



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Paula Helena Kubitschek Barreira

**Análise proteômica dos componentes da superfície celular e do secretoma
de *Aspergillus fumigatus***

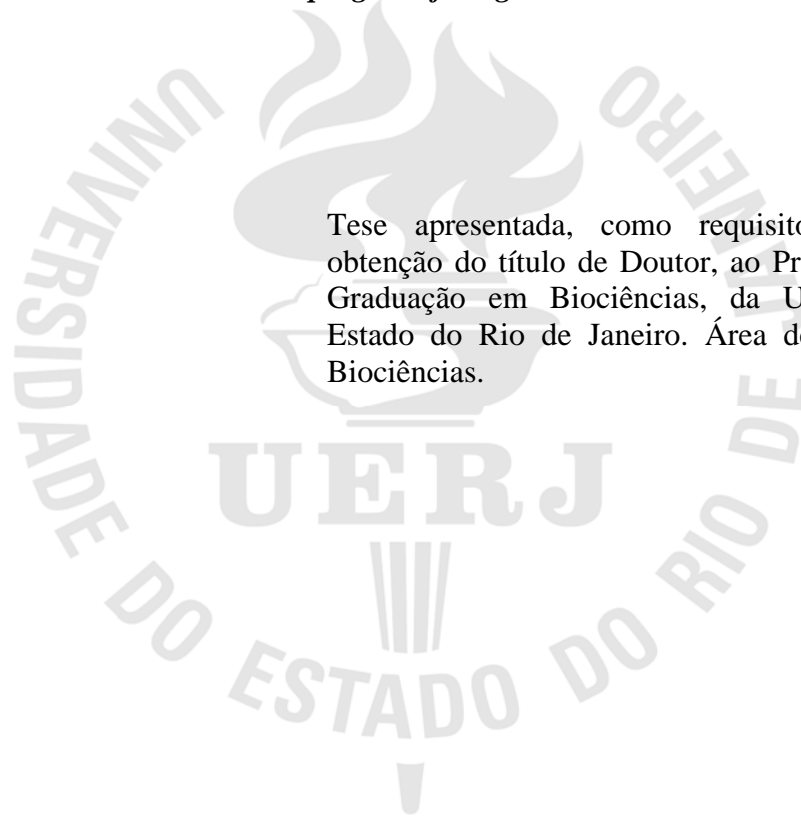
Rio de Janeiro

2011

Paula Helena Kubitschek Barreira

**Análise proteômica comparativa dos componentes da superfície celular e do secretoma
de *Aspergillus fumigatus***

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. Área de concentração: Biociências.



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

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

K95 Kubitschek-Barreira, Paula Helena.
Análise proteômica comparativa dos componentes da superfície celular e do secretoma de *Aspergillus fumigatus* / Paula Helena Kubitschek Barreira. - 2011.
137 f.

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

1. *Aspergillus fumigatus* - Teses. 2. Fungo patogênico. 3. Proteínas fúngicas. 4. Proteômica - Teses. I. Rodrigues, Márcia Maria Jardim. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 582.28

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

Assinatura

Data

Paula Helena Kubitschek Barreira

Análise proteômica de componentes da superfície celular e do secretoma do *Aspergillus fumigatus*

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. Área de concentração: Biociências

Aprovada em 26 de agosto de 2011.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Vera Lucia Freire da Cunha Bastos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Ayres Guimarães Dias
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman
Universidade de São Paulo – USP/RP

Prof. Dr. Richard Hemmi Valente
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof^a. Dra. Eliana Barreto Bergter
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Leila Maria Lopes Bezerra, pelos conselhos e empenho em querer me fazer ser uma profissional melhor.

À Dra. Rosana Puccia pela revisão final deste trabalho.

À banca avaliadora, por ter aceito o convite. Sei que receberei dicas valiosas de todos vocês.

Aos meus amigos do LMCProt pela ajuda, companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus amigos fora do LMCProt, pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Nathy e Gabi pela ajuda imprescindível na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio nos momentos difíceis, pela compreensão, amor e educação.

Ao Fábio pela ajuda, compreensão, amor e companheirismo.

