a intervir na modulação da resposta imunológica do hospedeiro, especificamente no processo fagocítico, podem ser investigadas como alvos terapêuticos, assim como proteínas recombinantes de origem vegetal, como a ArtinM, lectina derivada do extrato de sementes de *A. heterophyllus* que também têm sido avaliada devido a sua capacidade de modulação da fagocitose (LOYOLA *et al.*, 2012). Macrófagos provenientes de camundongos pré-tratados com a proteína ArtinM demonstraram aumento da capacidade fagocítica *in vitro* ao serem cocultivados com leveduras de *C. albicans* e concomitante elevação da produção de TNF de modo dependente aos receptores de manose e dectina-1 (LOYOLA *et al.*, 2012). Estudos prévios também identificaram que o pré-tratamento de camundongos com a lectina promove a polarização das respostas de linfócitos T *helper* 1 e 17 (TH1 e TH17), com liberação das citocinas IL-12, IL-17, TNF e IFN- γ e consequente aumento da sobrevivência dos grupos tratados após inoculação de uma quantidade de fungos que é letal aos animais (CUSTODIO *et al.*, 2011). O tratamento

de leveduras do fungo *C. neoformans* com lectinas derivadas do gérmen de trigo, ocasiona a redução da associação do fungo aos macrófagos devido ao bloqueio de oligômeros de quitina presentes na superfície celular, interferindo na liberação para o meio extracelular do componente capsular glucuronoxilomanana (GXM), proporcionalmente a dose de tratamento (FONSECA *et al.*, 2013). Por consequência há a diminuição da mortalidade de animais inoculados com células tratadas com a lectina proveniente do gérmen de trigo. As análises da expressão evidenciaram a supressão de genes envolvidos com o processo de encapsulamento (FONSECA *et al.*, 2013). Novas investigações ainda são necessárias para compreender os efeitos benéficos ou deletérios do tratamento com a proteína α -manosidase, para o estabelecimento do fungo *P. brasiliensis* no organismo.

Em estudos realizados por Vallejo *et cols.* (2012) foi reportada a localização da α -manosidase de *P. brasiliensis* em vesículas exocíticas do fungo, dentre 72 proteínas identificadas nessas vesículas. Ademais, estudos preliminares caracterizaram a presença de epítomos de α -galactose altamente imunogênicos e antigênicos nessas vesículas exocíticas de *P. brasiliensis*, que reagem fortemente com IgG isoladas de pacientes chagásicos e com PCM. Resíduos de α -galactose terminal também foram localizados inseridos na parede celular e no ambiente intracelular de vacúolos, através de marcação com a aglutinina *Marasmius oreades* (VALLEJO *et al.*, 2011). Vesículas exocíticas secretadas pelo fungo *C. neoformans*, são bem descritas em relação ao conteúdo e morfologia, as quais abrigam em alta concentração produtos fúngicos relacionados à patogênese, tais como superóxido dismutase, urease, fosfolipase B e proteínas reconhecidas por anticorpos presentes no soro de pacientes com criptococose, bem como o polissacarídeo glucuronoxilomanana (GXM) e o lipídio regulador de virulência glucosilceramida, que compõem as cápsulas do patógeno (RODRIGUES *et al.*, 2007). Além de um mecanismo para liberação do polissacarídeo capsular GXM, inicialmente produzido no interior da célula, o acúmulo de conjuntos vesiculares de *C. neoformans* contendo polissacarídeos, após ingestão por macrófagos do hospedeiro pode contribuir para intoxicação celular pela alteração da condição osmótica e interação com produtos celulares contribuindo para sobrevivência do fungo (RODRIGUES *et al.*, 2007; TUCKER e CASADEVALL, 2001). Porém o tratamento *in vitro* de macrófagos com vesículas exocíticas liberadas pelo fungo *C. neoformans* promove o aumento da capacidade microbicida e o estímulo de TNF, TGF- β e IL-10 (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Vesículas com possível origem exocítica parecem ser liberadas por *H. capsulatum*, nas quais também foram identificados fatores de virulência como a proteína Hsp70, assim

