Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Emylli Dias Virginio

Interação de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs) com cepas de *Aspergillus fumigatus* deficientes em galactosaminogalactana

Rio de Janeiro

2017

Emylli Dias Virginio

Interação de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs) com cepas de Aspergillus fumigatus deficientes em galactosaminogalactana

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Leila Maria Lopes Bezerra.

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

V817 Virginio, Emylli Dias.
Interação de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs) com cepas de *Aspergillus fumigatus* deficientes em galactosaminogalactana / Emylli Dias Virginio – 2017.
132 f.

Orientador: Leila Maria Lopes Bezerra.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Aspergillus fumigatus* - Teses. 2. Cordão umbilical - Teses. 3. Mutação (Biologia) – Teses. 4. Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana. I. Bezerra , Leila Maria Lopes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 582.282.123.4:618.38

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura Data

Emylli Dias Virginio

Interação de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs) com cepas de *Aspergillus fumigatus* deficientes em galactosaminogalactana

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de agosto de 2017.

Banca Examinadora: _____

Prof.ª Dra. Leila Maria Lopes Bezerra (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Luciana Pizzatti Barboza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

À Dra. Leila Lopes Bezerra, pela orientação.

Aos amigos que a UERJ me deu e que carregarei para sempre: Natália Caetano, Thayana, Mayara, Gabriela Neves, Jorge Cardoso, Marcel Cunha, Monique, Camila Cavalieri, Cecília Santos, Diego Gomes, Phillipe Rosado, João Paulo, Evandro. Vocês, direta ou indiretamente, tornaram o fardo mais leve e me deram ânimo a continuar, sempre.

À amiga-irmã e companheira de caminhada científica Ivy Ortega, por toda ajuda e apoio sempre prestados.

À Dra. Nathália Curty de Andrade por toda dedicação e companheirismo durante a realização desse trabalho e principalmente, pela amizade, sempre tão fiel e sincera.

À Dra. Paula Helena Kubitschek-Barreira pela toda ajuda e dedicação de anos, sempre disposta e pronta para ajudar em qualquer dificuldade e sanar qualquer dúvida. Obrigada por sua amizade e carinho de sempre.

Aos novos colegas de trabalho do Centro Panamericano de Febre Aftosa, principalmente a Anna Paula Alvim, por todo suporte durante a concretização desse trabalho.

Ao meu marido Henry, por todo amor, compreensão, apoio e companheirismo. Por nunca me deixar desistir. Amo você.

Aos meus pais, Aparecida Dias Virginio e Walmi Virginio Filho e ao meu irmão, Nikolas Dias Virginio, por todo o amor incondicional.

À Beatriz, minha filha. Que você tenha orgulho da mamãe.

A Deus, meu Senhor e soberano, pelo dom da sabedoria, pela força, pelo ânimo e pelo amor, em todos os dias da minha vida.

A vida passa rápido. Não é a duração da vida o mais importante, mas sim a capacidade de transformá-la em algo significativo.

Dom Robinson Cavalcanti

RESUMO

VIRGINIO, Emylli Dias. **Interação de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs) com cepas de Aspergillus fumigatus deficientes em galactosaminogalactana.** 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A parede celular do *Aspergillus fumigatus* é a primeira estrutura do fungo a entrar em contato com constituintes do hospedeiro. Estudos recentes sugerem que os glicoconjugados da superfície celular de *A. fumigatus* estejam envolvidos nos processos de adesão deste fungo a células do hospedeiro. Dentre estes carboidratos de superfície, uma galactosaminogalactana (GAG) foi caracterizada como tendo papel chave na adesão do fungo. O processo de síntese de GAG e seu transporte para a parede celular não é completamente conhecido. Entretanto, sabe-se que os genes UGE3 e GT4C codificam, respectivamente, uma UDP-glicose-4-epimerase e uma glicosil transferase, que são essenciais para a síntese de GAG em *A. fumigatus*. Nesse contexto, o objetivo dessa tese foi elucidar o papel da molécula de GAG na ativação endotelial e desvendar quais processos biológicos endoteliais são reguladas a partir desta ativação. Para atingir este objetivo, foi utilizado o modelo de cultura primária de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) desafiadas com cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*. As cepas mutantes utilizadas foram: (i) duas cepas deficientes na síntese de GAG (Δ*uge3* e Δ*gt4c*) e; (ii) uma cepa mutante que superexpressa GAG na parede (Δ*ugm1*). Após interação das HUVECs com cada uma das cepas de *A. fumigatus* foi verificado o perfil de adesão às células endoteliais, a viabilidade das HUVECs e a secreção de citocinas no meio condicionado. Além disto, foi realizado um estudo proteômico comparativo e quantitativo, para elucidar processos biológicos endoteliais modulados pela GAG. Os resultados desse estudo indicaram que as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4c* possuem perfil hipo-aderente às HUVECs quando comparadas com as cepas selvagens AF293 e *Ku80*, além de uma significativa diminuição da secreção de TNF-α. Em contraste, a cepa Δ*ugm1* apresentou perfil hiper-aderente às HUVECs, quando comparada as cepas selvagens. Corroborando dados anteriores de nosso grupo, a mutante Δ*ugm1* induziu um aumento significativo da secreção de TNF-α. As HUVECs infectadas com as mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4c,* apresentaram um perfil de redução de secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF-α em relação ao perfil observado com as cepas selvagens. Os dados proteômicos revelaram que a GAG está relacionada com a modulação de proteínas de HUVECs envolvidas em processos biológicos importantes na fisiopatologia da aspergilose invasiva, tais como: adesão e movimentação celular, regulação da angiogênese e da coagulação, estresse oxidativo, homeostase celular, ativação de plaquetas e apoptose.

Palavras-chave: *A. fumigatus*. HUVECs. Galactosaminogalactana. Mutante Δ*uge3*. Mutante Δ*gt4c*. Mutante Δ*ugm1*. Coagulação. Homeostase. Apoptose. Ativação de plaquetas.

ABSTRACT

VIRGINIO, Emylli Dias. **Interação de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs) com cepas de Aspergillus fumigatus deficientes em galactosaminogalactana.** 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The cell surface of *Aspergillus fumigatus* is the first structure of the fungus to get in contact with host constituents. Recent studies have shown that glycoconjugates of *A. fumigatus* cell surface are involved in the host adhesion processes. Among these surface carbohydrates, a galactosaminogalactan (GAG) was characterized for its key role at the adhesion of the fungus. The GAG synthesis process and its transportation to the cell wall is not fully understood. However, it is known that the UGE3 and GT4C genes encodes, respectively, an UDP-glucose-4-epimerase and a glycosyl transferase that are essentials for the production of *A. fumigatus* GAG. In this context, this work aimed to elucidate the role of GAG molecule at endothelial activation end to uncover which endothelial biological processes were regulated because of this activation. To achieve this objective, we used the primary culture of human umbilical vein endothelial cells model (HUVECs) challenged with wild type and mutant strains of *A. fumigatus*. The mutant strains used were: (i) two strains deficient at GAG synthesis (Δ*uge3* e Δ*gt4c*) and; (ii) one mutant strain wich super express GAG at cell surface (Δ*ugm1*). After HUVECs interaction with each *A. fumigatus* strains, we evaluated the adhesion profile to endothelial cells, the HUVECs viability and the secretion of cytokines in the conditioned media. Besides, a comparative and quantitative proteomic study was performed, to elucidate the biological processes modulated by GAG. The results of this study indicated that the mutant strains Δ*uge3* and Δ*gt4c* had a hypo-adherent profile to HUVECS when compared to the AF293 e *Ku80* wild type strains, also, a significant decrease at TNF-α secretion was observed. In contrast, the Δ*ugm1* strain showed a hyper-adherent profile to HUVECs, when compared to the wild type strains. Corroborating previous data of our group, the Δ*ugm1* strain induced a significant increase of TNF-α secretion. The HUVECs infected with the Δ*uge3* e Δ*gt4c* mutants showed a reduction of the pro-inflammatory IL-6 and the TNF-α secretion profile when compared to the wild type strains. The proteomic data indicated that GAG is related with the modulation of HUVECs proteins involved in biological processes that are important in the physiopathology of invasive aspergillosis, such as: adhesion and cellular movement, regulation of angiogenesis and coagulation, oxidative stress, cellular homeostasis, platelet activation and apoptosis.

Keywords: *A. fumigatus*. HUVECs. Galactosaminogalactan. Δ*uge3* mutant. Δ*gt4c* mutant. Δ*ugm1* mutant. Coagulation. Homeostasis. Apoptosis. Platelet activation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do conidióforo de *Aspergillus spp* 15
Figura 2 - Ciclo de vida assexuado de *Aspergillus fumigatus* 18
Figura 3 - Morfogênese do gênero *aspergilli* (e outros fungos filamentosos) baseado no modelo do *Aspergillus nidulans* 20
Figura 4 - Representação das aspergiloses em função da resposta imune do hospedeiro 26
Figura 5 - Fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos e não neutropênicos 27
Figura 6 - Adesão e invasão do endotélio vascular por *A. fumigatus* 29
Figura 7 - Modelo da interação de moléculas da superfície do *A. fumigatus* com o hospedeiro 30
Figura 8 - Representação esquemática da parece celular do conídio e da hifa de *A. fumigatus* 31
Tabela 1 - Composição estrutural da molécula de GAG 32
Quadro 1 - Composição da MEC de *A. fumigatus* in vivo e in vitro, em condições de crescimento de biofilme 34
Figura 9 - Localização celular da α-(1,3)-glucana e GAGna parede celular de *A. fumigatus* 35
Figura 10 - Genes diferencialmente regulados em ΔStutA e ΔMedA 39
Figura 11 - Microscopia eletrônica das hifas das cepas Af293 e Δ*uge3* 40
Figura 12 - Representação esquemática das vias de síntese de GM e GAG..... 41
Quadro 2 - Cepas mutantes utilizadas no estudo da interação de *A. fumigatus* com HUVECs 44
Figura 13 - Interação de TGs de *A. fumigatus* com HUVECs 46
Figura 14 - Representação do ensaio de imunofluorescência diferencial a partir da interação de HUVECs com TGs da cepa AF293 49
Figura 15 - Ilustração do esquema de trabalho para as análises por espectrometria de massas nLC-MS/MS 54
Figura 16 - Via hipotética de síntese de GAG em *A. fumigatus* 57
Figura 17- Interação das cepas selvagens (AF293 e *ku80*), mutantes (Δ*uge3*, Δ*gt4C* e

Δ*ugm1*) e complementada (Δ*uge3:* Δuge3) de *A. fumigatus* com células endoteliais humanas 59
Tabela 2 - Viabilidade celular das HUVECs por MTT 60
Figura 18 - Perfil de secreção da citocina pró-inflamatórias IL-6 em meio condicionado de culturas de HUVECs interagidas com TG das cepas mutantes e selvagem 62
Figura 19 - Perfil de secreção da citocina pró-inflamatórias TNF-α em meio condicionado de culturas de HUVECs interagidas com TG das cepas mutantes e selvagem 63
Figura 20 - Perfil de secreção da quimiocina IL-8 em meio condicionado de culturas de HUVECs interagidas com TG das cepas mutantes e selvagem 64
Figura 21 - *Volcano plot* da comparação (1) *Ku80* versus Controle 67
Figura 22 - Processos biológicos enriquecidos pelo *DAVID* validados nas comparações entre as cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus* com o Controle 69
Figura 23 - Processos biológicos enriquecidos pelo *DAVID* validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* com a cepa selvagem 73
Figura 24 - Processos biológicos enriquecidos pelo *DAVID* validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* 76
Tabela 3 - Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma *DAVID*, em cada uma das condições estudadas 78
Figura 25 - Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 1..... 98
Figura 26 - Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 2..... 99
Figura 27 - Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 3..... 100
Figura 28 - Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 4..... 101
Figura 29 - Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 1..... 102
Quadro 3 - Proteínas diretamente relacionadas com a presença de GAG na superfície do *A. fumigatus* 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Aspergilose Bronco-Pulmonar Alérgica
AI	Aspergilose Invasiva
CHO	Células de ovário de hamster chinês
DECH	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase
FvW	Fator von Willebrand
GAG	Galactosaminogalactana
Gal	Galactose
GalNAc	*N*-acetil-galactosamina
GlcNAc	*N*-acetil-glicosamina
GM	Galactomanana
Gp96	Glicoproteína 96
GPIb-IX	Glicoproteína plaquetária Ib-IX
Grp94	*Glucose-regulated protein 94*
GT	Glicosil Transferase
HSP90	*Heat shock protein* 90
HSP90B1	*Heat shock protein* 90 B1
HUVECs	*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
ICAM-1	*Intercellular Adhesion Molecule 1*
IFI	Infecção Fúngica Invasiva
IFN-γ	Interferon gama
IL1-β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
nLC-MS/MS	*Nano Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry*
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MCP-1	*Monocyte Chemotactic Protein 1*

MEC	Matriz Extra Celular
MP	Membrana Plasmática
MS1	*Mass spectra 1*
MS2	*Mass spectra 2*
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
PDGF	*Platelet-derived Growth Factor*
PGG	Fração não-solúvel da molécula de galactosaminogalactana
PMN	Células Polimorfonucleares
RT-PCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction*
SGG	Fração ureia-solúvel da molécula de galactosaminogalactana
TG	Tubo Germinativo
TLR 2	*Toll Like Receptor 2*
TLR 4	*Toll Like Receptor 4*
TNF-α	Fator De Necrose Tumoral Alfa
UGE	UDP-glicose-4-epimerase
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
XIC	*Extracted Ion Chromatogram*
14-3-3ζ	Proteína 14-3-3 zeta/delta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	**REVISÃO DE LITERATURA**	15
1.1	**O gênero *Aspergillus***	15
1.2	***Aspergillus fumigatus*: características gerais**	17
1.3	**Patogênese e fatores de virulência de *A. fumigatus***	20
1.4	**Fisiopatologia da aspergilose invasiva**	24
1.5	**Aspectos celulares e moleculares da interação fungo-hospedeiro**	29
1.5.1	A superfície celular do *A. fumigatus*	29
1.5.2	Qual o papel da GAG na interação *A.fumigatus*-hospedeiro?	36
2	**OBJETIVOS**	43
2.1	**Objetivo geral**	43
2.2	**Objetivos específicos**	43
3	**ESTRATÉGIA METODOLÓGICA**	44
3.1	**Microrganismos utilizados**	44
3.2	**Cultivo e obtenção dos tubos germinativos de *A. fumigatus***	45
3.3	**Cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano**	46
3.4	**Viabilidade das células endoteliais após interação com *A. fumigatus***	47
3.5	**Ensaio de internalização e adesão de *A. fumigatus* às monocamadas endoteliais**	47
3.6	**Dosagens de citocinas em meio condicionado de culturas de HUVEC após interação com *A. fumigatus***	49
3.7	**Análise estatística**	50
3.8	**Análise proteômica**	51
3.8.1	Obtenção do extrato proteico das HUVECs desafiadas com as cepas selvagem e mutante de *A. fumigatus*	51
3.8.2	Digestão tríptica	52
3.8.3	Análise por espectrometria de massas *nLC-MS/MS*	52
3.8.4	Análise de dados	53
3.8.4.1	Busca de proteínas por PSM	53
3.8.4.2	Análise *in silico* – enriquecimento de *Gene Ontology*	55

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 56
4.1 **As cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* possuem fenótipo hipoaderente e são menos internalizadas pelas HUVECs** 56
4.2 **As cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* induziram injúria similar nas HUVECs, em relação às cepas selvagens de *A. fumigatus*** 60
4.3 **Perfil de secreção de citocinas em meio condicionado de HUVECs após interação com as cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*** 61
4.4 **Processos biológicos endoteliais modulados pela molécula de GAG** 66
4.4.1 α-Actinina-1 E α-Actinina-4 105
4.4.2 Filamina A 106
4.4.3 Anexina A2 e a Anexina A5 107
4.4.4 Calveolina-1 110
4.4.5 Endoplasmina 111
4.4.6 Fator Von Willebrand 112
4.4.7 Glicoproteína CD59 114
4.4.8 Proteína 14-3-3 zeta/delta 115
CONCLUSÕES 118
REFERÊNCIAS 119

INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) tem aumentado nas últimas décadas devido à utilização, cada vez mais frequente, de terapias imunossupressoras para o tratamento de câncer e para o controle de rejeição a transplantes (Alangaden, 2011). Dentre as infecções fúngicas invasivas mais predominantes destaca-se a aspergilose invasiva, cujo principal agente etiológico é o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (Denning, 1998). Pacientes com neutropenia profunda e prolongada, principalmente aqueles com leucemia aguda ou submetidos a transplante de medula óssea configuram o principal grupo de risco para esta doença (Patterson, 2009). Mesmo quando tratada, a aspergilose invasiva apresenta altas taxas de mortalidade (74 a 92%) (Singh e Paterson, 2005).

Sabe-se que hifas deste fungo são capazes de causar injúria e ativação endotelial, induzindo o endotélio a um fenótipo pró-trombótico e também a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Deste modo, os eventos decorrentes da infecção sistêmica por *A. fumigatus* que levam a injúria, dano celular, e eventos pró-trombóticos no endotélio já foram descritos (Lopes-Bezerra e Filler, 2004; Filler e Sheppard, 2006; Kamai et al., 2006), entretanto, ainda não se sabe ao certo quais moléculas e quais receptores são os responsáveis pelo *start* dessa cadeia de eventos.

A galactosaminogalactana (GAG), um polissacarídeo estrutural da parece celular do *A. fumigatus*, atualmente tem sido apontada como a principal adesina e uma molécula chave na patogênese da aspergilose invasiva. Os genes *uge3* e *gt4c* codificam, respectivamente, as enzimas UDP-glicose-4-epimerase 3 e uma glicosil transferase, responsável pela síntese de GAG a nível de membrana plasmática (Latgé e Fontaine, comunicação pessoal). A UDP-glicose-4-epimerase 3 (UGE3) é uma epimerase de atividade dupla, sendo capaz de mediar a interconversão de UDP-*N*-acetil-glicosamina a UDP-*N*-acetil-galactosamina, bem como de UDP-glicose a UDP-galactose. O papel da glicosil transferase C (GT4C) ainda não foi totalmente confirmado, entretanto, tanto cepas com deleções para GT4C quanto UGE3 resultam no bloqueio da produção de GAG (Fontaine et al., 2011; Gravelat et al., 2013; Lee et al., 2014).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar o perfil de cepas mutantes, deficientes para a produção de galactosaminogalactana, a Δ*uge3* e Δ*gt4c*, avaliando o perfil de adesão e endocitose a células endoteliais isoladas da via umbilical humana (HUVECs). Avaliamos ainda, o perfil de secreção de citocinas por células endoteliais em meio

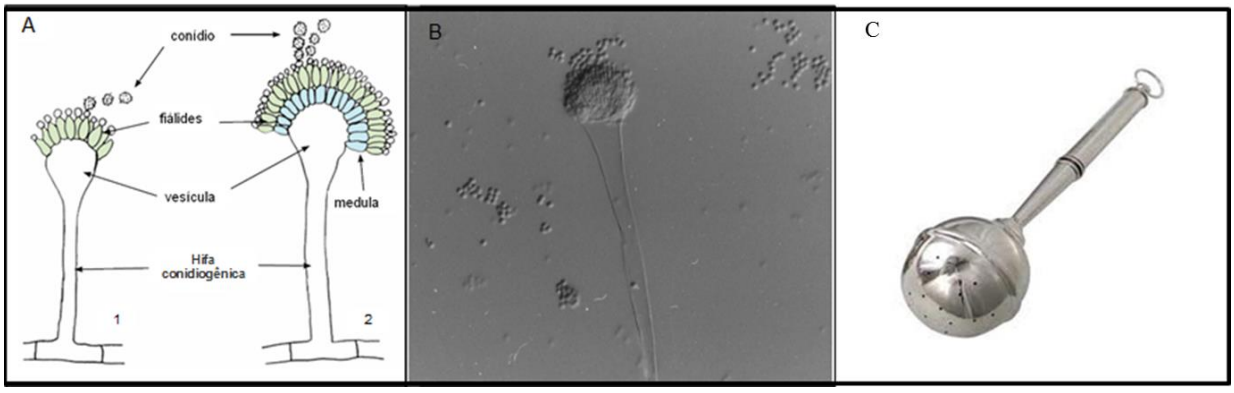
condicionado em HUVECs infectadas com estas mutantes. Por fim, utilizamos as cepas mutantes, a Δ*gt4c* e Δ*ugm1* (mutante de *A. fumigatus* que superexpressa GAG em sua superfície) para realizar uma análise proteômica das HUVECs, visando avaliar as proteínas diferencialmente expressas e os principais processos biológicos modulados na célula endotelial infectada que estejam realmente relacionados com a presença GAG. Desta forma visamos elucidar alguns dos mecanismos endoteliais que possam ser modulados pelo polissacarídeo GAG, expresso na superfície de hifas do *A. fumigatus*.

1 **REVISÃO DE LITERATURA**

1.1 **O gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus* pertence à Família Trichocomaceae, Ordem Eurotiales, Classe Ascomycota do Reino Fungi. Os membros do filo Ascomycota, quando realizam reprodução sexuada (fase teleomorfa), caracterizam-se por produzirem ascósporos em estruturas denominadas ascos. Alguns membros, entretanto, reproduzem-se assexuadamente (fase anamorfa) através da produção de conídios, que se formam a partir de estruturas de reprodução assexuada denominadas conidióforos (Alexopoulos et al., 1996). Pier Antonio Micheli, em seu trabalho intitulado The Nova Geneva Plantarum (1729), foi primeiro a nomear o gênero *Aspergillus.* Micheli percebeu que o formato dos conidióforos assemelhava-se a um aspersório, instrumento utilizado para aspergir água benta em celebrações religiosas (Figura 1). Desta forma, ele não só descreveu e ilustrou o fungo em seu trabalho, como também nomeou o gênero de *Aspergillus* (Micheli 1729 apud Denning 1998).

Figura 1 - Estrutura do conidióforo de Aspergillus spp



Legenda: (A) Esquema mostrando a conidiogênese unisseriada (1) e bisseriada (2) (Ellis et al., 2007); (B) Microscopia ótica por contraste interferencial de um conidióforo de *A. fumigatus* mostrando a fileira de conídios produzidos a partir das fiálides (Latgé, 1999); (C) Aspersório, acessório utilizado em cerimônias religiosas; a semelhança com sua aparência deu nome ao gênero.
Fonte: Micheli, 1979.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são saprofíticos e possuem um papel essencial na reciclagem de carbono e nitrogênio podendo ser encontrados no solo, plantas em decomposição e em qualquer tipo de matéria orgânica. Além disso, são facilmente cultivados em laboratório. Em geral, as espécies patogênicas são termotolerantes, apresentando crescimento ótimo a 36 $^{\circ}$C. As espécies diferem tanto pelas características macroscópicas

(coloração da cultura e etc.) quanto pela morfologia dos conídios e conidióforos. Quando crescido em meios de cultivo sólidos, a colônia de *Aspergillus* inicialmente apresenta-se despigmentada, porém, na medida em que a colônia cresce e os conidióforos amadurecem, ela passa a apresentar uma coloração que pode variar entre tons de verde, laranja, marrom ou preto, dependendo da espécie (Larone, 2002).

Membros do gênero *Aspergillus* apresentam um grande destaque nas áreas de biotecnologia e medicina. Suas aplicações na biotecnologia são diversas, principalmente na indústria alimentícia, onde possuem importantes papéis em processos de fermentação de alimentos e bebidas. Espécies como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae* (*koji molds*), *Aspergillus tamarii*, e *Aspergillus flavus* estão envolvidos na fermentação de grãos de soja para produção de molho shoyo e na fermentação de arroz para produção de saquê (Alexopoulos et al., 1996; Abe et al., 2006). Já a espécie *Aspergillus niger* está envolvida na produção de ácidos orgânicos, sendo considerada a principal fonte de produção mundial do ácido cítrico, substância amplamente utilizada na indústria alimentícia como conservante natural e para conferir sabor a alimentos, principalmente sucos e refrigerantes. Ainda no setor alimentício, *A. niger e A. oryzae* se destacam na produção de enzimas extracelulares com aplicações industriais, como é o caso da glicoamilase, utilizada na fabricação de pães e cerveja; e da pectinase, utilizada na eliminação de grumos em sucos de fruta industrializados (Carlsen e Nielsen, 2001; Carlile et al., 2007).

Por fim, na indústria farmacêutica, *A. terreus* é um importante produtor de estatinas[1], que representa um lucro de aproximadamente quinze bilhões de dólares ao ano nos Estados Unidos (Maggon, 2005). Os *koji molds*, juntamente com o *A. niger* são considerados fábricas celulares para uma variedade de enzimas, dentre elas as amilases (produção de pão e cerveja); as invertases (produção de sucos e refrigerantes); as pectinases (produção de sucos e clarificação de vinhos) e as *phytases* (aditivo na indústria alimentícia animal), entre outras (Magnuson et al., 2004; Bentley e Bennet, 2007).

[1] Fármaco utilizado para controle dos níveis de colesterol plasmáticos (Maggon, 2005).

1.2 *Aspergillus fumigatus*: características gerais

O *A. fumigatus* é um fungo filamentoso, cosmopolita e de caráter saprofítico. No ecossistema terrestre apresenta um papel fundamental na reciclagem de nutrientes, participando do decaimento de materiais orgânicos de origem vegetal, e do ciclo de carbono e nitrogênio (Tekaia e Latgé, 2005).

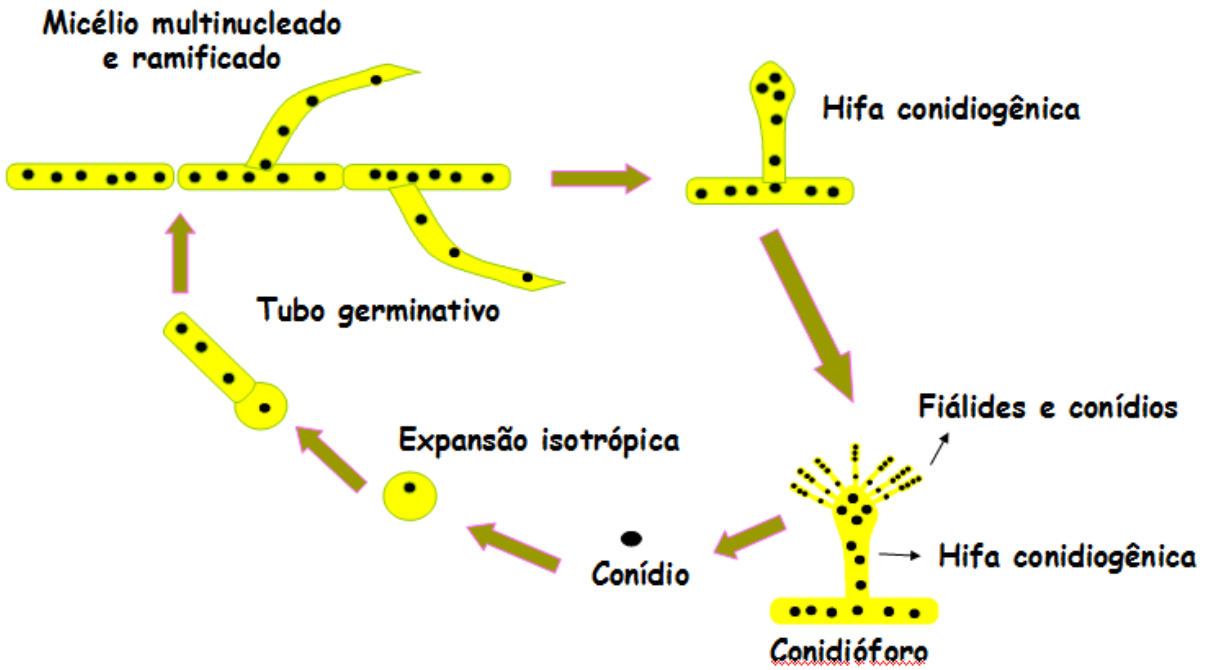
Este fungo pode ser morfologicamente caracterizado pelo seu conidióforo e também, pela ramificação dicotômica de suas hifas, cuja angulação é de 45°. O micélio é formado por hifas hialinas e septadas, cujo diâmetro varia de 2,5 a 8 µm. Durante aproximadamente dois séculos o *A. fumigatus* foi descrito como um fungo anamorfo, ou seja, apresentando somente reprodução assexuada (Alexopoulos et al., 1996). Entretanto, diversas evidências genéticas apontavam para a presença de genes relacionados à reprodução sexuada. Então, em 2008, O'Gorman et al. (2009) descreveu o ciclo reprodutivo sexuado do *A. fumigatus*. Na forma telomorfa, este fungo passa a se chamar *Neosartorya fumigata*, e o ciclo sexual envolve a formação de cleistotécio[2], produção de ascos[3] e ascósporos.

Apesar de quase uma década da descrição da reprodução sexuada do fungo, o ciclo de vida assexuado ainda é o único bem conhecido e melhor descrito. O ciclo de vida assexuado de *A. fumigatus* é caracterizado pela formação dos conidióforos, estruturas eréteis e longas, responsáveis pela produção dos esporos assexuados, denominados conídios. Os conidióforos de *A. fumigatus* são formados a partir de uma hifa somática que sofre um processo de diferenciação, formando assim uma hifa conidiogênica. Essa hifa conidiogênica carrega uma célula bulbosa em seu ápice, a vesícula, que por sua vez dá origem às fiálides, estruturas que produzem os conídios por divisão mitótica. Todo este processo é denominado conidiogênese de *A. fumigatus* (Figura 2) (Alexopulos et al., 1996; Webster & Weber, 2007).

[2] Corpo de frutificação ou ascocarpo (estrutura de reprodução sexuada) completamente fechado (Alexopoulos et al., 1996).

[3] Estrutura produtora de ascósporos presente no ascocarpo (Alexopoulos et al., 1996).

Figura 2 – Ciclo de vida assexuado de *Aspergillus fumigatus*



Fonte: A autora, 2017.

As espécies de *aspergilli* são capazes de produzir conídios em abundância. A espécie *A. fumigatus* produz conidióforos uniseriados, onde as fiálides partem diretamente da vesícula (Figura 1). Em outras espécies de *aspergilli* também pode ocorrer a formação de conidióforos bisseriados, onde as fiálides surgem a partir de uma camada de células chamada medula produzida a partir da vesícula. Quando as fiálides amadurecem, cada conídio se desenvolve a partir de uma protrusão esférica em sua extremidade. O núcleo da fiálide se divide mitoticamente, um dos núcleos migra para o conídio em desenvolvimento e forma-se, então, um septo que delimita o conídio e a fiálide. Quando o conídio está maduro, outro se desenvolve logo abaixo e, como a parede dos conídios adjacentes permanece fisicamente conectada, uma corrente de conídios se forma e acumula na superfície da fiálide (Alexopoulos et al., 1996; Webster e Weber, 2007).

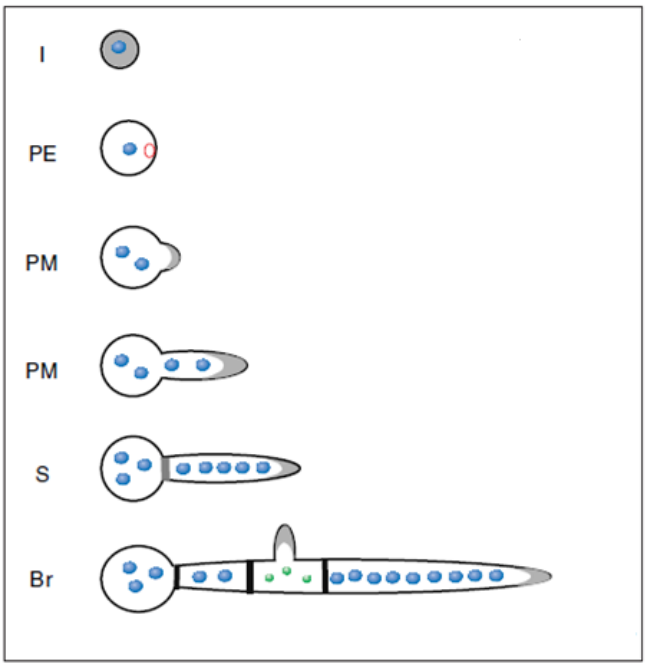
A produção de conídios é uma etapa crítica para o ciclo de vida de *A. fumigatus*, pois além de ser o principal meio de dispersão do fungo no ambiente, os conídios servem também como estrutura de resistência em situações de escassez de água e nutrientes (Osherov, 2009). Os conídios são cobertos por uma fina camada denominada *rodlet*, uma estrutura composta por hidrofobinas que formam uma rede organizada na superfície dos conídios. A presença de *rodlets* na superfície celular é uma característica exclusiva dos conídios, fornecendo a essas

células propriedade hidrofóbica, que permite sua eficiente dispersão pelas correntes aéreas no ambiente (Aimanianda et al., 2009; Osherov, 2009).

Após a dispersão no ambiente e ao encontrar um substrato adequado, os conídios de *A. fumigatus* iniciam o processo de germinação. Essa germinação é iniciada pela presença de água, oxigênio e fontes de carbono, fosfato e nitrato (Taubitz et al. 2007). Dessa forma, os conídios de *A. fumigatus* captam a múltiplos estímulos do ambiente, ativando diversas vias intracelulares, iniciando ou não o processo de germinação. Além disso, já foi observado em cultura que concentrações elevadas de conídios induzem uma menor taxa de germinação. Isso pode ser uma estratégia vantajosa na medida em que garante a sobrevivência do fungo em condições ambientais desfavoráveis de limitação nutricional (Osherov, 2009).

Uma vez iniciado o processo de germinação, a morfogênese do *A. fumigatus* se dá nas seguintes etapas: primeiro os conídios passam por uma fase de crescimento isotrópico, denominada *swelling* (fase de hidratação do conídio). Após o *swelling*, os conídios passam pela primeira divisão mitótica. Ocorre então a formação de um eixo de polaridade. Sabe-se que após a primeira divisão mitótica, mais de 90% das células encontram-se polarizadas (Momany e Taylor, 2000). Estas células polarizadas se desenvolvem em tubos germinativos e o eixo de polaridade mantém-se enquanto o tubo germinativo cresce de forma apical. Após aproximadamente três mitoses, é formado o primeiro septo. Um segundo tubo germinativo emerge do esporo, a maioria das vezes em um ângulo de 45 graus com relação ao primeiro, em um arranjo bipolar. Estes tubos germinativos crescem até se tornarem hifas bem desenvolvidas, profusamente ramificadas, septadas, hialinas e multinucleadas. As hifas por sua vez podem formar conidióforos, reiniciando todo o ciclo (Rhodes et al., 2006). A morfogênese descrita acima está ilustrada na Figura 3.

Figura 3 – Morfogênese do gênero *aspergilli* (e outros fungos filamentosos) baseado no modelo do *Aspergillus nidulans*



Legenda: (I) Crescimento isotrópico (*swelling*); (PE) Estabelecimento da polaridade; (PM) Manutenção da polaridade; (S) Septação; (Br) Ramificação. As esferas azuis representam os núcleos em intérfase; as verdes, os núcleos em mitose.
Nota: As áreas sombreadas em cinza mostram áreas em crescimento apical.
Fonte: Adaptado de Momany, 2002.

1.3 **Patogênese e fatores de virulência de *A. fumigatus***

Alguns *aspergilli* são capazes de causar um espectro de doenças em humanos e outros animais, denominadas aspergiloses. Dentre as principais doenças desse espectro, destacam-se a aspergilose bronco-pulmonar alérgica (ABPA), o aspergiloma e a aspergilose invasiva, essa última, a forma mais grave dentre as aspergiloses (Denning, 1998; Latgé,1999). E, dentre as principais espécies do gênero, destaca-se o *A. fumigatus* como o principal agente etiológico (Alexopoulos et al., 1996; Latgé, 1999).

A principal porta de entrada e sítio de infecção do *A. fumigatus* é o trato respiratório. Outros sítios de infecção como a pele, os rins, olhos e trato gastrointestinal já foram descritos, porém, tais infecções são pouco frequentes (Denning, 1998; Dixon et al., 1989). O tipo de manifestação clínica, por sua vez, depende não somente de fatores relacionados ao fungo, mas principalmente de fatores relacionados com o estado imunológico do hospedeiro, bem como

da localização da infecção no trato respiratório do grau de invasão do micélio no organismo (Casadevall e Pirofski, 2007).

Após a inalação dos conídios, ocorre a deposição destas células nos bronquíolos ou nos espaços alveolares. Em indivíduos hígidos, os conídios que, porventura, não são eliminados pelas células ciliadas do trato respiratório, chegam aos alvéolos pulmonares e então são eliminados pelos macrófagos residentes. Os macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa celular do sistema imune inato contra os conídios do *A. fumigatus*. Eles são responsáveis pela fagocitose e morte dos conídios, bem como pelo início da resposta pró-inflamatória que irá recrutar os neutrófilos para o sítio da infecção. Os conídios que conseguem evadir da fagocitose e subsequente morte pelos macrófagos, germinam formando as hifas que se tornam alvos dos neutrófilos. Sabe-se ainda que a liberação de radicais livres pelo *burst* oxidativo dos neutrófilos é o mecanismo responsável pela eliminação das hifas do *A. fumigatus* (Philippe et al., 2003; Lessing et al., 2007; Dagenais e Keller, 2009).

Características ambientais tais como a habilidade de resistir a danos oxidativos, de crescer em condições extremas, de apresentar versatilidade nutricional e termotolerância contribuem não apenas para o sucesso do *A. fumigatus* como competidor ambiental, mas também para sua posição de destaque como patógeno oportunista (Tekaia e Latgé, 2005).

As características já apresentadas acima, somadas ao estado imune do hospedeiro conferem ao *A. fumigatus* papel de destaque entre outros microrganismos oportunistas por sua capacidade de causar uma variedade de manifestações clínicas em indivíduos com algum grau de imunossupressão. Desta forma, fica claro que não somente os fatores de virulência[4] do fungo são importantes para o sucesso da infecção causada pelo *A. fumigatus*, mas o estado imunológico do hospedeiro tem papel de destaque no sucesso dessa infecção. O papel do estado imunológico do hospedeiro e a fisiopatologia da aspergilose serão discutidos no tópico seguinte deste trabalho, sendo neste, destacados somente os fatores de virulência relacionados ao *A. fumigatus*.

Características do *A. fumigatus* tais como o pequeno tamanho dos conídios, a capacidade de resistir a danos oxidativos, de apresentar versatilidade nutricional e a elevada termotolerância, em conjunto, formam uma combinação de fatores de virulência quase exclusivos deste patógeno. Nenhuma outra espécie menos patogênica de *aspergilli* ou outro fungo patogênico apresenta tal combinação multifatorial. Em adição, destacam-se também os

[4] Fatores determinantes do patógeno capazes de causar dano direto ou indireto ao hospedeiro infectado (Casadeval, 2005).

pigmentos protetores e antioxidantes, o sistema de efluxo de toxinas, bem como as toxinas e proteases secretadas (Hohl e Feldmesser, 2007; Osherov, 2007).

A capacidade de multiplicação do *A. fumigatus* em temperaturas elevadas (37°C) permite ao fungo infectar mamíferos de forma mais eficiente. A termotolerância de *A. fumigatus* parece estar relacionada a modificações na sequência de aminoácidos de algumas enzimas, o que permitiria a termoestabilização das mesmas ou à expressão de proteínas protetoras conhecidas como proteínas de choque térmico (proteínas *heat shock*) (Araújo e Rodrigues, 2004).

Atualmente, sabe-se que o sítio de infecção do *A. fumigatus* no pulmão é um microambiente com baixa concentração de oxigênio, ou seja, hipóxia. Nesse contexto, alguns estudos têm focado na capacidade do *A. fumigatus* de se adaptar em ambientes de hipóxia. Gral *et al.*, (2011) demonstraram que *A. fumigatus* é capaz de realizar processos de fermentação alcoólica em microambientes de hipóxia durante a infecção em modelos murinos de aspergilose invasiva. A capacidade do *A. fumigatus* não só de sobreviver, mas como ser bem-sucedido em ambientes com concentrações limítrofes de oxigênio fornece um mecanismo biológico pelo qual o fungo pode se adaptar a diferentes ambientes isquêmicos (Hsu, et al., 2013).