RESUMO

Kubitschek-Barreira, Paula Helena. **Análise proteômica comparativa dos componentes da superfície celular e do secretoma de *Aspergillus fumigatus***. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Aspergillus fumigatus é o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, infecção fúngica oportunista com altas taxas de mortalidade afetando, principalmente, pacientes com neutropenia profunda e prolongada. Durante o processo de invasão e disseminação características desta infecção sistêmica, os conídios do fungo inalados e não eliminados pelas células do sistema imune inato diferenciam-se em hifas que, sua vez, são angioinvasivas. Pouco se conhece sobre as moléculas da parede celular envolvidas na patogênese do *A. fumigatus* e/ou secretadas por este patógeno. Neste contexto, este trabalho procura ampliar o entendimento desta doença através do estudo de proteínas diferencialmente expressas na superfície de *A. fumigatus* durante a morfogênese. Foi utilizada uma abordagem proteômica e foram estudados extratos de superfície de células de *A. fumigatus* em diferentes estágios durante o processo de filamentação. Estas células foram denominadas, de acordo com o tempo de cultivo e a morfologia, como: TG_{6h} (tubo germinativo), H_{12h} ou H_{72h} (hifas). As proteínas de superfície celular foram extraídas, a partir de células intactas, por tratamento brando com o agente redutor DTT (ditiotreitól). Observou-se que o perfil funcional das proteínas expressas por H_{12h} e H_{72h} foi similar, com exceção de proteínas relacionadas à resposta ao estresse, enquanto o perfil para TG_{6h} apresentou diferenças significativas para vários grupos funcionais de proteínas quando comparado às hifas. Desta forma, foram realizados experimentos de proteômica diferencial entre tubo germinativo (TG_{6h}) e a hifa madura (H_{72h}), pela técnica de DIGE (differential gel electrophoresis). Os resultados revelaram que entre as proteínas diferencialmente expressas, aquelas relacionadas às vias de biossíntese e outras denominadas multifuncionais encontraram-se superexpressas em TG_{6h}. Em relação às proteínas de resposta a estresse, observou-se que algumas HSPs eram mais expressas neste morfotipo, enquanto a MnSOD, relativa à resposta ao estresse oxidativo, era mais abundante na hifa. Com exceção da PhiA, integrante da parede celular, as proteínas identificadas como diferencialmente expressas na superfície do *A. fumigatus* não possuem sinal para secreção identificável, enquadrando-se nas “proteínas atípicas” de superfície. Foi verificada a integridade da membrana celular após tratamento com DTT, bem como a marcação por biotina das proteínas extraídas, o que comprovou sua localização superficial na célula fúngica. Hipóteses de que estas proteínas sejam endereçadas à parede celular por via secretória alternativa sustentam estes dados. Estas evidências foram confirmadas pelo fato de não terem sido encontradas as mesmas proteínas da superfície na análise do secretoma do *A. fumigatus*. Além disso, todas as proteínas caracterizadas no secretoma apresentavam sinal de secreção determinado pelo FunSecKB (www.proteomics.yzu.edu/secretomes/fungi.php). A análise do secretoma foi realizada utilizando-se a cepa selvagem AF293 e a mutante Δ prtT, mutante para um fator de