como moléculas relacionadas à fisiologia e à defesa ao estresse (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). Estudos realizados *in vitro* evidenciaram que a incubação de vesículas extracelulares provenientes de *P. brasiliensis* em culturas de macrófagos da linhagem J774 promoveu a elevação da taxa fagocítica, bem como da capacidade microbicida e o estímulo de componentes pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-12 IL-1 α e IL-1 β de modo dose-dependente, além de induzir a ativação clássica de macrófagos com consequente caracterização de macrófagos M1, mesmo sob condições favoráveis para obtenção de M2 (DA SILVA *et al.*, 2016). Os resultados acima sugerem que a secreção de vesículas exocíticas desempenha a função de transporte de fatores que possam interferir na interação fungo-hospedeiro e, consequentemente, no estabelecimento da patogênese. Portanto os componentes vesiculares também têm sido investigados como potenciais alvos terapêuticos e profiláticos. A vacinação de murinos com o conteúdo de vesículas extracelulares de *C. albicans* se mostrou protetora contra candidíase após desafio letal, reduzindo as cargas fúngicas no fígado, rim e baço, além de aumentar citocinas como IL-12p70, TNF- α e IFN- γ , promovendo proteção independentemente da adição de adjuvante (VARGAS *et al.*, 2020). Uma vez que a proteína α -manosidase interfere na atividade fagocítica e é secretada por meio de vesículas exocíticas, levanta-se a hipótese de que a molécula em estudo possa estar envolvida na interação fungo-hospedeiro interferindo na resposta imunológica juntamente com outros componentes transportados. Em *A. fumigatus*, por exemplo, foi identificada uma α -1,2-manosidase de classe I, exigida para morfogênese e septação do fungo, como um novo antígeno relacionado a aspergilose alérgica broncopulmonar, devido sua reatividade com anticorpos IgG e IgE de pacientes com aspergilose (LI *et al.*, 2008, SINGH *et al.*, 2010).

A importância dos polissacarídeos na interação das células fúngicas com o hospedeiro tem sido descrita na literatura (revisto por SNARR *et al.*, 2017) e em *P. brasiliensis*, a composição da parede celular, principalmente a dos polissacarídeos, varia de acordo com a fase fúngica morfológica (KANETSUNA e CARBONELL, 1970): a glucana com ligações glicosídicas do tipo α -1,3 é o principal constituinte de polissacarídeo neutro na parede celular da fase de levedura (SAN-BLAS *et al.*, 1987), enquanto o tipo de ligação encontrado nesse polissacarídeos da fase miceliana é o tipo β -1,3 (CARBONELL *et al.*, 1970), sendo observadas pequenas quantidades de galactose e manose (SAN-BLAS *et al.*, 1987). Estudos *in vitro* demonstram que frações ricas em α -glucanas e quitinas provenientes da parede celular de *P. brasiliensis*, induzem a diferenciação de células dendríticas CD1a⁻ derivadas de monócitos, as quais favorecem a polarização da resposta de