O *A. fumigatus*, assim como outros fungos patogênicos, possui mecanismos de defesa para resistir a danos oxidativos. A melanina dihidroxinaftaleno e as hidrofobinas, presentes na superfície de conídios de *A. fumigatus*, são barreiras físicas de proteção à resposta oxidativa produzida por células do sistema imune inato. Outro mecanismo de defesa ao estresse oxidativo é o sistema de detoxificação das espécies reativas de oxigênio, composto por enzimas como as catalases, peroxidases e superóxido dismutases (Jahn et al., 2000; Langfelder et al., 2003).

O *A. fumigatus* possui ainda um sistema de bombas de efluxo do tipo *ATP-binding cassete transporters* (transportadores ABC). O fungo utiliza esse sistema para facilitar a expulsão de moléculas tóxicas que possam, eventualmente, entrar em contato com a célula. No ambiente, tal sistema é útil para eliminar componentes tóxicos secretados por micro-organismos competidores no solo (Tekaya e Latgé, 2005). Quando em um processo infeccioso, o sistema ABC está envolvido na resistência do *A. fumigatus* aos antifúngicos, bem como na desintoxicação de moléculas bioativas da resposta imune do hospedeiro (Osherov, 2007).

Alguns autores afirmam que a virulência de *A. fumigatus* está relacionada à liberação de toxinas pelos conídios que, dentre outras funções, poderiam prevenir a fagocitose dos

mesmos. A fumigaclavina, por exemplo, é um metabólito alcalino inibidor da síntese de DNA e da ativação, proliferação e adesão de linfócitos T (Bertout, 2006). Outras toxinas são liberadas pelas hifas de *A. fumigatus*, ressaltando-se a gliotoxina e as ribotoxinas. A gliotoxina apresenta efeitos imunossupressores pleiotrópicos tais como a interferência nas funções fagocíticas (quimiotaxia, fagocitose e *burst* oxidativo) (Tsunawaki et al., 2004), inibição da NF-κB (Choi et al., 2007), e indução de apoptose em células mononucleares, macrófagos e células polimorfonucleares (PMNs) (Suen et al., 2001). Além disso, a gliotoxina foi descrita como potencial mediador a atividade anti-angiogênica (Ben-Ami et al., 2009). A gliotoxina é o metabólito secundário que, dentre as toxinas, é melhor caracterizada e apresenta a maior toxicidade em *A. fumigatus* (Reeves *et al*., 2004; Schulz *et al*., 2004).

As ribotoxinas, por sua vez, atuam inativando a ação dos ribossomos nas células do hospedeiro. Dentre elas destaca-se a Aspf1, uma proteína de 18 kDa secretada pelo fungo. Sua classificação como fator de virulência está relacionada ao seu possível papel na atividade citotóxica durante a aspergilose invasiva (Kao e Davies, 1999).

A invasão do epitélio pulmonar por hifas de *A. fumigatus* é a primeira etapa para o estabelecimento da doença infecciosa. Dessa forma, *A. fumigatus* parece secretar enzimas com atividade elastinolítica e colagenolítica que atuariam na invasão da barreira epitelial pulmonar, que é rica em colágeno e elastina (Monod *et al*., 2000). Cada vez mais a adesão dos patógenos a células endoteliais e epiteliais, bem como os eventos decorrentes dessa interação (produção de citocinas, processo inflamatório e expressão de moléculas de adesão), têm sido estudados em infecções fúngicas invasivas (Filler e Sheppard, 2006).

A primeira proteína descrita como adesina e relacionada como fator de virulência em *A. fumigatus* foi a hidrofobina RodA, presente nos conídios desse fungo. Essa proteína estaria envolvida na adesão ao colágeno e à albumina. As hidrofobinas, de modo geral, tem um papel importante na interação do *A. fumigatus* com o hospedeiro, pois atuam mascarando β-1,3-glucana e impedindo, consequentemente, seu reconhecimento pelas células do sistema imune (Aimanianda et al., 2009). Sabe-se ainda que a α-(1,3)-glucana é essencial para a virulência de *A. fumigatus*, uma vez que cepas mutantes para síntese desse carboidrato apresentaram modificações estruturais significativas na parede celular dos conídios e, foram menos virulentas em modelo murino de aspergilose invasiva (Beauvais et al., 2013).

Apesar das recentes descobertas a respeito dos mecanismos de adesão deste fungo à célula hospedeira ainda há muitos desafios a serem suplantados. Atualmente, acredita-se que os carboidratos da superfície celular do *A. fumigatus* sejam as principais moléculas envolvidas

neste processo. Entretanto, complexidade da composição e da organização estrutural da parede celular fúngica faz com que o entendimento destes processos seja lento e trabalhoso.

Estudos recentes têm sugerido o envolvimento de dois polímeros de carboidratos, a GAG e a galactomanana (GM), nos processos de adesão do *A. fumigatus* ao hospedeiro. Ambos os polissacarídeos são constituintes da Matriz Extracelular (MEC) produzida por este fungo e estão associados à sua capacidade de formar biofilmes. Atualmente, a GAG é considerada um fator de virulência de *A. fumigatus* por sua capacidade de modulação da resposta imune (Lousserte et al., 2010; Fontaine et al., 2011; Sheppard, 2011; Gravelat et al., 2013; Beauvais et al., 2014; Gresnigt, et al., 2014).

Devido a sua relevância no presente trabalho, os mecanismos da interação de *A. fumigatus* a células do hospedeiro e o papel desta interação na fisiopatologia da aspergilose invasiva, bem como as características e os principais componentes da parece celular de *A. fumigatus* serão contemplados com maior riqueza de detalhes nos tópicos seguintes.

1.4 **Fisiopatologia da aspergilose invasiva**

Como citado anteriormente, a fisiopatologia da aspergilose invasiva é diretamente dependente do estado imune do hospedeiro (Denning, 1998; Latgé,1999). Em geral, a capacidade de adesão, colonização, disseminação e imunomodulação, em conjunto, favorecem o estabelecimento e agravamento das infecções fúngicas (Casadevall e Pirofski, 1999). Como visto no tópico anterior, os fatores de virulência auxiliam em todos estes processos. Assim, as aspergiloses são resultado não apenas do potencial de virulência do *A. fumigatus*, mas também e principalmente do estado imunológico do hospedeiro (Casadeval e Pirofski, 2003).

Casadeval e Pirofski (2003) denominaram "*damage-response framework*" a relação entre fatores de virulência do patógeno e o estado imune do hospedeiro na patogênese e virulência de um micro-organismo, redefinindo o conceito de doença. A Figura 4 ilustra a relação entre a resposta imune do hospedeiro e o tipo de aspergilose causada por *A. fumigatus*.

Em indivíduos hígidos, a inalação de conídios de *A. fumigatus* normalmente não é causa de doença e não gera efeito nocivo à saúde do indivíduo. Nesse cenário, macrófagos alveolares residentes fagocitam os conídios de *A. fumigatus* e produzem espécies reativas de oxigênio NADPH-dependentes, gerando dano e destruindo os conídios. Ademais, os

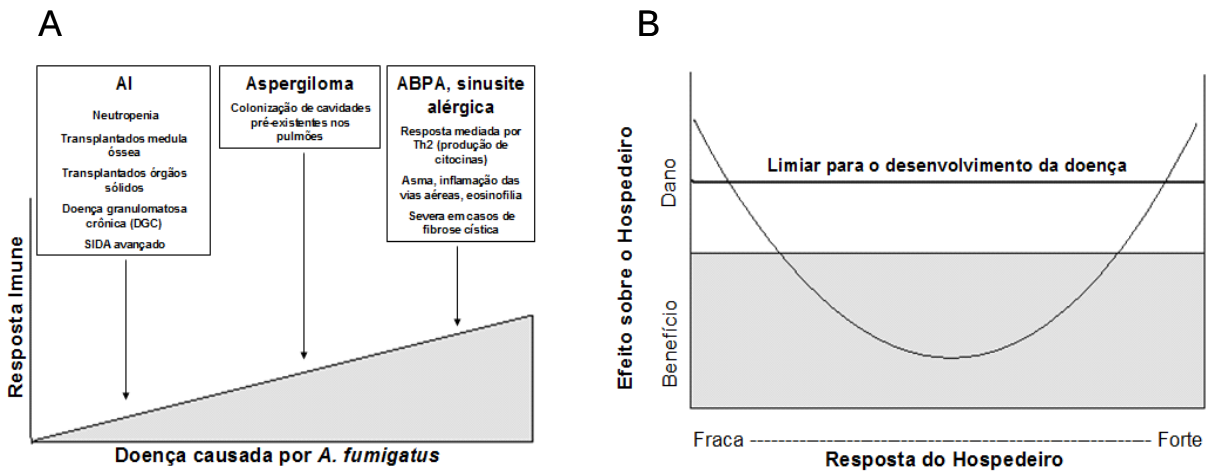
macrófagos são capazes de recrutar PMNs para os pulmões. Dentre estas células, os neutrófilos têm papel de destaque agregando-se às hifas e conídios, liberando seus conteúdos granulares para causar danos às células fúngicas, e liberar filamentos de DNA, formando as *NETs* (*Neutrophil Extracellular Traps* – armadilhas extracelulares de neutrófilos), redes fibrosas formadas de DNA capazes de envolver as hifas, na tentativa de conter o crescimento das mesmas (Phillipe, et al., 2003; Bruns et al., 2010).

Em pacientes com algum grau de imunossupressão, o espectro da aspergilose pode variar de hipersensibilidade ao patógeno até a forma mais grave da doença, a aspergilose invasiva. O desenvolvimento dos diferentes tipos de aspergilose em relação ao estado imune do hospedeito está ilustrado na Figura 4.

Em indivíduos com alguma alteração nas funções pulmonares, como hipersensibilidade, asma e fibrose cística, o *A. fumigatus* pode causar a ABPA (Figura 4) (Stevens, 2008; Zmeili e Soubani, 2007). Nos pacientes com cavidades ou lesões pré-existentes[5] nos pulmões, a forma mais comum da doença é o aspergiloma (Figura 4). O aspergiloma, também conhecido como "bola fúngica", é caracterizado por uma massa de hifas, fibrina, muco e detritos celulares. O aspergiloma geralmente é benigno, se circunscrito a uma cavidade, mas pode ocorrer invasão, irritação do tecido pulmonar adjacente ou reações inflamatórias e alérgicas, que podem levar à hemorragia e/ou ter consequências fatais irritação do tecido pulmonar adjacente ou reações inflamatórias e alérgicas, que podem levar à hemorragia e/ou ter consequências fatais (Stevens, 2009; Zmeili e Soubani, 2007).

[5] Cavidades pré-existentes ocorrem normalmente em pacientes que tiveram tuberculose ou pacientes com sarcoidose (Stevens, 2009).

Figura 4 – Representação das aspergiloses em função da resposta imune do hospedeiro.



Legenda: (A) Gráfico mostrando relação entre a resposta imune do hospedeiro e o tipo de doença causada por A. fumigatus; (B) Curva de resposta do hospedeiro ao dano causado pelo patógeno (damage-response framework); AI = aspergilose invasiva; SIDA = síndrome da imunodeficiência humana; ABPA = aspergilose bronco-pulmonar alérgica; Th2 = linfócitos T helper do tipo 2.

Nota: O dano ao hospedeiro pode ser representado em função da resposta à infecção, que varia de acordo com o estado imunológico.

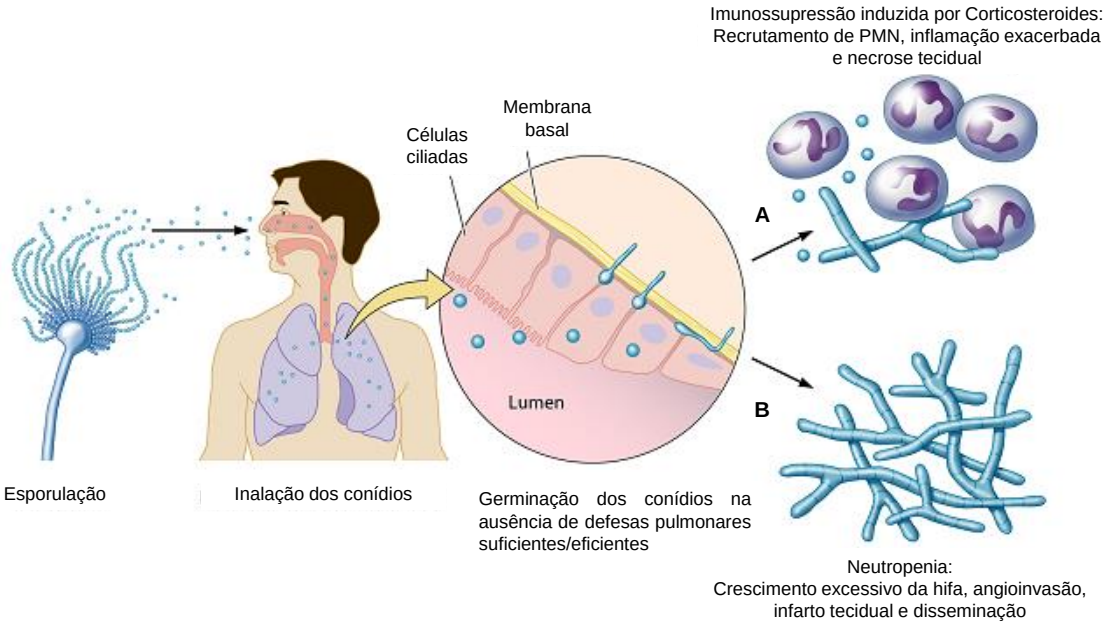
Fonte: (A) adaptado de Segal & Walsh, 2006; (B) adaptado de Casadevall e Pirofki 2003.

Quando as células fagocíticas do hospedeiro estão debilitadas em número ou função, por consequência da terapia quimioterápica citotóxica ou pelo tratamento com altas doses de corticosteroides, respectivamente, (ambos amplamente utilizados no tratamento de malignidades hematológicas) esta linha de defesa é completamente suprimida, tornando o hospedeiro susceptível à infecção invasiva (Ben-Ami, 2013).

Estudos histopatológicos com modelos animais mostram diferenças significativas na fisiopatologia da aspergilose invasiva, em pacientes neutropênicos e não neutropênicos, tanto em relação ao padrão de invasão fúngica quanto ao padrão de resposta inflamatória do hospedeiro (Balloy et al., 2005; Dagenais e Keller, 2009; Bem-Ami, 2013). A Figura 5 ilustra as diferenças na fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos e não neutropênicos.

A utilização de corticosteroides tem consequências importantes para as células fagocíticas, incluindo o comprometimento da fagocitose, o *burst* oxidativo, a produção de citocinas, quimiocinas e migração celular. Vários são os estudos que demonstram que corticosteroides prejudicam a capacidade funcional de fagócitos para matar conídios de *A. fumigatus*. Nesse contexto, em pacientes não neutropênicos a fisiopatologia da aspergilose invasiva tem caráter não angioinvasivo (Figura 5A). Os conídios inalados germinam e formam as hifas, mas o crescimento é limitado. A infecção é caracterizada por infiltrados granulomatosos, necrose tecidual e inflamação excessiva.

Figura 5 – Fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos e não-neutropênicos.



Legenda: (A) Fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes não neutropênicos; (B) Fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos; PMN = células polimorfonucleares.

Nota: (A) A fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes não neutropênicos é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos (PMN), inflamação exacerbada devido aos infiltrados granulomatosos, com consequente necrose tecidual; (B) A fisiopatologia da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos é caracterizada pelo crescimento exacerbado das hifas, angioinvasão, infarto tecidual e disseminação dos fragmentos das hifas, podendo levar à doença sistêmica.

Fonte: Adaptado de Dagenais e Keller, 2009.

Apesar dos efeitos dos esteroides na funcionalidade das células fagocíticas, os neutrófilos são recrutados para o pulmão na tentativa de evitar a invasão de hifas, entretanto, essa manobra cria um ambiente inflamatório que resulta em lesão tecidual. Esta resposta inflamatória exacerbada é geralmente considerada a principal causa de morte do paciente, em contraste com o observado em pacientes neutropênicos, onde o crescimento do fungo é descontrolado levando à infecção sistêmica.

Em pacientes com neutropenia profunda e prolongada (Figura 5B), os conídios aderem às células epiteliais dos pulmões e são endocitados pelas mesmas. Já foi descrito que conídios e hifas de *A. fumigatus* são capazes de induzir a formação de pseudópodes por pneumócitos tipo II. Os conídios, ao serem endocitados permanecem nos lisossomos e endossomos dessas células epiteliais podendo germinar dentro das mesmas (Paris et al., 1997; Wasylnka e Moore, 2003). Durante esse processo, os conídios vivos estimulam a expressão de TNF-α pelos pneumócitos, levando à inibição da apoptose das células epiteliais (Berkova, 2006). Esse mecanismo de evasão do fungo pode, portanto, contribuir para sua virulência. Uma vez que

escapam das células epiteliais dos pulmões, os conídios germinam e formam hifas que crescem de forma exacerbada e apresentam tropismo pelos vasos sanguíneos. Essas hifas angioinvasivas aderem e invadem a superfície abluminal do endotélio. Ao atingir a luz dos vasos sanguíneos, fragmentos de hifas se disseminam pela corrente sanguínea, atingindo diferentes pontos da face luminal do endotélio. Nesse momento as hifas aderem e atravessam o endotélio vascular, alcançando novos tecidos. Esses eventos estão ilustrados detalhadamente na Figura 6 e são responsáveis pela disseminação hematogênica do fungo, processo que caracteriza a infecção sistêmica e leva a injúria, dano celular, e eventos pró-trombóticos no endotélio. Por fim, a morte de pacientes com aspergilose invasiva decorre do infarto tecidual e falência dos órgãos vitais (Lopes-Bezerra e Filler, 2004; Filler e Sheppard, 2006; Kamai et al., 2006).

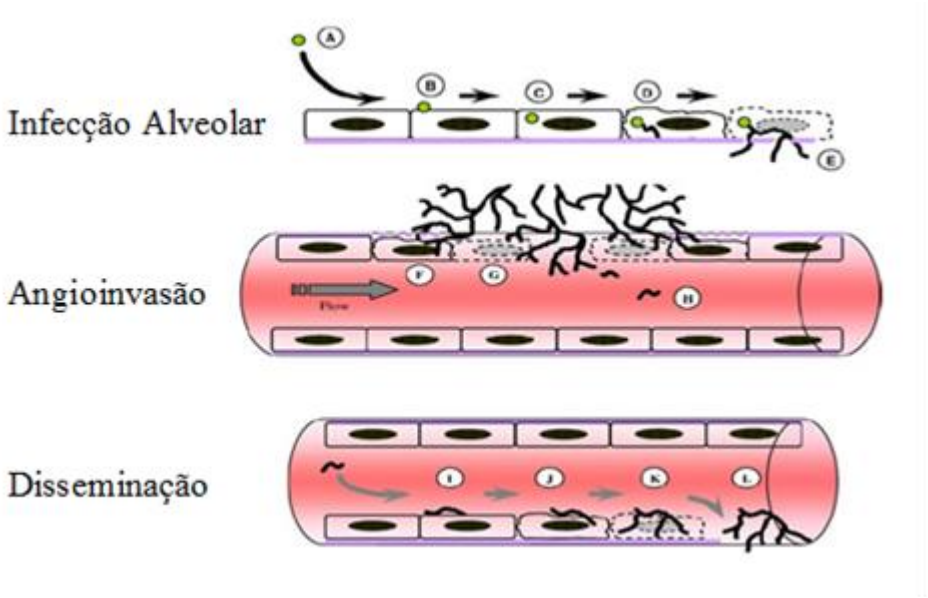
Apesar de alguns mecanismos envolvidos na interação de *A. fumigatus* com células endoteliais já terem sido descritos em outros trabalhos, ainda não se sabe quais receptores nestas células hospedeiras e quais moléculas da superfície celular do fungo podem estar envolvidos nesse processo.

Em adição, já foi demonstrado que o sítio de infecção tecidual causado por *A. fumigatus* é um ambiente de hipóxia. Utilizando cloridrato de pimonidazol[6], Grahl et al. (2011) confirmaram o microambiente de hipóxia em diferentes modelos murinos de aspergilose invasiva *in vivo*. Os mecanismos responsáveis pela criação do ambiente de hipóxia diferem de acordo com o tipo de imunossupressão. Os autores hipotetizam que, no modelo neutropênico de aspergilose invasiva (quimioterapia), a angioinvasão e a trombose intravascular precipitam o infarto tecidual, sendo a causa da hipóxia. Em contraste, em modelos com camundongos tratados com corticosteroides ou com doença granulomatosa crônica, onde a resposta imune desregulada é a principal causa do dano tecidual, a hipóxia é causada pela infiltração excessiva de PMNs no tecido.

Esses dados demonstram a complexidade e a dinamicidade da interação entre o *A. fumigatus.* Destacamos aqui as células endoteliais. Como foco do presente trabalho, a interação entre *A. fumigatus* e o hospedeiro será explorada com maior riqueza de detalhes no tópico a seguir.

[6] Substância que se liga com o grupo tiol de proteínas peptídeos e aminoácidos especificamente em células hipóxicas (Varia et al., 1998).

Figura 6 – Adesão e invasão do endotélio vascular por *A. fumigatus.*



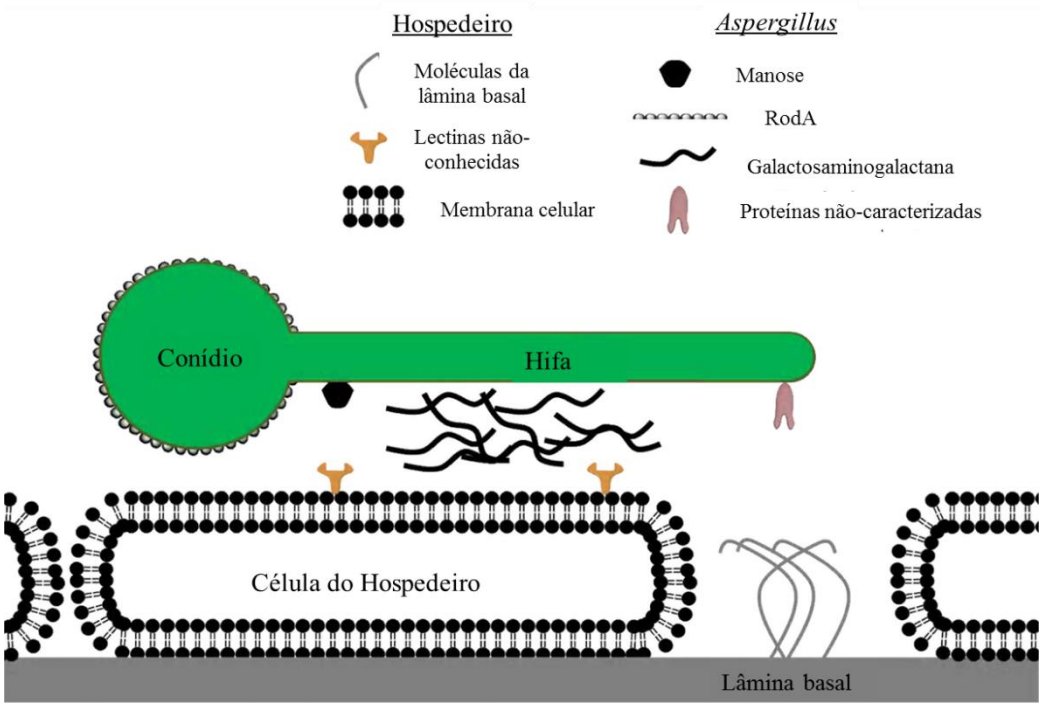
Legenda: (A) Inalação; (B) Adesão epitelial; (C) Endocitose; (D) Germinação; (E) Escape; (F) Penetração no endotélio abluminal; (G) Indução ao dano celular; (H) Disseminação hematogênica; (I) Adesão ao endotélio luminal; (J) Invasão; (K) Dano celular; (L) Invasão extravascular.
Fonte: Adaptado de Filler e Sheppard, 2006.

1.5 **Aspectos celulares e moleculares da interação fungo-hospedeiro**

1.5.1 A superfície celular do *A. fumigatus*

De modo geral, a adesão de microrganismos ao hospedeiro (célula ou tecido) é um evento chave na patogênese de doenças infecciosas. Assim como em outros fungos, a parede celular do A. fumigatus atua como um reservatório de moléculas efetoras, tais como antígenos e enzimas, que possuem papéis importantes no curso da infecção (Beauvais et al., 2014). Ademais, as enzimas biossintéticas encontradas na parede celular representam alvos exclusivos de drogas, como as equinocandinas, drogas inibidoras da síntese de β-(1,3)-glucana. Dessa forma, essa estrutura dinâmica e complexa ganha destaque como o ponto chave na interação deste patógeno com células hospedeiras, como ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Modelo da interação de moléculas da superfície do *A. fumigatus* com o hospedeiro.

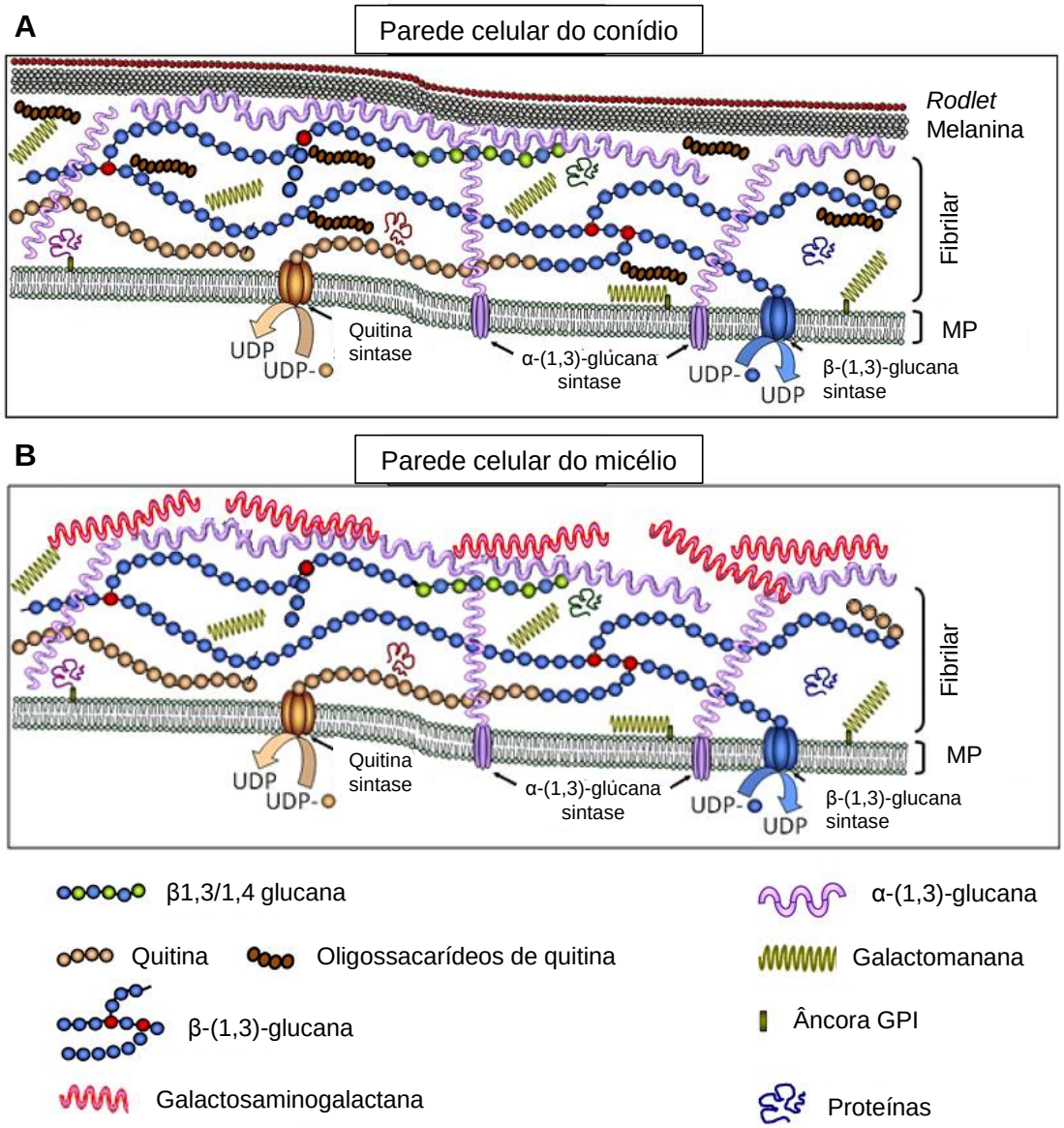


Nota: Estão representadas moléculas conhecidas e/ou suspeitas de estarem envolvidas na adesão desse micro-organismo às células e moléculas do hospedeiro. A lâmina basal inclui componentes como colágeno IV, fibronectina e laminina.
Fonte: Adaptado de Sheppard, 2011.

Cerca de 90% da parede celular fúngica é composta por carboidratos, principalmente quitina, glucanas e outros glicoconjugados. Existem ainda, outras moléculas na parede celular do *A. fumigatus*, como pigmentos e proteínas. A parece celular, em geral, é formada por uma camada mais interna, fibrilar e álcali-insolúvel; e uma camada mais externa, amorfa e álcali-solúvel, ilustrada na Figura 8 (Bowman e Free, 2006; Latgé, 2010; Beauvais et al., 2014).

O core fibrilar álcali-insolúvel da parede celular do *A. fumigatus* é composto por polímeros de β-(1,3)-glucana (com aproximadamente 4% de ramificações do tipo β-1,6). A este polímero, estão covalentemente ligadas parte da quitina/quitosana, a β-(1,3)-/β-(1,4)-glucana e a galactomanana (GM). A GM é composta por uma estrutura central, um polímero de manose α-1,2/α-1,6 ligadas, com cadeias laterais oligossacarídicas de β (1,5) galactofuranose.

Figura 8 – Representação esquemática da parece celular do conídio e da hifa de *A. fumigatus*



Legenda: (A) Parede celular do conídio de *A. fumigatus*; (B) Parede celular do micélio de *A. fumigatus;* MP = membrana plasmática.
Fonte: Adaptado de Beauvais et al., 2014.

A fração mais externa, amorfa e álcali-solúvel, por sua vez, é composta por cadeias lineares de α-(1,3)-glucana (com 1% de ligações do tipo α-1,4), GM e galactosaminogalactana (GAG) (Gastebois et al., 2009; Latgé, 2010; Beauvais et al., 2014).

Os polissacarídeos descritos acima podem ou não ser comuns à parede celular de conídios e hifas de *A. fumigatus*. Entretanto, existem diferenças estruturais significativas entre a superfície celular desses morfotipos, tanto em relação à sua presença quanto em relação à

concentração e localização desses polissacarídeos. Além disso, como pode ser observado na Figura 8A, os conídios são cobertos por uma camada superficial de *rodlets* e melanina (Aimanianda et al., 2009; Sharon, 2009), que conferem hidrofobicidade e inércia imunológica ao conídio, esta última, evidenciada pela incapacidade do conídio de desencadear uma resposta inflamatórias significativa pelas células fagocíticas do hospedeiro (Beauvais et al., 2014).

Em contraste, a camada mais externa das hifas de *A. fumigatus* (Figura 8B) contém polímeros de GAG, molécula ausente na superfície do conídio e atualmente apontada como molécula chave na patogênese da aspergilose invasiva (Fontaine et al., 2000; Aimanianda et al., 2009; Loussert et al., 2010; Fontaine et al., 2011). A GAG é um polímero linear, heterogêneo, complexo, composto por resíduos de α-(1,4) galactopiranose e α-(1,4) *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) (Gastebois et al., 2009; Latgé, 2010).

Análises químicas mostraram que a GAG representa 2% do total de polissacarídeos da parede celular do *A. fumigatus*. Sua composição está descrita na Tabela 1 (Loussert et al., 2010). Quimicamente, a molécula de GAG pode ser dividida em duas frações: uma fração ureia-solúvel, a SGG; e uma fração insolúvel, a PGG. A proporção de galactose e GalNAc presente nas frações SGG e PGG são de 60/40 e 15/85, respectivamente. As frações SGG e PGG possuem estruturas similares, sendo suas principais diferenças o grau de polimerização dos oligossacarídeos de galactose e a presença em maior quantidade de GalNAc na fração PGG (2 a 3 vezes maior) (Fontaine et al., 2011).

Tabela 1 – Composição estrutural da molécula de GAG

	SGG	**PGG**
Galactose/GalNAc	60/40	15/85
Sequências de oligossacarídeos	Porcentagem relativa	
αGalNAc1-[4αGalNAc1-]$_n$ n>10	10	25
αGal1-[4αGal1-]$_n$ n>10	5	2
αGal1-[4αGalNAc1-]$_{2-10}$-αGal1-	10	40
αGalNAc1-[4αGal1-]$_{2-10}$αGal1-	30	10
αGal1-[4αGalNAc1-4αGal1]$_n$-4αGalNAc1-	45	23

Fonte: Adaptação de Loussert et al., 2010.

Na fração SGG os oligossacarídeos de galactose, de 2 a 10 resíduos, estão unidos por um único resíduo de GalNAc. Em contraste, na fração PGG, um resíduo de GalNAc ou poli resíduos de GalNAc estão unidos por um único resíduo de galactose (Tabela 1). Esses dados demonstram a heterogeneidade da molécula de GAG, característica que tem impacto direto nas propriedades físico-químicas da molécula (Fontaine et al., 2011).

A GAG foi descrita como tendo papel importante na virulência de *A. fumigatus* e como mediadora da adesão a diversos substratos do hospedeiro. A fração SGG dessa molécula possui papel imunossupressor e favorece o desenvolvimento da aspergilose invasiva por induzir a apoptose das células do sistema imune do hospedeiro (neutrófilos), e ainda, por mascarar a β-(1,3)-glucana, impedindo seu reconhecimento pelo receptor Dectina-1 (Fontaine et al., 2011; Gravelat et al., 2013).

Cepas deficientes na produção de GAG apresentaram virulência atenuada em modelos murinos de aspergilose invasiva (Gravelat et al., 2013). Além disso, estudos demonstram que a GAG favorece o crescimento fúngico durante a infecção (Fontaine et al., 2011), inibe a resposta protetora Th1/Treg e promove a resposta Th2 (Gravelat et al., 2013). O mecanismo pelo qual a GAG induz tal padrão de resposta anti-inflamatória se dá pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares de sangue periférico. A molécula de GAG é capaz de induzir a produção de um antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), que bloqueia toda a via de sinalização por IL-1. Em modelo murino de aspergilose invasiva, os autores demonstraram a indução de IL-1Ra *in vivo* pela GAG. Ademais, foi observado um aumento na susceptibilidade à aspergilose invasiva em camundongos selvagens, mas não em camundongos *knockout* para IL-1Ra (Gresnigt et al., 2014).

Fica claro, portanto, que a parede celular do *A. fumigatus* é uma estrutura de suma importância durante o desenvolvimento da infecção invasiva. A parede celular tem papel de destaque nas interações com o hospedeiro e não somente como um escudo protetor para o fungo, mas também e principalmente, contem fatores determinantes para o sucesso da infecção (Beauvais et al., 2014).

Tanto nos sítios das infecções causadas quanto na natureza sob substrato sólido, o *A. fumigatus* cresce como uma colônia caracterizada por camadas múltiplas de hifas multicelulares embebidas em uma MEC. Tal tipo de crescimento consiste na definição de biofilme: uma comunidade microbiana estrutural envolta em uma MEC (Beauvais e Latgé, 2015).

Análises *in vitro* demonstraram que, sob condições aéreas e estáticas, o micélio de *A. fumigatus* cresce na forma de biofilme, tal qual no aspergiloma. Nesse caso, a composição da MEC do biofilme é principalmente GM, GAG, α-(1,3)-glucana, melanina, antígenos proteicos e monossacarídeos. Os monossacarídeos e os antígenos proteicos compõem a menor porção da MEC, e dentre os antígenos destacam-se as enzimas catalase (catB), dipeptidil peptidase V (DppV) e a ribotoxina Aspf1 (Beauvais et al., 2007; Beauvais e Latgé, 2015).

As análises *in vivo* revelaram que a composição da MEC do biofilme de *A. fumigatus* é similar à composição descrita *in vitro*, contendo GM, GAG, α-(1,3)-glucana e melanina. Entretanto, em contraste com a composição *in vitro*, os principais antígenos catB, DppV e Aspf1 não foram detectados. O Quadro 1 indica a composição da MEC no biofilme de *A. fumigatus in vivo* e *in vitro*.

Quadro 1 – Composição da MEC de *A. fumigatus in vivo* e *in vitro*, em condições de crescimento de biofilme

	Aspergiloma	Aspergilose invasiva	Biofilme in vitro
Galactosaminogalactana	+	+	+
Galactomanana	+	+	+
α-(1,3)-glucana	+	-	+
Melanina	+	sem informação	+
Antígenos (DppV, CatB, AspF1)	-	-	+

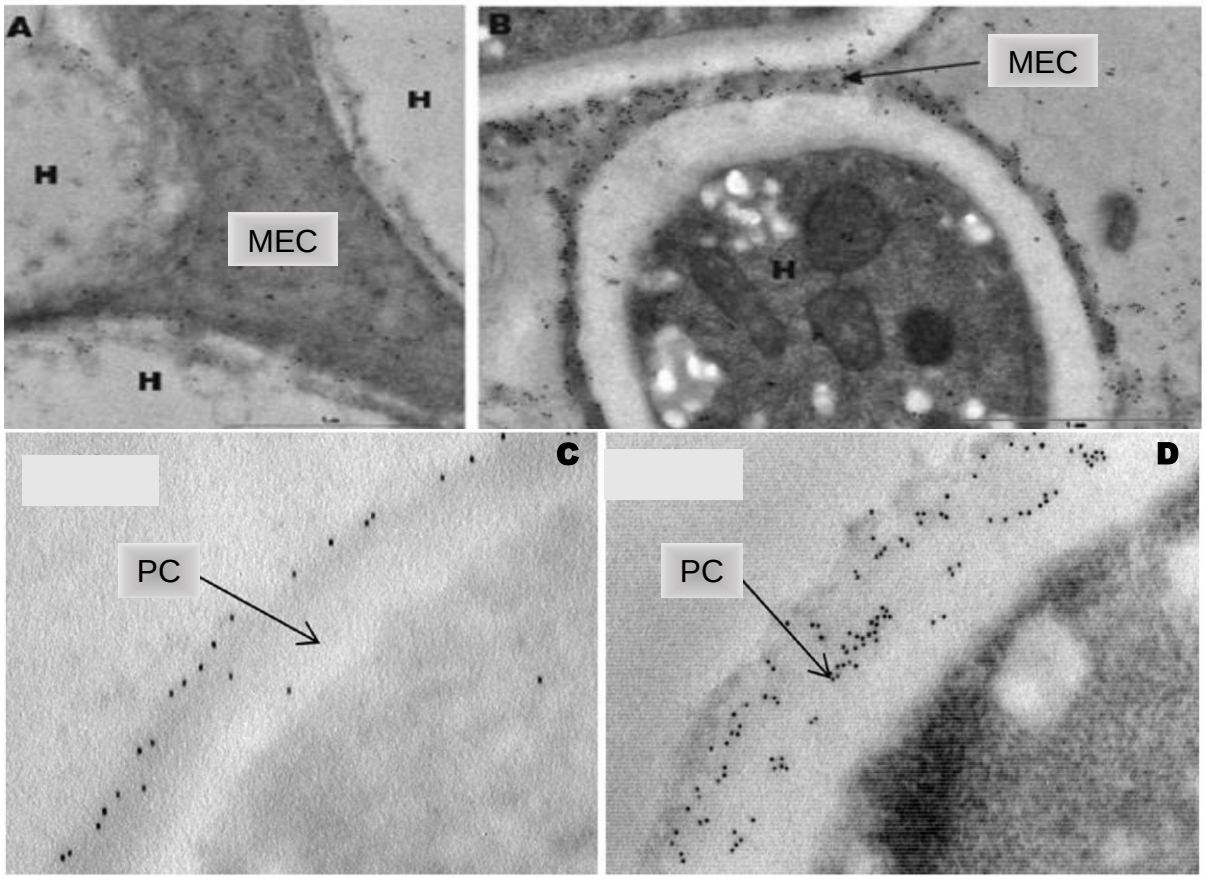
Fonte: Adaptado de Loussertet al., 2010 e Beauvais e Latgé, 2015.