transcrição que atua na regulação da secreção de proteases. Os resultados revelam a ALP1 como expressa na cepa selvagem, assim como outras proteases importantes para virulência e desenvolvimento da célula fúngica, estando suprimidas quando o gene prtT foi deletado.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*. Superfície celular. Secretoma.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is the main etiologic agent of invasive aspergillosis (IA), an opportunistic and life-threatening disease for immunocompromised hosts, especially those with acute and prolonged neutropenia. During the invasion and dissemination, which occurs in this systemic infection, the *A. fumigatus* conidia, after its inhalation, germinate into angioinvasive hyphae in case the innate immune response fails to eliminate these cells. Little is known about the cell wall molecules and/or the secreted proteins involved in the *A. fumigatus* pathogenesis, at this context the present work aims to amplify the knowledge about aspergillosis by studying the differentially surface proteins of *A. fumigatus* during the filamentation process. These cells were denominated according to their morphology and their growth time as: TG6h (germ tubes), H12h and H72h (hyphae). The surface proteins were mildly extracted from intact cells using the reducing agent DTT (dithiothreitol). The functional profile of the H12h and H72h were similar except for the stress response proteins, while the TG6h presented significant differences for several functional groups. On this base, the DIGE (differential gel electrophoresis) was performed using the surface extracted proteins of the germ tubes (TG6h) and mature hyphae (H72h) cells. The results indicate that multiple functional proteins and proteins related to the biosynthesis pathways were overexpressed at TG6h. Some stress response proteins as the HSPs were overexpressed on this morphotype while the MnSOD, oxidative stress responsive protein, was most abundant at the hyphae. PhiA, an integrant protein of the cell wall, was the only protein with a secretion signal sequence. All other proteins identified on the cell surface lack an identifiable secretion signal, and are denominated atypical proteins. The plasma membrane integrity was verified after the mild extraction using DTT, and also the biotinylation of the cell extracted proteins, which ensured these proteins' surface localization on the fungal cell. There is a hypothesis that some proteins can be transported to the cell wall by alternative pathways and support the results found for this work. These evidences were confirmed by the fact that the proteins identified at the surface were not the same identified on the *A. fumigatus* secretome. Besides, all proteins identified on the secretome presented secretion signal determined by the FunSecKB (www.proteomics.yzu.edu/secretomes/fungi.php). The secretome analysis was performed using the wild type AF293 and the Δ prtT mutant, lacking a transcription factor that regulates protease secretion. The results demonstrate ALP1 overexpressed on the wild type and also other proteases important to virulence and development of the fungal cell suppressed when prtT was deleted.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*. Cell surface. Secretome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do conidióforo dos <i>Aspergilli</i>	17
Figura 2 -	Representação esquemática da arquitetura da parede celular de <i>Candida albicans</i>	31
Figura 3 -	Parede celular do <i>Aspergillus fumigatus</i>	35
Figura 4 -	Morfotipos do <i>A. fumigatus</i> analisados por MEV.....	36
Figura 5 -	Esquema experimental da obtenção de células de <i>A. fumigatus</i>	39
Figura 6 -	Esquema da obtenção de extratos proteicos a partir dos morfotipos do <i>A. fumigatus</i>	41
Figura 7 -	Células de <i>A. fumigatus</i> cultivadas por diferentes tempos em meio Sabouraud a 37°C por 6 h, 12 h e 72 h.....	51
Figura 8 -	Teste de viabilidade realizado com células de TG _{6h} usando o kit LIVE/DEAD® Yeast Viability.....	53
Figura 9 -	Ampliação das imagens sobrepostas para marcação com Calcofluor White e com FUN-1 antes (D) e após (H) o tratamento de células intactas de TG _{6h} com DTT.....	54
Figura 10 -	Perfil de bandeamento por SDS–PAGE corado pela prata e <i>Western blot</i> dos extratos de células TG _{6h} biotiniladas e não biotiniladas.....	56
Figura 11 -	Mapas bidimensionais dos morfotipos de <i>A. fumigatus</i>	58
Figura 12 -	Diagramas de Venn mostrando a quantidade de spots detectados nos géis <i>master</i> para cada morfotipo.....	59
Figura 13 -	Mapa bidimensional representativo do extrato de superfície TG _{6h} mostrando as proteínas numeradas já identificadas por MS/MS.....	62
Figura 14 -	Mapa 2D representativo do extrato de superfície H _{12h} mostrando as proteínas numeradas já identificadas por MS/MS.....	71
Figura 15 -	Mapa 2D representativo do extrato de superfície H _{72h} mostrando as proteínas numeradas já identificadas por MS/MS.....	77
Figura 16 -	Classificação funcional das proteínas identificadas nos extratos de superfície celular do <i>A. fumigatus</i> nos três estágios de filamentação.....	86
Figura 17 -	2D-DIGE dos extratos de superfície celular dos morfotipos GT _{6h} and H _{72h} de <i>A. fumigatus</i>	88