linfócitos Th2, com redução nas concentrações de TNF e aumento de IL-8 e IL-1 β , em comparação aos controles não estimulados com a fração (SOUZA *et al.*, 2019). Curiosamente as mananas possuem um importante papel em relação a *C. albicans*, de modo que parecem revestir as β -glucanas da parede, atuando de modo supressor na resposta imunológica do hospedeiro e células deficientes de β -1,2 mananas promovem uma resposta de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12p40 e TNF (UENO *et al.*, 2013). A fagocitose em *C. albicans* realizada *in vitro* por células dendríticas derivadas de monócitos é dependente dos receptores de manose e DC-SIGN, lectinas do tipo C que reconhecem mananas N-ligadas (CAMBI *et al.*, 2008). As α -1,2-mananas são especificamente reconhecidas pelo receptor de dectina-1, as quais podem ser recobertas por mananas- β ligadas, contribuindo para evasão da resposta imunológica (IFRIM *et al.*, 2016). Moléculas proteicas manosiladas exercem um importante papel no desencadeamento da resposta imunológica e manoproteínas extraídas do fungo *C. neoformans*, promovem *in vitro* a proliferação de PBMC (ORENDI *et al.*, 1997), a maturação e estímulo de células dendríticas, bem como a produção de TNF, IL-12 (PIETRELLA *et al.*, 2004). A adição de mananas reduz significativamente o índice de fagocitose *in vitro* de células melanizadas e não melanizadas de *P. brasiliensis* por fagócitos J774, em relação ao controle não tratado (DA-SILVA *et al.*, 2009). Pode-se inferir a relevância dos polissacarídeos de manose na interação com o hospedeiro e na modulação da resposta imunológica de fungos patogênicos, e consequentemente de enzimas envolvidas na síntese, degradação e remodelamento desses açúcares como a α -manosidase em estudo, cuja secreção pode possibilitar a interferência não só em ligantes como também proteínas que desempenham o papel de receptores os quais auxiliam na imunomodulação.

6. CONCLUSÃO

- De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho podemos concluir que a α -manosidase presente no sobrenadante de culturas de leveduras do isolado Pb18 pode ser isolada parcialmente por meio de cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap Q XL, em pH 9, sendo o eluída eluída com tampão contendo NaCl entre 0,2 e 0,5M, com manutenção da atividade catalítica. Em relação às condições de expressão da proteína α -manosidase recombinante, determinou-se a padronização de modo que bactérias transformadas foram crescidas até atingir a DO a 600nm de 0,7, a 37°C, com

posterior adição do indutor IPTG a 1mM e subsequente incubação à temperatura ambiente, por 30 horas.