A α-(1,3)-glucana é encontrada na superfície mais externa da MEC quando *A. fumigatus* é crescido em condições estáticas e aéreas, tal qual no aspergiloma (Figura 9C). Entretanto, quando cultivado submerso e sob agitação (planctônica), bem como no tecido pulmonar de camundongos com aspergilose invasiva, a α-(1,3)-glucana encontra-se nas camadas mais internas da parede celular (Figura 9D) (Loussertet al., 2010). Isso sugere que a α-(1,3)-glucana exerça uma importante função na aglomeração de hifas, como é o caso do crescimento do fungo em meio sólido *in vitro* ou no aspergiloma *in vivo*. No caso da aspergilose invasiva, uma infecção sistêmica e descentralizada, as hifas não formam um agregado, o que permite que seus fragmentos sejam disseminados pela corrente sanguínea.

O genoma do *A. fumigatus* apresenta somente um gene responsável pela transcrição da β-(1,3)-glucana sintase, o *Fks1* (Firon et al., 2002). Recentemente, estudos demonstraram que

a deleção desse gene na cepa mutante Δ*fks1* resultou em uma cepa totalmente desprovida de β-(1,3)-glucana. Uma vez que a β-(1,3)-glucana é a âncora pela qual a GM se liga covalentemente à parede celular, há redução significativa da incorporação de GM na parede celular do fungo. Adicionalmente, um aumento do conteúdo de GM foi observado nos sobrenadantes de cultura, sugerindo que a GM estaria sendo produzida, mas não necessariamente incorporada na parede celular do fungo. Neste mesmo estudo, foi observado um aumento no conteúdo de GalNAc na parede celular da mutante Δ*fks1* (Dichtl et al., 2014).

Figura 9 – Localização celular da α-(1,3)-glucana e GAG na parede celular de *A. fumigatus*.



Legenda: (A) Microscopia eletrônica com anticorpo monoclonal anti-GAG de hifas de A. fumigatus em modelo murinho de aspergiloma; : (B) Microscopia eletrônica com anticorpo monoclonal anti-GAG de hifas de A. fumigatus em modelo murinho de aspergilose invasiva; (C) Microscopia eletrônica com anticorpo monoclonal anti- α-(1,3)-glucana de hifas de A. fumigatus cultivadas sob condições estáticas e aéreas; (D) Microscopia eletrônica com anticorpo monoclonal anti- α-(1,3)-glucana de hifas de A. fumigatus cultivadas submersas e sob agitação; PC = parede celular
Fonte: Adaptado de Loussert et al., 2010 e Beauvais et al., 2014.

Os estudos aqui apresentados demonstram o nível de complexidade por trás da síntese e liberação dos polissacarídeos presentes na superfície celular do *A. fumigatus*. Cada vez mais, estes carboidratos vêm sendo apontados como moléculas chave na adesão e interação do

fungo com as células do hospedeiro. Portanto, maior destaque será dada ao papel dos carboidratos de parede de *A. fumigatus*, principalmente da GAG no tópico a seguir.

1.5.2 Qual o papel da GAG na interação *A.fumigatus*-hospedeiro?

Como dito anteriormente, a superfície celular é a primeira estrutura do fungo a entrar em contato com o hospedeiro. De modo geral, um dos principais eventos para o estabelecimento da doença infecciosa é a adesão do micro-organismo ao (s) tecido (s) do hospedeiro. Como defesa constitutiva, o hospedeiro apresenta barreiras físicas, como a pele e o epitélio de mucosas; proteínas com ação antimicrobianas, como as defensinas; receptores solúveis e opsoninas, como as colectinas e proteínas do sistema complemento e, receptores celulares de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares específicos do patógeno (PAMPs) (Romani, 2004; Van de Veerdonk et al., 2008). A presença desses PRRs em fagócitos inicia uma cascata intracelular que promove a ativação da resposta imunológica, que pode desencadear uma resposta específica contra o patógeno. Contudo, não apenas macrófagos e neutrófilos atuam na resposta imune inata contra fungos patogênicos. Células não fagocíticas, como células epiteliais e endoteliais, podem expressar PRRs, estando também envolvidas nesse processo (Liu et al., 2010).

Desta forma, a adesão do *A. fumigatus* ao hospedeiro é uma etapa crítica para a colonização e, principalmente, para o desenvolvimento da infecção invasiva (Sheppard, 2011). Neste trabalho, já foi citado que, após sua inalação, os conídios aderem rapidamente às células epiteliais pulmonares e aos macrófagos residentes, sendo internalizados e germinando dentro das células do hospedeiro (Campoli et al., 2011). Após a germinação, a hifa angioinvasiva permanece em contato direto com células epiteliais, endoteliais e com as células do sistema imune do hospedeiro. Esse contato íntimo induz dano tecidual e desencadeia a resposta inflamatória do hospedeiro (Lopes-Bezerra e Filler, 2004; Kamai et al, 2009; Gravelat et al., 2013)

O tecido endotelial compreende uma monocamada contínua de células que reveste a luz dos vasos sanguíneos de todo o sistema circulatório, desde o coração até os capilares mais delgados (Campbell e Campbell, 1983). Esse tecido reage a estímulos químicos e físicos (Simionescu, 1992; Michiels, 2003), é versátil, multifuncional e apresenta diversas

propriedades metabólicas, como regulação da homeostase, modulação da vasomotricidade, além da regulação de respostas imune e inflamatória (Sumpio et al., 2002). Adicionalmente, o tecido endotelial interage e estimula, de maneira parácrina e autócrina, outros tipos celulares, como células do tecido muscular e elementos sanguíneos, como plaquetas e glóbulos brancos. Entretanto, a manutenção da integridade estrutural e funcional deste tecido é essencial para o bom funcionamento dessas propriedades (Sumpio et al., 2002).

Sob condições basais, o endotélio mantém a homeostase regulando eventos como trombose, trombólise, adesão plaquetária, tônus vascular e fluxo sanguíneo. Essa regulação ocorre através da liberação de substâncias vasoativas, como óxido nítrico e prostaciclinas, que inibem a adesão plaquetária e causam vasodilatação. Esses mediadores, por sua vez, são liberados em resposta a variados estímulos químicos (ex.: trombina, bradicinina, ADP) e físicos (ex.: forças hemodinâmicas) (Sumpio, et al., 1993).

Quando estimulado, o endotélio varia de um fenótipo basal, para um estado ativado, caracterizado por um perfil pró-trombótico, proliferativo e vasoconstritor (Sumpio, et al., 1993). A ativação endotelial pode ser causada por uma série de doenças infecciosas e vasculares, que estimulam processos inflamatórios e pró-trombóticos, contribuindo significativamente na patogênese dessas doenças (Dejana et al., 2008). Esses estímulos pró-trombóticos estão diretamente envolvidos com o processo inflamatório, através da ação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-2, IFN-γ e fatores de crescimento tais como VEGF, MCP-1 e PDGF, que contribuem para a expressão de fator tecidual nas células endoteliais (Libby e Simon, 2001; Lopes-Bezerra e Filler, 2003).

O modelo de estudo da interação *Aspergillus*-HUVECs utilizando tubos germinativos (TGs) de *A. fumigatus* foi criado por Lopes-Bezerra e Filler (2004). Nesse estudo, os autores demonstraram que conídios de *A. fumigatus* são endocitados pelas HUVECs cerca de duas vezes mais que os TGs e que há um rearranjo dos microfilamentos de actina das células endoteliais durante o processo de endocitose. Os autores demonstraram ainda que o nível de ativação celular induzida pelo fungo nas HUVECs atinge seu ponto máximo após 16 horas de interação. Além disso, observaram que a injúria endotelial é diretamente dependente do contato fungo-endotélio e que, o nível injúria causada por tubos germinativos independe da viabilidade do fungo. Em contraste, a injúria causada por conídios está diretamente ligada à viabilidade dos mesmos.

Sabe-se que a resposta endotelial à infecção por *A. fumigatus* é polarizada e que tanto a invasão luminal quanto abluminal do endotélio pela hifa levam a ativação endotelial, que é mediada por TNF-α. Essa citocina leva a um estímulo autócrino e/ou parácrino, induzindo a

expressão de moléculas de adesão leucocitária, de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esse fenótipo pró-trombótico do endotélio após a interação com hifas de *A. fumigatus* pode caracterizar um mecanismo de defesa do hospedeiro que tenta, dessa forma, prevenir a disseminação hematogênica do fungo (Lopes-Bezerra e Filler, 2004; Chiang et al., 2008; Kamai et al., 2009).

Os primeiros indícios da participação de carboidratos nos processos de adesão de *A. fumigatus* as superfícies epiteliais surgiram com os estudos de Wasylnka e Moore (2000), quando foi observado que conídios deste fungo apresentam afinidade por domínios de ligação para glicosaminoglicanas presentes em moléculas de fibronectina. Além disso, este grupo também constatou que açúcares carregados negativamente eram capazes de inibir a ligação de conídios tanto à fibronectina quanto à lâmina basal de células epiteliais de pulmão.

Nesse contexto, a adesão da hifa angiogênica a constituintes do hospedeiro possui papel essencial na patogênese da aspergilose invasiva. Logo, as moléculas ligantes na superfície da hifa, evolvidas nessa adesão são moléculas chave para elucidar os mecanismos de patogênese do *A. fumigatus*, bem como desenvolver estratégias terapêuticas para reduzir a morbidade e a mortalidade da aspergilose invasiva.

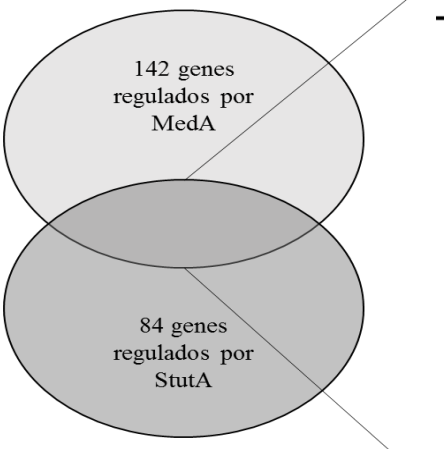
Os resíduos de galactofuranose são componentes essenciais de moléculas da parede celular do *A. fumigatus*, como a GM, polissacarídeo presente na MEC. Ademais, esses resíduos compõem glicoproteínas e moléculas de membrana celular como a lipofosfogalactomanana e glicoesfingolipídios. O gene *ugm1*, em *A. fumigatus*, codifica a enzima UDP-galactopiranose mutase, responsável pela conversão de resíduos de galactopiranose em galactofuranose. A cepa mutante Δ*ugm1* apresenta um fenótipo de hiperprodução de polímeros de GAG e ausência de qualquer polímero que contenha resíduos de galactofuranose, como a GM (Lamarre et al., 2009).

Dois outros genes foram descritos como envolvidos na síntese de carboidratos em *A. fumigatus*: os genes *StutA* e *MedA*, que interferem diretamente na síntese de GAG e GM. Estes genes codificam proteínas envolvidas na formação de biofilme e nos mecanismos de adesão de *A. fumigatus* a linhagem de células epiteliais pulmonares (Gravelat et al, 2010; Gravelat et al, 2013). A StutA é um fator de transcrição de desenvolvimento, enquanto a MedA tem papel regulatório nos mecanismos de adesão e formação de biofilme (Sheppard et al., 2005; Gravelat et al, 2010). Análise dos carboidratos das cepas mutantes Δ*StutA* e Δ*MedA* mostraram que ambas são incapazes de produzir GAG (Gravelat et al, 2013), contrastando com o fenótipo observado na cepa Δ*ugm1*, que é de hiperprodução de GAG (Lamarre et al., 2009).

Utilizando as cepas mutantes Δ*StutA* e Δ*MedA*, Gravetal et al., (2013) confirmaram o papel da GAG como a principal adesina de *A. fumigatus*. Tais mutantes apresentaram perfil hipo-aderente, mostrando-se incapazes de aderir a superfícies plásticas e substratos biológicos. Os autores demonstraram ainda que a adição de GAG exógena (fração SGG), isolada de sobrenadantes de cultura da cepa selvagem de *A. fumigatus*, resultou no aumento da capacidade de aderência de Δ*StutA* e Δ*MedA* de forma dose-dependente. Estes dados corroboram com o estudo de Lamarre et al., (2009) que demonstrou que a cepa Δ*ugm1*, que apresenta uma superexpressão GAG em sua superfície celular, possui perfil hiper-aderente a superfícies inertes (vidro e plástico) e a células epiteliais pulmonares.

StutA e MedA controlam a expressão de centenas de genes envolvidos ou não na síntese de GAG. Através de uma análise transcriptômica comparativa, Gravetal et al., (2013) identificaram 10 genes significativamente desregulados em ambos mutantes. Análises por RT-PCR em tempo real revelaram que, dentre outros, o gene *Afu3g07910*, designado *uge3*, tinha sua expressão reduzida em Δ*StutA* e Δ*MedA* (Figura 10). O gene *uge3* codifica uma UDP-glicose-4-epimerase (UGE), enzima que possui papel chave na biossíntese de galactose e galactosamina (Gravelat et al., 2013). O genoma do *A. fumigatus* possui ainda outras duas UGEs preditas, codificadas pelos genes *uge4* (Afu4g14090) e *uge5* (Afu5g10780) (Lee et al., 2014).

Figura 10 – Genes diferencialmente regulados em ΔStutA e ΔMedA

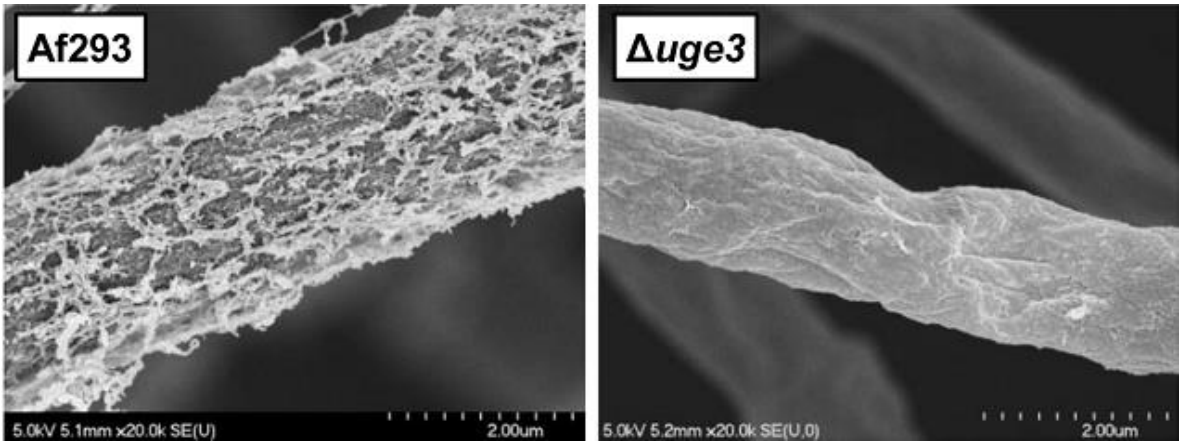


Lócus	Função da proteína identificada
Afu1g10390	Transportador multidrogas ABC
Afu1g14300	Família do domínio fascilina
Afu3g07870	Proteína extracelular rica em serina
Afu3g07910	**UDP-glicose-4-epimerase**
Afu4g12700	Proteína hipotética
Afu5g10950	Proteína hipotética
Afu6g00680	Proteína hipotética
Afu7g06780	Proteína hipotética
Afu8g00190	Citocromo P450
Afu8g00200	O-metiltransferase

Nota: Análise de *microarray* feita a partir do genoma total das cepas mutantes.
Fonte: Gravetal et al., 2013.

Nesse contexto, a cepa mutante para o gene *uge3*, Δ*uge3,* foi construída e, apresentou ausência total de GAG, por microscopia de varredura da superfície celular, bem como, da MEC, como ilustrado na Figura 11. Além disso, a Δ*uge3* apresentou um aumento nos níveis de GlcNAc e, especialmente, a Δ*uge3* não apresentou níveis detectáveis de GalNAc ou GAG na parede celular e no filtrado de cultura (Gravelat et al., 2013). Os autores demonstraram que a mutante Δ*uge3* foi incapaz de aderir a polímeros plásticos, células epiteliais e fibronectina. A deleção do gene *uge3* ainda bloqueou completamente a capacidade do *A. fumigatus* de aderir e causar injúria em células epiteliais pulmonares da linhagem A549. Ademais, a Δ*uge3* demonstrou virulência atenuada em modelo murino de aspergilose invasiva (Gravelat et al., 2013).

Figura 11 – Microscopia eletrônica das hifas das cepas AF293 e Δ*uge3*



Fonte: Adaptado de Gravetal et al., 2013.

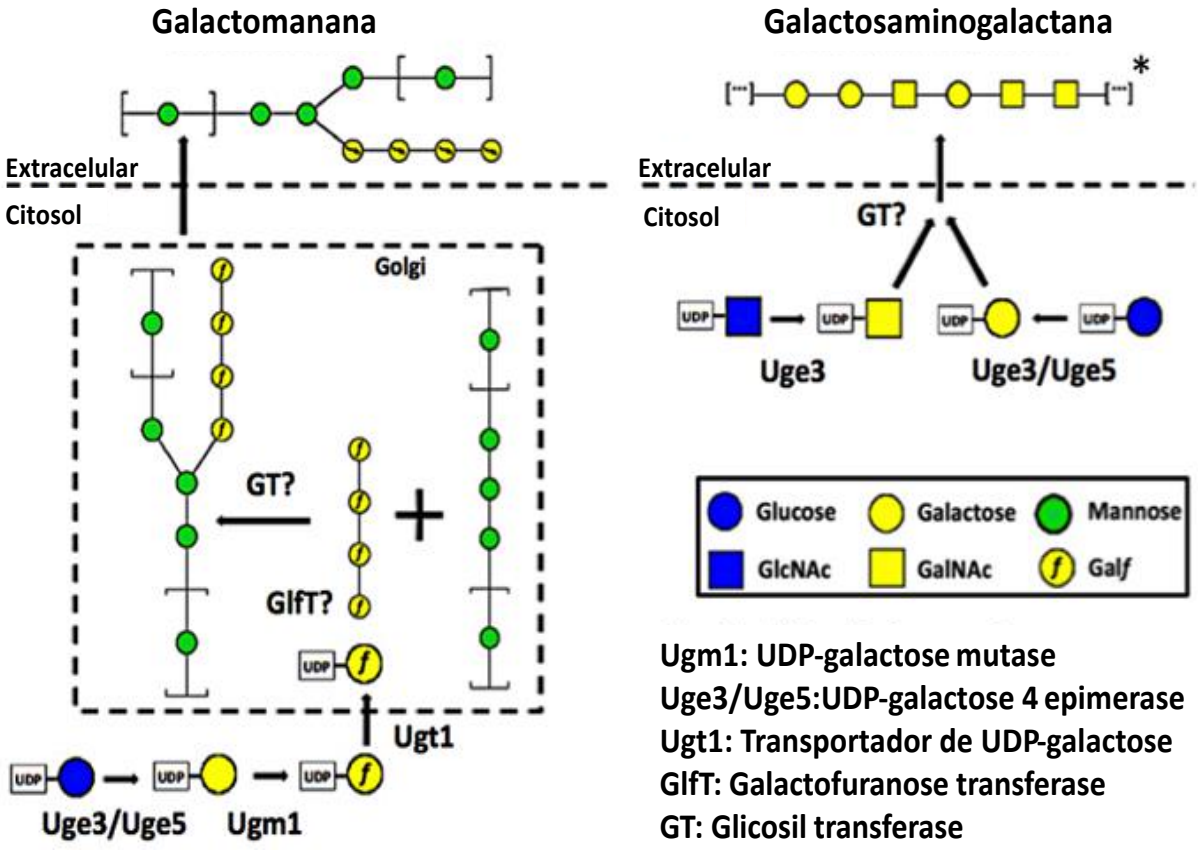
A UGE5 é a epimerase dominante em *A. fumigatus*, entretanto, tal enzima é essencial somente para a síntese de galactofuranose, componente da GM. A cepa mutante Δ*uge5* apresentou polímeros de GAG com conteúdo reduzido de galactose e ausência total de polímeros de GM. Em contraste, a deleção do gene *uge4* não resultou em nenhum fenótipo, não alterando o metabolismo da galactose ou a produção de GAG e GM (Lee et al., 2014).

Esses dados, em conjunto, evidenciam o papel da UGE3 como enzima mediadora da síntese de GalNAc e, consequentemente do polímero de GAG. Lee et al., (2014) demonstram que a UGE3 é uma epimerase de atividade dupla, sendo capaz de mediar a interconversão de UDP-GlcNAc a UDP-GalNAc, bem como de UDP-glicose a UDP-galactose.

Apesar da importância dos polímeros de GAG e GM na patogênese do *A. fumigatus*, os mecanismos envolvidos na síntese desses carboidratos são altamente complexos e precisam ser melhor elucidados. Os dados aqui apresentados ressaltam a importância da UGE3 no

metabolismo e síntese de GAG. Há ainda indícios do envolvimento de uma possível glicosil transferase (GT4C), na membrana celular de *A. fumigatus*, cuja função hipotética seria a síntese da GAG e a montagem da estrutura final na parede celular (Jean-Paul Latgé, comunicação pessoal), similar às enzimas de síntese de quitina e de β-1,3 glucana, todas enzimas localizadas na membrana plasmática. A cepa mutante para GT4C foi recentemente construída pelo grupo do Dr. Jean-Paul Latgé, no *Institut Pasteur* (França), estando os estudos com esta mutante em fases iniciais, dentre os quais o presente projeto. A Figura 12 ilustra uma representação esquemática das possíveis vias de síntese de GM e GAG, já incluindo esta glicosil transferase.

Figura 12 – Representação esquemática hipotética das vias de síntese de GM e GAG



Legenda: * a estrutura da GAG representa múltiplas combinações de potenciais combinações de galactose e GalNAc.
Fonte: Adaptado de Lee et al., 2014.

Trabalhos recentemente publicados por nosso grupo (Neves et al., 2016; Neves et al., 2017) demonstraram que a mutante que superexpressa a GAG na superfície celular, a Δ*ugm1,* parece modular a resposta endotelial nas HUVECs, aumentando a secreção de TNF-α e a transcrição de fator tecidual. Dados proteômicos destes trabalhos mostram que a Δ*ugm1* é

capaz de modular os níveis de proteínas em vias endoteliais relacionadas a resposta inflamatória mediada por TNF-α e de resposta ao estresse, tais como: coagulação sanguínea e resposta imune; resposta ao estresse e resposta ao desenovelamento de proteínas; processo apoptótico e resposta ao estresse. Outra via endotelial importante, que se mostrou alterada pela mutante Δ*ugm1*, foi a via de sinalização *14-3-3*, também regulada por TNF-α. Essa via de sinalização leva a ativação de ELK-1 e P73, dois fatores de transcrição diretamente relacionados à resposta inflamatória.

Neves e colaboradores (2016 E 2017) demonstraram ainda que a fração SGG purificada também é capaz de induzir maior secreção de TNF-α pelas HUVECs e de alterar vias coincidentes àquelas alteradas pela mutante Δ*ugm1*, dentre elas a via de sinalização *14-3-3*. Em conjunto, todas essas informações, enfatizam a complexidade dos eventos decorrentes da interação *Aspergillus*-endotélio e a importância dos polissacarídeos presentes na MEC do *A. fumigatus* nesse processo, em especial da molécula de GAG, corroborando com a literatura relacionada.

Cabe ressaltar que a que a fração SGG não reflete o comportamento e a complexidade da molécula completa de GAG. Nesse contexto, o presente trabalho visa dar continuidade a esta linha de pesquisa, a fim de desvendar o verdadeiro papel da molécula de GAG na interação com o endotélio e usa como estratégia, além da mutante Δ*ugm1* (que superexpressa GAG em sua superfície), cepas mutantes que não apresentam a GAG em sua superfície.

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo geral**

Elucidar os mecanismos de resposta endotelial que podem estar efetivamente relacionados a presença deste polissacarídeo GAG na parede celular de *A. fumigatus*, utilizando como estratégia o estudo de duas cepas mutantes que não o sintetizam, Δ*uge3* e Δ*gt4c*.

2.2 **Objetivos específicos**

Os objetivos específicos são:

a) avaliar a taxa de adesão e internalização de tubos germinativos das cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4c* de *A. fumigatus* pelas células endoteliais;
b) determinar o padrão de secreção de citocinas e/ou quimiocinas no meio condicionado de culturas de HUVECs interagidas com tubos germinativos das cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4c* e, comparar com as cepas selvagens (AF293 e *Ku80*) de *A. fumigatus*, bem como com a cepa mutante Δ*ugm1*;
c) realizar a análise proteômica da célula endotelial desafiada com as mutantes Δ*gt4c* e Δ*ugm1* e com a correspondente cepa selvagem *Ku80*;
d) correlacionar as vias e processos biológicos das HUVECs modulados pela cepa mutante (Δ*gt4c*) com o padrão de expressão de proteínas endoteliais obtido com a mutante Δ*ugm1*.

3 **ESTRATÉGIA METODOLÓGICA**

3.1 **Microrganismos utilizados**

Para desenvolver este estudo foram utilizadas 6 cepas de *A. fumigatus:* duas cepas selvagens (AF293 e *Ku80*); uma cepa mutante para o gene UGE3 (Δ*uge3*) e a cepa complementada para esse gene (Δ*uge3::*Δ*uge3*), cedidas pelo Dr. Don Sheppard *McGill University*, Canadá; uma cepa mutante para um gene que codifica a enzima glicosil transferase (*Δgt4c*) e uma cepa mutante para o gene UGM1 (*Δugm1*), cedidas pelo Dr. Jean-Paul Latgé, *Pasteur Institute*, França

A cepa selvagem AF293 tem seu genoma sequenciado e é uma cepa de referência de *A. fumigatus*. A cepa selvagem *Ku80* foi utilizada por ser o background genético dos mutantes *Δugm1* e Δ*gt4c* e ainda, por servir como um modelo comparativo com a cepa selvagem AF293. A cepa *Δugm1* foi escolhida por apresentar um fenótipo caracterizado pela maior expressão de GAG e por ter sido alvo recente de estudos em nosso grupo de pesquisa. A cepa *Δgt4c* foi escolhida por apresentar um fenótipo totalmente polarizado em relação a cepa *Δugm1*, caracterizado pela ausência de moléculas de GAG em sua superfície. Por fim, a cepa Δ*uge3* também foi escolhida com base em seu fenótipo caracterizado pela ausência de GAG em sua superfície, e a cepa complementada Δ*uge3*::Δ*uge3* foi utilizada como controle, para confirmar se as diferenças apresentadas pela cepa mutante são consequência da deleção do gene em questão. Os genes deletados de cada cepa mutante estão representados no Quadro 2.

Quadro 2 – Cepas mutantes utilizadas no estudo da interação de *A. fumigatus* com HUVECs

Mutantes	**Gene deletado**	***Background* genético**	**Função biológica**
Δ*uge3*	*UGE3* (Afu3g07910)	AF293	Transcrição da enzima UDP-glucose 4-epimerase
Δgt4c	GT4C	*Ku80*	Transcrição da enzima glicosil transferase
Δugm1	UGM1	*Ku80*	Transcrição da enzima UDP-galactopiranose mutase

Fonte: A autora, 2017.

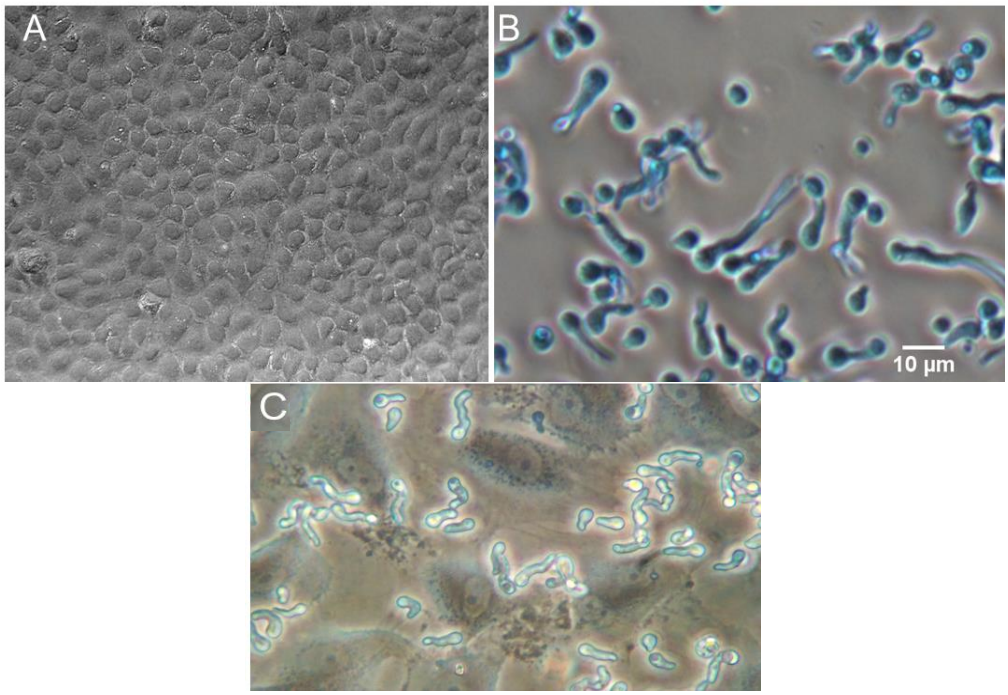
3.2 **Cultivo e obtenção dos tubos germinativos de *A. fumigatus***

As cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, foram cultivadas em placas de petri, em meio sólido Sabouraud (Difco). Primeiramente, após 7 dias de crescimento em meio sólido a 37ºC, os conídios foram extraídos das culturas de micélio, sob agitação suave, com solução de NaCl 0,15 M tamponada com fosfato 50 mM pH 7,4, com Tween 80 0,01% (v/v) (PBS-Tween), e isolados por centrifugação a 4000 g por 5 minutos, a 4ºC. Os conídios foram então lavados duas vezes com NaCl 0,15 M tamponada com fosfato 50 mM pH 7,4 (PBS). Posteriormente, os conídios foram suspensos em meio Sabouraud líquido para uma concentração final de 10^6 conídios/mL. Um volume total de 15 mL da suspensão de conídios foi incubado em placas de Petri de 150 mm previamente tratadas com gelatina 0,2 % (p/v) por 6 horas, a 37 ºC, sendo a diferenciação monitorada em microscópio invertido (Figura 13 B).

As cepas selvagens AF293 e *ku80* e a cepa complementada Δ*uge3*::Δ*uge3* apresentaram o mesmo perfil de germinação, entretanto, as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* apresentaram perfil não aderente à gelatina. O meio foi aspirado com pipeta pasteur estéril e os tubos germinativos (TGs) aderidos à placa de petri, foram lavadas com PBS. No caso das mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C*, o meio foi transferido para um tubo a parte, os TGs isolados por centrifugação a 4000 g por 5 minutos, a 4ºC e então lavados com PBS.

Para os ensaios de interação com TGs inviáveis, estas células foram incubadas com timerosal 0,02% (v/v) em salina tamponada por pelo menos 12 horas, a 4ºC. Nos ensaios com TGs viáveis, as células foram deixadas por 12 horas à 4ºC na presença de PBS glicose 0,2 % pH 7,4. Após esse período de incubação, os TGs foram lavados duas vezes com meio 199 (Gibco) puro. Os TGs das cepas selvagens AF293 e *ku80* foram primeiramente retirados da placa de petri com auxílio de um *cell scraper* e então lavados com meio 199 (Gibco) puro. Os TGs viáveis e inviáveis (tratados com timerosal) foram contados na câmara de Neubauer e suspensos em meio 199 (Gibco) completo para os ensaios de interação com monocamadas confluentes de HUVECs (Figura 13 A e C).

Figura 13 – Interação de TGs de *A. fumigatus* com HUVECs



Legenda: (A) Monocamadas confluentes de HUVECs. Aumento de 200x; (B) TGs da cepa AF293 obtidos a partir de conídios incubados por 6 horas em meio Sabouraud líquido. Corados com lactofenol azul de algodão. Aumento de 400x. (C) Microscopia de contraste de fase da interação de TGs da cepa AF293 com monocamadas confluentes de HUVECs. Aumento de 400x.
Fonte: Lopes-Bezerra, comunicação pessoal.

3.3 **Cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano**

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) foram isoladas seguindo-se o método descrito por Jaffe *et al*. (1973), modificado por Lopes-Bezerra e Filler (2004). Brevemente, os cordões umbilicais foram coletados semanalmente na Maternidade Carmela Dutra (aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro, número de protocolo 196/09) e após a coleta, uma cânula acoplada a uma seringa foi introduzida na veia umbilical de cada cordão umbilical. Feito isso, a veia foi lavada com PBS acrescido de 0,2% de glicose (p/v) e as células endoteliais foram isoladas a partir da incubação a 37ºC por 6 minutos em solução de colagenase IV 0,1% (p/v) (Sigma). As células endoteliais extraídas foram então suspensas em meio 199 (Gibco) puro e sedimentadas por centrifugação a 200 x g, durante 5 min a 25ºC. Por fim, o precipitado foi suspenso em meio 199 (Gibco) completo, e transferido para uma garrafa de cultura celular de 25 cm^2 (Corning), cuja superfície foi previamente recoberta com gelatina 0,2% (Sigma). As

culturas foram mantidas a 37 ºC em atmosfera com 5% CO^2, até a obtenção de monocamadas confluentes (culturas primárias - P0) (Figura 13A).

Para obtenção das subculturas de primeira (P1) e segunda passagem (P2), as culturas primárias em confluência foram tripsinizadas, utilizando-se 0,025% de tripsina e 0,2% EDTA (Gibco) em PBS. A reação de tripsinização foi paralisada com meio 199 (Gibco) completo. Desta forma as células endoteliais utilizadas nos experimentos de interação mantinham sua integridade fenotípica (Bachetti e Morbidelli, 2000). Todas as interações com células endoteliais foram realizadas na presença de meio 199 completo a 37ºC, e em atmosfera de 5% de CO_2.

3.4 **Viabilidade das células endoteliais após interação com *A. fumigatus***

A viabilidade das células endoteliais desafiadas com TGs de cada uma das cepas utilizadas nesse estudo foi determinada utilizando-se o ensaio de MTT (Denizot e Lang 1986). Brevemente, as HUVECs foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) até a confluência. Uma vez confluentes, as HUVECs foram desafiadas com $2x10^5$ TGs inviáveis por poço e incubadas por 16 horas a 37ºC, em atmosfera de 5% de CO^2. Após a interação com *A. fumigatus*, as células foram lavadas três vezes com meio 199 (Gibco) puro e então, incubadas com MTT 1mg/ml em meio 199 (Gibco) puro (300 µL/poço). Após incubação por 2 horas a 37ºC, em atmosfera de 5% de CO^2, o meio contendo MTT foi descartado. Em seguida adicionou-se 400 µL de isopropanol por poço, por 5 minutos a 25 °C. Alíquotas de 200 µL foram retiradas e transferidas para placas de 96 poços e a absorbância foi determinada a 595 nm em um leitor de placas. Como controle positivo, foi utilizado meio 199 (Gibco) acrescido de 1ng/ml de LPS. Cada experimento foi realizado com triplicata biológica e experimental.

3.5 **Ensaio de internalização e adesão de *A. fumigatus* às monocamadas endoteliais**

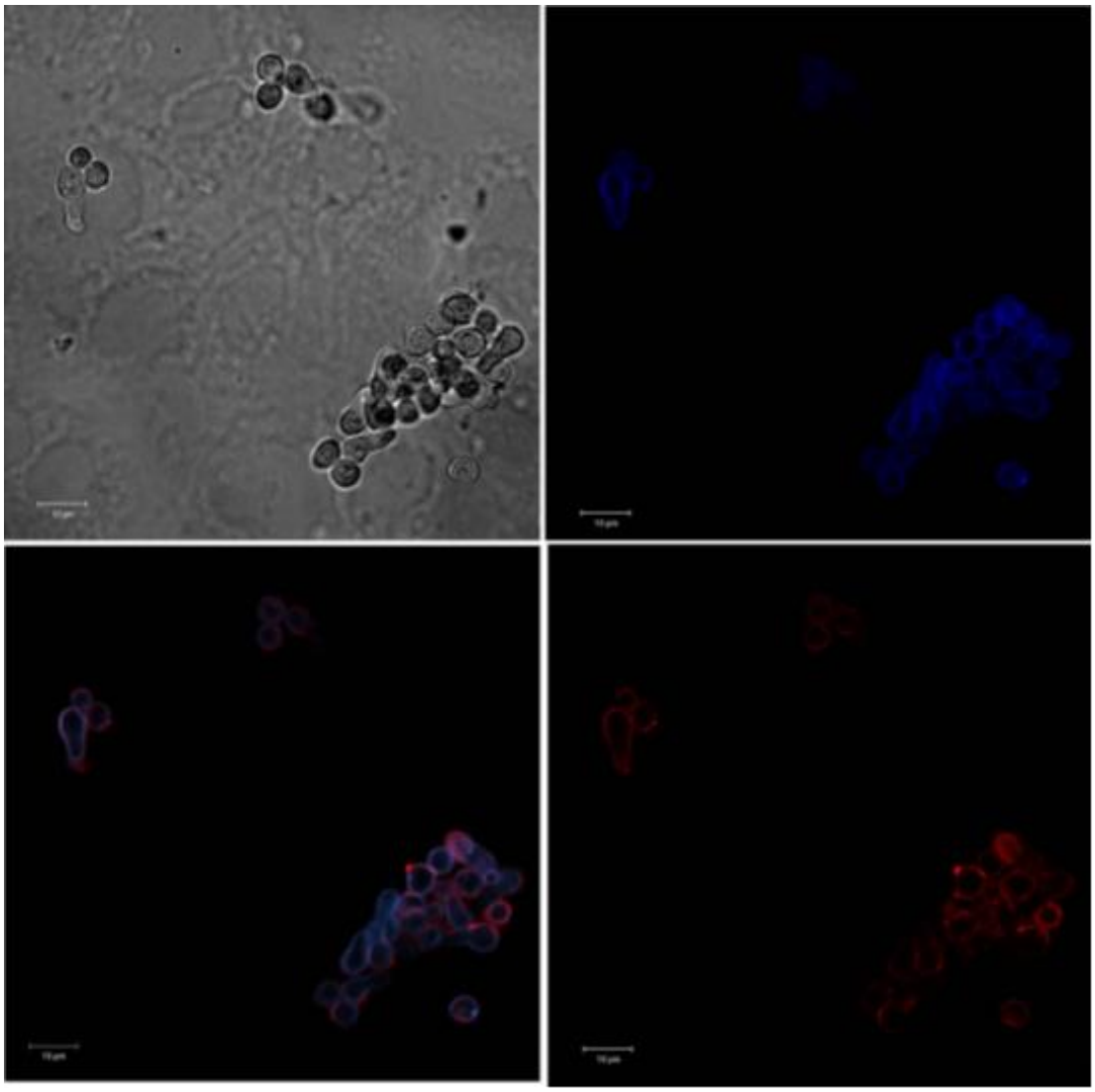
Para os ensaios de adesão e internalização, células endoteliais (P2) foram cultivadas sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro previamente tratadas com fibronectina

0,001% (v/v) em solução salina de HANK´S (Cultilab), em placas de cultura de 24 poços (Corning). Atingida a confluência, as monocamadas de células endoteliais foram infectadas TGs viáveis das 6 cepas de *A. fumigatus*, na concentração de 6 x 10^4 TGs por poço (Figura 14), e incubadas a 37ºC em atmosfera de 5% de CO^2 por 45 minutos, conforme descrito por Lopes-Bezerra e Filler (2004).

Após a interação das monocamadas de células endoteliais com as cepas listadas de *A. fumigatus*, o meio de cultura foi aspirado e as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 3% (p/v), sendo posteriormente lavadas uma vez com PBS pH 7,4 e incubadas com tampão de bloqueio (Soro de cabra 1% em solução salina) por 12 horas a 4ºC. O bloqueio das células foi seguido de incubação com soro policlonal de coelho anti-*A. fumigatus* (gentilmente cedido pelo Dr. Jean-Philippe Bouchara, *Université D'Angers*, France), na diluição de 1:100 em solução de BSA 1% em PBS pH 7,4 (PBS-BSA), por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as monocamadas foram lavadas três vezes com PBS-BSA e depois incubadas com anti-IgG de coelho conjugada a Alexa Flúor 568 (Molecular Probes) na concentração de 1µg/mL em PBS-BSA, por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Essa etapa foi realizada para marcar os micro-organismos não internalizados com fluorescência vermelha. Posteriormente, as células endoteliais foram lavadas com solução de PBS-BSA e permeabilizadas por 6 minutos com solução de Triton X-100 0,1% (v/v) em PBS pH 7,4. Após nova etapa de lavagem com PBS pH 7,4, as lamínulas foram incubadas com solução de Uvitex 1% (p/v) em PBS pH 7,4 por 30 minutos, no escuro. Dessa forma, tanto os organismos internalizados quanto os não internalizados foram marcados com fluorescência azul (Figura 14).