Figura 18 -	Análise estatística dos géis de 2D-DIGE.....	90
Figura 19 -	Imagem da sobreposição de um gel preparativo de DIGE com as proteínas identificadas.....	92
Figura 20 -	Classificação funcional das proteínas superexpressas identificadas nos extratos de superfície celular do <i>A. fumigatus</i> nos dois estágios de filamentação.....	102
Figura 21 -	Gráfico 3D de quantificação relativa da abundância de proteínas.....	103
Figura 22 -	SDS-PAGE 12% de proteínas secretadas das cepas AF293 e Δ prtT.....	105
Figura 23 -	2D-DIGE comparando o secretoma das cepas selvagem e Δ prtT.....	108
Figura 24 -	Gel representativo da sobreposição do secretoma das cepas selvagem e mutante (Δ prtT) de <i>A. fumigatus</i>	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas do extrato de superfície celular do TG _{6h} do <i>A. fumigatus</i> identificadas por MS ou MS/MS.....	63
Tabela 2 - Proteínas do extrato de superfície celular H _{12h} do <i>A. fumigatus</i> identificadas por MS/MS.....	72
Tabela 3 - Proteínas do extrato de superfície celular H _{72h} do <i>A. fumigatus</i> identificadas por MS/MS.....	78
Tabela 4 - Proteínas identificadas na superfície celular de <i>A. fumigatus</i> nos morfotipos GT _{6h} e H _{72h} (DIGE). Identificação por MS ou MS/MS....	93
Tabela 5 - Proteínas do secretoma de uma cepa selvagem (AF293) e uma mutante (Δ prtT) identificadas por MS ou MS/MS. Proteínas obtidas a partir de géis unidimensionais.....	106
Tabela 6 - Proteínas do secretoma de <i>A. fumigatus</i> identificadas por MS ou MS/MS. Proteínas extraídas de gel preparativo de DIGE.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC -	ATP Binding Cassetes
ABPA -	Aspergilose broncopulmonar alérgica
ACN -	Acetonitrilo
ADN -	Ácido desoxirribonucléico
AI -	Aspergilose invasiva
ALP -	Serino protease alcalina
AmBic -	Bicarbonato de amônio
API -	Aspergilose pulmonar invasiva
ASL -	Ligação alcalino-sensível
BCA -	Ácido bicinconínico
BVA -	Análise de variação biológica
CFTR -	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFW -	Calcofluor <i>white</i>
CHAPS -	3-(3-colamidopropil) dimetilamônio-1-propano sulfonato
CT -	Tomografia computadorizada
CWP -	Proteína de parede celular
Da -	Dalton
DGC -	Doença granulomatosa crônica
DIA -	Análise diferencial <i>In-gel</i>
DIGE -	Eletroforese diferencial em gel por fluorescência
DTT -	Ditiotreitol
ECL -	Quimioluminescência ampliada
EDA -	Análise estendida dos dados
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIVC -	Estruturas intravacuolares cilíndricas

ExPASy -	<i>Expert Protein Analysis System</i>
FLIM -	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
FRET -	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
FunSecKB -	<i>Fungal Secretome Knowledge Base</i>
GAPDH -	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GO -	Gene ontology
GPI -	Glicosilfosfatidilinositol
GPI-CWP -	Proteína de parede celular ligada a resquício de âncora de GPI
GVHD -	Doença de reação aguda do enxerto contra o hospedeiro
HEPES -	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1
HIV -	Vírus da imunodeficiência humana
HRCT -	Tomografia computadorizada de alta resolução
HRP -	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP -	Proteínas Heat-shock
IAA -	Iodoacetoamida
IgE -	Imunoglobulina E
IgG -	Imunoglobulina G
IPG -	Gradiente de pH imobilizado
kDa-	Quilodaltons
NHS-LC-Biotin -	sulfosuccinimidil-6-(biotinamido)hexanoato
MALDI -	Ionização por desorção a laser auxiliada por matriz
MAPK -	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEC -	Matriz extracelular
MEV -	Microscopia eletrônica de varredura
MET -	Microscopia eletrônica de transmissão
MEP -	Metaloprotease

MS -	Espectrometria de massa
MS/MS -	Espectrometria de massa <i>in tandem</i>
NCBI -	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NL -	Não linear
ORF -	<i>Open reading frame</i>
PBS -	Tampão fosfato/salina
Pir-CWP -	Proteína de parede celular com sequência interna repetitiva
PMN -	Polimorfonucleares
PMSF -	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
ppm -	Partes por milhão
SAP -	Aspartil-proteases secretadas
SDS -	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE -	Eletroforese em gel de poliacrimida na presença de SDS
SIB -	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>
SNC -	Sistema nervoso central
SOD -	superóxido dismutase
TBS -	Tampão tris salina
TBS-T -	Tampão tris salina com Tween
TCA -	Ácido tricloroacético
TFA -	Ácido trifluoroacético
TG -	Tubo germinativo
ToF -	Tempo de voo
Tris -	Tris(hidroximetil)-aminoetano
UniProt -	Universal Protein Resource
UTI -	Unidade de terapia intensiva
Vhs -	Volt/horas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1 -	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1 -	<i>Aspergillus fumigatus</i>	16
1.2 -	Aspergilose	18
1.2.1 -	<u>Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA)</u>	19
1.2.2 -	<u>Aspergiloma</u>	19
1.2.3 -	<u>Aspergilose invasiva (AI)</u>	20
1.3 -	Fatores de virulência	23
1.4 -	Parede celular de fungos	28
1.5 -	Parede celular do <i>A. fumigatus</i>	32
2 -	OBJETIVO GERAL	37
2.1 -	Objetivos específicos	37
3 -	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 -	Preparação dos morfotipos do <i>A. fumigatus</i>	38
3.2 -	Obtenção do secretoma	38
3.3 -	Obtenção dos extratos de superfície celular	40
3.4 -	Ensaio de viabilidade celular	42
3.5 -	Ensaio de biotinylação	42
3.6 -	SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	42
3.7 -	Eletroforese bidimensional (2DE)	44
3.7.1 -	<u>Dos extratos de superfície celular dos morfotipos</u>	44
3.7.2 -	<u>Secretoma</u>	45
3.8 -	2D-DIGE	45
3.9 -	Análise de imagens	46
3.9.1 -	<u>Eletroforese clássica</u>	46