- A proteína recombinante foi isolada utilizando-se cromatografias de afinidade em coluna de níquel imobilizado com posterior cromatografia de troca aniônica, em pH 9. Uma banda de aproximadamente 116kDa, massa semelhante a predita para essa α -manosidase – 124,29kDa, foi eluída entre as concentrações de 0,2 a 0,5M de NaCl. Massa similar, 128kDa, também foi determinada quando a molécula isolada foi cromatografada por permeação em gel.
- A α -manosidase recombinante manteve a capacidade de hidrólise do substrato artificial p-NP- α -D-manopiranosídeo e apresentou especificidade de clivagem para as ligações glicosídicas α -1,2 e α -1,3, mas não para α -1,6. As condições ótimas de catálise, pH de 6,0 e temperatura de 45°C foram semelhantes a aquelas identificadas para proteína caracterizada no sobrenadante de cultura (pH 5,6 e temperatura 45-50°C), porém ambas diferem em estabilidade, de modo que a proteína recombinante permanece estável mantendo 90% de atividade residual após 30 minutos de incubação em temperatura ótima (45°C). A taxa da reação utilizando 1,7 μ g da proteína recombinante e 3mM de substrato p-NP- α -D-man foi reduzida em função do tempo de forma significativa a partir dos primeiros 5 minutos, semelhantemente a proteína nativa do sobrenadante, atingindo valores que se aproximam a zero após 60 minutos de catálise. Já a atividade enzimática relativa apresenta-se de forma acumulativa e eleva-se quase linearmente, em cerca de 5% nos intervalos iniciais de 5 a 20 minutos, e mais 5% ao atingir 40 minutos de reação após um curto período estável no intervalo entre 40 e 60 minutos, o aumento volta a ser constante numa taxa de aproximadamente 5% a cada 10 minutos. O agente quelante EDTA não apresentou efeitos sobre a catálise do substrato pNP- α -D-Man pela enzima α -manosidase recombinante, indicando que cátions divalentes são possivelmente dispensáveis para realização da hidrólise, no entanto a atividade da proteína recombinante foi inibida quando a indução da expressão foi realizada na presença de glicose a 1% no meio de cultura.
- A presença da α -manosidase recombinante durante o cocultivo de macrófagos e leveduras do isolado Pb18, interfere na taxa fagocítica *in vitro*, elevando a internalização de forma dependente a dose quando comparada aos controles onde os macrófagos foram tratados ou não BSA, fato que reforça a participação da enzima na modulação da resposta imunológica durante a interação fungo-hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINO, T. *et al.* Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.26, n.4, p.323-27, 1987.
- ADEMARK, P. *et al.* Hydrolytic properties of a β -mannosidase purified from *Aspergillus niger*. *J. biotechnol*, v.75, n.2-3, p. 281-89, 1999.
- AKAO, T. *et al.* Cloning and expression of 1,2-alpha-mannosidase gene (fmanIB) from filamentous fungus *Aspergillus oryzae*: in vivo visualization of the FmanIBp-GFP fusion protein. *Biosci Biotechnol Biochem*, v.70, n.2, p.471-9, 2006.
- ALMEIDA, B. R. *et al.* *Paracoccidioides* species present distinct fungal adherence to epithelial lung cells and promote different IL-8 secretion levels. *Med Microbiol Immunol*, v.209, n.1, p.59-67, 2020.
- ALBORNOS, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*, v.9, n.3, p.248–253, 1971. Doi:10.1080/00362177185190491.
- ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*, v.10, n.8, p.1695-610, 2008.
- BAGAGLI, R. C. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects *Mycopathologia*, v.165, n.4, p.197-207, 2008.
- BISCHOFF, J. *et al.*, Isolation, characterization, and expression of cDNA encoding a rat liver endoplasmic reticulum α -Mannosidase. *J Biol Chem*, v.265, n.28, p.17110-7, 1990.
- BISCHOFF, J. KORNFIELD, R. Evidence an α -manosidase in endoplasmatic reticulum of rat liver. *J Biol Chem*, v.268, n.13, p.7907-10, 1983.
- BISCHOFF, J. KORNFIELD, R. The soluble form of rat liver α -mannosidase is Immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane α -mannosidase. *J Biol Chem*, v.261, n.10, p.4758-65, 1986.

- BLUM, H., BEIER, H.; GROSS, J. H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-9, 1987.
- BORGES-WALMSLEY, M. I. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*, v.10, n.2, p.80-7, 2002.
- BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol*, v.29 p.1–21, 2011.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*, v.6, n.2 p.89-117, 1993.
- CACERE, Camila R. *et al.* The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol*, v.105, n.2, p.215-22, 2002.
- CANTAREL, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic acids research*, v.37, n.suppl_1, p.D233-D238, 2009.
- CALICH, V. L. G. *et al.* Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*, v.149, n 4-5, p.407-417, 1998.
- CAMBI, A. *et al.* The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol*, v.33, n.2, p.532-8, 2003. doi: 10.1002/immu.200310029.
- CARBONELL, L. M. *et al.* Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, *J Bacteriol*, v.102, n.2, p. 636-42, 1970.
- CARRERO, L. L. *et al.* New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol*, v.45, n.5, p.605-12, 2008.
- CHAUHAN, P. S; GUPTA, N. Insight into microbial mannosidases: a review. *Critical reviews in biotechnology*, v.37, n.2, p.190-201, 2017.
- CHAVES, E. G. A. *et al.* Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during infection of alveolar macrophages primed or not by interferon-gamma. *Front Microbiol*. v.10, artigo 96, 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.00096.

CHOJNOWSKA, S. *et al.* Determination of lysosomal exoglycosidases in human saliva. *Acta Biochim Pol*, v. 61, n. 1, p85–90, 2014.

CORREA., Priscila Cristina. Análise da expressão gênica diferencial e caracterização enzimática da proteína alfa-manosidase de *Paracoccidioides brasiliensis*. Trabalho de conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas-especialização em Biologia Molecular e Tecnológica) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

CUMMING, D. A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology*, v.1, n.2, p. 115-30, 1991.