Após a marcação com os fluorocromos, as lamínulas foram então montadas sobre lâminas, com o reagente de montagem *Vectashield* (*Vector Laboratories*). Os organismos aderidos e internalizados às células endoteliais foram visualizados em microscópio de fluorescência (Olympus IX71/IX51). Foi quantificado o número total de organismos interagidos com as monocamadas confluentes de HUVECs, marcados com UVITEX; e o número de organismos aderidos marcados pelo Alexa Flúor 568. Desta forma, o número de organismos endocitados pelas células endoteliais foi determinado pela subtração do número de organismos aderidos às células (fluorescência vermelha) pelo número total de micro-organismos interagidos (fluorescência azul). Os valores encontrados foram expressos por número de organismos por campo. Os parâmetros adotados para a contagem dos organismos foram: mínimo de 10 campos por experimento (Figura 14). Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes triplicata.

Figura 14 – Representação do ensaio de imunofluorescência diferencial a partir da interação de HUVECs com a cepa AF293 de *A. fumigatus*



Nota: Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas por 45 minutos com tubos germinativos da cepa selvagem AF293 de *A. fumigatus*. O número total de organismos foi determinado pela contagem dos TGs corados em azul (Uvitex) e o número de organismos aderidos foi determinado pela contagem dos TGs corados em vermelho (Alexa flúor 568). Aumento de 630 x. Barra de 10 µm.
Fonte: Neves et al.; 2016.

3.6 **Dosagens de citocinas meio condicionado de culturas de HUVECs após interação com *A. fumigatus***

Foram realizadas dosagens das citocinas IL-6, IL1-β, TNF-alfa e quimiocina IL-8 no meio condicionado após o período de interação de 16 horas.

Brevemente, as células endoteliais (P2) foram cultivadas em placas de 96 poços (Corning) previamente tratadas com fibronectina 0,001% (p/v) diluída em solução salina de HANK´S (Cultilab). Atingida a confluência, as monocamadas endoteliais foram infectadas com TGs das cepas selvagens e mutantes numa proporção fungo:célula endotelial de 2:1 ($4x10^4$ TGs inviáveis por poço). Após a interação, o sobrenadante foi coletado e transferido para outra placa de 96 poços estéril (Corning), sem nenhum tratamento. Esta placa espelho foi então centrifugada a 1000 g por 15 minutos a 4°C, para retirada de possíveis fragmentos celulares ou de células em suspensão. O sobrenadante coletado para as análises de secreção de citocinas. As análises do perfil de secreção das citocinas IL-6, IL1-β, TNF-alfa e quimiocina IL-8, presentes nos sobrenadantes da cultura foram feitas através de kits de ELISA específicos para cada citocina (R&D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata experimental. Os controles negativos referem-se ao meio condicionado das culturas de HUVECs não infectadas. Os controles positivos referem-se ao lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* 0111.B4 (Sigma), na concentração de 1 ng/mL. Ainda como um controle positivo, foi utilizada a cepa mutante *Δugm1* que superexpressa a molécula de GAG em sua superfície.

3.7 **Análise estatística**

Os testes estatísticos utilizados nos ensaios de adesão e endocitose foram análise de variância, complementada pelo pós-teste *Dunnet*. Para os ensaios de MTT e ELISA de secreção de citocinas, não foi possível verificar se os dados seguiam uma distribuição normal e portanto, foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Todos os cálculos foram realizados no *GraphPad Prism Software version 5* (GraphPad Software).

3.8 **Análise proteômica**

3.8.1 Obtenção do extrato proteico das HUVECs desafiadas com as cepas selvagem e mutante de *A. fumigatus*

Para as análises proteômicas foram utilizadas a cepa selvagem *ku80* e as cepas mutantes *Δgt4C* e *Δugm1*. Trabalhos recentes publicados por nosso grupo apontam para os primeiros passos no sentido de elucidar o papel da GAG na interação com as HUVECs, utilizando as cepas *Δumg1* e *ku80* (Neves et al., 2016; Neves et al., 2017). Portanto, a fim de dar continuidade a este estudo, a cepa mutante escolhida para representar a ausência da molécula de GAG em *A. fumigatus* foi a *Δgt4C*. Ademais, uma vez que possui o mesmo *background* genético da mutante *Δumg1* (a cepa *ku80*), a cepa *Δgt4C* permitiu maior fidelidade na comparação dos resultados entre o presente estudo e os trabalhos já publicados por nosso grupo.

A obtenção do extrato foi realizada como descrito por Neves et al., 2017, com modificações. Brevemente, as células endoteliais (P2) foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm^2, como descrito acima, até alcançar a confluência. Atingida a confluência, as HUVECs foram desafiadas com TGs da cepa selvagem (*ku80*) e das cepas mutantes (*Δgt4C* e *Δugm1*). Após 16 horas de interação, as HUVECs infectadas com as cepas selvagem e mutantes foram lavadas três vezes com solução salina de Hank's (Cultilab) e removidas da garrafa de cultura com auxílio de um *cell scraper* (Corning). As garrafas foram lavadas por mais duas vezes para um melhor rendimento celular. As células foram então isoladas por centrifugação a 200g por 10 minutos em temperatura ambiente.

O pellet de células foi ressuspenso em 250 µL de tampão de lise (8 M ureia, 1 M Tris, 4% (w/v) CHAPS, suplementado com 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 160 µM leupeptina, 1 µM pepstatina, 0.125 unidades/µL benzonase) e incubado a 4°C por 1 hora e 30 minutos sob agitação suave. Posteriormente, os extratos celulares totais foram centrifugados a 800 g por 30 minutos e os sobrenadantes coletados. Os extratos foram então precipitados com TCA/Acetona (na proporção 1:7:2 de amostra:acetona:tca), ressuspensos em tampão de solubilização (7 M ureia, 2M tioureia, 50 mM bicarbonato de amônio) e armazenados a -80 °C até o momento do uso.

3.8.2 Digestão tríptica

A quantificação de cada extrato proteico foi feita pelo método de Bradford (BIO-RAD) de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o tampão de solubilização foi trocado por 50 mM de bicarbonato de amónio usando um dispositivo de ultrafiltrarão de 3 kDa (Millipore). Um total de 50 µg de proteínas de cada extrato foi desnaturado utilizando solução de 0,2% de *RapiGEST SF* (Waters), por 15 minutos a 60 °C. As proteínas foram reduzidas com 100 mM DTT a 60 °C por 30 minutos e em seguida, alquiladas com 300 mM iodoacetamida a 25 °C por 30 minutos no escuro.

A digestão tríptica (Tripsina Promega) foi realizada na proporção enzima:proteína de 1:100 (p/p) por 16 horas a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (TFA), seguida de incubação por 90 minutas a 37 °C. Durante essa etapa, o *RapiGEST SF* foi hidrolisado e então, posteriormente sedimentado por centrifugação a 14000 rpm, 6ºC por 30 minutos. Foi realizada uma etapa de dessalinização com *tips* OMIX C18, seguindo instruções do fabricante. Por fim, as amostras contendo os peptídeos trípticos foram secas em concentrador *speedvac* e ressuspensas em 20 µl de ácido fórmico 0,1%.

3.8.3 Análise por espectrometria de massas *nLC-MS/MS*

Os peptídeos obtidos de cada condição experimental de cada triplicata biológica, foram analisados em triplicata técnica por nanocromatografia líquida (nLC) no instrumento *Easy-nLC 1000* acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna (Maish-ReproSil-lPur C18-AQ, esferas de 3 µm, 2cm de comprimento e 100µm de I.D.) e separados na coluna analítica (Maish-ReproSil-Pur C18-AQ, esferas de 3 µm, 20 cm de comprimento e 75 µm de I.D.).

Para separação, foi utilizado um fluxo constante de 250 nL/min em um gradiente linear de 5-40% de solvente B (95% ACN/5% H2O/0,1% de ácido fórmico) diluído no solvente A (95% H2O/5% ACN/0,1% de ácido fórmico) durante 112 minutos e um gradiente de 40-95% de solvente B, completando total de corrida de 120 minutos, seguido de lavagem e equilíbrio da coluna.

Na fonte de ionização ESI foram configurados uma voltagem de 2,5 kV, fluxo zero de *sheath* e *auxiliary gas* e 235 °C no aquecimento do capilar. O espectrômetro LTQ Orbitrap Velos foi operado em modo de aquisição dependente de dados (*Data Dependency Analysis*-DDA) em alta resolução, com uma lista de exclusão dinâmica de 45s. A varredura inicial do MS (*full scan*) foi adquirida em 60.000 de resolução para 400 m/z no analisador Orbitrap.

Foram selecionados os dez íons mais intensos para fragmentação usando dissociação por colisão em alta energia (HCD) com energia de colisão normalizada de 30 e aquisição dos íons fragmento no Orbitrap (7500 de resolução).

3.8.4 Análise de dados

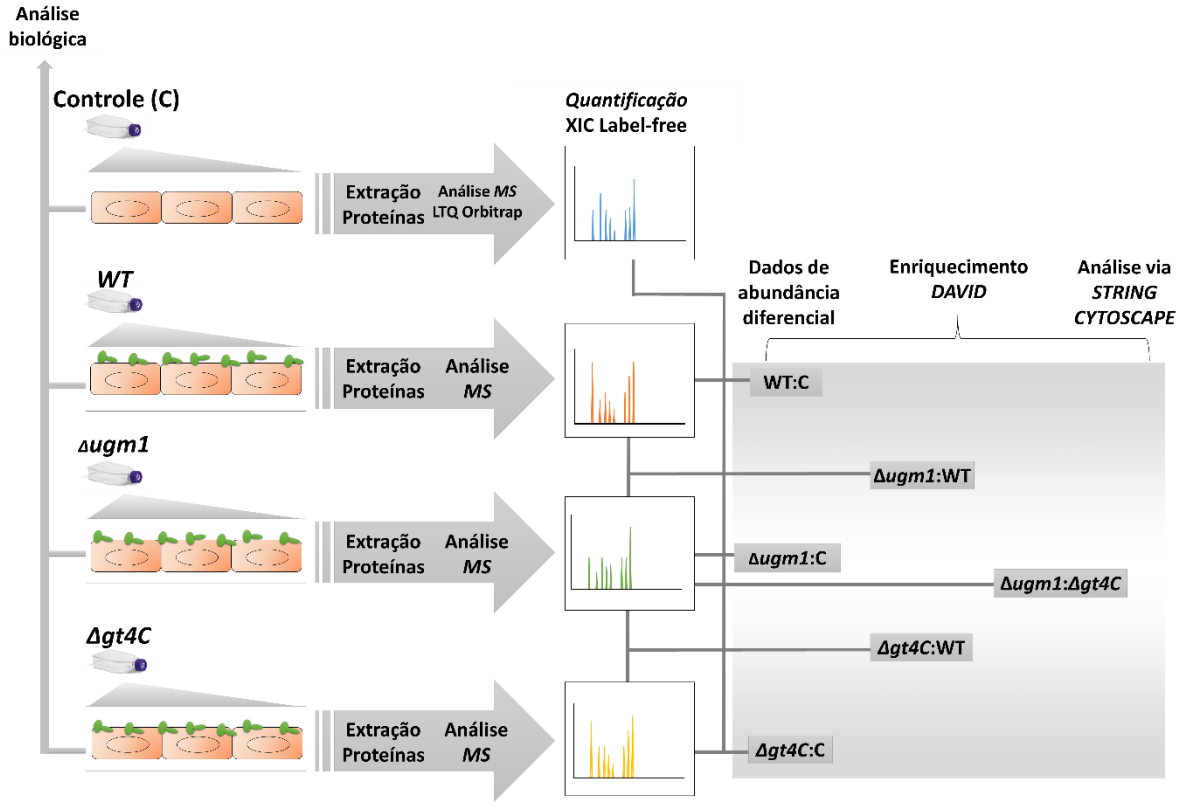
3.8.4.1 Busca de proteínas por PSM

Os arquivos de espectros de massas experimentais (**.RAW files*) foram processados no programa *PatternLab for proteomics* 4.0 (Carvalho et al., 2016). A identificação dos peptídeos foi realizada contra a base de dados *Homo sapiens* baixado do *Universal Protein Resourse* (*Uniprot*) em maio de 2017. Em seguida, foi criado o banco de dados *target-reverse* incluindo contaminantes comuns (queratina, BSA, etc) no *Targets*. No módulo *Comet PSM*, foram utilizados os seguintes parâmetros: tolerância de massa do precursor de 40 ppm; especificidade da tripsina total com duas *missedclevages*; carbamidometilação de cisteína (+57,021 Da) como modificação fixa; e, oxidação da metionina (+15,999 Da) como modificação variável. No filtro *Search Engine Processor (SePro - for PSM)* foram selecionados os parâmetros de inclusão do *MS*2 nos resultados, com alta resolução do *MS*1, *Protein Logic* e com espectros de mais de 50K. Além disso, foram considerados, um delta de massa em *PPM* a partir da média em *PPM* de 6,0.

Os dados de quantificação de cada análise e suas respectivas replicatas biológicas e técnicas foram extraídos do arquivo de resultados do *PatternLab for proteomics* 4.0. A quantificação relativa foi do tipo *label-free*, baseada no *Extracted Ion Chromatogram* (*XIC*). No *XIC browser* foram considerados os seguintes parâmetros: número mínimo de dois peptídeos e apenas os peptídeos únicos; máxima parcimônia; mínimo de dois *MS*1 *count*. Além disso, foram considerados um *XIC ppm* de 15 e com estado de carga de 2,3. Esta

quantificação foi feita entre a relação de abundância nas quatro condições (Controle não interagido, *Δugm1*, *Δgt4c* e K*u80*) combinadas par a par (*Ku80 vs* Controle, *Δugm1 vs* Controle, *Δgt4c vs* Controle, *Δugm1 vs Ku80*, *Δgt4c vs Ku80* e *Δugm1 vs Δgt4c*) (Figura 15). Estes valores foram transformados em escala logarítmica de base 2 e normalizados com a mediana dos mesmos.

Figura 15 – Ilustração do esquema de trabalho para as análises por espectrometria de massas nLC-MS/MS



Nota: Os dados de abundância diferencial foram comparados par a par entre as quatro condições estudadas: *Ku80 vs* Controle, *Δugm1 vs* Controle, *Δgt4c vs* Controle, *Δugm1 vs Ku80*, *Δgt4c vs* K*u80* e *Δugm1 vs Δgt4c*.
Fonte: A autora, 2017.

Com base nos resultados do teste estatístico Grubb, os valores de quantificação de peptídeos foram levados para proteínas. O módulo *TFold test* do programa *PatternLab for proteomics 4.0* foi utilizado para maximizar as identificações que satisfizessem tanto um *cut-off* de *fold change* quanto de *p-valor*. Neste módulo, o *cut-off* do *fold change* de uma proteína é dado em função do seu *p-valor* e um critério de estringência que objetiva detectar (e separar) proteínas de baixa abundância usando um estimador *BH FDR* (Carvalho et al., 2016).

Foram utilizados os seguintes parâmetros: mínimo de 2 replicatas, *BH q-value* de 0,05 e *F-stringency* otimizado para cada análise pareada. Este parâmetro é o expoente da lei de

potência que o programa usa para maximizar o número de proteínas diferencialmente expressas para o *q-valor* específico. Cada proteína mapeada é representada por um ponto em um *Volcano plot*, de acordo com seu *p-valor* (eixo x) e *fold-change* (eixo y) (Carvalho et al., 2012; Carvalho et al., 2016).

Os pontos vermelhos correspondem às proteínas que não satisfazem nenhum dos critérios (*fold-change* e *q-valor*) estipulados pelo programa; os pontos verdes, àquelas que satisfazem somente critério de *fold-change*; os laranjas correspondem às proteínas que satisfazem tanto o critério de *fold change* quanto o de *q-valor*, entretanto, são proteínas de baixa abundância, que precisariam de mais experimentos para confirmar sua diferença de abundância; por fim, os pontos azuis representam as proteínas que satisfazem todos os filtros estatísticos e, portanto, foram as utilizadas para as análises das proteínas diferencialmente expressas.

3.8.4.2 Análise *in silico* – enriquecimento de Gene Ontology

As análises de enriquecimento de termos de *Gene Ontology* (GO) e de vias de sinalização foram realizadas na plataforma on-line *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* (Huang et al., 2009a.; Huang et al., 2009b). Esta análise foi realizada com a base de dados *Homo sapiens*, utilizada para quantificação dos termos relacionados aos processos biológicos e vias de sinalização; sendo estas a partir de dois repositórios: KEGG e *Reactome*. Processos biológicos e vias com *p*-valor menor ou igual que 0,05 e *fold change* maior ou igual 1,1 e menor ou igual -1,1 foram comparados quanto ao seu aparecimento e proteínas constituintes, incluindo seu *fold-change*, entre as 6 diferentes razões do estudo. Estes dados foram organizados em tabelas comparativas e gráficos para facilitar a visualização dos resultados.

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

4.1 **As cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* possuem fenótipo hipoaderente e são menos internalizadas pelas HUVECs**

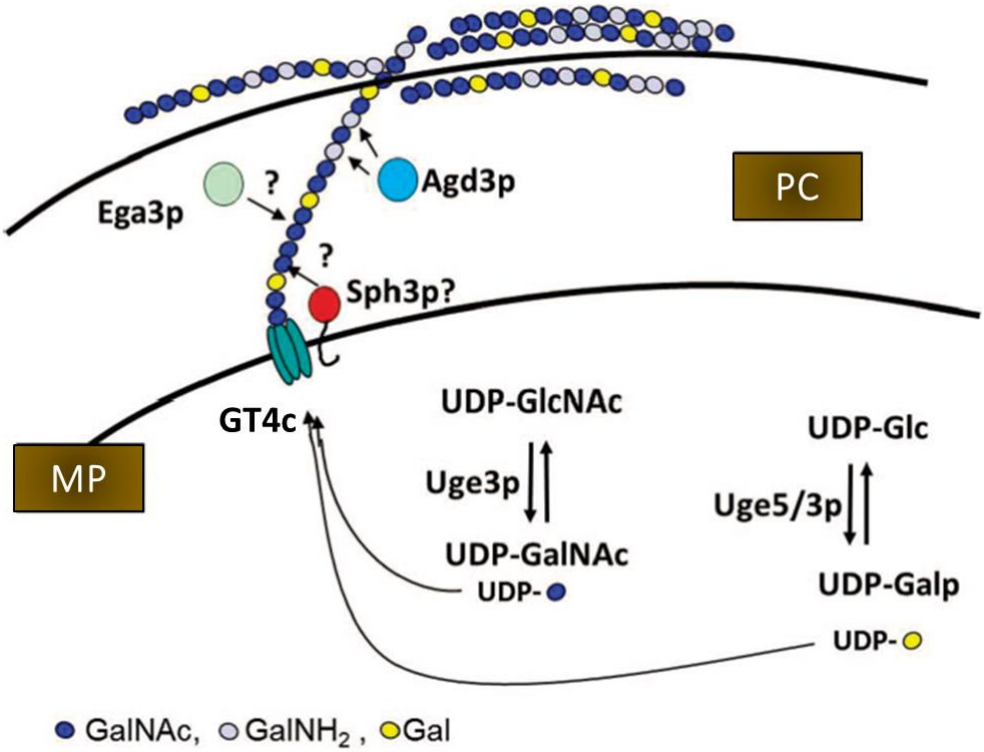
A adesão de um micro-organismo patogênico ao hospedeiro é um evento determinante na fisiopatologia de doenças infecciosas e, precede o processo de invasão e colonização observado nas infecções fúngicas invasivas. Dessa forma, a parede celular de fungos patogênicos sempre foi o alvo para os estudos de adesão. Apesar das tentativas iniciais de identificação de adesinas terem sido focadas em proteínas de parede celular, estudos mais recentes têm demonstrado que o papel dos carboidratos de superfície nesse processo possui maior destaque. Diversos estudos apontam para o papel da molécula GAG como a principal "adesina" de *A. fumigatus* (Lousserte et al., 2010; Fontaine et al., 2011; Sheppard, 2011; Gravelat et al., 2013; Beauvais et al., 2014; Gresnigt, et al., 2014; Briard et al., 2016).

Duas das cepas mutantes utilizadas neste trabalho possuem mutações que resultam na incapacidade de produzir polímeros de GAG, as cepas *Δuge3* e *Δgt4C.*

Resumidamente, a cepa *Δuge3* possui mutação para o gene codifica a enzima UGE3, uma UDP-glicose-4-epimerase diretamente envolvida na síntese de GAG. Esta enzima possui atividade dupla, ou seja, é capaz de mediar a interconversão de UDP-GlcNAc a UDP-GalNAc bem como de UDP-glicose a UDP-galactose (Gravelat et al., 2013; Lee et al., 2014). Já a cepa *Δgt4C* possui uma mutação para o gene GT4C, que codifica uma possível glicosil transferase, responsável pela a síntese de GAG. A topologia dessa proteína e a presença de 14 domínios transmembrana sugerem que essa glicosil transferase seja a GAG-sintase responsável pela síntese do polissacarídeo em *A. fumigatus* (Briard et al., 2016). A Figura 16 abaixo representa a via hipotética de síntese GAG em *A. fumigatus.*

Recentemente, outras enzimas associadas a síntese de GAG foram identificadas. Entretanto, o papel efetivo dessas enzimas na síntese ou no remodelamento da GAG ainda não foi elucidado. É o caso da *Sph3p*, uma hidrolase de GAG ligada à membrana. Curiosamente, essa hidrolase de GAG é importante para a polimerização do polissacarídeo. É o caso também da GAG de-*N*-acetilase e da endo-α(1,4)galactosaminadase. Essas duas estão associadas à parede celular de *A. fumigatus* e estão relacionadas a processos de biossíntese e remodelamento de GAG ainda desconhecidos (Bamford et al., 2015).

Figura 16 – Via hipotética de síntese de GAG em *A. fumigatus.*



Nota: Via hipotética representativa das principais etapas (conhecidas até o momento) e enzimas envolvidas na biossíntese de GAG em *A. fumigatus*.

Legenda: Uge = UDP-glicose-4-epimerase; Sph = *Spherulin-like* 3, GT4c glicosil transferase membro da família CAZy GT4. Adg = GAG d-*N*-acetilase; Ega3 = endo-α(1,4)galactosaminadase; GalNAc= *N*-acetil-galactosamina; $GalNH_2$ = galactosamina; Gal = galactose.

Fonte: Adaptado de Briard et al., 2016.

Uma vez que a principal característica das mutantes *Δuge3* e *Δgt4C* é a ausência de GAG em sua superfície celular de *A. fumigatus*, e tendo em mente a importância dos processos de interação fungo-hospedeiro para o estabelecimento da doença, o primeiro objetivo do trabalho avaliar possíveis alterações na capacidade de adesão e internalização destas cepas mutantes por HUVECs.

Neste sentido, tubos germinativos inviáveis (tratados com timerosal) das cepas selvagens (AF293 e *Ku80*), das cepas mutantes (Δ*uge3*, Δ*gt4C* e Δ*ugm1*) e de uma cepa complementada (Δ*uge3*::Δ*uge3*) de *A. fumigatus* foram interagidos com monocamadas confluentes de HUVECs, por 45 minutos. O número de organismos internalizados e aderidos foi determinado como ilustra a Figura 17.

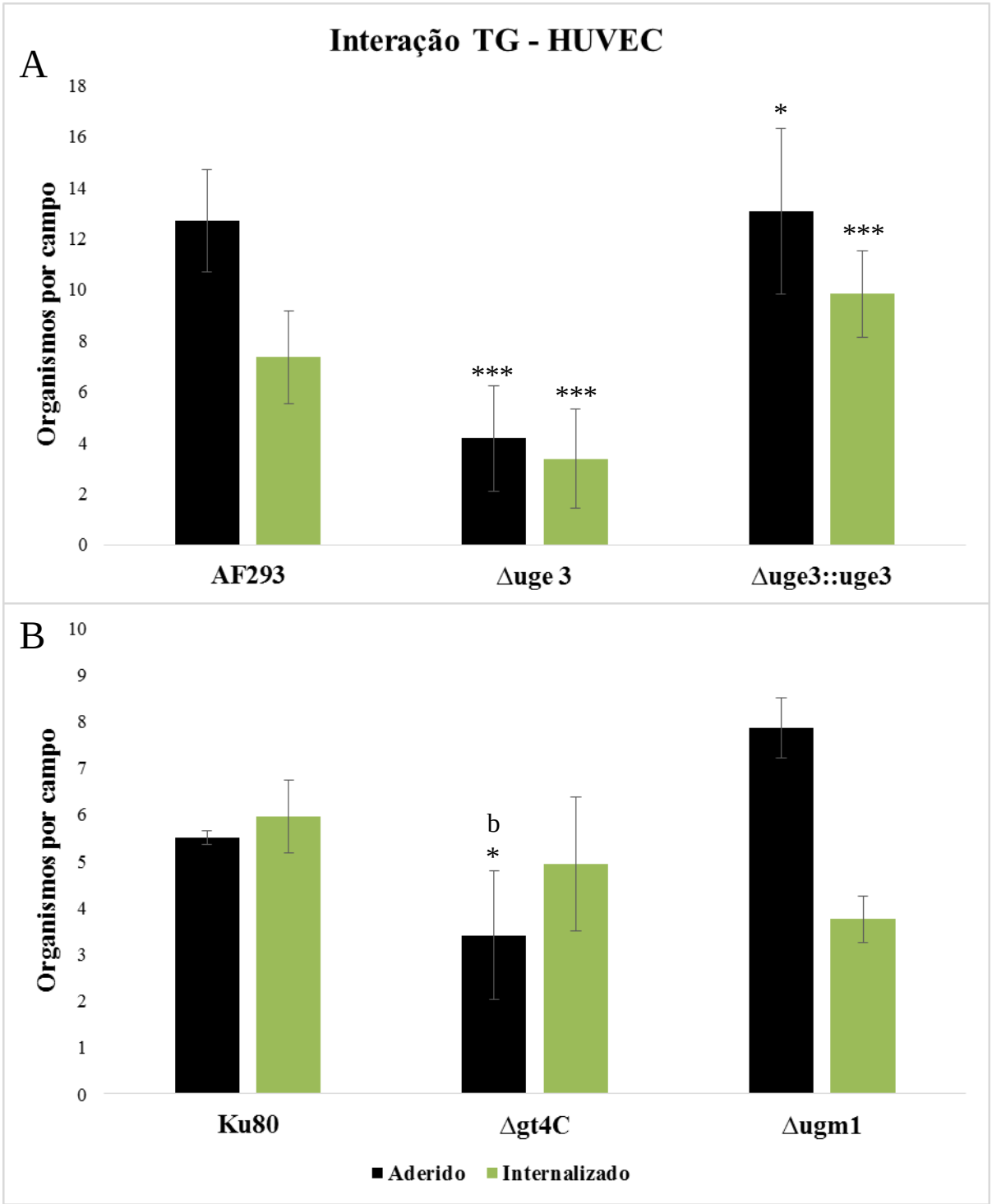
Nas Figuras 17 A e B, respectivamente, é possível observar que a cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* apresentaram menor capacidade adesiva às células endoteliais em relação às cepas selvagens correspondentes (AF293 e *Ku80*, respectivamente). Em estudos anteriores,

Gravelat et al., (2013) mostraram que a mutante Δ*uge3* apresentou fenótipo hipoaderente, sendo incapaz de aderir a superfícies plásticas, células epiteliais pulmonares e fibronectina. Esses autores ainda demonstraram que a recuperação da capacidade de adesão ocorreu de forma dose dependente após a adição de uma suspensão de GAG extraída da cepa selvagem. A recuperação da capacidade de adesão não foi observada quando a cepa mutante foi suplementada com uma suspensão de *zymozan*, uma preparação da parede celular de fungos rica em β-glucana, o que evidenciou que capacidade de aderência está diretamente associada à GAG. Até o momento, nosso trabalho é o primeiro relato na literatura das características relacionadas a adesão e internalização da mutante *Δgt4C*.

Na Figura 17A, também é possível observar que a capacidade de internalização da cepa Δ*uge3* pelas HUVECs foi significativamente menor quando comparada a cepa selvagem AF293. Essa redução da endocitose da cepa Δ*uge3* parece estar diretamente relacionada à ausência de GAG na superfície celular desta mutante.

Na Figura 17B, é possível observar uma redução no perfil de internalização da cepa *Δgt4C* quando comparada à cepa selvagem *Ku80*. Entretanto, nesse trabalho, essa diferença não se mostrou significativa. Ainda na Figura 17B, é possível observar o comportamento hiper-aderente da cepa Δ*ugm1* quando comparada à selvagem *Ku80*, entretanto, tal diferença não se mostrou estatisticamente significativa no presente trabalho. Como dito anteriormente, o gene UGM1 de *A. fumigatus* é o responsável pela transcrição da enzima UDP-galactopiranose mutase, que converte resíduos de galactopiranose a galactofuranose. Estudo prévios demonstraram que a deleção do gene *ugm1* resulta em uma cepa mutante não expressa GM e superexpressa GAG na superfície celular (Lamarre *et al*., 2009; Heesemann *et al*., 2011). Ademais, outros estudos previamente realizados pelo nosso grupo corroboram que a mutante Δ*ugm1* possui um fenótipo hiper-aderente e é mais internalizada pelas HUVECs (Neves et al.,2016; Neves et al., 2017).

Figura 17 – Interação das cepas selvagens (AF293 e *ku80*), mutantes (Δ*uge3*, Δ*gt4C* e Δ*ugm1*) e complementada (Δ*uge3::*Δ*uge3*) de *A. fumigatus* com células endoteliais humanas



Nota: Os tubos germinativos foram incubados com monocamadas confluentes de HUVECs por 45 minutos. O número de organismos aderidos ou internalizados foi determinado por ensaio de imunofluorescência diferencial. Os resultados expressos no gráfico correspondem a média ± DP de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata.

Legenda: *= $p \leq 0,05$ em relação às cepas selvagens; ***= $p \leq 0,001$ em relação às cepas selvagens; b= $p \leq 0,01$ em relação à cepa mutante Δugm1.

Fonte: A autora, 2017.

4.2 As cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* induziram injúria similar nas HUVECs, em relação às cepas selvagens de *A. fumigatus*

Como citado na metodologia (item 3.1.4), a viabilidade das células endoteliais desafiadas com as cepas de *A. fumigatus*, utilizadas nesse trabalho, foi determinada pelo ensaio de MTT (Denizot e Lang 1986).

Na Tabela 2 encontram-se os valores de viabilidade celular, representados pela porcentagem de células viáveis interagidas com as cepas selvagens, mutantes e complementada, em relação ao controle negativo. Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular das HUVECs após 16 horas de interação com quaisquer das seis cepas utilizadas nesse estudo.

Outros autores, utilizando células epiteliais pulmonares de linhagem A549, também demonstraram que a cepa *Δuge3* causa o mesmo nível de injúria quando comparada à cepa selvagem AF293. Nossos dados relativos aos controles (negativo e positivo) revelaram níveis similares de injúria às HUVECs com as cepas selvagens AF293 e *Ku80* (Curty et al., 2014; Neves et al., 2017). Até o momento, este é o primeiro relato demonstrando a capacidade da cepa *Δgt4C* causar injúria em HUVECs. O presente trabalho ainda corrobora os dados de injúria celular obtidos por Neves et al. (2017), em relação à cepa mutante *Δugm1*.

De modo geral, o presente estudo mostra que os níveis de injúria causados pelas diferentes cepas de *A. fumigatus* não apresentam diferenças entre si. Sendo assim, estes resultados indicam que o perfil de secreção de citocinas (apresentado no tópico a seguir) não tem relação com possíveis diferenças na morte celular induzida por qualquer uma das cepas de *A. fumigatus* utilizadas nesse estudo.

Tabela 2 – Viabilidade celular das HUVECs por MTT

Período de infecção	**Porcentagem em relação ao controle** [a]							
	AF293	***ku80***	**Δ*uge3***	**Δ*uge3*::Δ*uge3***	**Δ*gt4c***	**Δ*ugm1***	**C-**	**LPS**
16 horas	55,9±1,5[b]	55,8±1,7[b]	54,9±1,9[b]	54,3±2,9[b]	52,1±2,5[b]	58±3,2[b]	100±2,5[b]	69,6±1,2[c]

Fonte: A autora, 2017.

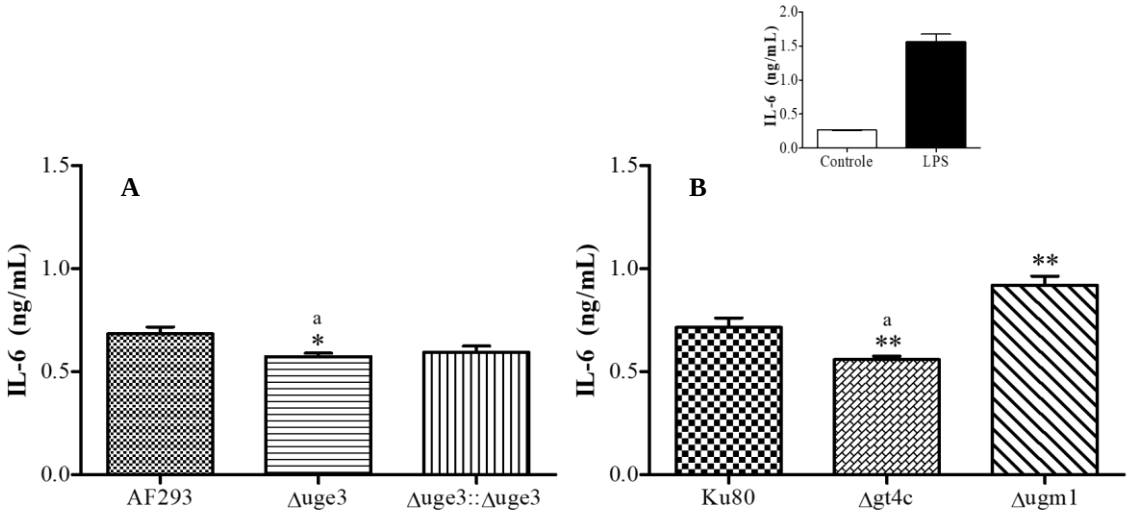
4.3 **Perfil de secreção de citocinas em meio condicionado de HUVECs após interação com as cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus***

Para avaliar o perfil de secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF-α e da quimiocina IL-8, as células endoteliais foram desafiadas com tubos germinativos das cepas selvagens (AF293 e *Ku80*), mutantes (*Δuge3* e Δgt4C) e complementada (*Δuge3::Δuge3*) de *A. fumigatus*. Os meios condicionados foram então coletados após 16 horas de interação. Estas citocinas foram escolhidas por apresentarem perfil de secreção aumentado quando na interação com a cepa mutante Δ*ugm1* (Neves et al., 2017). Foi ainda avaliado o perfil de secreção da citocina pró-inflamatória IL1-β. No entanto, os níveis secreção desta citocina não puderam ser detectados.

Adicionalmente, foi analisado o perfil de secreção das mesmas citocinas e quimiocina utilizando HUVECs infectadas com a cepa mutante Δ*ugm1*, que superexpressa a molécula de GAG. Tal perfil serviu como um controle de referência aos ensaios com as mutantes *Δuge3* e Δgt4C, uma vez que estudos prévios mostram um aumento da secreção de IL-6, TNF-α e IL-8 por HUVECs após 16 horas interação com a mutante Δ*ugm1*. Os resultados do perfil de secreção de citocinas pelas HUVECs estão apresentados abaixo, nas Figuras 18, 19 e 20.

Conforme apresentado na Figura 18, os resultados demonstram que as cepas selvagens AF293 e *Ku80* foram capazes de estimular um aumento significativo na secreção de IL-6 pelas HUVECs, em relação ao controle. Em contraste, a interação com as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* resultaram na diminuição significativa dos níveis de IL-6 secretados pelas HUVECs em relação às cepas selvagens AF293 e *ku80*, respectivamente. Na Figura 18B é possível ainda observar que a cepa mutante Δ*ugm1* foi capaz de induzir maior secreção de IL-6 quando comparada a cepa selvagem *Ku80*. O mesmo perfil de secreção foi observado quando comparado à cepa selvagem AF293. Tal resultado corrobora os dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo (Neves et al., 2017). Por fim, as HUVECs infectadas com as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* secretaram significativamente menos IL-6 no meio condicionado, quando comparadas àquelas interagidas com a cepa Δ*ugm1*.

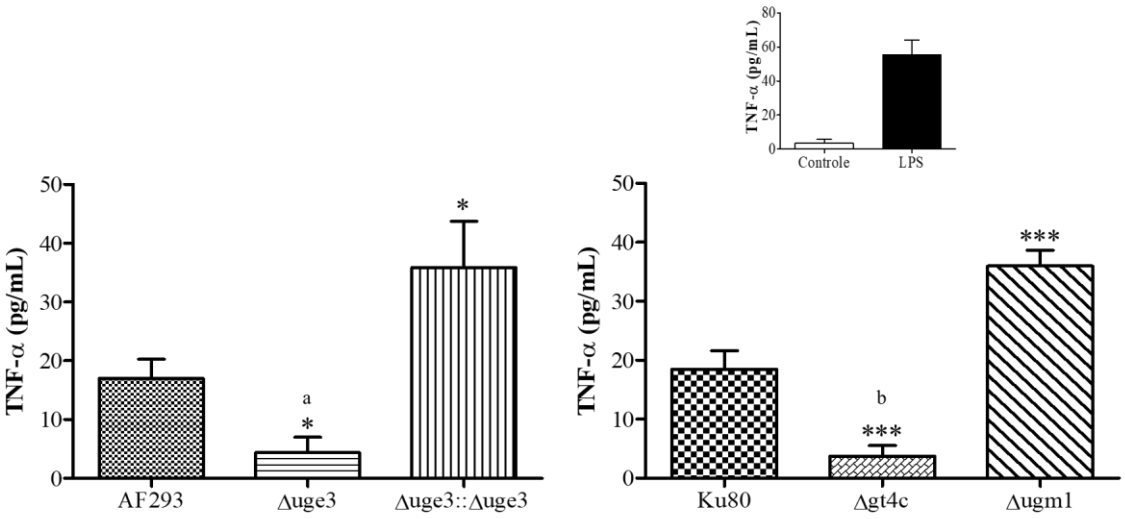
Figura 18 – Perfil de secreção da citocina pró-inflamatórias IL-6 em meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas mutantes e selvagem



Legenda: ** p < 0,01 comparado às cepas selvagens (AF293 e ku80); * p < 0,05 comparado às cepas selvagens; p < 0,05 comparado às cepas selvagens. a = p < 0,001 comparado à mutante Δugm1.
Nota: Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com TGs dessas cepas e o meio condicionado foi coletado após 16 horas de interação. Os níveis de IL-6 foram determinados através de kit de ELISA (R&D Systems). Os resultados obtidos são a média ± DP de um experimento em triplicata.
Fonte: A autora, 2017.

Em relação à expressão da citocina pró-inflamatória TNF-α, na Figura 19 é possível observar mais uma vez que cepas selvagens AF293 e *Ku80* induziram um aumento significativo na secreção de TNF-α pelas HUVECs quando comparado ao controle. Houve ainda uma significativa redução da secreção de TNF-α pelas HUVECs interagidas com as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* quando comparado com suas respectivas selvagens (AF293 e *Ku80*). A secreção de TNF-α pelas HUVECs interagidas com as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* apresentou níveis tão baixos quanto os níveis apresentados pelo controle não interagido (não houve diferença significativa entre estes). Como esperado, a cepa mutante Δ*ugm1* apresentou níveis significativamente altos de TNF-α quando comparados às HUVECs interagidas com as cepas selvagens (AF293 e *Ku80*). Estes níveis foram ainda mais altos quando comparados às HUVECs interagidas com as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C*, uma vez que o perfil de indução de secreção promovido por estas foi similar ao controle.