3.9.2 -	<u>DIGE</u>	46
3.10 -	Identificação das proteínas por espectrometria de massa	47
3.10.1 -	<u>Digestão trípica</u>	47
3.10.2 -	<u>Análise de MALDI-ToF-ToF e sequenciamento de peptídeos</u>	48
4 -	RESULTADOS	50
4.1 -	Obtenção de diferentes morfotipos de <i>A. fumigatus</i>	50
4.2 -	Ensaio de viabilidade celular	52
4.3 -	Marcação das proteínas de superfície por biotina para avaliação qualitativa dos extratos de <i>A. fumigatus</i>	55
4.4 -	Mapeamento das proteínas da superfície de TG_{6h}, H_{12h} e H_{72h} por eletroforese bidimensional	57
4.5 -	Identificação das proteínas nos mapas 2-DE dos extratos de superfície do <i>A. fumigatus</i>	60
4.6 -	Expressão diferencial de proteínas de TG_{6h} e H_{72h}	87
4.7 -	Análise multivariada para os géis de DIGE	89
4.8 -	Identificação de proteínas diferencialmente expressas entre TG_{6h} e H_{72h}	91
4.9 -	Análise do secretoma de <i>A. fumigatus</i>	104
4.10 -	Análise do secretoma do <i>A. fumigatus</i> por DIGE	107
5 -	DISCUSSÃO	113
6 -	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS	123

INTRODUÇÃO

1- REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - *Aspergillus fumigatus*

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentosos pertencente ao filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales*, família *Trichomaceae*. Os membros do filo *Ascomycota*, quando realizam reprodução sexuada, caracterizam-se por produzirem ascósporos em estruturas denominadas ascos. Alguns membros, entretanto, reproduzem-se assexuadamente através da produção de conídios, que se formam a partir de conidióforos. Muitas espécies da família *Trichomaceae* produzem metabólitos secundários que podem ser prejudiciais à saúde, as chamadas micotoxinas. Além disso, alguns componentes desta família são capazes de infectar humanos e animais, como é o caso do *A. fumigatus* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Inicialmente, o micélio de *Aspergillus spp.* produz conidióforos em abundância. Os conidióforos são formados perpendicularmente a partir da célula pé, que é uma diferenciação da hifa. Quando desenvolvidos, são estruturas longas, eretas, que terminam em uma vesícula globosa onde se assentam as filíades ou células conidiogênicas. O *A. fumigatus* é uma espécie unisseriada, ou seja, suas filíades possuem apenas uma camada de células que produzem os fialoconídios; além disso, suas filíades ocupam apenas dois terços da vesícula. O conjunto composto pela vesícula, filíades e fialoconídios é designado cabeça aspergilar (Alexopoulos *et al.*, 1996).

O desenvolvimento dos conídios é blástico. Cada conídio se desenvolve como uma protrusão a partir da ponta da filíade, onde um septo é formado e delimita o conídio. Quando este está maduro, outro conídio se forma abaixo e empurra o anterior para fora, porém, as paredes celulares dos conídios adjacentes permanecem fisicamente conectadas por algum tempo. Com isso, uma cadeia de conídios se acumula na ponta da filíade (Mims *et al.*, 1988; Hennebert e Sutton, 1994). O conidióforo dos *Aspergilli* e do *A. fumigatus* está ilustrado na figura 1.