CUSTODIO, L. A. *et al.* Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol*, v.11, n.10, p.1510-5, 2011.

DANIEL, P. F. *et al.* Mammalian alpha-mannosidases--multiple forms but a common purpose? **Glycobiology**, v.5, n.5, p.551-66, 1994.

DA SILVA, M. B. *et al.* Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*, v.8, n.1, p.197-205, 2006.

DA SILVA, M. B. *et al.* Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.104, n.4, p.644-8, 2009.

DA SILVA, T. A. *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep*, n.6, v.35867, 2016. DOI: 10.1038/srep35867.

DINIZ, S. N. *et al.* *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes Infect*, v.1, n.5, p.353-60, 1999.

DINIZ, S. N. *et al.* *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol*, v.62, n.8, p.799-808, 2001.

- DE-ARRUDA-GROSSKLAUS, D. *et al.* Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes Infect*, v.15, p.347-64, 2013
- DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*, v.17, n.2, p.41-8, 2000
- DE CASTRO, L. F. *et al.* Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect*, v.67, n. 5, p.470-85, 2013.
- DEWALD, B. TOUSTER, O. A new α -D-mannosidase occurring in golgi membranes. *J Biol Chem*, v.248, n.20, p7222-33, 1973.
- ENEYSKAYA, E. V. *et al.* Alpha-Mannosidase from *Trichoderma reesei* participates in the postsecretory deglycosylation of glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, v.245, n.1, p.43-9, 1998.
- ENEYSKAYA, E. V. *et al.* Transglycosylating and hydrolytic activities of the β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochimie*, v.91, n.5, p.632-38, 2009.
- FERNANDES, V. C. *et al.* The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, v.13, p.1062-72, 2011
- FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Immunol Lett*, v.103, n.2, 121-6, 2006
- FERREIRA, K. S. *et al.* Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and Toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis*, v.196, n.7, p.1108-15, 2007.
- FRANCO, M.; *et al.* Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.20, n.2, p.129-32, 1987.
- FARIAS, M. R. *et al.* Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*, v.172, n.2, p.147-152, 2011.

- FONSECA, F. L. *et al.* Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chitoooligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* v.60, p.64-73, 2013.
- FORTES, M. R. P. *et al.* Immunology of paracoccidioidomycosis. *An Bras Dermatol*, v.86, n.3, p.516-24, 2011.
- GALDINO, N. A. L. *et al.* Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome. *Sci Rep*, v.8, n.1, p.1-15, 2018.
- GAUTHIER, G. M. Fungal dimorphism and virulence: molecular mechanisms for temperature adaptation, immune evasion, and *in vivo* survival. *Mediators Inflamm*, artigo ID 8491383, 2017. Doi: 10.1155/2017/8491383.
- GEUNES-BOYER, S. *et al.* Surfactant protein D increases phagocytosis of hypocapsular *Cryptococcus neoformans* by murine macrophages and enhances fungal survival. *Infect Immun*, v.77, n.7, p.2783-94, 2009.
- GOES, T. S. *et al.* Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. *Immunol Lett*, v.101, p.24-31, 2005.
- GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. *Yeast*, v.33, n.4, p.113-28, 2016.
- GONZALEZ, A. *et al.* Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun*, v. 68, n.5, p. 2546-52, 2000.
- GONZALEZ, D. S.; JORDAN, I. K. The α -mannosidases: phylogeny and adaptive diversification. *Mol Biol Evol*, v.17, n.2, p.292-300, 2000.
- GONZALEZ, A. *et al.* Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol*, v.41, p.391-9, 2003.
- HAAS A. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic*, v.8, n.4, p.311-30, 2007.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, v.281, p.309-16, 1991.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, v.7, n.5, p.637-44, 1997.

HERSCOVICS, A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis *Biochim Biophys Acta*, v.1473, p.96-107, 1999.