Figura 19 – Perfil de secreção da citocina pró-inflamatórias TNF-α em meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas mutantes e selvagem



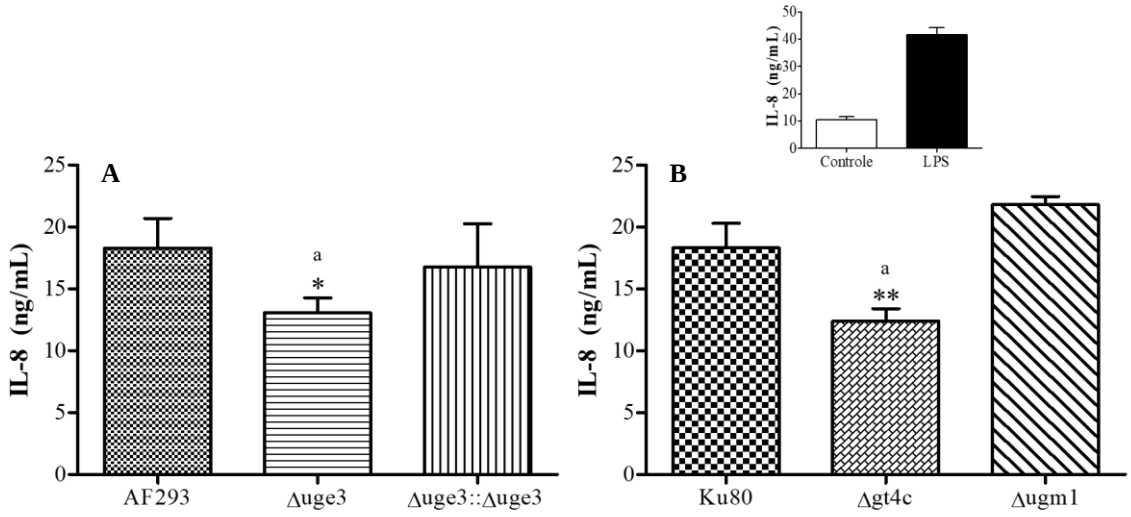
Legenda: *** p < 0,001 comparado às cepas selvagens (AF293 e ku80); * p < 0,05 comparado às cepas selvagens; p < 0,05 comparado às cepas selvagens. a = p < 0,001 comparado à mutante Δugm1; b = p < 0,01 comparado à mutante Δugm1.

Nota: Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com TGs dessas cepas e o meio condicionado foi coletado após 16 horas de interação. Os níveis de TNF-α foram determinados através de kit de ELISA (R&D Systems). Os resultados obtidos são a média ± DP de um experimento em triplicata.

Fonte: A autora, 2017.

Em relação à quimiocina IL-8 (Figura 20), as HUVECs interagidas com as cepas selvagens (AF293 e *Ku80*) apresentaram significativamente maior secreção quando comparadas ao controle. Ademais, as cepas mutantes (Δ*uge3* e Δ*gt4C*) foram capazes de induzir quantidades significativamente menores desta quimiocina quando comparadas às respectivas cepas selvagens (AF293 e *Ku80*). Em contraste, apesar da secreção de IL-8 ser significativamente maior nas HUVECs interagidas com a cepa selvagens utilizadas nesse estudo, nenhuma diferença significativa foi observada após a interação das células com a cepa mutante Δ*ugm1*. Resultados similares foram encontrados anteriormente por Neves et al. (2017).

Figura 20 – Perfil de secreção da quimiocina IL-8 em meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas mutantes e selvagem



Legenda: ** p < 0,01 comparado às cepas selvagens (AF293 e ku80); * p < 0,05 comparado às cepas selvagens; p < 0,05 comparado às cepas selvagens. a = p < 0,001 comparado à mutante Δugm1.
Nota: Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com TGs dessas cepas e o meio condicionado foi coletado após 16 horas de interação. Os níveis de IL-8 foram determinados através de kit de ELISA (R&D Systems). Os resultados obtidos são a média ± DP de um experimento em triplicata.
Fonte: A autora, 2017.

O item 1.5 deste trabalho apresenta os estudos de base pelos quais a molécula de GAG tem sido apontada como molécula chave durante a patogênese da aspergilose invasiva. Estudos prévios, realizados pelo nosso grupo, apontam proteínas envolvidas na sinalização celular por IFN-γ e TNF-α na resposta imune. Foi ainda observado que proteínas envolvidas na resposta celular de mamíferos a condições patológicas são mais expressas pelas HUVECs desafiadas tanto com a cepa selvagem quanto com a mutante *Δugm1* (Curty et al., 2014; Neves et al., 2016 e 2017).

Nesse contexto, os resultados do presente trabalho somados aos resultados já obtidos pelo nosso grupo demonstram que a cepa Δ*ugm1*, que possui uma expressão exacerbada de GAG em sua superfície, foi capaz não só de induzir maior ativação endotelial como induzir maior expressão das citocinas TNF-α e IL-6, quando comparada às cepas selvagens. Sabe-se ainda que a fração SGG purificada é capaz de induzir maior secreção de TNF-α e IL-8 pelas HUVECs (Neves et al., 2016 e 2017). Em contraste, a ausência de GAG na superfície de *A. fumigatus*, representadas pelas mutantes (Δ*uge3* e Δ*gt4C*) resultou na diminuição significativa nos níveis de secreção destas citocinas pró-inflamatórias, além da quimiocina IL-8 pelas HUVECs.

De uma forma ainda não completamente clara, a GAG parece influenciar diretamente o perfil de secreção de citocinas por células endoteliais. Alguns mecanismos pelos quais a GAG pode modular a resposta imune já foram esclarecidos. Dentre eles, a capacidade da GAG de mascarar a β-(1,3)-glucana, impedindo seu reconhecimento pelo receptor Dectina-1. Em adição, a fração SGG é capaz induzir a apoptose de neutrófilos (Fontaine et al., 2011; Gravelat et al., 2013).

Sabe-se ainda que a molécula de GAG é capaz de inibir a resposta protetora Th1/Treg e promover a resposta Th2 (Gravelat et al., 2013). No presente estudo não foi possível detectar, em nenhum nível, a secreção de IL1-β pelas HUVECs infectadas com as cepas de *A. fumigatus*. Este resultado vai ao encontro de outros estudos que demonstraram que a GAG é capaz de induzir a produção do antagonista do receptor IL-1, o IL-1Ra, que bloqueia toda a via de sinalização por IL-1 (Gresnigt et al., 2014). Em contraste, mesmo as cepas deficientes na produção da GAG não foram capazes de induzir a secreção de níveis detectáveis de IL1-β pelas HUVECs.

Adicionalmente, Rambach et al. (2015) demonstraram que a molécula de GAG participa ativamente da interação entre as hifas de *A. fumigatus* e plaquetas. Os autores demonstraram que, na presença de concentrações mínimas da fração purificada SGG (10 μg/mL), houve um aumento significativo na liberação de grânulos densos e na exposição de CD63P[7] pelas plaquetas. Efeitos significativos na liberação de grânulos alfa pelas plaquetas também foram observados nas concentrações de 30 e 100 μg/mL de SGG, além de alterações na membrana e exposição de fostatidilserina (outra característica da ativação plaquetária).

De modo geral, os resultados aqui apresentados enfatizam o papel fundamental da molécula de GAG na infecção por *A. fumigatus* e na fisiopatologia da aspergilose invasiva. O presente trabalho também corrobora dados da literatura que apontam esta molécula como a principal adesina de *A. fumigatus*, além de um importante fator de virulência do fungo. Finalmente, enfatizamos o papel essencial da GAG na modulação da resposta imune do hospedeiro, o que favorece ao patógeno e o estabelecimento da infecção.

[7] Glicoproteína presente na superfície da membrana de grânulos densos das plaquetas.

4.4 **Processos biológicos endoteliais modulados pela molécula de GAG**

A fim de elucidar os mecanismos endoteliais modulados pela molécula de GAG e o impacto desta na fisiopatologia da aspergilose invasiva, realizamos um estudo proteômico diferencial utilizando três cepas de *A. fumigatus.* Dentre estas, duas cepas mutantes: uma que apresenta um fenótipo de superexpressão de GAG e outra que não expressa esta molécula, respectivamente, as cepas *Δugm1* e *Δgt4c*. Como referência foi utilizada a cepa selvagem *Ku80,* que é o background genético dos mutantes *Δugm1* e Δ*gt4c*. A cepa *Ku80* foi utilizada em outro estudo proteômico realizado por nosso grupo de pesquisa que descreveu, pela primeira vez, a análise proteômica global de HUVECs após a interação com *A. fumigatus* (Curty et al., 2014).

Como apresentado no item 4.2 do presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular das HUVECs após interação com nenhuma das cepas utilizadas nesse estudo. Isso significa que o perfil de injúria e dano celular causado tanto pelas cepas mutantes quanto pela cepa selvagem de *A. fumigatus* é similar. Desse modo, as alterações aqui apresentadas, seja no perfil de secreção de citocinas, sejam nas abundâncias ou no perfil de proteínas diferencialmente expressas, estão diretamente relacionadas à resposta das HUVECs face as diferenças na superfície celular das cepas de *A. fumigatus* utilizadas.

Utilizando o critério para identificação de no mínimo dois peptídeos, sendo um deles peptídeo único e o princípio da máxima parcimônia, 839 proteínas foram identificadas nas HUVECs não infectadas (controle). Utilizando os mesmos critérios, foram identificadas 938 proteínas nas HUVECS após interação com a cepa mutante *Δugm1*; 838 proteínas na interação com a cepa mutante Δ*gt4c*; e, 841 proteínas na interação com a cepa selvagem *Ku80*.

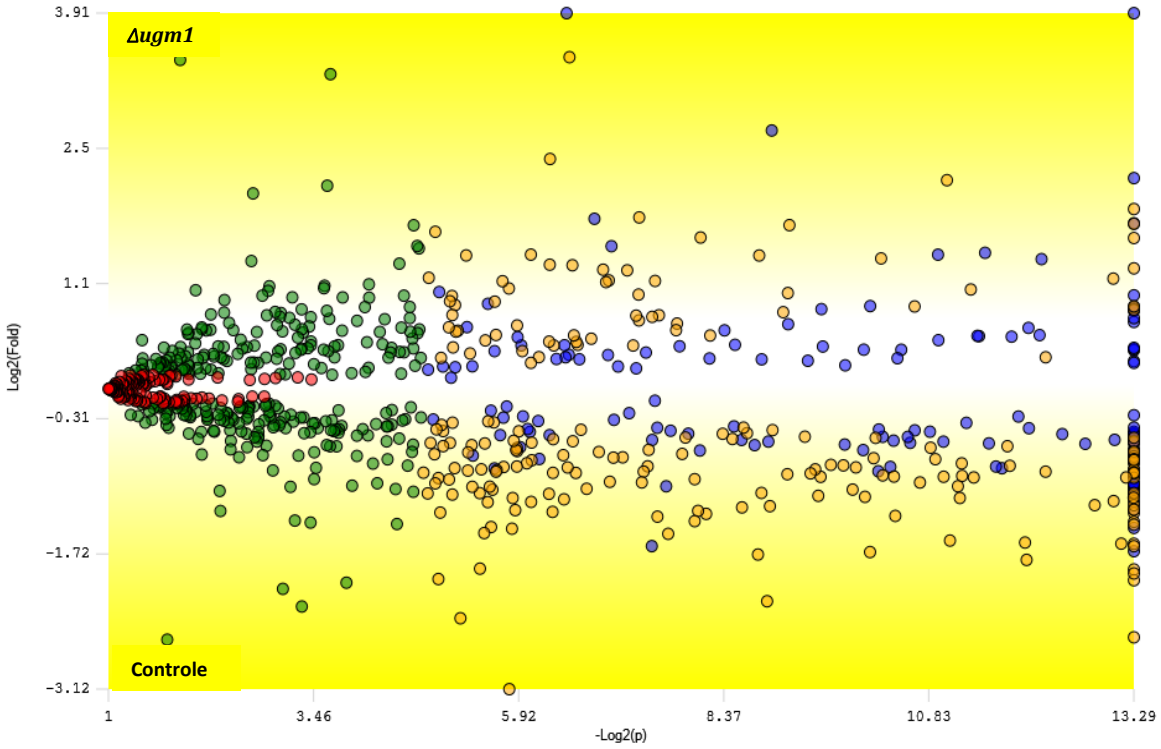
A quantificação das proteínas endoteliais identificadas foi baseada na relação de sua abundância nas quatro condições experimentais: HUVECS:controle; HUVECs:*Δugm1*; HUVECs:*Δgt4c* e HUVECs:*Ku80*. A comparação entre as diferenças na abundância das proteínas foi realizada por combinações par a par, como ilustrada na Figura 15 desse trabalho. São elas: (1) *Ku80 vs* controle, (2) *Δugm1 vs* controle, (3) *Δgt4c vs* controle, (4) *Δugm1 vs Ku80*, (5) *Δgt4c vs Ku80* e (6) *Δugm1 vs Δgt4c*.

Como descrito no item 3.8.4.1 da metodologia, as proteínas diferencialmente expressas para cada combinação foram estatisticamente validadas de acordo com o parâmetro *F-Stringency* do programa *PatternLab for proteomics 4.0* (Carvalho et al., 2016). Foram

utilizadas para as análises das proteínas diferencialmente expressas as proteínas referentes aos pontos azuis dos *Volcanos plots*, ou seja, aquelas que satisfizeram todos os filtros estatísticos (*fold change* e *q-valor*). A Figura 21 ilustra um dos *volcano plots* criados pelo programa.

O número total de proteínas diferencialmente expressas nas comparações par a par foi de: (1) *Ku80 vs* controle - 166 proteínas; (2) *Δugm1 vs* controle - 143 proteínas; (3) *Δgt4c vs* controle - 130 proteínas; (4) *Δugm1 vs Ku80* - 116 proteínas; (5) *Δgt4c vs Ku80* - 123 proteínas; e (6) *Δugm1 vs Δgt4c* - 91 proteínas.

Figura 21 – Volcano plot da comparação (2) *Δugm1* vs controle



Legenda: Pontos vermelhos: proteínas que não satisfazem os critérios estatísticos critérios (*fold-change* e *q-valor*) estipulados pelo programa*;* Pontos verdes: proteínas não validadas estatisticamente, que satisfazem o critério de *fold change*; Pontos laranja: proteínas de baixa abundância que satisfazem ambos critérios estatísticos; Pontos azuis: proteína que satisfazem ambos os critérios estatísticos e de *fold change* e, portanto, escolhidas para as análises.
Nota: Proteínas em vermelho: 139; em verde: 316; em laranja: 217; em azul: 143. Total: 815 proteínas.
Fonte: A autora, 2017.

O enriquecimento dos dados proteômicos foi feito através da plataforma online *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* (Huang et al., 2009a.; Huang et al., 2009b). Foram considerados validados os processos biológicos com *p-valor* menor ou igual a 0,05 e *fold change* maior ou igual 1,1 e menor ou igual -1,1.

Os processos biológicos validados pelas análises feitas na plataforma *DAVID* são apresentados nas Figuras 22 a 24. Para facilitar a visualização dos resultados, os dados foram divididos em três gráficos. Na Figura 22 encontram-se os processos biológicos validados nas condições experimentais *Ku80 vs* controle; *Δugm1 vs* controle; e, *Δgt4C vs* controle. Na Figura 23, apresentamos os processos biológicos validados nas condições *Δugm1 vs Ku80* e *Δgt4C vs Ku80*. Na Figura 24, os processos biológicos validados nas condições *Δugm1 vs Δgt4C*.

As proteínas validadas nestes processos biológicos estão listadas na Tabela 3, juntamente com as informações dos números de acesso, *p-valor* e *fold change* de cada proteína para cada condição experimental.

Figura 22 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus com controle* (continua)

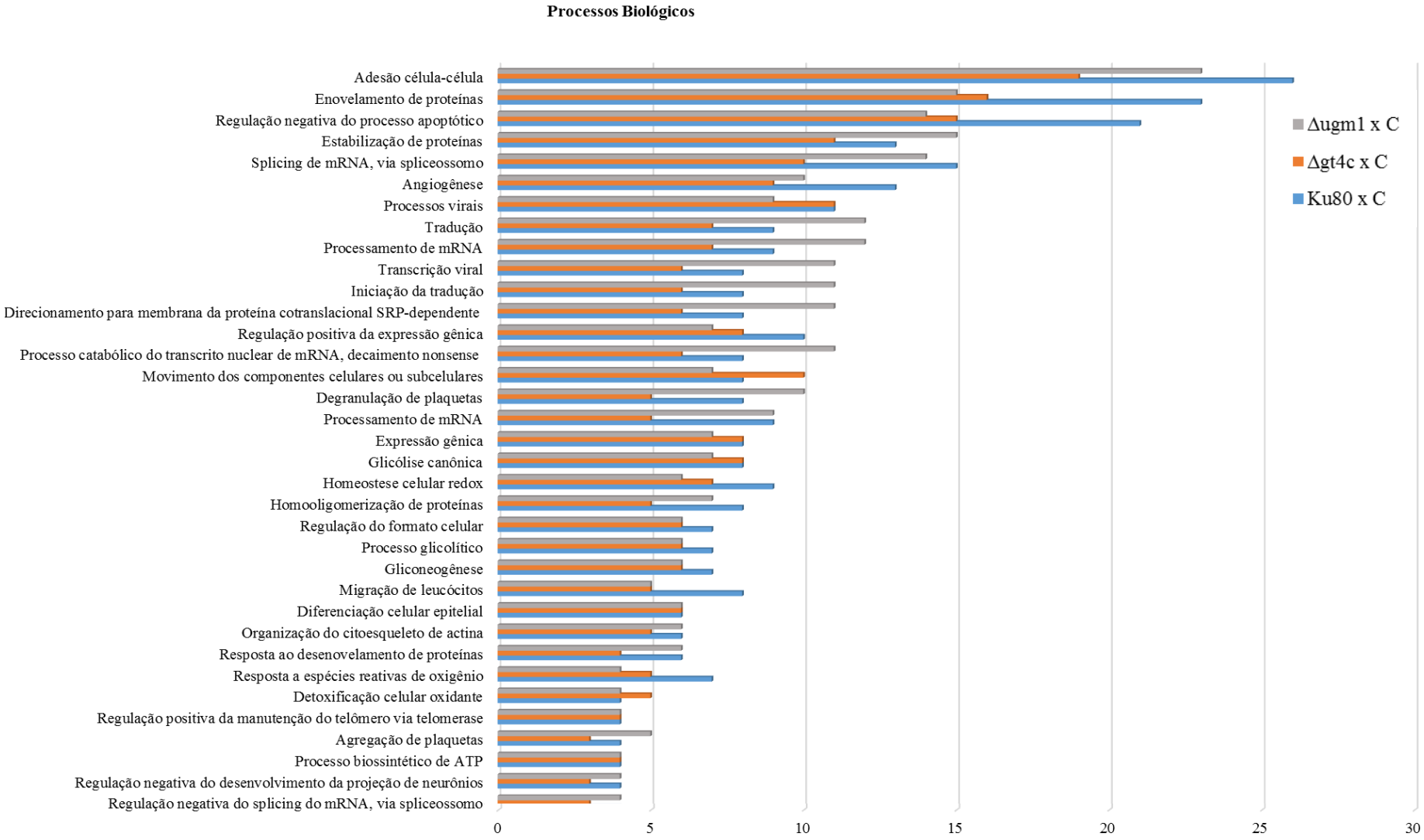


Figura 22 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus com controle* (continuação)

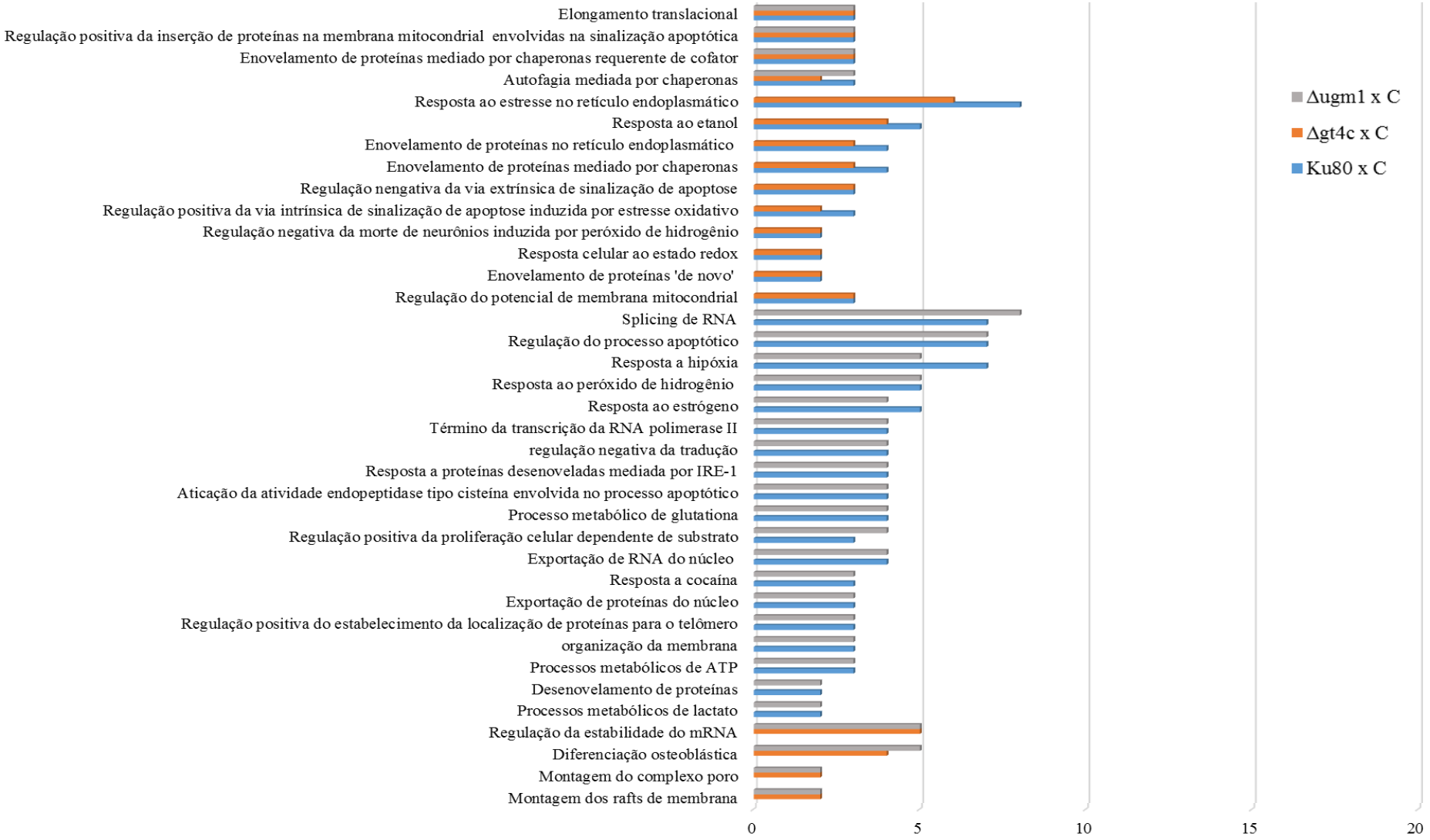


Figura 22 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus com controle* (continuação)

Figura 22 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus com controle* (conclusão)

Nota: Este gráfico compreende as análises de enriquecimento dos processos biológicos validados pelo *DAVID* nas comparações *Ku80 vs* controle; Δ*ugm1 vs* controle; e, Δ*gt4C vs* controle.
Fonte: A autora, 2017.

Figura 23 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* com a cepa selvagem (continua)

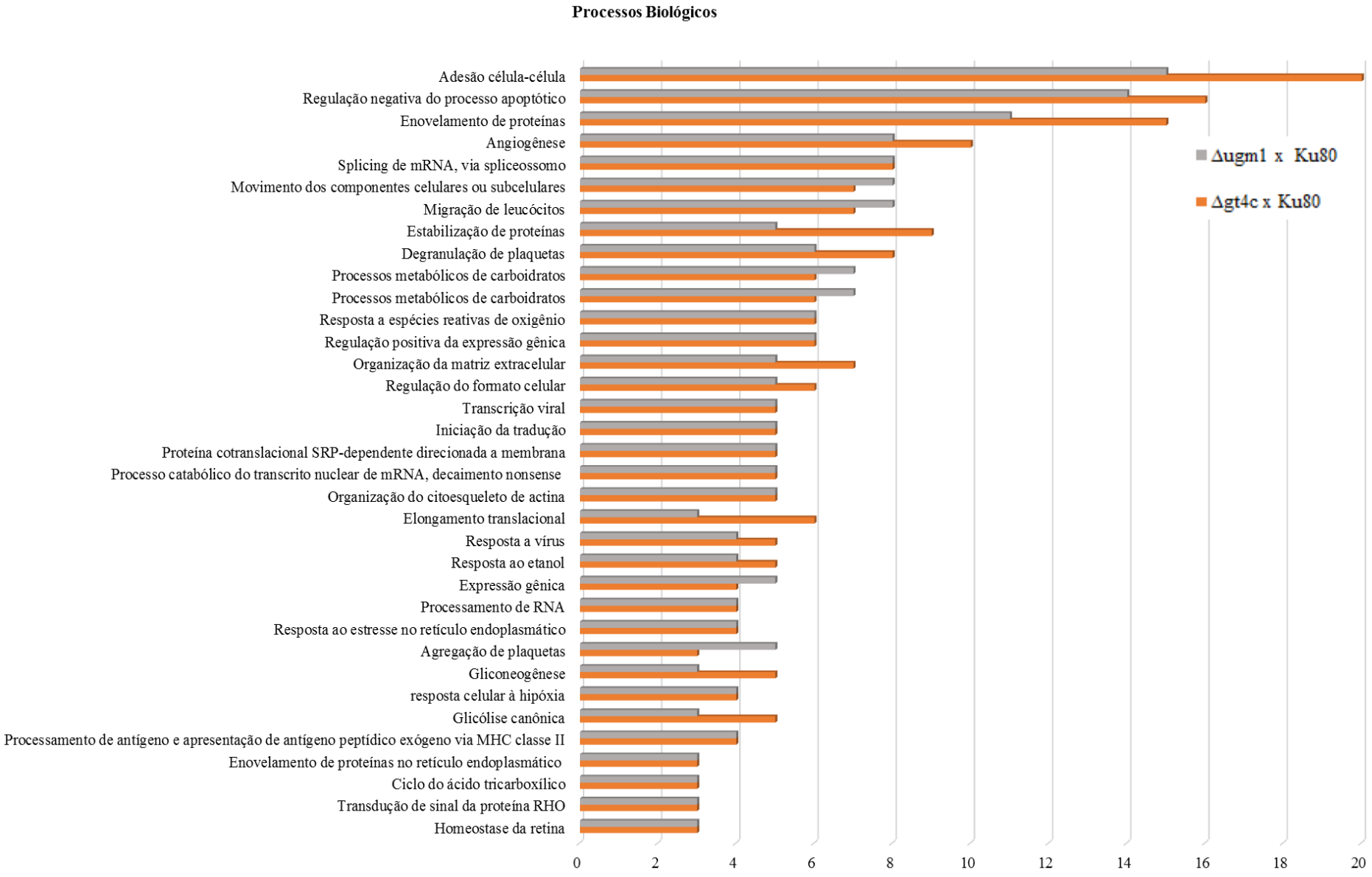


Figura 23 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* com a cepa selvagem (continuação)

Figura 23 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* com a cepa selvagem (conclusão)

Nota: Este gráfico compreende as análises de enriquecimento dos processos biológicos validados pelo *DAVID* nas comparações Δ*ugm1 vs Ku80*; e, Δ*gt4C vs Ku80*.
Fonte: A autora, 2017.

Figura 24 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* (continua)

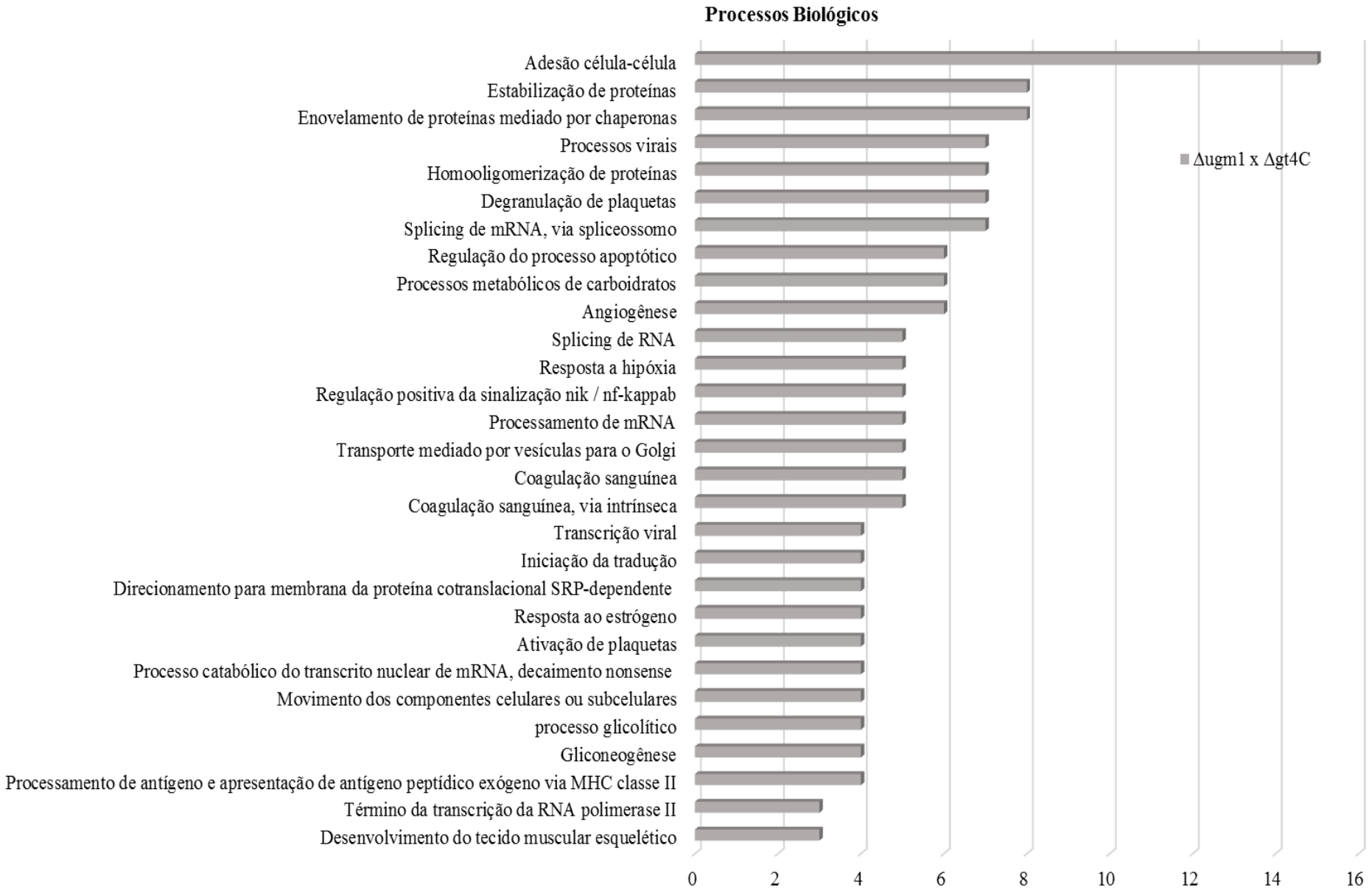


Figura 24 – Processos biológicos enriquecidos pelo DAVID validados nas comparações entre as cepas mutantes de *A. fumigatus* (conclusão)

Nota: Este gráfico compreende as análises de enriquecimento dos processos biológicos validados pelo *DAVID* nas comparações Δ*ugm1vs* Δ*gt4C*.
Fonte: A autora, 2017.

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continua)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 *vs* C	*Δgt4C* *vs* C	*Δugm1* *vs* C	*Δgt4C* *vs* *Ku80*	*Δugm1* *vs* *Ku80*	*Δugm1* *vs* *Δgt4C*	*Ku80* *vs* C	*Δgt4C* *vs* C	*Δugm1* *vs* C	*Δgt4C* *vs* *Ku80*	*Δugm1* *vs* *Ku80*	*Δugm1* *vs* *Δgt4C*
O00299	Proteína canal intracelular de cloreto 1	-2.84	-1.37	-1.32	2.07	2.14	N/V	1.0E-05	2.4E-03	5.2E-03	5.5E-04	2.9E-04	N/V
O15145	Proteína relacionada a actina complexo 2/3 subunidade 3	N/V	-1.19	-1.56	N/V	N/V	N/V	N/V	3.3E-02	3.7E-03	N/V	N/V	N/V
O43707	α-actinina-4	N/V	N/V	-1.59	N/V	-1.37	-1.40	N/V	N/V	2.7E-05	N/V	1.4E-02	6.3E-04
O43852	Calumenina	N/V	N/V	1.55	N/V	1.44	1.44	N/V	N/V	2.4E-04	N/V	1.6E-02	1.2E-03
O75083	Proteína contendo WD repetido 1	-2.01	-1.60	-1.49	N/V	N/V	N/V	3.5E-04	4.2E-05	1.5E-04	N/V	N/V	N/V
O75369	Filamina-B	1.18	N/V	-1.64	-1.28	-1.94	-1.52	2.6E-02	N/V	3.7E-05	1.0E-02	1.0E-05	1.2E-03
O75390	Citrato sintase mitocondrial	1.85	N/V	N/V	-1.34	-1.86	N/V	2.2E-04	N/V	N/V	3.4E-02	1.1E-03	N/V
O95810	Proteína de resposta a derivatização de soro	N/V	1.18	1.32	1.20	1.35	1.12	N/V	2.3E-04	1.0E-05	2.6E-02	6.9E-04	9.4E-05
P00338	L-lactato desidrogenase cadeia A	-1.87	N/V	-1.75	1.77	N/V	-1.66	5.2E-04	N/V	3.1E-04	2.2E-04	N/V	3.3E-05
P00352	Desidrogenase de retina 1	-1.57	N/V	N/V	1.45	N/V	N/V	9.1E-03	N/V	N/V	2.7E-02	N/V	N/V
P00387	Citocromo b5 NADH redutase 3	1.58	N/V	N/V	-1.46	-1.76	N/V	1.3E-03	N/V	N/V	5.8E-03	5.2E-04	N/V
P00441	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	-1.37	N/V	N/V	1.28	1.29	N/V	2.0E-03	N/V	N/V	2.4E-03	2.3E-02	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P00491	Nucleosídeo purina fosforilase	-3.35	-1.25	N/V	2.68	2.50	N/V	1.0E-05	1.6E-02	N/V	1.5E-05	9.2E-03	N/V
P00558	Fosfoglicerato quinase 1	-1.62	-1.25	-1.44	1.30	N/V	-1.16	2.0E-04	5.4E-05	1.0E-05	3.4E-02	N/V	1.6E-02
P02545	Prelamina-A/C	1.77	1.25	1.17	-1.42	-1.51	N/V	1.0E-05	1.0E-05	7.3E-03	1.0E-05	1.0E-05	N/V
P02751	Fibronectina	1.45	N/V	N/V	-1.46	N/V	N/V	2.0E-02	N/V	N/V	2.3E-02	N/V	N/V
P04075	Frutose-bisfosfato aldolase A	-1.55	-1.21	-1.44	1.29	N/V	-1.20	9.8E-04	5.8E-03	1.2E-04	2.8E-02	N/V	6.1E-03
P04080	Cistatina-B	-2.96	-1.48	N/V	N/V	N/V	N/V	2.4E-02	2.7E-02	N/V	N/V	N/V	N/V
P04083	Anexina A1	-3.00	-1.41	-1.38	2.13	2.17	N/V	1.0E-05	1.0E-05	4.0E-03	1.0E-05	4.1E-04	N/V
P04275	Fator von Willebrand	N/V	N/V	-1.68	N/V	-1.77	-2.00	N/V	N/V	5.1E-05	N/V	1.2E-03	4.1E-04
P04406	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	-1.63	-1.31	-1.32	1.25	1.24	N/V	2.3E-05	7.3E-05	2.1E-05	1.3E-02	1.2E-02	N/V
P04792	Proteína heat shock beta-1	-2.03	N/V	N/V	1.83	1.88	N/V	1.0E-05	N/V	N/V	1.1E-05	7.8E-04	N/V
P04843	Proteína fosfo-oligossacarídeo dolicol glicosiltransferase subunidade 1	1.85	1.66	N/V	N/V	-1.94	-1.74	1.0E-05	1.1E-04	N/V	N/V	1.0E-05	6.5E-04
P04899	Proteína G(i) de ligação ao nucleotídeo guanina sub. alfa-2	1.34	N/V	N/V	N/V	-1.47	N/V	1.2E-02	N/V	N/V	N/V	7.3E-03	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P05121	Inibidor de ativador de plasminogênio 1	2.67	N/V	2.63	-1.75	N/V	1.73	2.0E-03	N/V	5.1E-04	2.1E-02	N/V	8.9E-03
P05386	Proteína ribo. 60S acídica P1	N/V	N/V	N/V	1.75	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	2.5E-02	N/V	N/V
P05387	Proteína ribo.l 60S acídica P2	N/V	N/V	N/V	1.68	1.64	N/V	N/V	N/V	N/V	4.7E-03	4.7E-03	N/V
P05556	Integrina beta-1	1.78	N/V	N/V	-1.60	-1.74	N/V	1.0E-05	N/V	N/V	1.0E-05	2.3E-05	N/V
P06576	ATP sintase subunidade beta, mitocondrial	1.93	1.42	1.75	-1.36	N/V	1.23	1.4E-04	1.0E-05	1.9E-05	1.5E-02	N/V	1.7E-02
P06703	Proteína S100-A6	N/V	N/V	N/V	N/V	1.90	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.7E-02	N/V
P06748	Nucleofosmina	N/V	1.36	1.24	N/V	N/V	N/V	N/V	2.3E-05	1.2E-02	N/V	N/V	N/V
P07195	L-lactato desidrogenase cadeia B	-2.30	N/V	-1.60	2.06	1.43	-1.44	1.0E-05	N/V	2.0E-05	2.6E-05	2.2E-03	1.2E-03
P07237	Proteína dissulfeto isomerase	1.30	1.22	N/V	N/V	-1.22	-1.14	1.0E-03	4.0E-05	N/V	N/V	1.2E-02	1.5E-02
P07339	Catepsina D	-1.41	N/V	N/V	1.44	1.51	N/V	2.0E-02	N/V	N/V	9.0E-03	3.3E-03	N/V
P07355	Anexina A2	-1.19	-1.09	-1.40	N/V	-1.18	-1.28	3.3E-04	2.7E-02	1.0E-05	N/V	6.8E-03	4.8E-04
P07437	Tubulina cadeia beta	-1.84	-1.36	-1.45	N/V	N/V	N/V	1.6E-04	1.0E-05	1.0E-05	N/V	N/V	N/V
P07602	Prosaposina	N/V	4.41	2.55	5.62	N/V	-1.73	N/V	1.0E-05	2.2E-04	6.2E-05	N/V	6.9E-04

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P07686	Beta-hexosaminidase subunidade beta	N/V	N/V	3.41	N/V	3.09	N/V	N/V	N/V	8.8E-03	N/V	1.2E-02	N/V
P07737	Profilina-1	-2.14	-1.27	-1.41	1.69	1.51	N/V	1.0E-05	1.0E-05	6.5E-04	9.4E-05	1.0E-02	N/V
P07858	Catepsina B	N/V	1.19	N/V	N/V	N/V	-1.28	N/V	3.6E-03	N/V	N/V	N/V	8.7E-04
P07900	Proteína heat shock HSP 90 alfa	-1.60	N/V	-1.46	1.33	N/V	-1.22	2.7E-04	N/V	4.9E-04	4.8E-03	N/V	1.0E-02
P07910	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea C1/C2	N/V	1.34	1.24	N/V	N/V	N/V	N/V	7.8E-04	2.2E-03	N/V	N/V	N/V
P08133	Anexina A6	-2.89	-1.25	-2.05	2.32	N/V	-1.65	1.0E-05	1.0E-05	1.0E-05	1.0E-05	N/V	1.1E-04
P08238	Proteína heat shock HSP 90 beta	-1.36	N/V	-1.44	N/V	N/V	-1.20	1.5E-02	N/V	2.6E-03	N/V	N/V	8.1E-03
P08670	Vimentina	1.40	1.13	1.21	-1.24	-1.16	N/V	1.0E-05	7.0E-03	8.6E-05	4.0E-05	2.3E-04	N/V
P08758	Anexina A5	-2.28	N/V	-1.26	2.16	1.81	N/V	1.0E-05	N/V	1.4E-02	1.0E-05	4.0E-04	N/V
P08865	Proteína ribossomal 40S SA	-1.49	-1.16	-1.25	N/V	N/V	N/V	6.0E-03	2.6E-02	7.5E-03	N/V	N/V	N/V
P09211	Glutationa S-transferase P	-2.67	-1.40	-1.22	1.91	2.19	N/V	1.0E-05	1.7E-04	1.6E-02	7.1E-04	1.3E-04	N/V
P09382	Galectina-1	-1.32	-1.17	-1.39	N/V	N/V	-1.19	1.4E-03	1.0E-05	1.0E-05	N/V	N/V	1.3E-05
P09601	Heme oxigenase 1	39.01	N/V	15.06	-9.54	-2.59	3.68	1.5E-02	N/V	1.1E-02	2.7E-03	8.3E-03	4.8E-03