Os conídios são liberados em estágio “dormente” e germinam quando encontram condições adequadas de água e nutrientes, passando por uma fase de crescimento isotrópico (*swelling*) e posterior formação de um eixo de polaridade. Quando ocorre a primeira divisão

mitótica, mais de 90% das células estão polarizadas (Momany e Taylor, 2000). Estas células se desenvolvem em tubos germinativos (TG) e, posteriormente, em hifas septadas. Os TGs possuem estruturas similares a apêndices em sua superfície que estariam relacionadas a propriedades adesivas deste fungo (Rohde *et al.*, 2001).

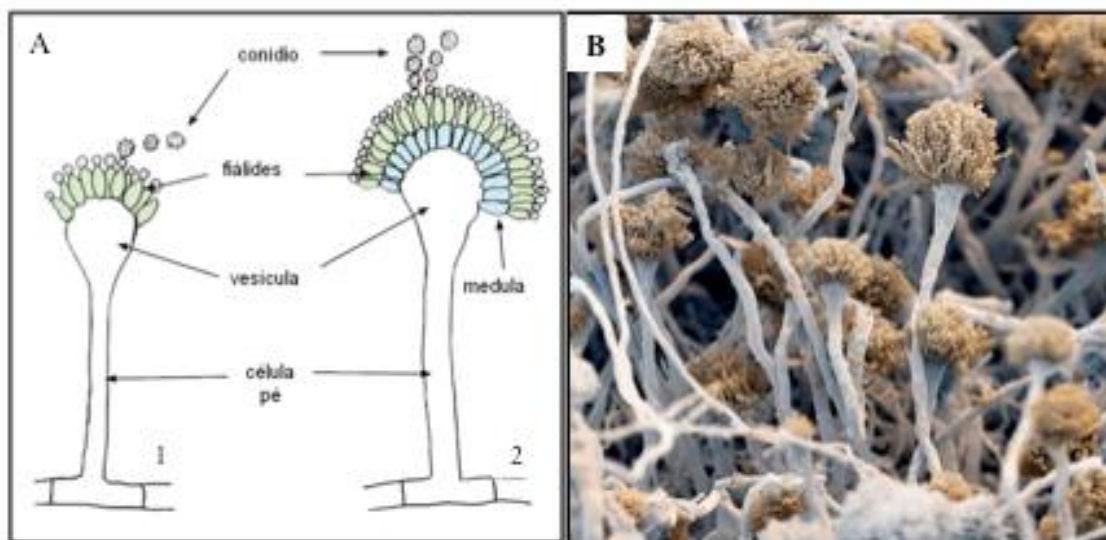


Figura 1. Estrutura do conidióforo dos *Aspergilli*. (A) Esquema mostrando a conidiogênese uniseriada (1) e bisseriada (2) (extraído de Ellis *et al.*, 2007); (B) Microscopia eletrônica de varredura de conidióforos do *A. fumigatus*(<http://www.sciencephoto.com/media/13947>).

Durante 145 anos o *A. fumigatus* foi descrito como anamorfo, ou seja, possuía apenas reprodução assexuada através da formação de fialoconídios. Todavia, em 2009 foi descrito o teleomorfo deste fungo, *Neosartorya fumigata*, ou seja, a forma capaz de se reproduzir sexuadamente. *Neosartorya fumigata* é capaz de produzir ascósporos no interior de cleistotécios, que são corpos de frutificação globosos e fechados onde se encontram os ascos (O’Gorman *et al.*, 2009). Antes deste trabalho, outros grupos apresentaram evidências de *A. fumigatus* possuir um teleomorfo através de recombinação de fluxo gênico em estudos de populações, pela presença de genes do tipo *mating* e de outros relacionados à reprodução sexuada (Varga e Tóth, 2003; Dyer e Paoletti, 2005; Paoletti *et al.*, 2005; Nierman *et al.*, 2005).

Quanto ao aspecto macroscópico do *A. fumigatus*, podem-se observar colônias inicialmente brancas na fase de maturação que se tornam verde-escuras ou cinzas. A textura da colônia é algodoadada, tornando-se pulverulenta com a produção dos conídios (Larone, 2002). Esses, por sua vez, são dispersos pelas correntes de ar. Desta forma, conídios do *A.*

fumigatus estão presentes no solo e em fragmentos orgânicos, sendo que já foram isolados de tinta fresca, lentes de contato, poeira de construção, aterros sanitários, sistemas de ventilação, etc. (Rippon, 1988).