HRYCYK, M. F. *et al.* Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Med Mycol*, v.56, n.8, p.950-62, 2018.

HUTCHINS, M. U; KLIONSKY, D. J. Vacuolar localization of oligomeric α -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bio Chem*. v.276, n.23, p.20491-98, 2001.

IFRIM, D. C. *et al.* The role of dectin-2 for host defense against disseminated candidiasis. *J Interferon Cytokine Res*, v.36, n.4, p.267-76, 2016.

INOUE, T. *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of the 1,2- α -D-mannosidase gene, *msdS*, from *Aspergillus saitoi* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, v.1253, n.2, p.141-5, 1995.

JORGENSEN. H. *et al.* Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Appl Biochem Biotechnol*, v.161, n.1-8, p318-32, 2010.

KANETSUNA, F. *et al.* Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*, v.97 n.3, p.1036-41, 1969.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*, v.101, n.3, p.675-80, 1970.

KESKAR, S. S.; *et al.* Production and properties of α -mannosidase from *Aspergillus* sp. *Biotechnol Lett*, v.15, n.7, p. 685-90, 1993.

KOLLÁR, R. *et al.* Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, v.272, n.28, p.17762-75, 1997.

KUMIONSKAYA, A. A. *et al.* Enzymatic activity and beta-galactomannan binding property of b-mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol*, v.25, n.3-5, p.372-7, 1999.

KURAKAKE, M; KOMAKI, T. Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Curr Microbiol*, v.42, n.6, p.377-80, 2001.

LANDGRAF., Taise Natali. Monofosforil lipídeo A e diidrolipoil desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* têm efeito terapêutico na paracoccidioidomicose experimental. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. doi:10.11606/T.17.2017.tde-06012017-165041. Acesso em: 2020-05-18. 471-479. 2006.

LANDGRAF, T. N. *et al.* Involvement of dihydrolipoyl dehydrogenase in the phagocytosis and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by macrophages. *Front Microbiol*, v.8, artigo 1803, 2017. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01803.

LI, Y. *et al.* Deletion of the *msdS/AfmsdC* gene induces abnormal polarity and septation in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology (Reading)*, v.154, Pt. 7, p.1960-72, 2008.

LOMBARD, J. The multiple evolutionary origins of the eukaryotic N-glycosylation pathway. *Biol Direct*, v.11, artigo 36, 2016. Doi:10.1186/s13062-016-0137-2.

LOURES, F. V. *et al.* Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun*, v.78, n.3, p.1078-88, 2010.

LOYOLA, W. *et al.* Artin M enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. *Int Immunopharmacol*, v.2, n.2, p.378-83, 2012.

MAMONI, R. L. *et al.* Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol*, v.40, n.2, p.153-9, 2002.

MARAS, M. *et al.* Molecular cloning and enzymatic characterization of a *Trichoderma reesei* 1,2- α -D-mannosidase. *J Biotechnol*, v.77, n.2-3, p.255-63, 2000.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop São Paulo, v.57, suppl.19, p.11-20, 2015.

MARQUES A. F. *et al.* Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Antimicrob Agents Chemother, v.50, n.8, p.2814-9, 2006.

MARQUES, S. A. *et al.* Paracoccidioidomycosis: frequency, morphology, and pathogenesis of tegumentary lesions. An Bras Dermatol, v. 82, n. 5, p.411-7, 2007.

MATTA, K. L.; BAHL, O. P. Glycosidases of *Aspergillus niger*. IV. Purification and characterization of α -mannosidase. J Biol Chem, v.247, n.6, p.1780-7, 1972.

MATUTE, D. R. *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol, v.23, p.65–73, 2006.

MCEWEN, J. G. *et al.* Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet. Biol, v.20, p.125-31, 1996.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Inst Med Trop, v.32, n.5, p.384-5, 1990.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. Microbes Infect, v.6, n.10, p.882-91, 2004..

MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. Mycopathologia, v.165, n.4-5, p.237-248, 2008.

MESQUITA-DA-COSTA, M.; MARQUES-DA-SILVA, S. H. Epidemiology, clinical, and therapeutic aspects of paracoccidioidomycosis. Curr Trop Med Rep, v.1, n.2, p.138-44, 2014.

MIERENDORF, R. C. Jr *et al.* Synthesis of related forms of the lysosomal enzyme alpha-mannosidase in *Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem, v.258, n.9, p.5878-84, 1983.

MORA-MONTES, H. M *et al.* Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N-glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eucaryot Cell*, v.6, n.12, p.2184–93, 2007.

MORA-MONTES, H. M. *et al.* Purification and biochemical characterisation of endoplasmic reticulum alpha1,2-mannosidase from *Sporothrix schenckii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.105, n.1, p.79-85, 2010.

MOREMEN, K. W *et al.* Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*, v.4, n.2, p.113-125, 1994.

MOREMEN, K. W. Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Biochim Biophys Acta*, v.1573, n.3, p. 225-35, 2002.

MOREMEN, K. W. α -Mannosidases in asparagine-linked oligosaccharide processing and catabolism. In: ERNST, B.; *et al.* *Carbohydr Chem Biol*, 2000. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, p. 81-117.

MOSCARDI-BACCHI, M *et al.*. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol*, v.40, p.159-64, 1994

MUÑOZ, J. E. *et al.* Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, v.178, n.3-4, p.177-88, 2014

NELSON, R. D *et al.* *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev*, v.4, n.1, p.1-19, 1991.

NETEA, M. G *et al.* Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*, v.116, n.6, p.1642-50, 2006.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol*, v.14, n.1, p.15-21, 2006.

OPHEIM, D. J. α -d-mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae* characterization and modulation of activity. *Biochim Biophys Acta*, v.524, n.1, p. 121-30, 1978.

OLIVEIRA, D. L. *et al.* Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*, v.78, n.4, p.1601-9, 2010.

ORENDI, J. M, *et al.* Mannoproteins of *Cryptococcus neoformans* induce a proliferative response in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and enhance HIV-1 replication. *Clin Exp Immunol*, v.107, p.293-9, 1997.

PIETRELLA, D. *et al.* Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun*, v.73, n.2, p.820-7, 2005.

PINA, A. *et al.* Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells. *Infect Immun*, v.81, n.4, p.1064-77, 2013.

PERES-DA-SILVA, R. *et al.* Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. *J. Med. Microbiol.* v.60, n.3 p.269–80, 2011.

POPI, A. F. *et al.* GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*, v. 218, n.1-2, p.87-94, 2002.

PUCCIA, R. *et al.* The *Paracoccidioides* cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. *Front Microbiol*, v.2, artigo 257, 2011. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00257

RANGARAJAN, M. *et al.* Characterization of the α - and β -mannosidases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, v.195, n.23, p.5297-307, 2013.

RESTREPO, A. *et al.* Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, v.46, n.2, p.346-53, 1984.

RODRIGUES, M. L *et al.* Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic cell* v.6, n.1, p.48-59, 2007.

RODRIGUES, D. R. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol*, v.45, p.27-33, 2007.

SALGADO-SALAZAR, C. *et al.*. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. v.26, n.6, p.613-24, 2010.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia*, v.62, n.2, p.77-86, 1977.

SAN-BLAS, G. *et al.* A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez*, v.38, n.2, p.202-11, 1987.

SAN-BLAS, G.; VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall α -1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. *Infect Immun*, v.15, n.3, p.897-902, 1977.

SANO, A. *et al.* The research encouragement award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v.40, n.1, p.1-8, 1999.

SCHÄFER, F.; SCHÄFER, A.; STEINERT K. A highly specific system for efficient enzymatic removal of tags from recombinant proteins. *J Biomol Tech*, v.13, n.3, p.158-71, 2002.

SEIDER, K. *et al.* Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol*, v.13, n.4, p.392-400, 2010.