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P09651	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A1	1.46	1.63	N/V	N/V	-1.46	-1.62	6.9E-04	2.6E-05	N/V	N/V	7.1E-04	2.6E-05
P09972	Frutose-bisfosphate aldolase C	-1.60	-1.76	-1.59	N/V	N/V	N/V	1.4E-03	1.0E-05	7.6E-05	N/V	N/V	N/V
P10599	Tioredoxina	-3.58	-1.44	-1.28	2.49	2.81	N/V	1.0E-05	7.0E-05	4.0E-04	2.3E-04	1.0E-05	N/V
P10809	Proteína heat shock 60 kDa, mitocondrial	1.51	1.27	1.28	N/V	N/V	N/V	6.9E-04	5.6E-03	7.9E-03	N/V	N/V	N/V
P10909	Clusterina	N/V	N/V	N/V	1.16	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	4.1E-03	N/V	N/V
P11142	Proteína heat shock 71 kDa cognata	-1.44	-1.27	-1.25	N/V	N/V	N/V	1.7E-03	1.8E-02	3.4E-02	N/V	N/V	N/V
P11279	Glicoproteína 1 associada a membrana do lisossomo	1.42	1.75	1.46	1.23	N/V	-1.20	1.0E-05	1.0E-05	2.8E-04	3.5E-03	N/V	2.9E-02
P12814	α-actinina-1	N/V	N/V	-1.58	N/V	-1.48	-1.52	N/V	N/V	1.0E-05	N/V	5.1E-04	3.2E-05
P12956	Proteína 6 de reparo a raio-X cross-complementar	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	-1.34	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	2.5E-02
P13010	Proteína 5 de reparo a raio-X cross-complementar	1.28	1.29	N/V	N/V	-1.47	-1.48	3.0E-03	1.7E-02	N/V	N/V	1.6E-03	7.0E-03
P13473	Glicoproteína 2 associada a membrana do lisossomo	1.46	1.49	1.33	N/V	N/V	N/V	2.0E-05	7.3E-03	6.9E-04	N/V	N/V	N/V
P13598	Molécula de adesão intercelular 2	1.49	1.52	N/V	N/V	N/V	N/V	1.9E-04	3.0E-02	N/V	N/V	N/V	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P13639	Fator de alongamento 2	-2.67	N/V	-2.03	2.23	N/V	-1.70	1.0E-05	N/V	1.0E-05	1.8E-04	N/V	1.1E-04
P13667	Proteína dissulfeto isomerase A4	1.20	N/V	N/V	-1.24	N/V	N/V	1.4E-02	N/V	N/V	1.1E-02	N/V	N/V
P13693	Proteína tumoral controlada por tradução	-1.43	N/V	N/V	1.29	N/V	N/V	1.7E-02	N/V	N/V	5.1E-03	N/V	N/V
P13987	Glicoproteína CD59	1.71	1.61	N/V	N/V	-1.75	-1.64	4.1E-05	9.0E-05	N/V	N/V	4.4E-04	1.4E-03
P14314	Glicosidase 2 subunidade beta	1.54	N/V	1.78	-1.26	N/V	1.45	5.7E-05	N/V	1.3E-03	3.5E-02	N/V	2.5E-02
P14618	Piruvato quinase	-2.08	-1.42	-1.42	1.46	1.47	N/V	1.0E-05	1.0E-05	1.0E-05	8.5E-03	6.1E-03	N/V
P14625	Endoplasmina	1.52	1.10	N/V	-1.38	-1.41	N/V	1.0E-05	2.0E-02	N/V	9.5E-05	1.1E-04	N/V
P14866	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear L	1.79	N/V	N/V	-1.84	-1.65	N/V	1.9E-05	N/V	N/V	5.0E-05	1.1E-04	N/V
P15586	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	N/V	1.44	1.42	1.75	1.72	N/V	N/V	1.8E-05	5.1E-04	2.4E-04	6.0E-04	N/V
P16284	Molécula de adesão celular plaquetária endotelial	2.15	1.69	1.45	-1.27	-1.48	N/V	1.0E-05	2.0E-04	1.7E-02	4.1E-03	1.2E-03	N/V
P16949	Estafimina	N/V	1.75	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	9.3E-03	N/V	N/V	N/V	N/V
P17096	Proteína do grupo de alta mobilidade HMG-I/HMG-Y	N/V	N/V	N/V	N/V	-2.90	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.9E-02	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 vs C	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***	***Ku80 vs C***	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***
P17813	Endoglina	1.30	N/V	N/V	N/V	-1.74	-1.52	2.5E-02	N/V	N/V	N/V	6.7E-04	5.9E-03
P17987	Proteína do complexo T 1 sub A	-2.24	N/V	-1.69	2.03	N/V	-1.54	8.4E-05	N/V	2.6E-05	6.4E-04	N/V	3.0E-04
P18669	Fosfoglicerato mutase 1	-1.69	-1.76	-1.34	N/V	N/V	1.31	2.5E-04	1.0E-05	8.3E-04	N/V	N/V	1.9E-02
P19338	Nucleolina	1.77	1.23	1.36	-1.44	-1.30	N/V	1.0E-05	2.6E-04	4.4E-03	3.1E-04	1.0E-02	N/V
P20700	Lamina-B1	1.77	N/V	N/V	-1.49	-1.31	N/V	2.6E-04	N/V	N/V	7.0E-03	2.0E-02	N/V
P21291	Proteína rica em cisteína e glicina 1	-1.64	-1.57	-1.56	N/V	N/V	N/V	3.3E-03	3.5E-05	1.0E-05	N/V	N/V	N/V
P21333	Filamina-A	N/V	N/V	-1.87	N/V	-2.02	-1.71	N/V	N/V	3.8E-05	N/V	2.6E-05	3.2E-04
P21796	Proteína dependente de canal anionico 1	1.41	1.21	1.33	-1.17	N/V	1.10	2.1E-05	7.2E-04	1.3E-05	4.8E-03	N/V	8.8E-03
P21810	Biglicana	39.20	N/V	32.19	-47.03	N/V	38.62	6.1E-05	N/V	1.0E-05	1.3E-04	N/V	1.1E-05
P21980	Proteína gama-glutamiltransferase glutamina 2	-1.89	N/V	-1.41	1.61	1.34	-1.20	3.9E-05	N/V	8.1E-04	1.9E-04	3.7E-03	7.0E-03
P22626	Ribonucleoproteína het nuclear A2/B1	1.45	1.32	1.24	N/V	N/V	N/V	5.6E-03	1.6E-04	1.0E-02	N/V	N/V	N/V
P23246	Fator de splicing, rico em prol e glut	1.63	1.17	1.37	-1.39	N/V	N/V	1.1E-04	1.3E-02	2.7E-03	2.0E-03	N/V	N/V
P23284	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B	N/V	1.09	-1.09	N/V	N/V	-1.18	N/V	1.3E-03	5.3E-03	N/V	N/V	1.0E-05

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P23381	Triptofano tRNA ligase, citoplasmica	-2.96	-1.32	-1.45	N/V	N/V	N/V	1.0E-05	1.3E-03	5.5E-03	N/V	N/V	N/V
P23396	Proteína ribossomal 40S S3	-1.96	-1.66	-1.77	N/V	N/V	N/V	6.2E-04	1.0E-03	3.0E-04	N/V	N/V	N/V
P23528	Cofilina-1	-2.59	N/V	-1.34	2.59	1.94	N/V	1.0E-05	N/V	1.5E-02	1.0E-05	2.1E-03	N/V
P24534	Fator de alongamento 1-beta	N/V	1.38	N/V	1.94	1.63	N/V	N/V	1.4E-02	N/V	2.1E-03	1.5E-02	N/V
P25398	Proteína ribossomal 40S S12	-2.41	-1.33	-1.81	1.81	N/V	N/V	1.0E-05	1.5E-02	8.4E-04	1.4E-03	N/V	N/V
P25705	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial	1.50	1.30	1.22	-1.16	-1.23	N/V	1.0E-05	1.0E-05	1.0E-05	1.3E-03	3.1E-05	N/V
P26038	Moesina	-3.54	-1.39	-1.55	2.54	2.28	N/V	1.0E-05	4.7E-05	9.5E-04	1.0E-05	9.9E-04	N/V
P26599	Proteína polipirimidina de ligação ao trato 1	N/V	1.36	1.31	N/V	N/V	N/V	N/V	5.3E-03	2.0E-02	N/V	N/V	N/V
P26641	Fator de alongamento 1 gama	-1.32	N/V	-1.50	1.45	N/V	-1.66	5.1E-03	N/V	2.3E-03	2.5E-04	N/V	2.8E-04
P27105	Proteína de eritrócito integral de membrana	1.75	1.53	N/V	N/V	-1.78	-1.55	1.0E-05	7.4E-05	N/V	N/V	1.4E-04	1.6E-03
P27797	Calreticulina	1.15	N/V	1.19	-1.20	N/V	1.24	1.2E-02	N/V	1.1E-03	2.6E-03	N/V	1.6E-04
P27824	Calnexina	1.75	1.28	N/V	-1.36	-1.90	-1.39	1.0E-05	7.4E-04	N/V	3.1E-04	1.0E-05	3.0E-03
P28066	Proteassoma tipo-5 subunidade alfa	N/V	-1.20	N/V	N/V	1.73	1.25	N/V	1.5E-02	N/V	N/V	3.6E-03	1.7E-02

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 vs C	*Δgt4C vs C*	*Δugm1 vs C*	*Δgt4C vs Ku80*	*Δugm1 vs Ku80*	*Δugm1 vs Δgt4C*	*Ku80 vs C*	*Δgt4C vs C*	*Δugm1 vs C*	*Δgt4C vs Ku80*	*Δugm1 vs Ku80*	*Δugm1 vs Δgt4C*
P29401	Transcetolase	N/V	N/V	-1.21	N/V	-1.21	-1.15	N/V	N/V	1.0E-05	N/V	3.3E-02	3.6E-05
P29692	Fator de alongamento1-delta	N/V	-1.16	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	3.0E-02	N/V	N/V	N/V	N/V
P30040	Proteína residente de retículo endoplasmático 29	1.36	1.26	1.37	N/V	N/V	N/V	3.1E-03	2.0E-02	1.6E-02	N/V	N/V	N/V
P30044	Peroxirredoxina-5, mitocondrial	-2.01	N/V	N/V	1.97	N/V	N/V	2.0E-04	N/V	N/V	2.4E-04	N/V	N/V
P30048	Peroxido redutase tiorredoxina-dependente, mitocondrial	N/V	1.38	1.18	N/V	N/V	N/V	N/V	2.9E-04	2.4E-02	N/V	N/V	N/V
P30050	Proteína ribossomal 60S L12	-1.16	-1.22	-1.48	N/V	-1.28	-1.21	1.7E-02	1.7E-03	2.5E-05	N/V	1.2E-03	3.9E-03
P30101	Proteína dissulfeto isomerase A3	1.35	1.21	N/V	N/V	-1.21	N/V	1.0E-05	1.8E-04	N/V	N/V	1.6E-03	N/V
P31942	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear H3	1.63	N/V	1.25	-1.51	-1.31	1.15	1.0E-05	N/V	7.1E-04	1.0E-05	2.4E-04	2.8E-02
P31943	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear H	1.89	N/V	1.47	-1.96	-1.29	1.52	1.0E-05	N/V	3.7E-04	1.0E-05	4.6E-04	5.3E-05
P31946	Proteína 14-3-3 beta/alfa	-2.64	-1.23	-1.31	N/V	N/V	N/V	1.0E-05	1.2E-02	2.8E-03	N/V	N/V	N/V
P32119	Peroxirredoxina-2	-2.21	N/V	N/V	2.34	2.17	N/V	4.6E-03	N/V	N/V	5.4E-04	3.2E-03	N/V
P33151	Caderina-5	N/V	N/V	-3.11	N/V	N/V	-3.66	N/V	N/V	5.5E-03	N/V	N/V	5.8E-05
P35232	Proibitina	2.11	1.60	1.67	-1.32	-1.27	N/V	1.0E-05	1.1E-03	7.3E-05	9.8E-03	9.0E-03	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P35268	Proteína ribossomal 60S L22	N/V	N/V	-1.45	1.29	-1.25	-1.61	N/V	N/V	7.4E-04	2.1E-02	3.2E-02	7.1E-05
P35579	Miosina-9	-1.65	-1.19	-2.39	1.39	-1.45	-2.01	1.0E-05	1.3E-02	1.0E-05	4.2E-03	3.1E-03	1.0E-05
P35613	Basigina	1.68	N/V	N/V	-1.57	-1.57	N/V	2.8E-05	N/V	N/V	2.5E-05	8.4E-04	N/V
P37802	Transgelina-2	-3.99	-1.18	-1.48	3.38	2.69	-1.26	1.0E-05	1.6E-03	3.3E-04	1.0E-05	1.3E-04	1.8E-02
P37837	Transaldolase	N/V	N/V	-1.82	N/V	-2.24	-2.12	N/V	N/V	9.4E-05	N/V	3.3E-05	1.0E-05
P38646	Proteína de estresse 70, mitocondrial	1.77	1.23	1.37	-1.44	N/V	N/V	1.7E-04	2.7E-03	1.1E-02	5.4E-03	N/V	N/V
P39656	Proteína glicosiltransferase subunidade de 48 kDa	N/V	1.94	N/V	N/V	N/V	-1.85	N/V	7.2E-04	N/V	N/V	N/V	9.3E-04
P40227	Proteína 1 complexo T subunidade zeta	-1.82	-1.62	-1.98	N/V	N/V	N/V	1.6E-04	1.0E-05	1.0E-05	N/V	N/V	N/V
P40926	Malato desidrogenase, mitocondrial	1.39	N/V	1.15	-1.45	-1.21	1.20	3.1E-04	N/V	3.5E-02	2.2E-04	1.2E-02	1.5E-02
P40939	Enzima trifuncional subunidade alfa, mitocondrial	1.35	N/V	N/V	-1.24	-1.45	N/V	7.2E-04	N/V	N/V	1.6E-02	1.5E-03	N/V
P42785	Carboxipeptidase lisossomal Pro-X	N/V	1.58	1.24	1.34	N/V	-1.27	N/V	1.0E-05	3.4E-03	7.5E-03	N/V	5.3E-03
P43121	Glicoproteína de superfície celular MUC18	1.88	N/V	N/V	-1.51	-1.41	N/V	6.2E-05	N/V	N/V	9.5E-04	2.1E-02	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 vs C	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***	***Ku80 vs C***	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***
P45880	Proteína 2 de canal seletivo aniônico dependente de voltagem	1.67	1.22	1.22	-1.37	-1.36	N/V	1.0E-05	4.0E-04	1.5E-03	1.0E-05	1.0E-05	N/V
P47755	Subunidade alfa 2 da proteína de capping de F-actina	N/V	-1.22	N/V	N/V	1.86	1.35	N/V	2.3E-02	N/V	N/V	3.9E-05	1.4E-04
P48681	Nestina	2.03	N/V	N/V	-1.73	-1.70	N/V	4.3E-04	N/V	N/V	6.8E-04	7.3E-03	N/V
P48735	Isocitrato desidrogenase [NADP], mitocondrial	1.58	1.28	N/V	-1.24	-1.72	-1.38	1.3E-04	2.2E-03	N/V	2.6E-02	7.6E-04	1.7E-02
P49368	Proteína de complexo T 1 subunidade gama	N/V	-1.27	-1.36	N/V	N/V	N/V	N/V	3.5E-02	1.5E-02	N/V	N/V	N/V
P49411	Fator de alongamento Tu, mitocondrial	1.94	1.30	1.30	-1.50	-1.50	N/V	1.0E-05	1.2E-04	5.8E-03	1.0E-05	1.0E-05	N/V
P49755	Proteína transmembrana emp24 contendo domínio 10	N/V	1.45	N/V	N/V	N/V	-1.43	N/V	7.7E-03	N/V	N/V	N/V	3.6E-03
P50395	Rab GDP inibidor de dissociação beta	-1.89	-1.21	-1.64	1.56	N/V	-1.35	2.0E-04	1.5E-02	1.0E-05	8.5E-03	N/V	1.5E-03
P50454	Serpina H1	N/V	1.16	1.08	N/V	N/V	N/V	N/V	1.2E-03	2.9E-02	N/V	N/V	N/V
P50990	Proteína de complexo T 1 subunidade theta	-1.60	-1.32	-2.12	N/V	N/V	-1.61	3.9E-03	3.0E-03	1.0E-05	N/V	N/V	1.5E-05
P51149	Proteína relacionada a Ras Rab-7a	1.70	1.22	N/V	-1.40	-1.87	-1.33	1.0E-05	2.3E-02	N/V	1.2E-03	1.0E-05	1.2E-02

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 vs C	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***	***Ku80 vs C***	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***
P51571	Proteína associada a translocon subunidade delta	1.39	1.26	N/V	N/V	-1.35	-1.22	1.0E-05	8.6E-05	N/V	N/V	6.7E-04	1.5E-02
P51991	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A3	1.41	1.41	N/V	N/V	N/V	N/V	1.8E-02	3.0E-03	N/V	N/V	N/V	N/V
P52272	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea M	1.61	1.27	N/V	-1.27	-1.38	N/V	1.0E-05	2.9E-04	N/V	7.2E-04	6.8E-04	N/V
P52565	Rho GDP inibidor de dissociação 1	-2.21	-1.49	N/V	1.48	1.93	1.30	1.0E-05	1.0E-05	N/V	5.1E-03	1.1E-04	2.4E-03
P52566	Rho GDP inibidor de dissociação 2	-3.38	-2.10	N/V	1.61	2.70	1.68	1.4E-04	5.0E-04	N/V	2.6E-03	5.7E-05	1.2E-03
P52597	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear F	1.95	N/V	N/V	-1.54	-1.51	N/V	3.5E-05	N/V	N/V	9.4E-04	2.2E-03	N/V
P52907	Subunidade alfa 1 da proteína de capping de F-actina	N/V	-1.23	1.26	-1.25	1.24	1.55	N/V	3.6E-02	1.1E-02	3.5E-02	2.1E-02	7.6E-04
P52943	Proteína rica em cisteína 2	-1.30	-1.50	-1.38	N/V	N/V	N/V	3.1E-02	1.0E-05	1.0E-05	N/V	N/V	N/V
P53999	Coativador transcricional ativado de RNA polimerase II p15	1.70	1.40	1.80	N/V	N/V	1.29	6.7E-04	8.0E-03	1.2E-05	N/V	N/V	2.5E-03
P55072	ATPase transicional de reticulo endoplasmático	-1.21	N/V	-1.39	N/V	N/V	-1.34	3.6E-02	N/V	1.8E-04	N/V	N/V	2.3E-04
P55209	Proteína de montagem de nucleossomo 1 tipo 1	-1.32	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	3.2E-03	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 vs C	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***	***Ku80 vs C***	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***
P59998	Proteína relacionada actina complexo 2/3 subunidade 4	-1.87	N/V	-1.77	N/V	N/V	N/V	5.0E-03	N/V	2.0E-02	N/V	N/V	N/V
P60174	Triosefosfato isomerase	-2.49	-1.15	N/V	2.15	2.19	N/V	1.0E-05	3.1E-02	N/V	1.0E-05	4.0E-04	N/V
P60660	Miosina polipeptídeo leve 6	-2.41	N/V	-1.35	2.37	1.78	-1.33	1.0E-05	N/V	4.7E-03	1.0E-05	8.2E-04	4.2E-03
P60866	Proteína ribossomal 40S S20	N/V	N/V	-1.98	N/V	-1.85	-1.86	N/V	N/V	1.0E-05	N/V	4.7E-04	1.0E-05
P60900	Proteassoma subunidade alfa tipo-6	N/V	N/V	-1.17	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	2.1E-02	N/V	N/V	N/V
P60903	Proteína S100-A10	-1.21	1.14	1.16	1.39	1.41	N/V	1.7E-03	8.2E-03	6.2E-03	3.2E-03	3.5E-03	N/V
P61158	Proteína relacionada actina 3	-1.32	-1.13	-1.19	N/V	N/V	N/V	3.4E-03	2.5E-02	6.6E-03	N/V	N/V	N/V
P61247	Proteína ribossomal 40S S3a	-1.50	N/V	-2.10	N/V	N/V	-1.82	8.2E-03	N/V	1.0E-05	N/V	N/V	1.0E-05
P61604	Proteína heat shock 10 kDa, mitocondrial	1.79	1.34	1.34	-1.33	-1.33	N/V	3.8E-04	9.1E-05	4.2E-05	2.2E-02	1.7E-02	N/V
P61916	Proteína Epididimal secretória E1	N/V	N/V	1.17	N/V	1.31	1.12	N/V	N/V	2.8E-02	N/V	2.5E-02	8.8E-03
P61978	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K	1.11	1.13	N/V	N/V	N/V	N/V	2.0E-03	2.6E-03	N/V	N/V	N/V	N/V
P61981	Proteína 14-3-3 gama	N/V	N/V	-1.14	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.8E-02	N/V	N/V	N/V
P62081	Proteína ribossomal 40S S7	-5.07	N/V	N/V	5.75	5.09	N/V	2.2E-05	N/V	N/V	1.0E-05	2.4E-02	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P62158	Calmodulina	-1.95	N/V	N/V	1.77	N/V	N/V	2.7E-04	N/V	N/V	9.9E-03	N/V	N/V
P62258	Proteína 14-3-3 epsilon	-2.38	N/V	N/V	2.20	2.22	N/V	1.0E-05	N/V	N/V	1.0E-05	2.2E-05	N/V
P62263	Proteína ribossomal 40S S14	N/V	N/V	-1.40	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.9E-02	N/V	N/V	N/V
P62304	Ribonucleoproteína nuclear pequena E	N/V	N/V	1.56	N/V	1.56	1.37	N/V	N/V	2.5E-02	N/V	1.1E-02	8.7E-03
P62318	Ribonucleoproteína nuclear pequena Sm D3	1.73	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	3.5E-02	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V
P62701	Proteína ribossomal 40S S4, X isoforma	-2.08	-1.45	-2.72	N/V	N/V	N/V	3.2E-04	8.8E-03	3.4E-05	N/V	N/V	N/V
P62805	Histona H4	2.50	N/V	N/V	-2.50	N/V	N/V	4.5E-03	N/V	N/V	3.3E-03	N/V	N/V
P62826	Proteína Ran ligante de GTP nuclear	-1.99	-1.16	-1.33	1.71	1.50	-1.14	1.0E-05	8.9E-03	2.4E-04	1.8E-04	3.0E-03	1.8E-02
P62829	Proteína ribossomal 60S L23	-1.91	-1.82	N/V	N/V	N/V	N/V	8.7E-03	4.6E-03	N/V	N/V	N/V	N/V
P62857	Proteína ribossomal 40S S28	N/V	N/V	-1.22	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	2.6E-04	N/V	N/V	N/V
P62873	Proteína de ligação a nucleotídeos Guanina G(I)/G(S)/G(T)	2.13	N/V	N/V	-1.88	-1.45	N/V	1.0E-05	N/V	N/V	3.1E-05	1.8E-03	N/V
P62937	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	-2.27	-1.35	-1.49	1.69	1.52	N/V	1.0E-05	8.3E-05	1.1E-03	1.1E-03	2.5E-02	N/V
P62942	Peptidil-prolil cis-trans isomerase FKBP1A	-2.90	-1.29	N/V	2.25	2.55	N/V	1.0E-05	1.1E-03	N/V	4.2E-05	2.2E-03	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta	-1.98	-1.10	-1.36	1.80	1.45	-1.24	1.0E-05	2.5E-02	5.4E-04	1.0E-05	3.0E-03	5.8E-03
P63167	Cadeia leve 1 da Dineína	N/V	-1.33	N/V	N/V	N/V	1.25	N/V	2.0E-02	N/V	N/V	N/V	5.2E-03
P63173	60S Proteína ribossomal L38	N/V	N/V	-1.66	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.4E-02	N/V	N/V	N/V
P63244	Receptor da proteína C quinase 1 ativada	-1.83	-1.26	-1.46	1.45	N/V	-1.16	2.2E-03	2.3E-02	2.1E-03	2.6E-02	N/V	2.4E-02
P98160	*Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core Proteína*	7.89	N/V	N/V	-8.26	-3.02	N/V	6.0E-04	N/V	N/V	1.0E-03	5.2E-03	N/V
Q00610	Cadeia pesada da clatrina 1	N/V	N/V	-1.75	-1.28	-2.07	-1.61	N/V	N/V	7.6E-04	1.5E-02	1.0E-05	3.3E-03
Q01130	Fator 2 de *splicing* rico em serina/arginina	1.41	N/V	1.52	-1.44	N/V	1.56	3.7E-05	N/V	3.0E-03	1.9E-04	N/V	4.5E-03
Q01518	Proteína 1 associada a Adenilil ciclase	-3.84	-1.69	-1.99	N/V	N/V	N/V	1.0E-05	1.5E-05	1.0E-05	N/V	N/V	N/V
Q01813	Fosfofrutoquinase-6 ATP dependente, tipo plaquetário	-4.03	-1.86	-3.22	N/V	N/V	N/V	1.0E-05	4.0E-04	1.0E-05	N/V	N/V	N/V
Q03135	Caveolina-1	1.33	1.49	N/V	N/V	-1.29	-1.45	1.1E-02	8.9E-03	N/V	N/V	2.2E-02	1.4E-02
Q06830	Peroxirredoxina-1	-1.84	-1.22	-1.36	1.51	1.35	N/V	5.9E-05	2.0E-04	1.4E-05	5.4E-03	2.9E-02	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
Q07021	Proteína de ligação ao subcomponente 1 Q, componente do complemento	1.35	N/V	1.46	N/V	N/V	1.32	3.7E-02	N/V	3.6E-04	N/V	N/V	4.9E-03
Q07065	Proteína 4 associada ao citoesqueleto	1.68	1.28	N/V	-1.31	-1.55	N/V	1.0E-05	1.0E-05	N/V	1.0E-05	4.0E-05	N/V
Q07955	Fator 1 de splicing rico em serina/arginina	1.90	1.44	1.82	-1.31	N/V	N/V	1.0E-05	2.5E-04	8.9E-04	3.9E-03	N/V	N/V
Q09666	Proteína AHNAK associada a fiferenciação do neuroblasto	1.24	N/V	-1.52	-1.35	-1.88	-1.39	3.8E-02	N/V	1.6E-02	9.4E-04	5.2E-05	2.4E-02
Q12805	Proteína 1 de matriz extracelular tipo fibulina contendo EGF	3.53	N/V	N/V	-2.53	-2.10	N/V	2.6E-05	N/V	N/V	2.8E-04	9.5E-04	N/V
Q12905	Intensificador de interleucina - fator de ligação 2	1.66	1.36	N/V	N/V	-1.64	N/V	6.3E-03	4.8E-03	N/V	N/V	1.2E-02	N/V
Q13151	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A0	N/V	N/V	1.28	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.1E-02	N/V	N/V	N/V
Q13162	Peroxirredoxina-4	N/V	N/V	1.59	N/V	N/V	1.43	N/V	N/V	1.8E-03	N/V	N/V	4.7E-03
Q14103	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea D0	N/V	1.23	1.17	N/V	N/V	N/V	N/V	2.7E-03	3.1E-02	N/V	N/V	N/V
Q14195	Proteína 3 relacionada a Dihidropirimidinase	-1.48	-1.41	-1.47	N/V	N/V	N/V	1.3E-02	8.7E-04	7.6E-05	N/V	N/V	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		Ku80 vs C	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***	***Ku80 vs C***	***Δgt4C vs C***	***Δugm1 vs C***	***Δgt4C vs Ku80***	***Δugm1 vs Ku80***	***Δugm1 vs Δgt4C***
Q14697	Alfa-glucosidase AB neutra	1.61	1.28	N/V	-1.26	-1.57	-1.25	1.0E-05	2.0E-04	N/V	3.8E-04	1.0E-05	4.6E-05
Q14847	Domínio LIM e SH3 da proteína 1	-2.15	-1.47	-1.48	N/V	N/V	N/V	3.4E-04	1.4E-03	6.4E-04	N/V	N/V	N/V
Q15084	Proteína dissulfeto isomerase A6	1.14	1.19	1.36	N/V	N/V	N/V	3.8E-02	8.7E-04	1.3E-03	N/V	N/V	N/V
Q15233	Proteína de ligação a octâmero contendo domínio Non-POU	1.28	N/V	1.78	N/V	1.39	1.69	2.1E-02	N/V	1.9E-05	N/V	4.4E-03	8.6E-05
Q15293	Reticulocalbina-1	N/V	N/V	N/V	1.70	1.95	N/V	N/V	N/V	N/V	1.8E-02	1.0E-03	N/V
Q15365	Proteína 1 de ligação Poly(rC)	N/V	N/V	-1.23	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.9E-02	N/V	N/V	N/V
Q16629	Fator 7 de splicing rico em serina/arginina	1.64	N/V	1.62	-1.61	N/V	1.59	1.3E-02	N/V	5.3E-05	2.2E-02	N/V	4.2E-04
Q16658	Fascina	-2.05	-1.36	-1.54	1.51	1.32	N/V	1.0E-05	1.2E-04	1.0E-05	4.0E-03	3.0E-02	N/V
Q6NZI2	Polimerase I e Fator de liberação de transcrição	-1.09	N/V	N/V	N/V	1.21	N/V	2.4E-02	N/V	N/V	N/V	6.4E-03	N/V
Q7KZF4	Proteína 1 contendo domínio de nuclease estafilocócica	N/V	N/V	N/V	1.72	N/V	-2.72	N/V	N/V	N/V	3.9E-02	N/V	3.3E-03
Q8N3V7	Sinaptopodina	12.87	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.4E-02	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V
Q8NBS9	Proteína 5 contendo o domínio da Thioredoxina	1.40	1.12	N/V	-1.25	-1.29	N/V	1.0E-05	1.1E-03	N/V	3.1E-05	3.9E-04	N/V

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (continuação)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
Q8TDB4	Proteína MGARP	N/V	N/V	N/V	-1.72	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	3.5E-02	N/V	N/V
Q969H8	Fator de crescimento mielóide-derivado	1.68	1.31	1.47	-1.28	N/V	N/V	1.0E-05	5.4E-03	2.2E-04	7.5E-03	N/V	N/V
Q96CX2	Proteína KCTD12 contendo domínio BTB/POZ	-1.66	N/V	N/V	1.55	1.46	N/V	4.6E-03	N/V	N/V	1.5E-02	1.3E-02	N/V
Q96FW1	Ubiquitina tioesterase OTUB1	N/V	2.35	2.01	N/V	N/V	N/V	N/V	7.9E-03	3.2E-02	N/V	N/V	N/V
Q96HC4	Proteína 5 contendo domínio PDZ e LIM	2.18	N/V	N/V	-2.58	-1.60	N/V	5.8E-05	N/V	N/V	1.1E-04	3.5E-03	N/V
Q99497	Proteína DJ-1	-3.17	-1.36	N/V	2.33	2.72	N/V	1.0E-05	4.2E-03	N/V	3.6E-05	1.0E-05	N/V
Q99536	Protepina de vesícula sináptica homóloga a VAT-1	N/V	1.19	N/V	N/V	N/V	-1.22	N/V	9.7E-03	N/V	N/V	N/V	1.7E-02
Q9BRX8	Proteína Redox reguladora FAM213A	N/V	1.18	N/V	N/V	N/V	N/V	N/V	1.0E-02	N/V	N/V	N/V	N/V
Q9BUF5	Tubulina beta cadeia 6	-3.70	-1.25	-1.40	2.96	2.65	N/V	1.0E-05	3.2E-03	1.3E-02	1.0E-05	1.0E-03	N/V
Q9H299	Domínio SH3 de ligação rico em ácido glutâmico-like da proteína 3	N/V	N/V	6.44	N/V	3.74	N/V	N/V	N/V	2.0E-03	N/V	2.6E-02	N/V
Q9UNN8	Receptor da proteína C endotelial	N/V	N/V	-1.62	N/V	-2.16	-1.76	N/V	N/V	2.4E-02	N/V	1.7E-02	1.7E-02

Tabela 3 – Proteínas validadas nos processos biológicos enriquecidos na plataforma DAVID, em cada uma das condições estudadas (conclusão)

N° Acesso	Proteína	*Fold change - Log(2) ratio*						ANOVA *p-valor*					
		***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***	***Ku80* vs C**	***Δgt4C* vs C**	***Δugm1* vs C**	***Δgt4C* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Ku80***	***Δugm1* vs *Δgt4C***
Q9UQ80	Proteína associada a proliferação 2G4	-1.90	-1.99	-2.02	N/V	N/V	N/V	1.1E-02	3.4E-03	4.9E-03	N/V	N/V	N/V
Q9Y3B3	Proteína 7 contendo domínio emp24 transmembrana	2.22	1.75	N/V	N/V	-1.91	-1.51	1.6E-04	4.2E-05	N/V	N/V	7.8E-04	1.3E-03
Q9Y4L1	Proteína *up*-regulada de hipóxia 1	1.33	1.24	1.33	N/V	N/V	N/V	4.1E-05	2.1E-03	9.4E-04	N/V	N/V	N/V
Q9Y696	Proteína 4 de canal intracelular de cloreto	N/V	-1.57	-1.35	N/V	N/V	N/V	N/V	4.3E-04	6.2E-04	N/V	N/V	N/V

Legenda: C – Controle (HUVECs não infectadas); N/V – proteína não validada na condição em questão.
Fonte: A autora, 2017.

Como observado nas Figuras 22 a 24 e na Tabela 3, uma gama de processos biológicos foi validada após o enriquecimento dos dados na plataforma *DAVID*, em cada uma das condições estudadas. A partir dos dados enriquecidos, uma análise criteriosa foi feita a fim de identificarmos os processos biológicos mais relevantes nas células endoteliais, que estariam relacionados com a GAG da superfície de *A. fumigatus*. A seleção dos processos baseou-se no quadro clínico-patológico associado à aspergilose invasiva.

Para estas análises, foram consideradas as comparações (1) *Ku80 vs* Controle, (4) *Δugm1 vs Ku80*, (5) *Δgt4c vs Ku80* e (6) *Δugm1 vs Δgt4c*. Desse modo, foi possível avaliar com mais clareza o efeito das diferenças na expressão de GAG na superfície celular das cepas selvagem e mutantes de *A. fumigatus* (*Ku80*, *Δgt4c* e *Δugm1*) na modulação biológica das HUVECs.

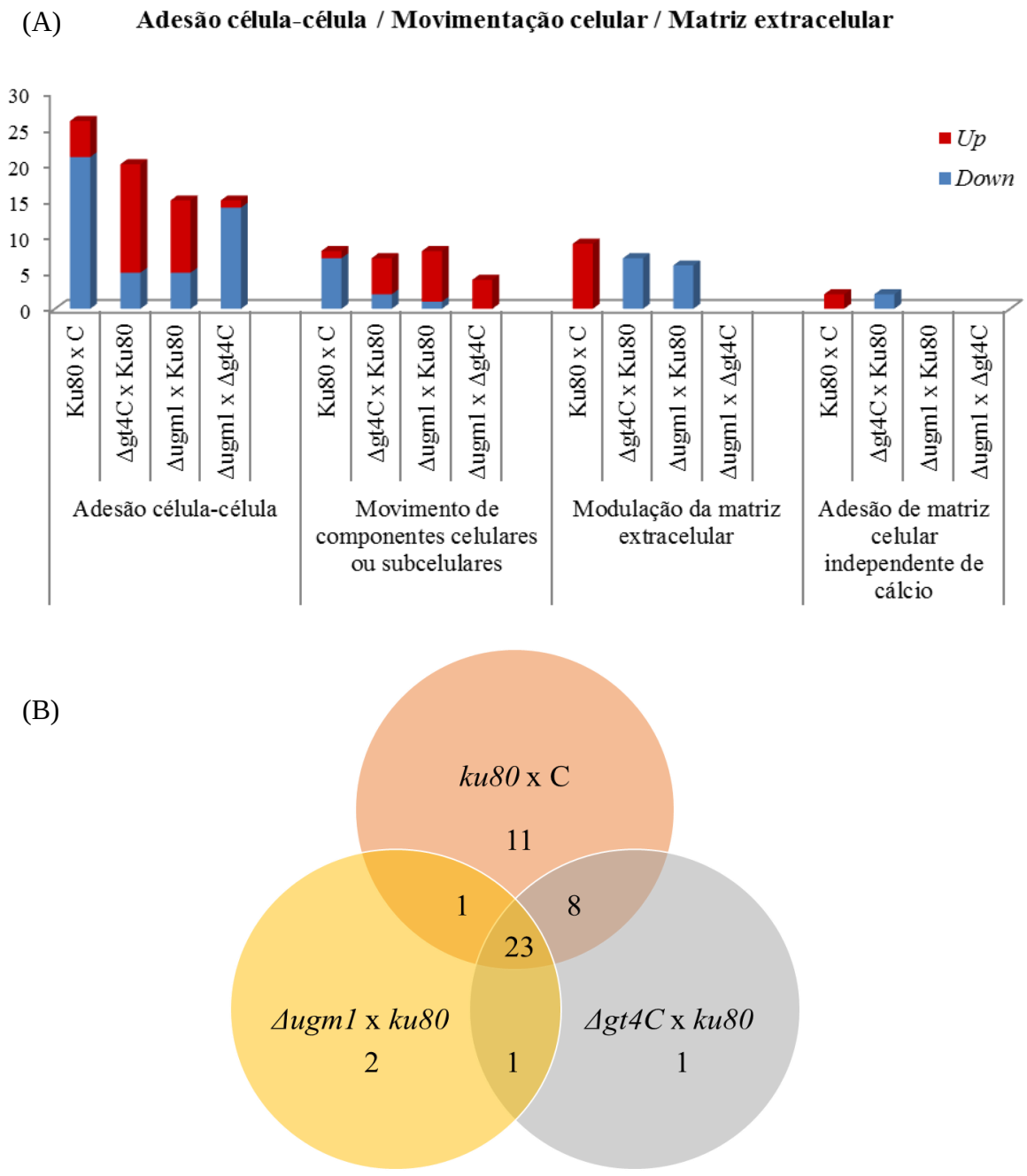
Com base neste critério, os processos biológicos selecionados e correlacionados foram agrupados em: **Grupo 1 - Adesão/ Movimentos celulares/ Matriz extracelular; Grupo 2 - Homeostase/ Coagulação/ Angiogênese; Grupo 3 - Estresse; Grupo 4 - Resposta imune/ Migração leucocitária; e, Grupo 5 - Processos apoptóticos**.

Estes cinco grupos, com seus respectivos processos biológicos, foram apresentados em gráficos de barra indicando proteínas com expressão aumentada e diminuída, representadas pelas cores azul (expressão diminuída) e vermelho (expressão aumentada), respectivamente, nas Figuras 25A a 29A.

Ainda com base nesses dados, foram construídos diagramas de Venn, a fim de elucidarmos quais proteínas moduladas estariam efetivamente relacionadas com a presença de GAG na superfície celular de *A. fumigatus*. Como a mutante *Δgt4C* não possui GAG em sua superfície, pudemos concluir que as proteínas de HUVECs alteradas na interação com esta mutante não estão sob efeito desse polissacarídeo, sendo esta modulação considerada GAG-independente. Desse modo, no diagrama de Venn pode-se observar que, as proteínas de HUVECs que demonstram estar efetivamente relacionadas com presença da GAG na superfície do *A. fumigatus*, encontram-se na porção do diagrama que corresponde a condição *Δugm1 vs Ku80* e a intersecção *Δugm1 vs Ku80* ∩ *Ku80 vs* controle, descartando as porções no diagrama comuns à condição *Δgt4C vs Ku80* (figuras 25B a 29B).

No Quadro 3 estão listadas as proteínas que satisfazem esta condição e, portanto, estão diretamente relacionadas com a presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*, sendo sua modulação nas HUVECs considerada dependente de GAG.

Figura 25 – Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 1.