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico, ubíquo e termotolerante, suportando temperaturas de até 70°C. Seus conídios são facilmente aerossolizados devido ao seu pequeno tamanho, entre 2-3 µm, e sua alta hidrofobicidade. Desta forma, mantêm-se viáveis por longos períodos, sendo constantemente inalados pelo homem e outros animais. Estes conídios podem germinar dando origem ao micélio, que é formado por um conjunto de hifas septadas (Chazalet *et al.*, 1998; Hospenthal *et al.*, 1998; Latgé, 1999).

Aproximadamente 175 espécies de *Aspergillus spp.* são conhecidas, mas apenas 20 são capazes de causar no homem um grupo de doenças denominado, de forma geral, como aspergilose. A principal via de infecção dos fungos do gênero *Aspergillus* é através da inalação de conídios; entretanto, existem casos de colonização da pele e olho por inoculação traumática, gerando infecções localizadas não-invasivas (Levitz, 1989; Denning, 1998; Larone, 2002; Hope *et al.*, 2005).

1.2 -Aspergilose

O *A. fumigatus* é o principal agente etiológico da aspergilose em humanos, sendo a espécie responsável por cerca de 90% dos casos da doença. Há uma gama de processos envolvidos na patogênese e/ou nas diferentes manifestações clínicas que incluem: (1) toxicidade por micotoxinas devido à ingestão de comida contaminada; (2) alergia e seqüela devido à presença dos conídios ou crescimento transiente do microorganismo em cavidades do corpo; (3) colonização sem invasão em cavidades pré-existentes e tecidos debilitados (exemplo: seqüelas da tuberculose); (4) doença invasiva, inflamatória, granulomatosa e necrosante dos pulmões e outros órgãos; (5) doença disseminada e sistêmica (Rippon, 1988; Denning, 1998).

A aspergilose pode ser nomeada como uma “doença do progresso da medicina”, por ser uma micose oportunista decorrente do uso de agentes quimioterápicos e esteróides. O aumento das terapias imunossupressoras levou a um aumento, nas últimas décadas, dos casos de aspergilose invasiva. As micoses sistêmicas causadas por *A. fumigatus* ocupam o segundo lugar em número de casos registrados, ficando atrás apenas da candidíase (Maschmeyer *et al.*, 2007).

A inalação dos conídios do *A. fumigatus* por indivíduos hígidos raramente leva ao desenvolvimento de alguma forma de aspergilose, já que nestes indivíduos as células do sistema imune inato eliminam o fungo do organismo. Os macrófagos alveolares eliminam os conídios, enquanto as células polimorfonucleares (PMN) eliminam as hifas. No caso de tratamento prolongado com esteróides e outros imunossupressores, a função de fagocitose dos macrófagos está inibida e ocorre neutropenia profunda e prolongada, permitindo que os conídios germinem após serem inalados (Shaffner *et al.*, 1982).

A maioria das infecções em humanos pode ser separada em três principais categorias: aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergiloma e aspergilose invasiva (AI) (Hogan *et al.*, 1996). Cada forma clínica será apresentada a seguir.

1.2.1 - Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA)

A aspergilose broncopulmonar alérgica é uma doença imunológica dos pulmões induzida por alérgenos e caracterizada pelo aumento da resposta imune mediada por IgE e IgG, aumento da eosinofilia no sangue periférico e por infiltrados pulmonares recorrentes (Agarwal, 2009; Riscili e Wood, 2009). A resposta imune é do tipo humoral e celular, com a participação de células T e de seus produtos (Kurup, 2005).

A ABPA deve ser diagnosticada antes que ocorra bronquiectasia, ou seja, uma distorção irreversível dos brônquios, pois, após este evento o prognóstico do paciente piora significativamente (Agarwal, 2009). O diagnóstico é sorológico, radiográfico, clínico e laboratorial. Nas lâminas preparadas com o escarro dos pacientes com ABPA é possível observar algumas vezes corpos de frutificação e conídios (Rippon, 1988).

A incidência da ABPA é de cerca de 1-2% em pacientes com asma e entre 2-15% naqueles com fibrose cística (Greenberger, 2003). Além destas condições, é preciso que o indivíduo possua alguns fatores de risco que estão relacionados à predisposição genética a mutações no gene CFTR e a polimorfismos nas proteínas surfactantes (Agarwal, 2009).