SINGH, B. *et al.* Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. *J Proteome Res*, v.9, n.11, p.5517-29, 2010.

SILVA, J. F. *et al.* Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.110, n.4, p.476-84, 2015.

SILVEIRA, L. H. *et al.* Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, v.165, n.6, p.367-71, 2008.

SHANKAR, J. *et al.* Influence of 17 β -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. *PLoS one*, v.6, n.12, artigo.e28402, 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0028402.

- SNARR, B. D. *et al.* Immune recognition of fungal polysaccharides. *J Fungi*, v.3, n.3, artigo 47, 2017. Doi: 10.3390/jof3030047.
- SOUZA, A. C. O. *et al.* New role of *P. brasiliensis* α -glucan: differentiation of non-conventional dendritic cells. *Front Microbiol*, v.10, artigo 2445, 2019. Doi:10.3389/fmicb.2019.02445.
- SUGUIURA, I. M. S. *et al.* First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. *Med Mycol*, v.58, n.6 p.1-7, 2019.
- SWAMINATHAN, N. *et al.* Glycosidases of *Aspergillus niger*. 3. Purification and characterization of 1,2- -mannosidase. *J Biol Chem*. v.247, n.6, p.1775-9, 1972.
- TABAS, I.; KORNFELD, S. Purification and characterization of a rat liver Golgi alpha-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem*. v.254, n.22, p.11655-63, 1979.
- TABORDA, C. P. *et al.* Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun*, v.66, p.786-93, 1998.
- TEIXEIRA, M. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*, v.52, n.2, p.273-83, 2009.
- TEIXEIRA, M. M. *et al.* *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog*, v.10, n.10, 2014.
- TRAVASSOS, L. R. *et al.* The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate, In: Dimer, J. E.; Kobayashi G. S. (eds.). *Human fungal pathogens*. Berlin:Springer-Verlag, 2004. p.279-96.
- TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, n.5, p.3165-70, 2002.
- TURISSINI, D. A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol*, v.106, p.9-25, 2017.

UENO, K. *et al.* The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol*, v.51, n.4, p.385-95, 2013.

UNTEREINER, W. A. *et al.*, The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*, v.96, n.8, p.12-61, 2004.

VALLEJO, M. *et al.* The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -galactosyl epitopes. *Eukaryotic cell*, v.10, n.3, p.343-351, 2011.

VALLEJO, M. C. *et al.* Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res*, v.11, n.3, p.1676-85, 2012.

VAN-DEN-ELSEN, *et al.* Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J*, v.20, n.12, p.3008-17, 2001.

VARGAS, G. *et al.* Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. *Cellular Microbiology*, v.22, n.10, artigo e13238, 2020. Doi: 10.1111/cmi.13238.

VARKI. A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, v.3 n.2 p.97-130, 1993.

VARKI, A. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Cell Biol*, v.8, p.34-40, 1998.

VERLI, F. D. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.38, n.3, p.234-7, 2005.

YAMAMOTO K. *et al.* Purification and characterization of 1,2-alpha-mannosidase of *Aspergillus oryzae*. *J Biochem*, v.91, n.6, p.1971-9, 1983.

YAMASHITA, K. *et al.* An alpha-mannosidase purified from *Aspergillus saitoi* is specific for alpha 1,2 linkages. *Biochem Biophys Res Commun*, v.96, n.3, p. 1335-42, 1980.

YOSHIDA, T. *et al.* 1,2- α -D-mannosidase from *Penicillium citrinum*: molecular and enzymic properties of two isoenzymes. *Biochem J*, v.290, pt.2, p.349-54, 1993.

YOSHIHISA, T. *et al.* Solubilization and purification of α -mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, v.263, n.11, p.5158-63, 1988.

ZHU, M. *et al.* β -Mannosidosis mice: a model for the human lysosomal storage disease. *Human molecular genetics*, v.15, n.3, p.493-500, 2006.