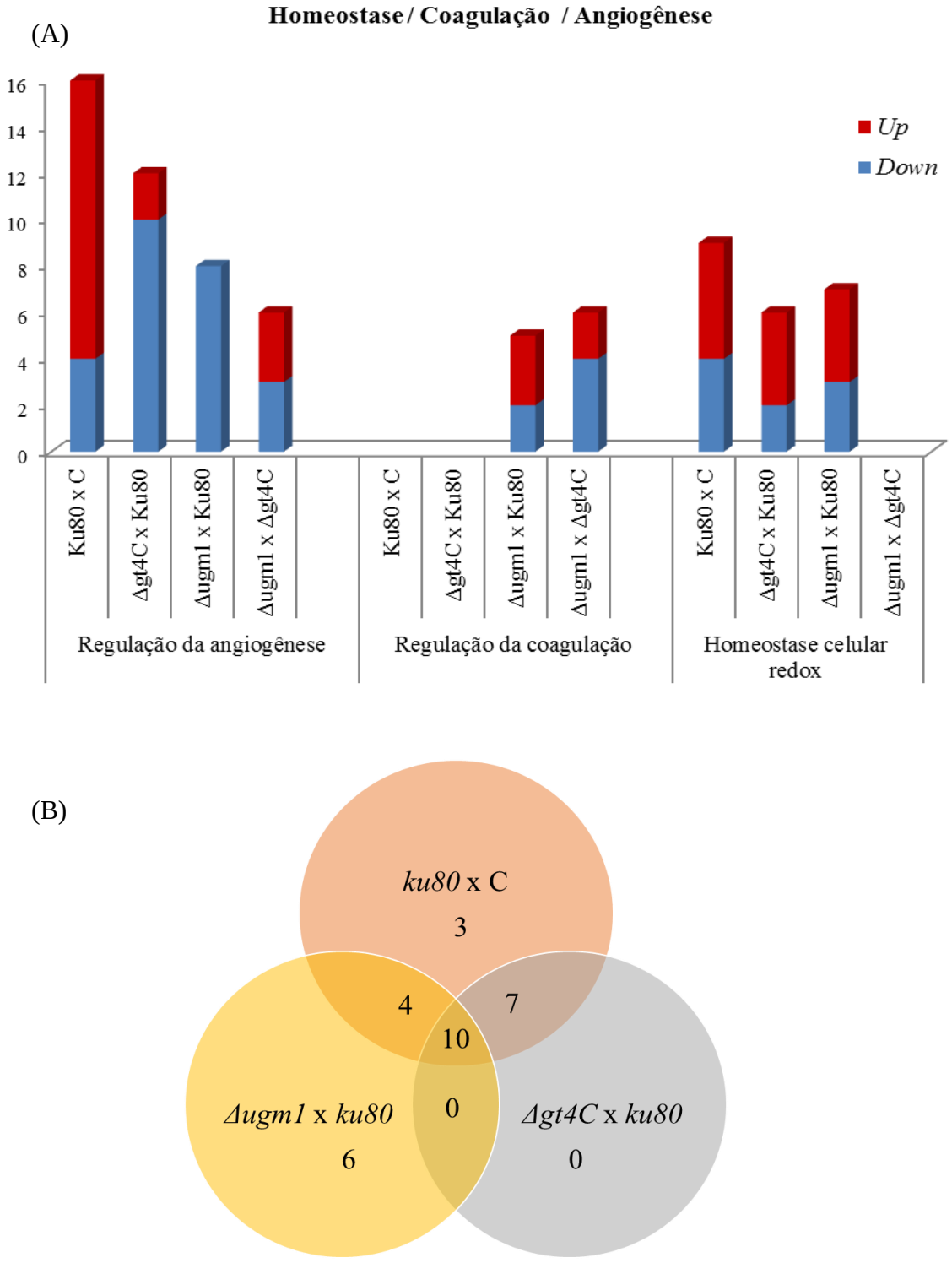


Legenda: (A) Processos Biológicos selecionados após as análises de enriquecimento pelo DAVID – Grupo 1: Adesão/ Movimentos celulares/ Matriz extracelular; (B) Diagrama de Venn das proteínas validadas nos processos biológicos do grupo 1

Nota: Nas porções Δugm1 vs Ku80 e a intersecção Δugm1 vs Ku80 ∩ Ku80 vs controle (C) do diagrama, se encontram as proteínas relacionadas à presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*. Total de proteínas: 3.

Fonte: A autora 2017.

Figura 26 – Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 2.

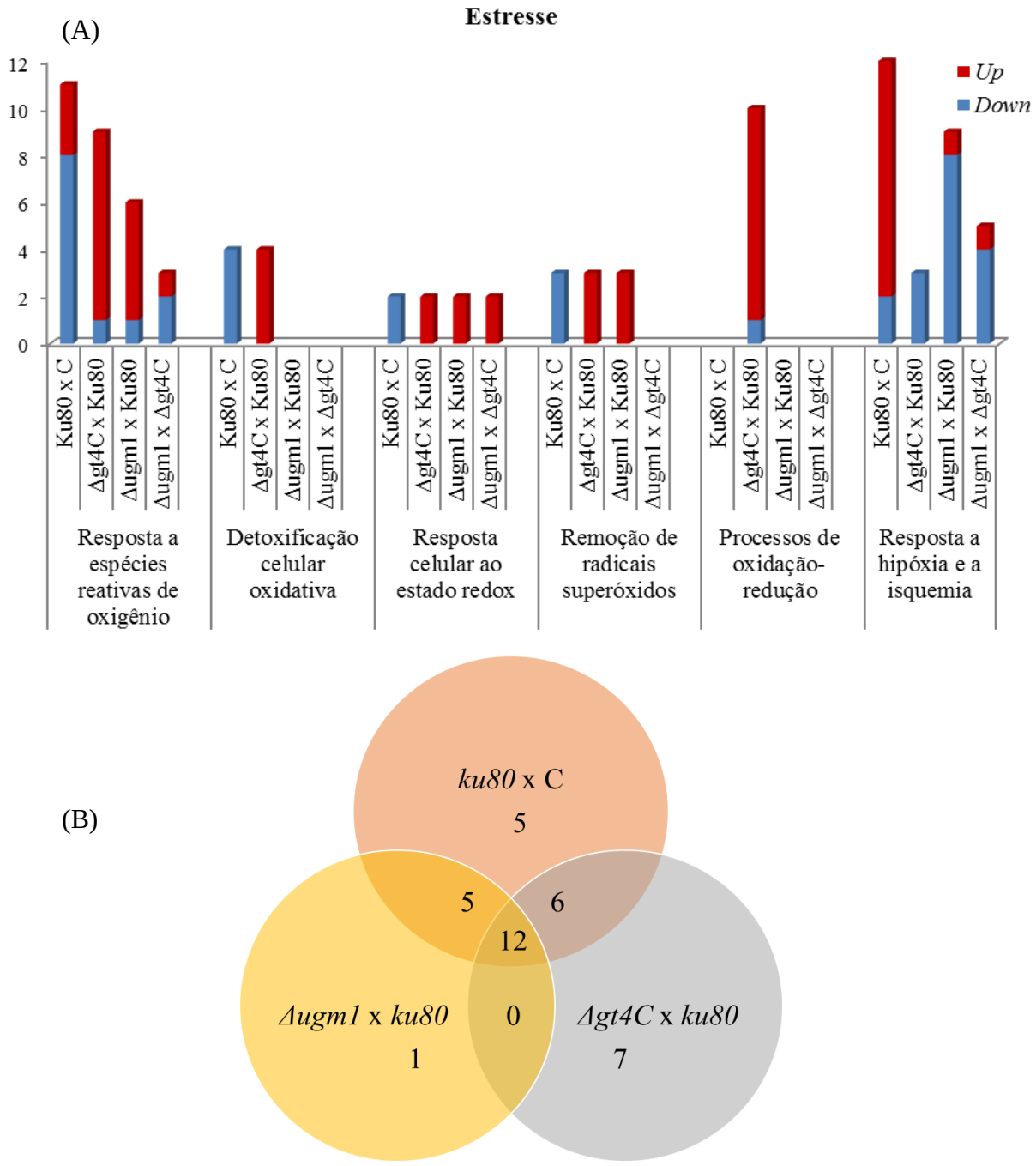


Legenda: (A) Processos Biológicos selecionados após as análises de enriquecimento pelo DAVID – Grupo 2: Homeostase/ Coagulação/ Angiogênese; (B) Diagrama de Venn das proteínas validadas nos processos biológicos do grupo 2

Nota: Nas porções Δugm1 vs Ku80 e a intersecção Δugm1 vs Ku80 ∩ Ku80 vs controle (C) do diagrama, se encontram as proteínas relacionadas à presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*. Total de proteínas: 10.

Fonte: A autora 2017.

Figura 27 – Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 3.

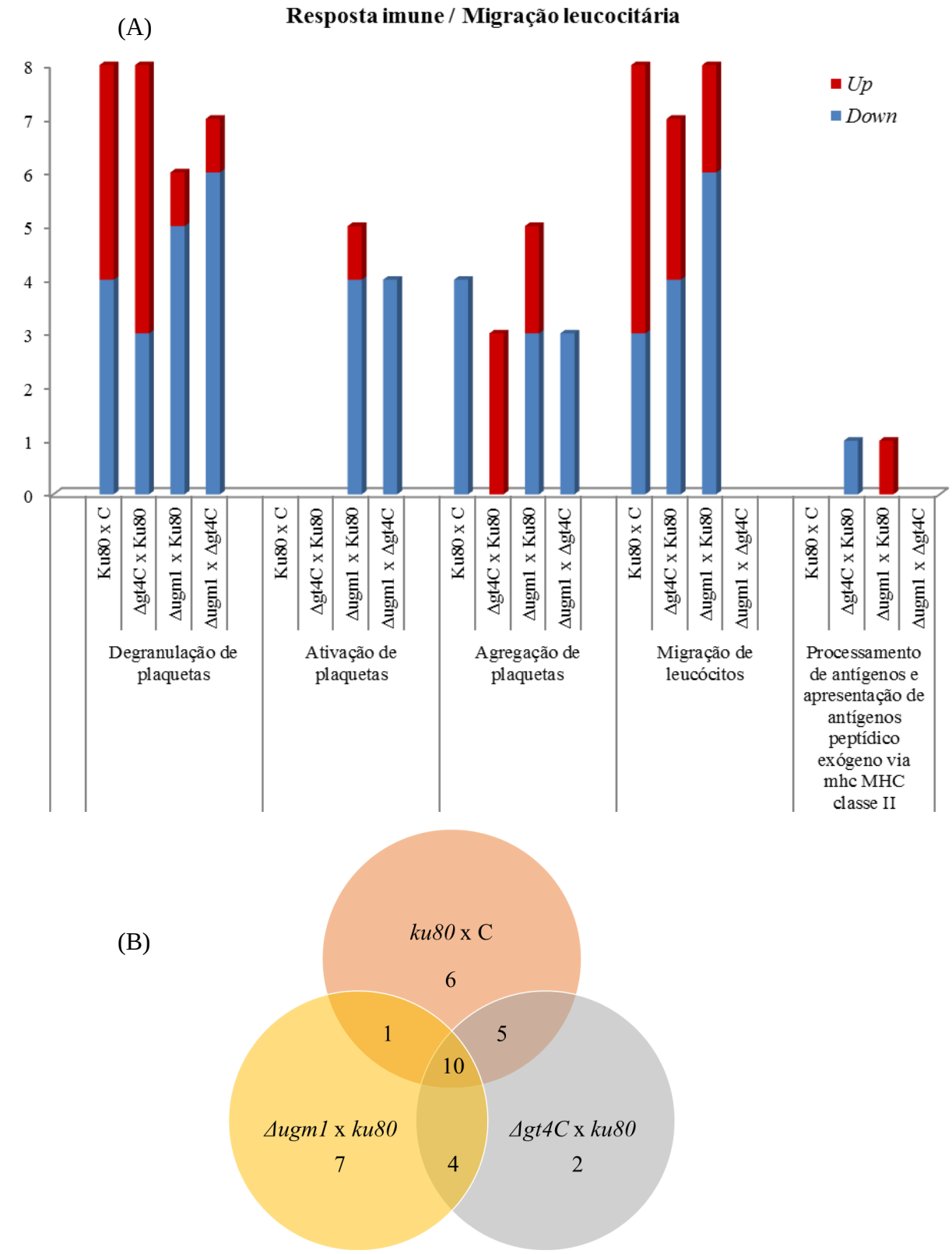


Legenda (A) Processos Biológicos selecionados após as análises de enriquecimento pelo DAVID – Grupo 3: Estresse; (B) Diagrama de Venn das proteínas validadas nos processos biológicos do grupo 3

Nota: Nas porções Δugm1 vs Ku80 e a intersecção Δugm1 vs Ku80 ∩ Ku80 vs controle (C) do diagrama, se encontram as proteínas relacionadas à presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*. Total de proteínas: 7.

Fonte: A autora 2017.

Figura 28 – Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 4.

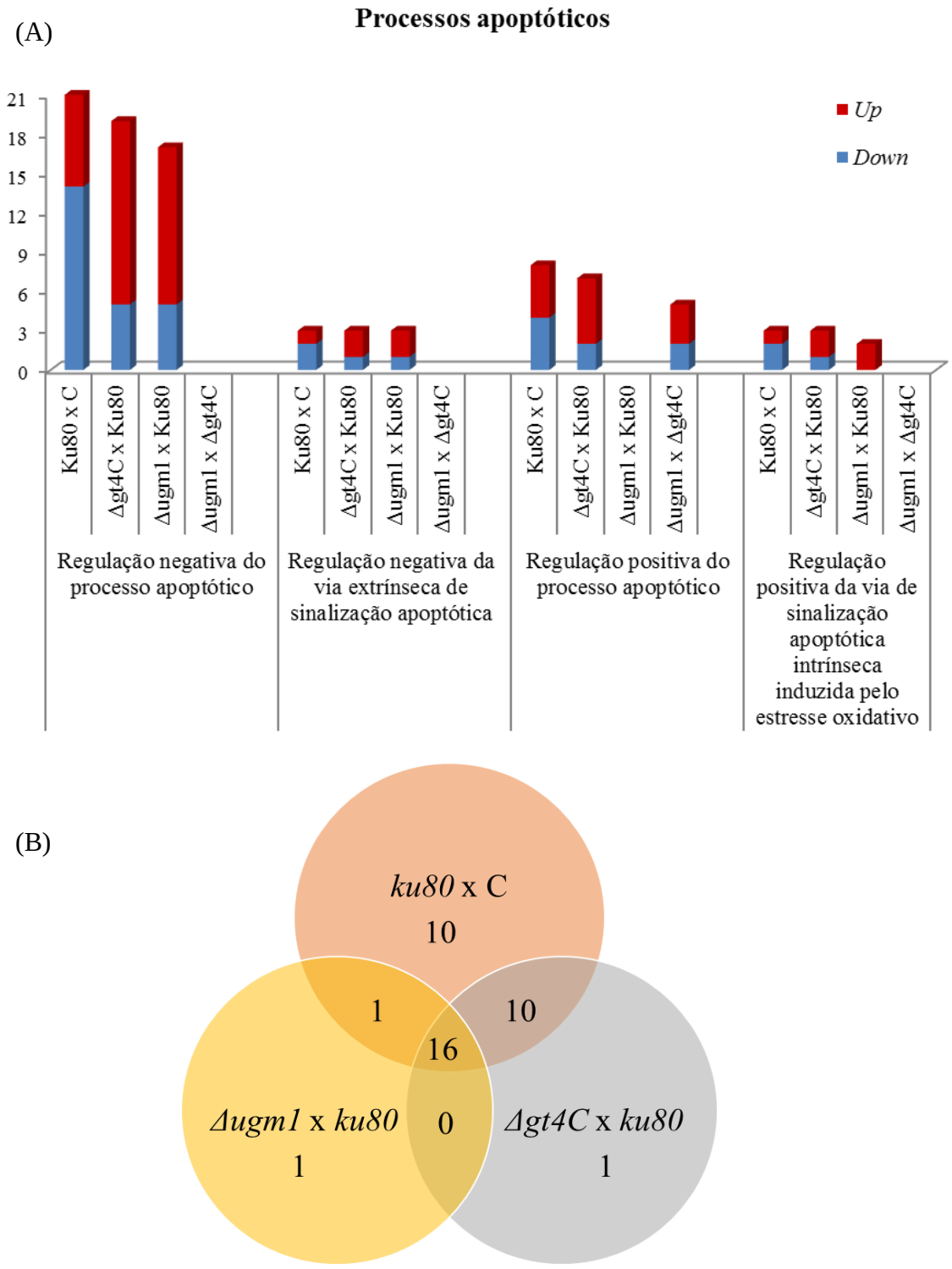


Legenda: (A) Processos Biológicos selecionados após as análises de enriquecimento pelo DAVID – Grupo 4: Resposta imune/ Migração leucocitária; (B) Diagrama de Venn das proteínas validadas nos processos biológicos do grupo 4.

Nota: Nas porções Δugm1 vs Ku80 e a intersecção Δugm1 vs Ku80 ∩ Ku80 vs controle (C) do diagrama, se encontram as proteínas relacionadas à presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*. Total de proteínas: 8

Fonte: A autora 2017..

Figura 29 – Processos Biológicos após as análises de enriquecimento – Grupo 5.



Legenda: (A) Processos Biológicos selecionados após as análises de enriquecimento pelo DAVID – Grupo 5: Processos apoptóticos; (B) Diagrama de Venn das proteínas validadas nos Processos Biológicos do grupo 5

Nota: Nas porções Δugm1 vs Ku80 e a intersecção Δugm1 vs Ku80 ∩ Ku80 vs Controle (C) do diagrama, se encontram as proteínas relacionadas à presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*. Total de proteínas: 2.

Fonte: A autora 2017.

Quadro 3 – Proteínas diretamente relacionadas com a presença de GAG na superfície do *A. fumigatus* (continua)

Grupos	Proteínas relacionadas a presença de GAG		*Fold change*	
	N° de acesso	Proteínas	*Ku80 vs* C	*Δugm1 vs Ku80*
Adesão/ Movimentos celulares/ Matriz extracelular	P04275	Fator von Willebrand	N/V	-1.77
	P07355	Anexina A2	-1.19	-1.18
	P47755	Subunidade alfa 2 da proteína de *capping* de F-actina	N/V	1.24
Homeostase / Coagulação / Angiogênese	P07355	Anexina A2	-1.19	-1.18
	P08758	Anexina A5	N/V	1.81
	Q03135	Caveolina-1	1.33	-1.29
	Q9H299	Domínio SH3 de ligação rico em ácido glutâmico-*like* da proteína 3	N/V	3.74
	P13987	Glicoproteína CD59	N/V	-1.75
	P07237	Proteína dissulfeto isomerase	1.30	-1.22
	P30101	Proteína dissulfeto isomerase A3	1.35	-1.21
	Q9UNN8	Receptor da proteína C endotelial	N/V	-2.16
	P52907	Subunidade alfa 1 da proteína de *capping* de F-actina	N/V	1.24
	P47755	Subunidade alfa 2 da proteína de *capping* de F-actina	N/V	1.86
Estresse	O43707	α-actinina-4	N/V	-1.37
	Q03135	Caveolina-1	1.33	-1.29
	P17813	Endoglina	1.30	-1.74
	P14625	Endoplasmina (HSP90B1)	1.52	-1.41
	P14618	Piruvato quinase	-2.08	1.47
	P07237	Proteína dissulfeto isomerase	1.30	-1.22

Quadro 3 – Proteínas diretamente relacionadas com a presença de GAG na superfície do *A. fumigatus*(conclusão)

Grupos	Proteínas relacionadas a presença de GAG		*Fold change*	
	N° de acesso	**Proteínas**	***Ku80 vs* C**	***Δugm1 vs Ku80***
Resposta imune / Migração leucocitária	P12814	α-actinina-1	N/V	-1.48
	O43707	α-actinina-4	N/V	-1.37
	Q03135	Caveolina-1	1.33	-1.29
	P04275	Fator von Willebrand	N/V	-1.77
	P21333	Filamina-A	N/V	-2.02
	P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta	N/V	1.45
	P62873	Proteína de ligação a nucleotídeos Guanina G(I)/G(S)/G(T)	N/V	-1.45
	Q9UNN8	Receptor da proteína C endotelial	N/V	-2.16
Processos apoptóticos	P21333	Filamina-A	N/V	-2.02
	P13987	Glicoproteína CD59	1.71	-1.75

Nota: As proteínas marcadas em cinza correspondem àquelas encontradas na porção *Δugm1 vs Ku80* do diagrama de Venn, descartando-se as porções no diagrama comuns à condição *Δgt4C vs Ku80*. As proteínas não marcadas correspondem àquelas encontradas na intersecção *Δugm1 vs Ku80* ∩ *Ku80 vs* controle (C) do diagrama de Venn, descartando-se as porções no diagrama comuns à condição *Δgt4C vs Ku80*.

Fonte: A autora, 2017.

Um total de dezesseis proteínas de HUVECs foram validadas como sendo moduladas pela GAG, nos cinco grupos de processos selecionados. Algumas dessas proteínas, descritas na Quadro 3 são comuns a mais de um grupo de processo biológico. Discutiremos as proteínas consideradas mais importantes, tendo em vista a fisiopatologia da aspergilose invasiva.

4.4.1 α-Actinina-1 E α-Actinina-4

Dentre as proteínas validadas, encontram-se duas α-actininas, a α-actinina-1 e a α-actinina-4, ambas validadas na condição *Δugm1 vs Ku80*. As duas proteínas foram validadas dentro do Grupo 4 - Resposta imune/ Migração leucocitária, no processo biológico "Degranulação de Plaquetas". Ainda dentro do mesmo grupo, a α-actinina-1 foi validada no processo "Ativação de plaquetas". A α-actinina-4 também foi validada no Grupo 3 - Estresse, dentro do processo biológico "resposta à hipóxia e a isquemia".

As α-actininas pertencem à superfamília do gene Espectrina, que representa um grupo diverso de proteínas do citoesqueleto. São proteínas de ligação de actina que desempenham múltiplos papéis em diferentes tipos celulares (Shnoor, 2015).

Como dito anteriormente, a infecção invasiva causada pelo *A. fumigatus* cria um ambiente inflamatório no endotélio, levando à sua ativação. Esses eventos resultam em um fenótipo pró-trombótico, induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais e o recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção (Filler e Sheppard, 2006; Kamai et al., 2006, Neves et al., 2017).

O endotélio é a primeira barreira que os leucócitos devem transpor durante o recrutamento para o (s) sítio (s) de infecção. A cascata que culmina com a infiltração de leucócitos nos sítios de infecção é um processo complexo e multifatorial, que requer a ativação de moléculas de adesão e vias de sinalização, bem como a remodelação de filamentos de actina, tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais. Moléculas de adesão endotelial, como E-selectina ou ICAM-1, são responsáveis por mediar a adesão firme de leucócitos ao endotélio. Para o processo de diapedese ser completo faz-se necessário que diversos movimentos celulares ocorram, bem como o remodelamento do citoesqueleto de actina. Nesse contexto, destaca-se o papel das proteínas de ligação de actina no processo de diapedese (Phillipson et al., 2006; Shnoor, 2015).

O citoesqueleto de actina é essencial para a funcionalidade do endotélio e, dependendo do tipo celular e da vascularidade, as células endoteliais expressam diferentes formas de F-actina. Sob condições inflamatórias, o citoesqueleto de actina é constantemente modulado para acomodar os movimentos de leucócitos pelo endotélio. As α-actininas 1 e 4 são responsáveis pela conexão dos receptores de adesão com a actina e pelo *cross-linking* de actina. As α-actininas 1 e 4 ligam-se diretamente à ICAM-1 para sustentar a transmigração dos leucócitos. A α-actinina-4 ainda regula a rigidez das células endoteliais, o *clustering* com moléculas de ICAM-1 e a formação de estruturas de ancoragem em torno de leucócitos aderentes (Barreiro et al., 2002; Celli et al., 2006; Schaefer et al., 2014).

No presente trabalho, tanto a α-actinina-1 quanto a α-actinina-4 encontravam-se com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80*, ou seja, quando GAG estava superexpressa na superfície do patógeno. Schaefer et al. (2014) demonstraram que a diminuição da expressão de α-actinina-4 é capaz de reduzir a capacidade de propagação, adesão e transmigração de neutrófilos para o sítio da infecção. Os autores demonstraram ainda que, a ausência de α-actinina-4 reduz a formação de feixes de actina e ainda o *clustering* de ICAM-1 dependente de F-actina. Nesse contexto pode-se hipotetizar que, a GAG da superfície do *A. fumigatus* parece regular negativamente a expressão dessas proteínas de ligação de actina no endotélio, prejudicando a transmigração de neutrófilos (e outros leucócitos) para o sítio da infecção, favorecendo assim, a progressão da infecção.

4.4.2 Filamina A

Outra proteína de ligação de actina validada nesse estudo foi a filamina. Existem três isoformas da filamina: as filaminas A e B possuem expressão ubíqua nas células de mamíferos, enquanto a filamina C é restrita a células dos músculos cardíacos e esqueléticos (Das et al., 2011). No presente trabalho, a filamina A foi a isoforma validada nos Grupos 4 - Resposta imune/ Migração leucocitária, dentro dos processos biológicos “Degranulação de Plaquetas” e “Agregação de Plaquetas”; e no Grupo 5 - Processos apoptóticos, dentro do processo “Regulação negativa do processo apoptótico”.

De acordo com a literatura, as filaminas têm papel multifatorial. Estas proteínas são capazes de organizar as fibras e redes de F-actina (Popowicz et al., 2006; van der Flier 2001); servem de âncora para o esqueleto de actina, para alguns receptores de membrana (receptor de

glutamato; receptor de calcitonina; receptores de dopamina D2/D3), para várias integrinas (β_1, β_2 -β_7) e para algumas proteínas transmembrana constitutivas, tais como SHIP-2 e calveolina-1 (Pottiez et al., 2009).

A maioria das conexões entre as integrinas e o citoesqueleto de actina ocorrem via interação de três tipos de proteínas de ligação: as α-actininas, as talinas e as filaminas (Calderwood et al., 2001). As β-integrinas dos leucócitos ligam-se de maneira específica a cada uma destas proteínas de ligação de actina. A integrina β_7, específica de leucócitos, por exemplo, liga-se à filamina de maneira mais forte que as integrinas β_{1A} e β_{1D} (Belkin et al., 1997; Pfaff et al., 1998). Essas diferenças de força de ligação entre as integrinas e proteínas de ligação de actina, geram diferenças na habilidade das integrinas de mediar processos celulares, tais como a migração celular, a montagem da MEC e a adesão celular (Pfaff et al., 1998).

Calderwood et al. (2001) concluíram que mudanças no perfil de afinidade da filamina com as β-integrinas resultam na alteração de alguns mecanismos celulares, como protrusões de membrana, polarização celular e, ainda sugerem que a regulação da ligação intergina-filamina controla diretamente a migração celular.

Durante o processo de agregação plaquetária e formação do trombo, a filamina A interage com o domínio citoplasmático (sequência 557-579) da glicoproteína plaquetária GPIb-IX. Essa interação regula a via de sinalização das tirosina-quinases nas plaquetas durante estresse por injúria tecidual (Andrew et al., 2001; Williamson et al., 2002).

No presente trabalho, a filamina A foi encontrada com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80*. Como descrito na literatura, alterações na expressão dessa proteína podem gerar consequências tanto na homeostase celular, quanto na migração de leucócitos para o sítio da infecção. Desta forma, a GAG na superfície de *A. fumigatus* pode estar contribuindo para a regulação negativa de proteínas endoteliais que participam na formação do trombo.

4.4.3 Anexina A2 e a Anexina A5

Também foram encontradas evidências de modulação pela GAG de duas proteínas da família das anexinas: a anexina A2 e a anexina A5. Ambas foram validadas dentro do Grupo 2 - Homeostase/ Coagulação/ Angiogênese; a Anexina 2 no processo “Regulação da

angiogênese" e a Anexina 5, no processo "Regulação da coagulação". A Anexina 2 também foi validada, dentro do Grupo 1 - Adesão/ Movimentos celulares/ Matriz extracelular, no processo "Adesão célula-célula".

As anexinas são proteínas de adesão presentes no endotélio que fazem parte de um grupo de proteínas que são capazes de ligar-se a fosfolipídios negativamente carregados, de maneira Ca^{+2} dependente (Gerke e Moss, 2002). São ainda relacionadas à homeostase e a manutenção da integridade do endotélio vascular (Sacre e Moss, 2002).

A anexina A2 é uma proteína periférica da célula endotelial que, primordialmente, tem função como receptor para o fator ativador do plasminogênio tecidual[8] e para o plasminogênio. A anexina A5 tem função na prevenção dos processos de coagulação sanguínea e também é utilizada como marcador de detecção de células apoptóticas (Galán et al., 2006; Cederholm e Frostegård, 2007; Mirnikjoo et al., 2009; Wolgast et al., 2017).

As proteínas de adesão endotelial organizam-se de diferentes maneiras na superfície celular. Existem evidências de que as moléculas de ICAM-1, por exemplo, organizam-se em múltiplos complexos com diferentes conteúdos proteicos, distinta organização espacial e localização subcelular (Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2008).

Estudo recente apontou a anexina A2 como capaz de ligar-se à molécula de ICAM-1 e regular tanto sua distribuição espacial quanto sua mobilidade na superfície das células endoteliais (Heemskerk et al. 2016). Segundo os autores, a anexina A2 regula negativamente a adesão, o rolamento e, posteriormente, a transmigração de neutrófilos pelo endotélio através do controle espacial das moléculas de ICAM-1. A adesão de neutrófilos a células endoteliais deficientes em anexina A2 foi significativamente maior que em células endoteliais controle. O número total de neutrófilos aderidos foi 2 a 3 vezes maior nas células em que a anexina A2 estava silenciada e, o número absoluto de neutrófilos que conseguiram concluir o processo de diapedese (transmigração pela barreira endotelial) foi maior. Nesse contexto, a anexina A2limita o processo de diapedese de neutrófilos para o sítio da infecção.

Como dito anteriormente, a anexina A5 é amplamente utilizada como marcador para a detecção de células apoptóticas. Essa anexina tem alta afinidade pela molécula de fosfatidilserina, um fosfolipídio normalmente presente nas camadas internas de membrana plasmática, que se transloca para as camadas externas durante o processo de morte celular programada. A ligação da anexina 5 à fosdatidilserina ocorre de maneira Ca^{+2} dependente (Vermes et al., 1995; Mirnikjoo et al., 2009; Rand et al., 2012).

[8] Fator responsável pela conversão do plasminogênio tecidual em plasmina (Galán et al., 2006).

Anexina A5 também tem papel descrito na inibição da via de coagulação. Este mecanismo se dá através da formação de uma espécie de escudo que encobre os fosfolipídios negativamente carregados, expostos na superfície plaquetária durante o processo de formação do coágulo, onde ocorre a ligação dos fatores de coagulação. Em adição, a anexina A5 mostrou-se muito eficiente na redução da deposição de plaquetas sobre superfícies cobertas com colágeno tipo III e na inibição da formação de trombina, desempenhando um importante papel antitrombótico (Gálan et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que a anexina A5 tem importante papel anticoagulante em modelo murino de sepse, com potencial terapêutico, uma vez que atua como inibidora de endotoxemia induzida por LPS através da redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 por células dendríticas (Rand et al., 2012; Park et al., 2016). Park et al. (2016) sugerem que a anexina A5 seja capaz de inibir a ligação de TLR-4 com endotoxinas, bem como com a proteína HMGB1[9], o que caracteriza a anexina A5 como inibidora da coagulação e da produção de citocinas inflamatórias durante a sepse.

Nos resultados apresentados nesse trabalho, a anexina A2 encontra-se com expressão diminuída nas condições *Ku80 vs* Controle e *Δugm1 vs Ku80*. Ou seja, a presença de GAG na superfície celular do *A. fumigatus* é capaz de induzir a redução da expressão de anexina A2 pelas HUVECs. Em consequência, isso pode favorecer a adesão e a transmigração de neutrófilos para o sítio de infecção. Estes dados contrastam com a regulação das α-actininas, que seriam responsáveis pela limitação do processo de transmigração de neutrófilos e estão igualmente reguladas negativamente. Isto sugere que possa ocorrer um processo de compensação pelas células endoteliais, demonstrando o quão finamente regulada é a resposta endotelial.

Ainda neste trabalho, a anexina A5 encontra-se com expressão aumentada na condição *Δugm1 vs Ku80*. Ou seja, a presença de GAG na superfície do *A. fumigatus* induziu uma maior expressão da anexina A5 pelas HUVECs. Sabe-se que a infecção invasiva causada pelo *A. fumigatus* cria um ambiente inflamatório no endotélio, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção. O aumento na expressão da anexina A5 nas HUVECs pode estar relacionada a formação dos processos trombolíticos, facilitando assim, a disseminação do fungo e favorecendo a evolução da doença.

[9] High-mobility group box 1 protein. Proteína nuclear de ligação ao DNA que funciona como um padrão molecular associado ao dano, liberada por células em processo de morte ou por células do sistema imune ativadas (Yang et al., 2015).

4.4.4 Calveolina-1

A calveolina-1 foi outra proteína validada dentro de três grupos de processos biológicos: Grupo 2 - Homeostase/ Coagulação/ Angiogênese, no processo biológico "Regulação da Angiogênese"; Grupo 3 - Estresse, no processo "Resposta a hipóxia e a isquemia"; em no Grupo 4 - Resposta imune/ Migração leucocitária, no processo "Migração de leucócitos".

Esta é a principal proteína estrutural da membrana plasmática do calvéolo[10], mas também está associada a membranas de organelas em células de diferentes tecidos, dentre estes, o endotélio vascular (Couet et al., 1997; Tourkina et al., 2005).

Nas células endoteliais, os calvéolos são sítios importantes que atuam na manutenção da homeostase e facilitam o transporte transendotelial via transcitose e a migração de leucócitos através da barreira endotelial vascular (Millán et al., 2006; Tiruppathi et al., 2014). Os calvéolos também possuem papel importante na regulação do tônus vascular, uma vez que neles ocorre a modulação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) endotelial. Dentro dos calvéolos a calveolina-1 interage diretamente com a eNOS, inibindo sua atividade, o que resulta no sequestro de eNOS dentro do calvéolo e, consequentemente, a redução da produção de óxido nítrico (Chidlow e Sessa, 2010).

A modulação da ação eNOS pela calveolina-1 regula a sinalização inflamatória através do controle local da produção de óxido nítrico (Bucci et al., 2000). A ausência da calveolina-1 interfere diretamente na ativação de NF-kB, inibindo a expressão dos genes que codificam ICAM-1 e eNOS (Garrean et al., 2006). A participação da calveolina-1 também já foi descrita em outros processos relacionados à inflamação, tais como a sinalização por integrinas (Wei et al., 1996; Wary et al., 1996) e, regulação e sinalização por Ca^{+2} (Murata et al., 2007).

No presente trabalho, a calveolina-1 encontra-se com expressão aumentada na condição *Ku80 vs* controle e com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80*. Dessa forma, a superexpressão da molécula de GAG na superfície do *A. fumigatus* parece modular de forma diferente a expressão de calveolina-1 pelas HUVECs.

[10] Tipo especializado de *rafts* de membrana. Formam invaginações na membrana plasmática de diferentes tipos celulares (Chidlow e Sessa, 2010).

4.4.5 Endoplasmina

Na literatura, a endoplasmina também é chamada de HSP90B1, Gp96, Grp94 ou ERp99. A Endoplasmina é uma chaperona residente do retículo endoplasmático, da família das *heat shock* 90 (HSP90) paráloga à HSP90 citoplasmática (Yang e Li, 2005). Esta proteína foi validada no Grupo 3 - Estresse, no processo biológico "Resposta a hipóxia e a isquemia".

A endoplasmina tem papel multifatorial, já tendo sido descrita como essencial para o enovelamento correto de TLRs, integrinas de células hematopoiéticas, do co-receptor LRP6 da via de sinalização Wnt, e do complexo de glicoproteínas plaquetárias Ib/IX/V (Yang et al., 2007; Liu et al., 2010; Staron et al., 2011; Liu et al., 2013). A endoplasmina é importante para uma série de processos moleculares e bioquímicos que mantém a homeostase no retículo endoplasmático, através do controle do enovelamento correto das proteínas recém-sintetizadas (Christianson et al., 2008). Ademais, outro estudo descreveu o papel da endoplasmina na regulação da linfopoiese, sendo a expressão da maioria das integrinas específicas do sistema hematopoiético controlada por esta proteína (Staron et al., 2010).

Alguns estudos demonstram a participação dessa proteína em eventos relacionados a hipóxia, como foi identificado no presente estudo na análise pelo algorítimo DAVID. Fan et al. (2011) investigaram as mudanças no perfil de apoptose induzido por estresse de retículo endoplasmático no tecido pulmonar de ratos com hipertensão pulmonar hipóxica. Através de RT-PCR, os autores encontraram a expressão da endoplasmina aumentada em 80,7%. Neste mesmo estudo, utilizando técnicas de imunohistoquímica, os autores observaram a endoplasmina com expressão aumentada e localizada nas células endoteliais vasculares do pulmão. Em outro estudo, com HUVECs, Østergaard et al., (2009) utilizaram uma abordagem proteômica para avaliar as vias de sinalização alteradas pela diminuição dos níveis de oxigênio nestas células. Os resultados revelaram que a endoplasmina encontrava-se com expressão aumentada em baixas concentrações de oxigênio, bem como quando as células foram submetidas a fatores indutores de hipóxia.

Neste trabalho, a endoplasmina foi encontrada com expressão aumentada na condição *Ku80 vs* controle e com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80*. De alguma maneira, a presença da GAG e outros componentes na cepa selvagem é capaz de regular positivamente a expressão de endoplasmina pelas HUVECs, mas a superexpressão deste polissacarídeo regulou negativamente a expressão dessa proteína. Mais uma vez, a modulação de proteínas de HUVECs induzida por GAG parece depender de um controle refinado por

parte do endotélio, que pode envolver um balanço com outros componentes da parede celular do fungo.

4.4.6 Fator Von Willebrand

O fator von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína encontrada no plasma sanguíneo, na matriz subendotelial, nos grânulos α de plaquetas e nas células endoteliais (Lenting et al., 2015). Nestas últimas, o FvW é sintetizado e pode ser liberado na circulação sanguínea e/ou armazenado nas células dentro dos corpos de *Weibel–Palade*[11] (Sporn et al., 1986; Lenting et al., 2015).

Esta proteína foi validada no Grupo 1 - Adesão/ Movimentos celulares/ Matriz extracelular, no processo biológico "Modulação da Matriz extracelular" e no Grupo 4 - Resposta imune/ Migração leucocitária, nos processos "Ativação de plaquetas" e " Degranulação de plaquetas".

O FvW tem papel crucial na homeostase celular. Em condições de injúria vascular, este fator medeia a ancoragem de plaquetas a componentes subendoteliais, tais como colágeno e heparina. A interação da glicoproteína GPIb-IX com o FvW inicia a adesão transitória das plaquetas e, simultaneamente, desencadeia várias cascatas de sinalização intracelular, tais como a ativação de múltiplas proteínas quinases, a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e a exposição de fosfatidilserina. Esses eventos culminam na ativação da integrina αIIbβ3 na superfície plaquetária e na adesão plaquetária dependente da integrina, com consequente formação de trombo (Kasirer-Friede et al., 2004). Nesse contexto o FvW é considerado molécula chave nos processos pró-trombóticos (Bryckaert et al., 2015; Springer, 2014). Na circulação, esta proteína ainda atua como carreador para o fator VIII da cascata de coagulação (Huang et al., 2009).

Sabe-se que, quando em altos níveis na circulação, o FvW está associado a trombose coronária, além de ser marcador clínico de risco associado à arteriosclerose (Spiel et al., 2008). Ademais, a deficiência ou a disfunção dessa proteína acarreta na doença de von Willebrand, uma das doenças hemorrágicas congênitas mais comuns em humanos (Sadler et al., 2005).

[11] Grânulos de armazenamento das células endoteliais que armazenam e liberam moléculas para manutenção da homeostase e para atuação em processos inflamatórios (Lenting et al., 2015).

Além de seu papel na homeostase e na formação do trombo plaquetário, o FvW também tem função descrita em diferentes aspectos da biologia vascular, como na regulação negativa da angiogênese (Starke et al., 2011) e na modulação da apoptose de células tumorais (Terraube et al., 2007; Mochizuki et al., 2012).

Recentemente, o conceito "imuno-trombose" tem ganhado força, baseado nas crescentes evidencias da participação de células inflamatórias nos processos trombóticos e, em contrapartida, de proteínas e/ou células envolvidas no processo de homeostase participando da resposta inflamatória. Nesse sentido, vários fatores apontam para a classificação do FvW como uma molécula envolvida em processos imuno-trombóticos (Kawecki et al., 2017).

A princípio, a relação do FvW com processos inflamatórios estava relacionada com sua liberação aguda, através dos corpos de *Weibel–Palade*, em resposta ao estímulo inflamatório (Pober et al., 2007). Posteriormente, foi descoberto o papel desta proteína na capacidade de direcionar a biogênese dos corpos de *Weibel–Palade*, que armazenam não só o FvW, mas também outras moléculas relacionadas à inflamação, como a P-selectina (Denis et al., 2001 e Ferraro et al., 2014). Nestes estudos, os autores demonstram que a ausência de FvW resultou em defeitos na expressão de P-selectina na superfície de células endoteliais (Denis et al., 2001).

Outras evidências apontam para o papel mais direto dessa molécula nos processos inflamatórios. Alguns estudos demonstram que a molécula de FvW é capaz de recrutar leucócitos diretamente através da ligação FvW-leucócitos; ou, de forma indireta, através do recrutamento das plaquetas que irão, por sua vez, atrair os leucócitos para o sítio de infecção (Petri et al., 2010; Hillgruber et al., 2014; Zhu et al., 2016).

O FvW foi encontrado com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80* do presente estudo. Ou seja, de alguma forma, o excesso da molécula de GAG na superfície do *A. fumigatus* aparenta ter causado a diminuição da expressão desse fator pelas células endoteliais. Como discutido acima, a disfunção ou ausência desse fator gera efeitos tanto na homeostase celular quanto nos processos inflamatórios. Desse modo, a regulação negativa desse fator pode atuar favorecendo a diminuição do processo trombótico em resposta à ativação endotelial causada pelo *A. fumigatus*, bem como, limitar o recrutamento de leucócitos, favorecendo assim o processo de infecção.

4.4.7 Glicoproteína CD59

A glicoproteína CD59 foi validada no Grupo 2 - Homeostase/ Coagulação/ Angiogênese, dentro do processo biológico "Regulação da coagulação" e, no Grupo 5 - Processos apoptóticos, dentro do processo "Regulação negativa do processo apoptótico".

Esta glicoproteína encontra-se inserida na membrana de diferentes grupos celulares, através de uma âncora GPI (Weinstock et al., 2015). A CD59 tem papel na regulação do complemento, através de sua ligação com os componentes C8 e C9, que resulta na inibição da polimerização do componente C9, passo essencial para a formação final do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) e lise da célula. Dessa forma a glicoproteína CD59 é caracterizada como uma molécula reguladora do sistema complemento, tendo papel crucial na proteção celular contra danos indesejados causados pelo sistema complemento ativado (Meri et al., 1990; Farkas et al., 2002; Nuutila et al, 2013; Weinstock et al., 2015).

Nuutila et al. (2013) demonstraram que a expressão de CD59 em fagócitos (neutrófilos e monócitos) é generalizada, ou seja, induzida mediante qualquer tipo de infecção, não havendo diferenças no padrão de expressão dessa glicoproteína em infecções de origem bacteriana, viral ou fúngica.

Alguns tipos celulares tumorais e patógenos utilizam a CD59 como mecanismo de evasão contra o sistema complemento, encobrindo sua superfície com CD59, e dessa forma, escapando do ataque pelo complemento. É o caso, por exemplo, do vírus do HIV (Fishelson et al., 2003; Hu et al., 2010). O *Streptococcus intermedius*, por sua vez, utiliza a CD59 para perfurar a membrana celular. A bactéria é capaz de secretar duas enzimas, a citolisina e a intermedilisina, que utilizam a CD59 para ancorar na membrana celular do hospedeiro e, promover a polimerização do poro lítico. A intermedilizina ainda se liga aos componentes C8 e C9 do complemento no mesmo sítio de ligação da CD59, bloqueando assim a sua função de inibição da formação do MAC (Wickham et al., 2011).

Sabe-se que a deposição do MAC estimula a resposta inflamatória, aumentando a translocação do fator NFκB e expressão de genes pró-inflamatórios em células endoteliais (Kilgore et al., 1997; Collard et al., 1999; Du et al., 2014). Em seu trabalho, Emin et al. (2016) demonstraram que a glicoproteína CD59 foi encontrada mais expressa e com a distribuição celular alterada em pacientes com apneia do sono obstrutiva, doença caracterizada por hipóxia intermitente e marcador de risco para doenças cardiovasculares. Utilizando HUVECs, os autores demonstraram que a hipóxia promove a endocitose de CD59,

diminuindo assim sua capacidade de proteção contra a atividade do complemento. Como consequência, a deposição do MAC em HUVECs é aumentada na hipóxia, resultando em processos inflamatórios no endotélio.

Outros estudos demonstram que a CD59 tem papel secundário na ativação de células T e na regulação de reações imunológicas (Kilgore et al., 1997; Collard et al., Du et al., 2014). Nestes estudos, a CD59 foi identificada como ligante secundário do marcador CD2 da superfície de linfócitos T, contribuindo para diversos processos, tais como: ativação dos linfócitos T; guia para adesão de T-linfócitos entre si ou com outros tipos celulares; e, regulação do crescimento celular.

Sabe-se ainda, que a CD59 é superexpressa na superfície de alguns tipos celulares tumorais, como intestino, ovário e próstata (Li et al. 2012). Nesse sentido, os autores demonstraram que o bloqueio da ação da CD59 por um peptídeo sintético (sp-22) foi capaz de promover o aumento da morte de células HeLa através de citólise mediada por complemento e de aumentar a expressão de fatores relacionados ao processo apoptótico (Faz e Caspase-3).

A glicoproteína CD59 foi encontrada com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80*, dentro do processo biológico "Regulação da coagulação". Este processo biológico não foi validado para a condição *Ku80 vs* controle. Já no processo biológico "Regulação negativa do processo apoptótico", esta proteína foi encontrada com expressão aumentada na condição *Ku80 vs* controle e com expressão diminuída na condição *Δugm1 vs Ku80*. Tais resultados a sugerem, mais uma vez, que ocorrem processos de compensação pelas células endoteliais em resposta ao excesso de GAG na parede do *A. fumigatus*, demonstrando o quão finamente regulada é a resposta endotelial.

4.4.8 Proteína 14-3-3 zeta/delta

A família 14-3-3 em mamíferos compreende sete isoformas (β, ε, η, γ, τ, ζ e σ) (Obsil e Obsilova, 2011). As proteínas da família 14-3-3 atuam através da modulação das funções das proteínas a que se ligam, levando a sua participação em diferentes processos biológicos como: regulação do ciclo celular, controle do metabolismo celular, apoptose e controle da transcrição gênica (Fu et al. 2000, Aitken 2006, Hermeking e Benzinger 2006).

Basicamente, a função da proteína 14-3-3 pode ser classificada de acordo com seu modo de ação na proteína a que se liga: (1) a proteína 14-3-3 pode mudar a conformação da

proteína ligante; (2) a 14-3-3 pode mascarar fisicamente importantes estruturas na superfície da proteína ligante; e, (3) a proteína 14-3-3 pode funcionar como base de ancoragem para estimular interações proteína-proteína (Bridges e Moorhead 2005).

No presente trabalho, a proteína 14-3-3 zeta/delta (14-3-3ζ) foi validada no Grupo 4 - Resposta imune/ Migração leucocitária, dentro do processo biológico "Ativação de plaquetas". Como discutido anteriormente, a ativação de plaquetas e consequentemente, a formação do trombo plaquetário, dependem da interação entre a glicoproteína plaquetária GPIb-IX e o FvW com exposto pelas células endoteliais, como consequência de processos de injúria celular (Kasirer-Friede et al., 2004).

A interação da proteína 14-3-3ζ com domínios citoplasmáticos da GPIb-IX tem papel fundamental na ligação do FvW com a GPIb-IX e, consequentemente, na ativação de plaquetas (Bodna et al., 2002; Dai et al., 2005; Yuan et al., 2009), entretanto detalhes acerca do real papel da 14-3-3ζ nessa interação continuam controversos.

Estudos apontam que a deleção do sítio de ligação da 14-3-3ζ, no domínio citoplasmático C-terminal da GPIbα foi capaz de inibir a ativação da glicoproteína GPIb-IX e a propagação das plaquetas sobre superfícies cobertas com FvW (Gu et al., 1999). Por outro lado, dados de outro grupo de pesquisa indicam que a ligação da 14-3-3ζ com o domínio GPIbα inibe propagação das plaquetas sobre superfícies cobertas com FvW enquanto o bloqueio da ligação 14-3-3ζ-GPIbα está associado ao aumento da reorganização do citoesqueleto induzida por integrinas (Bialkowska et al., 2003). Zhang et al. (2012) utilizaram um modelo de células CHO, com uma mutação no domínio GPIbα, o que impede a ligação 14-3-3ζ-GPIbα. Nesse estudo, os autores confirmaram que este bloqueio inibe a ativação das proteínas quinases e impede o aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+}, ambos eventos decorrentes da ligação da glicoproteína GPIb-IX com o FvW. Dessa forma, os autores concluíram que o bloqueio da ligação proteína 14-3-3ζ-GPIbα inibe a cascata de sinalização induzida pela ligação da glicoproteína GPIb-IX com o FvW.

No presente trabalho a proteína 14-3-3ζ foi encontrada com expressão aumentada na condição *Δugm1 vs Ku80*. Em um trabalho realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, Neves et al. (2017) encontraram a 14-3-3ζ, além de outras proteínas envolvidas na via de sinalização 14-3-3 com expressão aumentada em HUVECs infectadas com a cepa mutante *Δugm1*. Utilizando *iReport* do software de análise *Ingenuit (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity)* os autores reportaram a via de sinalização 14-3-3 envolvida com processos tais como apoptose, regulação do ciclo celular, sinalização celular,

estresse e resposta a inflamação. Ademais, esta via pode responder a estímulos de TNF-α e leva a ativação do fator de transcrição ELK-1 via TLR (Kawai e Akira, 2010).

Esses dados estão em concordância com o ensaio de secreção de citocinas apresentado nesse trabalho, onde a cepa mutante *Δugm1* foi capaz de estimular uma secreção significativamente maior de TNF-α pelas HUVECs em relação à cepa selvagem. Os mesmos dados ainda corroboram os achados por Neves et al. (2017) onde tanto a cepa mutante *Δugm1* quanto o carboidrato GAG purificado (fração SGG) induziram maior secreção de TNF-α pelas HUVECs.

Os dados até aqui apresentados ilustram o quão complexa é a regulação da resposta do endotélio em relação à presença da GAG, constituinte da parede celular de *A. fumigatus*. Mais análises serão feitas acerca da participação das proteínas diferencialmente expressas aqui encontradas em vias de sinalização, a fim de elucidarmos com o conjunto de dados quais vias encontram-se reguladas nas HUVECs, que estão relacionadas ao efeito da GAG.

Finalmente, os dados apresentados nesse trabalho representam mais um passo no sentido de elucidar o papel dos componentes da parede celular do *A. fumigatus*, fungo angioinvasivo, na resposta endotelial na aspergilose invasiva.

CONCLUSÕES

As conclusões do presente trabalha são:

a) a cepa mutante Δ*ugm1* apresenta um fenótipo hiper-adesivo às HUVECs, coincidente com uma maior expressão de GAG na superfície celular das hifas de *A. fumigatus*;

b) as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* apresentam fenótipo hipo-adesivo às HUVECs, coincidente com a ausência total de GAG na superfície celular das hifas *A. fumigatus*;

c) as cepas mutantes Δ*ugm1*, Δ*uge3* e Δ*gt4C* induziram perfil de injúria celular similar nas HUVECs, similar às duas cepas selvagens de *A. fumigatus* estudadas.

d) a cepa mutante *Δugm1* é capaz de induzir maior secreção de TNF-α e IL-6 pelas HUVECs, quando comparada à cepa selvagem de *A. fumigatus*;

e) as cepas mutantes Δ*uge3* e Δ*gt4C* induziram uma redução significativa na secreção de TNF-α e IL-6 pelas HUVECs quando comparada às cepas selvagens de *A. fumigatus*. A redução no perfil de secreção de TNF-α e IL-6 pelas HUVECs ainda é mais significativo, se os dados são comparados com HUVECs infectadas com a cepa Δ*ugm1*.

f) a presença de GAG na superfície de *A. fumigatus* modulou processos biológicos nas HUVECs relacionados à adesão e movimentação celular, montagem da MEC, homeostase, coagulação sanguínea, angiogênese, resposta imune, inflamação, trombose, apoptose, estresse e migração de leucócitos.

g) a presença de GAG na superfície do *A. fumigatus* foi capaz de modular proteínas-chave relacionadas a processos biológicos importantes na fisiopatologia da aspergilose invasiva, dentre elas as α-actininas 1 e 4, a filamina A, as anexinas A2 e A5, a calveolina-1, a endoplasmina, o fator *von* Willebrand, a glicoproteína CD59 e a proteína 14-3-3 zeta/delta.

REFERÊNCIAS

Abe K, Gomi K, Hasegawa F, Machida M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. Mycopatho. 2006; 162:143–53.

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of air borne fungal spores. Nat. 2009; 460:1117-1121.

Aitken A: 14-3-3 proteins: a historic overview. Semin Cancer Biol. 2006; 16:162-172.

Alangaden G.J., Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. Infect Dis Clin North Am. 2011; 251:201-25.

Alexopulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory Mycology. 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons; 1996. Cap. 11, p. 306-22.

Araújo R, Rodrigues AG. Variability of germinative potential among pathogenic speceis of *Aspergillus*. J Clin Microbiol. 2004; 42:4335-7.

Balloy V, Huerre M, Latgé JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. Infect. Immun. 2005; 73(1), 494–503.

Bamford NC, Snarr BD, Gravelat FN, Little DJ, Lee MJ, Zacharias CA, et al. Sph3 is a glycoside hydrolase required for the biosynthesis of galactosaminogalactan in *Aspergillus fumigatus*. J Biol Chem. 2015; 290:27438–27450

Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. J. Cell Biol. 2002; 157: 1233–1245.

Barreiro O1, Yáñez-Mó M, Sala-Valdés M, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Higginbottom A, et al. 2005. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. Blood 105: 2852–2861.

Barreiro O1, Zamai M, Yáñez-Mó M, Tejera E, López-Romero P, Monk PN, et al. 2008. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplatforms. J. Cell Biol. 183: 527–542.

Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret, E, Henry C,et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol. 2007; 9:1588–600.

Beauvais A, Bozza S, Kniemeyer O, Formosa C, Balloy V, Henry C, et al. Deletion of the α-(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog. 2013; 9(11): e1003716.

Beauvais A, Fontaine T, Aimanianda V, Latgé JP. *Aspergillus* cell wall and biofilm. Mycopathologia. 2014; 178(5-6):371-7.

Beauvais A, Latgé JP. Beauvais A, Latgé JP. Microbiol Spectr. 2015;3(4).

Belkin AM, Retta SF, Pletjushkina OY, Balzac F, Silengo L, Fassler R, et al. Muscle beta1D integrin reinforces the cytoskeleton-matrix link: modulation of integrin adhesive function by alternative splicing. J Cell Biol. 1997 Dec 15;139(6):1583-95.

Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. Blood. 2009; 4(26), 5393–5399.

Ben-Ami R. Angiogenesis at the mold-host interface: a potential key to understanding and treating invasive aspergillosis. Future Microbiol. 2013; 8(11):1453-62.

Bentley R, Bennett JW. A ferment of fermentations: reflections on the production of commodity chemicals using microorganisms. Adv Appl Microbiol. 2007; 63: 1-32.

Berkova N, Lair-Fulleringer S, Femenia F, Huet D, Wagner MC, et al. *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. Int Immunol. 2009; 18: 139–150.

Bertout S, Badoc C, Mallie M, Giaimis J, Bastide J M. Spore diffusate isolated from some strains of *Aspergillus fumigatus* inhibits phagocytosis by murine alveolar macrophages. FEMS Immunol & Med Microbiol. 2006; 33:101-106.

Bialkowska, K.; Zaffran, Y.; Meyer, S.C.; Fox, J.E. 14-3-3ζ mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. J. Biol. Chem. 2003; 278, 33342–33350

Bodnar, R.J.; Xi, X.; Li, Z.; Berndt, M.C.; Du, X. Regulation of glycoprotein Ib-IX-von Willebrand factor interaction by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation at Ser 166 of glycoprotein Ibβ. J. Biol. Chem. 2002; 277, 47080–47087.

Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays. 2006; 28(8):799-808.

Briard B, Muszkieta L, Latgé JP, Fontaine T. Galactosaminogalactan of *Aspergillus fumigatus*, a bioactive fungal polymer. Mycologia. 2016;108(3):572-80.

Bridges D, Moorhead GB: 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. Sci STKE. 2005; 2005(296):re10.

Bruns S1, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. PLoS Pathog. 2010; 6(4), e1000873.

Bryckaert M, Rosa JP, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. Cell Mol Life Sci 2015; 72: 307–26.

Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. Nat Med 2000; 6:1362 –1367.

Campbell JH, Campbell GR. Development of Vascular System. Ciba Found. Symp. 100. Londres: Pitman, 1983.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. The Fungi. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2007.

Carlsen M, Nielsen J. Influence of carbon source on alphaamylase production by *Aspergillus oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 57:346–9.

Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Yates JR 3rd, Barbosa VC. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. Curr Protoc Bioinformatics. 2012 Dec;Chapter 13:Unit13.19.

Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MD, Fischer JS, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. Nat Protoc. 2016;11(1):102-17.

Casadevall A. Pirofski LA. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. Eukaryot Cell. 2007; 6(12): 2169–2174.

Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? Fungal Genet. Biol. 2005; 42(2):98–106.

Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2003; 1(1):17–24.

Casadevall A, Pirofski LA. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect Immun. 67: 3703-3713.

Cederholm A, Frostegård J. Annexin A5 multitasking: a potentially novel antiatherothrombotic agent? Drug News Perspect. 2007; 20(5):321-6.

Celli L, Ryckewaert JJ, Delachanal E, Duperray A. Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1 and nonmuscle alpha-actinins in leukocyte diapedesis. J. Immunol. 2006; 177: 4113–4121.

Chiang LY1, Sheppard DC, Gravelat FN, Patterson TF, Filler SG.. *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. Infection and Immunity. 2008,76: 3429–3438.

Chidlow JH Jr, Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. Cardiovasc Res. 2010; 1;86(2):219-25.

Choi HS, Shim JS, Kim JA, Kang SW, Kwon HJ. Discovery of gliotoxin as a new small molecule targeting thioredoxin redox system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 359(3), 523–528.

Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. Nat Cell Biol. 2008;10(3):272–282.

Collard CD, Agah A, Reenstra W, Buras J, Stahl GL. Endothelial nuclear factor-κB trans-location and vascular cell adhesion molecule-1 induction by complement: Inhibition with anti-human C5 therapy or cGMP analogues. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19:2623–2629.

Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. J Biol Chem. 1997; 272:6525–33

Curty N, Kubitschek-Barreira PH, Neves GW, Gomes D, Pizzatti L, Abdelhay E, et al. Discovering the infectome of human endhotelial cells challenged with *Aspergillus fumigatus* applying a mass spectrometry label-free approach. Journal of Proteomics. 2014; 97:126-140.

Das M, Ithychanda SS, Qin J, Plow EF. Migfilin and filamin as regulators of integrin activation in endothelial cells and neutrophils. PLoS One. 2011;6(10):e26355.

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(3):447-65.

Dai, K.; Bodnar, R.; Berndt, M.C.; Du, X. A critical role for 14-3-3ζ protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications. Blood 2005; 106, 1975–1981.

Dejana E, Siminoescu H, Wolburg H. Endothelial cell biology and pathology. Cell tissue Res. 2008, 335(1):1-3.

Denis CV, Andre P, Saffaripour S, Wagner DD. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 4072–7.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986; 89(2):271-7.

Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 1998; 26: 781-805.

Dichtl K1, Samantaray S, Aimanianda V, et al. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall β-1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. Mol Microbiol. 2015; 95(3):458-71.

Dixon DM. Polak A, Walsh, TJ. Fungus dose dependente primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. Infection and Immunity. 1989; 57, 1452

Du Y, Teng X, Wang N, Zhang X, Chen J, Ding P, Qiao Q, Wang Q, Zhang L, Yang C, Yang Z, Chu Y, Du X, Zhou X, Hu W. NF-κB and enhancer-binding CREB protein scaffolded by CREBbinding protein (CBP)/p300 proteins regulate CD59 protein expression to protect cells from complement attack. J Biol Chem. 2014; 289:2711–2724.

Emin M, Wang G, Castagna F, Rodriguez-Lopez J, Wahab R, Wang J, Adams T, Wei Y, Jelic S3. Increased internalization of complement inhibitor CD59 may contribute to endothelial inflammation in obstructive sleep apnea. Sci Transl Med. 2016; 8(320):320ra1.

Fan XF, Li WJ, Chen ZQ, Wang XR, Kong XX, Mao SZ, el al. Changes of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pulmonary tissue of rats with hypoxic pulmonary hypertension. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. 2011; 27(3):270-4.

Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. J Physiol 2002; 539(Pt 2):537.

Ferraro F, Kriston-Vizi J, Metcalf DJ, Martin-Martin B, Freeman J, Burden JJ, et al. A two-tier Golgi-based control of organelle
size underpins the functional plasticity of endothelial cells. Dev Cell 2014; 29: 292–304.

Filler SG, Sheppard DC. Fungal Invasion of Normally Non-Phagocytic Host Cells. PLoS Pathog. 2006; 2:1099-105.

Firon A, Beauvais A, Latgé JP, Couvé E, Grosjean-Cournoyer MC, D'Enfert C. Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. Genetics. 2002; 161(3):1077-87.

Fishelson Z1, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. Mol Immunol. 2003; 40(2-4):109-23.

Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, van Kooyk Y, et al. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog. 2011; 7(11):e1002372.

Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. The Jounarl of Biological Chemistry. 2000; 275(36): 27594–607.

Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000; 40: 617-647.

Galán AM, van Heerde WL, Escolar G, Ordinas A, Sixma J, de Groot PG. Antithrombotic action of annexin V proved as efficient as direct inhibition of tissue factor or thrombin. Eur J Clin Invest. 2006; 36(9):633-9.

Garrean S, Gao XP, Brovkovych V, Shimizu J, Zhao YY, Vogel SM et al. Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. J Immunol 2006;177:4853 –60.

Gastebois A, Clavaud C, Aimanianda V, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. Future Microbiol. 2009; 4(5):583-95.

Gerke V, Moss SE. Annexins: From Structure to Function. Physiological Reviews. 2002, Vol. 82 no. 2, 331-71

Grahl N, Puttikamonkul S, Macdonald JM, Gamcsik MP, Ngo LY, Hohl TM, et al. In vivo hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. 2011; PLoS Pathog. 7(7), e1002145.

Gravelat FN, Ejzykowicz DE, Chiang LY, Chabot JC, Urb M, Macdonald KD, et al. *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. Cell Microbiol. 2010; 12(4):473-88.

Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, et al. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal β-glucan from the immune system. PLoS Pathog. 2013; 9(8):e1003575.

Gresnigt MS, Bozza S, Becker KL, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van der Berg WB, et al. A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. PLoS Pathog. 2014; 10(3):e1003936.

Gu, M.; Xi, X.; Englund, G.D.; Berndt, M.C.; Du, X. Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin αIIbβ3 using a reconstituted mammalian cell expression model. J. Cell Biol. 1999, 147, 1085–96

Heemskerk N, Asimuddin M, Oort C, van Rijssel J, van Buul JD. Annexin A2 Limits Neutrophil Transendothelial Migration by Organizing the Spatial Distribution of ICAM-1. J Immunol. 2016; 196(6):2767-78.

Heesemann L, Kotz A, Echtenacher B. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. Int J Med Microbiol. 2011; 301(6):523-30.

Hermeking H, Benzinger A: 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. Semin Cancer Biol. 2006; 16:183-192.

Hillgruber C, Steingraber AK, Poppelmann B, Denis CV, Ware J, Vestweber D, et al. Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. J Invest Dermatol 2014; 134: 77–86.

Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. Eukaryotic Cell. 2007; 6(11):1953–63.

Hsu JL1, Khan MA, Sobel RA, Jiang X, Clemons KV, Nguyen TT, et al. *Aspergillus fumigatus* invasion increases with progressive aidavrway ischemia. PLoS One. 2013; 8(10):e77136.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. Nature Protoc. 2009a; 4(1):44-57.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 2009b; 37(1):1-13.

Huang J, Roth R, Heuser JE, Sadler JE. Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress. Blood; 2009 Feb 12; 113(7):1589-97.

Hu W, Yu Q, Hu N, Byrd D, Amet T, Shikuma C, Shiramizu B, Halperin JA, Qin X. A high-affinity inhibitor of human CD59 enhances complement-mediated virolysis of HIV-1: implications for treatment of HIV-1/AIDS. J Immunol. 2010; 184(1):359-68.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 1973; 52(11):2745-56.

Jahn B, Boukhallouk F, Lotz J, Langfelder K, Wanner G, Brakhage AA. Interaction of human phagocytes with 1'pigmentless *Aspergillus* conidia. I nfect Immun. 2000, 68:3736-3739.

Kamai Y, Chiang LY, Lopes Bezerra LM, Doedt T, Lossinsky AS. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with vascular endothelial cells. Medical Mycology. 2006 44:S115-7.

Kamai Y, Lossinsky A S , Liu H , Sheppard D C , Filler S G. Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol. 2009; 11(1):170-82.

Kao R, Davies J. Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of natural genetically engineered ribonucleases. Journal of Biology Chemistry. 1999; 74:12576-82.

Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates αIIbβ3 independently of other receptors. Blood 2004, 103, 3403–11.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11(5):373-84.

Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. J Thromb Haemost. 2017; 15(7):1285-94.

Kilgore KS, Schmid E, Shanley TP, Flory CM, Maheswari V, Tramontini NL, et al. Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factorkappa B activation. Am J Pathol. 1997; 150:2019–31.

Lamarre C, Beau R, Balloy V, et al. Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol. 2009; 26: 26.

Larone DH. Medically important fungi, 4th ed. ASM Press. 2002.

Latgé J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12:310-50.

Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. Cellular Microbiology. 2010; 12(7): 863–72.

Lee MJ, Gravelat FN, Cerone RP, Baptista SD, Campoli PV, Choe SI, et al. Overlapping and distinct roles of *Aspergillus fumigatus* UDP-glucose 4-epimerases in galactose metabolism and the synthesis of galactose-containing cell wall polysaccharides. J Biol Chem. 2014; 289(3):1243-56.

Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. Blood 2015; 125: 2019–28.

Lessing F , Kniemeyer O ,Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, et al. The *Aspergillus fumigatus* Transcriptional Regulator AfYap1 Represents the Major Regulator for Defense against Reactive Oxygen Intermediates but Is Dispensable for Pathogenicity in an Intranasal Mouse Infection Model. Eukariot. Cell. 2007; 6:2290-2302.

Libby P; Simon DI. Inflammation and Thrombosis: The Clot Thickens. Circulation, 2001, 103:1718-20.

Liu B, Staron M, Hong F, Wu BX, Sun S, Morales C, Crosson CE, Tomlinson S, Kim I, Wu D, Li Z. Essential roles of grp94 in gut homeostasis via chaperoning canonical Wnt pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 23;110(17):6877-82.

Liu B, Yang Y, Qiu Z, Staron M, Hong F, Li Y, et al. Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. Nat Commun. 2010,; 21;1:79.

Li B1, Gao MH, Chu XM, Xu YJ, Yang F. Identification of a novel short peptide seal specific to CD59 and its effect on HeLa cell growth and apoptosis. Cell Oncol (Dordr). 2012; 35(5):355-65.

Liu, M, Spellberg B, Phan QT, Fu Y, Fu Y, Lee AS, et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. J. Clin. Invest. 2010, 120:1914–24.

Lopes-Bezerra L M. Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. Braz J Med Biol. 2003, 36(8):987-991.

Lopes-Bezerra L M; Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity.Blood, 2004, 103:2143-9.

Loussert C, Schmitt C, Prevost MC, Balloy V, Fadel E, et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol 2010, 12:405-410.

Maggon K. Best-selling human medicines. Drug Discov Today. 2005, (10):739–42.

Magnuson JK, Lasure LL. Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz JS, Lange L. Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 307-340. 2004.

Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, et al. Human protectin (CD59), an 18,000–20,000MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. Immunology 1990; 71(1):1.

Micheli PA. Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. Florence, Italy: Bernardo Paperini. 1729.

Michiels C. Endothelial cell functions. Journal Cell Physiology. 2003, 196:430-43

Millán J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. Nat Cell Biol. 2006; 8(2):113-23.

Mirnikjoo B, Balasubramanian K, Schroit AJ. Suicidal membrane repair regulates phosphatidylserine externalization during apoptosis. 2009; J. Biol. Chem. 284:22512–16.

Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, et al. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. J Natl CancerInst 2012; 104: 906–22.

Momany M. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. Curr. Opin. Microbiol. 2002, 5:580–585.

Momany M, Taylor I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans:* polarity, germ tube emergence and septation. Microbiol. 2000; 146:3279-3284.

Monod M , Capoccia S, Lechenne B , Zaugg C , Holdom M , Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. Int. J. Med. Microbiol. 2002; 292:405–19.

Murata T, Lin MI, Stan RV, Bauer PM, Yu J, Sessa WC. Genetic evidence supporting caveolae microdomain regulation of calcium entry in endothelial cells. J Biol Chem 2007;282:16631 –16643.

Narreddy S, Mellon-Reppen S, Abidi MH, Klein JL, Peres E, Heilbrun LK, et al. Non-bacterial infections in allogeneic non-myeloablative stem cell transplant recipients. Transpl. Infect. Dis. 2007; 9: 3–10.

Neves GW, Curty NA, Kubitschek-Barreira PH, Fontaine T, Souza GH, Cunha ML, et al. Dataset of differentially regulated proteins in HUVECs challenged with wild type and UGM1 mutant *Aspergillus fumigatus* strains. Data Brief. 2016; 9: 24–31.

Neves GW, Curty NA, Kubitschek-Barreira PH, Fontaine T, Souza GH, Cunha ML, et al. Modifications to the composition of the hyphal outer layer of *Aspergillus fumigatus* modulates HUVEC proteins related to inflammatory and stress responses. J Proteomics. 2017; 16;151:83-96.

Neves GW. Perfil de secreção de citocinas pelas células endoteliais após interação com *A.fumigatus.* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.

Nuutila J1, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, Kotilainen P, Pelliniemi TT, Nikoskelainen J, et al. Use of complement regulators, CD35, CD46, CD55, and CD59, on leukocytes as markers for diagnosis of viral and bacterial infections. Hum Immunol. 2013; 74(5):522-30.

Obsil T1, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. Semin Cell Dev Biol. 2011 Sep; 22(7):663-72.

O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus.* Nature. 2009; 457(7228):471-4.

Osherov N. Conidial germination of *A. fumigatus*. *Aspergillus* and Aspergillosis. ASM press, Washington, DC, 2009.

Osherov N. The virulence of *Aspergillus fumigatus*. In: Kavanagh K, editor. New insigths in medical mycology. Dordreeht: Springer; 2007. p.185-293.

Ostergaard L1, Simonsen U, Eskildsen-Helmond Y, Vorum H, Uldbjerg N, Honoré B, et al. Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmatic stress proteins in human endothelial cells. Proteomics. 2009; (19):4457-67

Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, et al. Internalization of *Aspergillus fumigatus* Conidia by Epithelial and Endothelial Cells. Iinfection and immunity. 1997, 1510–1514.

Park JH, Jang JH, Choi EJ, Kim YS, Lee EJ, Jung ID, et al. Annexin A5 increases survival in murine sepsis model by inhibiting HMGB1-mediated pro-inflammation and coagulation. Mol Med. 2016; 6;22.

Patterson T.F. Risk stratification for invasive aspergillosis: early assessment of host susceptibility. Med. Mycol. 2009; 47 Suppl 1:S2 55-60

Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, et al. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. Blood 2010; 116: 4712–9.

Pfaff M, Liu S, Erle DJ, Ginsberg MH. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. J Biol Chem. 1998 Mar 13;273(11):6104-9.

Philippe B, Ibrahum-Grnet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect. Immun. 2003, 71: 3034-3042.

Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. 2006; J. Exp. Med. 203: 2569–2575.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol 2007; 7: 803–15.

Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA. Filamins: Promiscuous organizers of the cytoskeleton. Trends Biochem. Sci. 2006, 31, 411–19.

Pottiez G, Sevin E, Cecchelli R, Karamanos Y, Flahaut C. Actin, gelsolin and filamin-A are dynamic actors in the cytoskeleton remodelling contributing to the blood brain barrier phenotype. Proteomics. 2009; 9(5):1207-19

Rambach G, Blum G, Latgé JP, Fontaine T, Heinekamp T, Hagleitner M, et al. Identification of Aspergillus fumigatus Surface Components That Mediate Interaction of Conidia and Hyphae With Human Platelets. J Infect Dis. 2015; 1;212(7):1140-9.

Rand JH, Wu XX, Lin EY, Griffel A, Gialanella P, McKitrick JC. Annexin A5 binds to lipopolysaccharide and reduces its endotoxin activity. MBio. 2012; 13;3(2). pii: e00292-11.

Rappleye, CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3) glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:1366–1370.

Reeves EP, Murphy T, Daly P, Kavanagh K Amphotericin B enhances the synthesis and release of the immunosuppressive agent gliotoxin from the pulmonary pathogen *Aspergillus fumigatus*. Journal of Medical Microbiology. 2004; 53:719-25.

Rementeria A., López-molina N., Ludwig A., Vivanco, B.A., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. Genes and molecules involved is *Aspergillus fumigatus* virulence. Rev. Iberoam. Micol. 2005; 22:1-23.

Rhodes CJ. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. Med. Myco. 2006; 44:77-S81.

Romani L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol. 2004; 4:1–2.

Sadler JE. New concepts in von Willebrand disease. Annu Rev Med. 2005;56:173–91.

Schaefer, A., J. Te Riet, K. Ritz, M. Hoogenboezem, E. C. Anthony, F. P. Mul, C. J. de Vries, M. J. Daemen, C. G. Figdor, J. D. van Buul, and P. L. Hordijk. Actin-binding proteins differentially regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration. 2014; J. Cell Sci. 127: 4470–82.

Schnoor M. Endothelial Actin-Binding Proteins and Actin Dynamics in Leukocyte Transendothelial Migration. Immunol 2015; 194:3535-41.

Schulz T, Senkpiel K, Ohgke H. Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds. Int. J. Hyg. Environ. Health. 2004; 207:267-77.

Segal BH, Walsh TJ. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis. Am J Respir Crit Care Med. 2006; 173:707–17.

Sharon H, Hagag S, Osherov N. Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. Infection and Immunity. 2009; 77: 4051–4060.

Sheppard DC, Doedt T, Chiang LY, et al. The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence. Mol Biol Cell. 2005; 16(12):5866-79.

Sheppard DC. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. Curr Opin Microbiol. 2011; 14(4):375-9.

Simionescu M. Endothelial cell response to normal and abormal stimuli: modulation, dysfunction, injury; adaptation, repair, death. In: Endothelial cell dysfunctions. Simionescu N. & Simuonescu M. (ed) Plenum Press New York, 3-8, 1992.

Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. Clin Microbiol Rev. 2005; 18:44-69.

Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. Circulation. 2008; 18; 117(11):1449-59.

Springer TA. von Willebrand factor. Jedi knight of the bloodstream. Blood 2014; 124: 1412–25.

Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. Cell. 1986; 18; 46(2):185-90.

Staron M1, Yang Y, Liu B, Li J, Shen Y, Zúñiga-Pflücker JC, Aguila HL, Goldschneider I, Li Z. gp96, an endoplasmic reticulum master chaperone for integrins and Toll-like receptors, selectively regulates early T and B lymphopoiesis. Blood. 2010; 25;115(12):2380-90.

Staron M, Wu S, Hong F, Stojanovic A, Du X, Bona R, Liu B, Li Z. Heat-shock protein gp96/grp94 is an essential chaperone for the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. Blood. 2011; 30;117(26):7136-44.

Stevens AD. Clinical aspergillosis for basic scientists. Med. Myco, 2008.

Suen YK, Fung KP, Lee CY, Kong SK. Gliotoxin induces apoptosis in cultured macrophages via production of reactive oxygen species and cytochrome c release without mitochondrial depolarization. Free Radic. Res. 2001; 35(1), 1–10.

Sumpio BE. Hemodynamic Force and Vascular cell Biology RG Landes Publichers, 1993.

Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2002, 34:1508-12

Taubitz A, B Bauer, J Heesemann, F Ebel. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus.* Infect Immun. 2007, 62: 4380-8.

Tekaia F, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* saprophyte or pathogen? Curr Opin in microbiol. 2005; 8:384-92.

Terraube V, Marx I, Denis CV. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. Thromb Res 2007; 120(Suppl. 2): S64–70.

Tiruppathi C, Naqvi T, Wu Y, Vogel SM, Minshall RD, Malik AB. Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 18;101(20):7699-704.

Tourkina E, Gooz P, Pannu J, Bonner M, Scholz D, Hacker S, et al. Opposing effects of protein kinase Calpha and protein kinase Cepsilon on collagen expression by human lung fibroblasts are mediated via MEK/ERK and caveolin-1 signaling. J Biol Chem. 2005; 280:13879–87.

Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. T. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. Infect. Immun. 2004; 72(6), 3373–3382.

Universal Protein Resourse [base de dados da internet]. Suíssa: European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR). 2002. [atualizada em 05/2017; acesso em 05/2017]. Disponível em: http://www.uniprot.org.

van der Flier, A., Sonnenberg, A., Structural and functional aspects of filamins. Biochim. Biophys. Acta 2001; 1538, 99– 117.

Van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. Current Opinion in Microbiology. 2008; 11:305–12.

Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC Jr, et al. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. Gynecol Oncol. 1998; 71(2):270-7.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin. 1995; V. J. Immunol. Methods 184:39 –51.

Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. Cell 1996;87: 733– 743.

Wasylnka JA, Moore MM. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. J Cell Sci. 2003, 116: 1579–87.

Webster J & Weber WSW. Introduction to Fungi. 3th ed. Cambridge University Press, 2007.

ZmeilI OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. Q J Med. 2007, 100:317–34.

Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. Science 1996; 273:1551 –5

Weinstock C, Anliker M, von Zabern I. CD59: A long-known complement inhibitor has advanced to a blood group system. Immunohematology. 2015;31(4):145-51.

Wickham SE, Hotze EM, Farrand AJ, Polekhina G, Nero TL, Tomlinson S, et al. Mapping the intermedilysin-human CD59 receptor interface reveals a deep correspondence with the binding site on CD59 for complement binding proteins C8alpha and C9. J Biol Chem. 2011; 286(23):20952-62

Wolgast LR, Arslan AA, Wu XX, Beyda JN, Pengo V, Rand JH3. Reduction of annexin A5 anticoagulant ratio identifies antiphospholipid antibody-positive patients with adverse clinical outcomes. J Thromb Haemost. 2017; 15(7):1412-21.

Yang Y, Li Z. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? Mol Cells. 2005;20(2):173–182. HMGB1: a novel protein that induced platelets active and aggregation via Toll-like receptor-4, NF-κB and cGMP dependent mechanisms. Diagn Pathol. 2015; 10:134.

Yang X, Wang H, Zhang M, Liu J, Lv B, Chen F. HMGB1: a novel protein that induced platelets active and aggregation via Toll-like receptor-4, NF-κB and cGMP dependent mechanisms. Diagn Pathol. 2015; 10:134

Yuan Y1, Zhang W, Yan R, Liao Y, Zhao L, Ruan C. Identification of a novel 14-3-3ζ binding site within the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein Ibα that plays a key role in regulating the von Willebrand factor binding function of glycoprotein Ib-IX. Circ. Res. 2009; 105, 1177–85.

Zhang W1, Zhao L, Liu J, Du J, Yan R, Dai K. Role of 14-3-3ζ in platelet glycoprotein Ibα-von Willebrand factor interaction-induced signaling. Int J Mol Sci. 2012;13(5):5364-74.

Zhu X, Cao Y, Wei L, Cai P, Xu H, Luo H, et al. von Willebrand factor contributes to poor outcome in a mouse model of intracerebral haemorrhage. Sci Rep 2016; 6:35901.