1.2.2- Aspergiloma

Esta condição, também nomeada de “bola fúngica”, pode resultar de aspergilose alérgica crônica, sendo que neste caso a “bola” se forma no interior dos brônquios ectásicos.

O aspergiloma frequentemente é formado no interior de cavidades pré-existentes no pulmão de indivíduos que desenvolveram tuberculose. Estas cavidades podem, entretanto, estar associadas a outras condições como sarcoidose, histoplasmose e adenocarcinoma. O único sintoma clínico é a ocorrência de hemoptise em até 90% dos casos (Hope *et al.*, 2005). Em raros casos, o aspergiloma se forma em áreas distintas do pulmão, como nos seios nasais, bexiga urinária e até dutos biliares. A “bola fúngica”, independente do sítio, consiste em um aglomerado de hifas, muco e fragmentos celulares cercado por uma parede fibrosa espessa e contida numa cavidade (Rippon, 1988; Hope *et al.*, 2005).

Curiosamente, se o paciente é virado durante o exame de tomografia computadorizada (*CT scan*), o aspergiloma tende a se mover, porque frequentemente encontra-se solto dentro da cavidade (Denning, 2001).

1.2.3- Aspergilose invasiva (AI)

É a forma clínica mais grave da aspergilose, com alta taxa de mortalidade, tendo como grupos de risco pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos (0,7-15%), de medula óssea (~26%) ou de células tronco hematopoéticas (~30%), portadores de leucemias agudas (24%) e pacientes submetidos a tratamento com drogas citotóxicas. Recentemente, foi relatado um aumento no número de pacientes internados em UTIs, com ausência de malignidade hematológica, apresentando quadro de AI com uma taxa de mortalidade excedendo os 80%. Dentre estes pacientes de UTI, destacam-se aqueles com queimaduras graves (Maschmeyer *et al.*, 2007).

Na aspergilose invasiva o principal órgão afetado é o pulmão, sendo cerca de 60% dos casos relativos à aspergilose pulmonar invasiva (API). Aproximadamente 20% dos casos são disseminados e em 15% os sítios de infecção estão distribuídos entre pele, seios paranasais e sistema nervoso central (SNC) (Patterson *et al.*, 2000).

Um diagnóstico rápido e acurado da aspergilose é crítico para administração da terapia antifúngica apropriada que resulta em destruição do fungo, seguida de cura para o paciente. O diagnóstico tardio está relacionado a uma mortalidade superior a 65%, sendo em geral realizado *post-mortem*. Em comparação, em pacientes com diagnóstico precoce a taxa de mortalidade é de 29%. Quando o paciente sobrevive após terapia antifúngica, a AI leva a complicações consideráveis que dificultam o uso de terapias antineoplásicas futuras, caso necessárias (Denning, 1996; Denning, 1998).

A profilaxia usando agentes antifúngicos continua sendo a estratégia de prevenção mais promissora contra AI, pois o diagnóstico precoce ainda é um desafio para a ciência. A terapia antifúngica ainda hoje apresenta baixa eficácia com reflexo na taxa de mortalidade. Os antifúngicos indicados atualmente para o tratamento da AI incluem poliênicos como a anfotericina B, que atuam na membrana plasmática, ou azólicos, como o voriconazol, que inibem a síntese do ergosterol (Maertens *et al.*, 2004). As formas prevalentes da aspergilose invasiva estão descritas a seguir.

Aspergilose pulmonar invasiva (API)

Esta forma envolve complicações quando a infecção se espalha para sítios contínuos, como o espaço pleural, o pericárdio, parede peitoral, esôfago e artérias (Hope *et al.*, 2005). Seu desenvolvimento depende da quantidade de fungos inoculados, da capacidade imune do hospedeiro e da virulência do microorganismo em si. A neutropenia é um dos maiores fatores de risco no caso específico da API (Fraser, 1993; Hope *et al.*, 2005).

A API pode ser subdividida em dois grupos. O primeiro possui a forma angioinvasiva da doença, caracterizada por infarto tecidual e necrose coagulativa. Está basicamente restrita a indivíduos com um quadro de neutropenia profunda e prolongada. A progressão da doença é rápida e não há sintomas clínicos específicos. Os afetados podem, entretanto, exibir um estado febril, dispnéia, hemoptise e dor peitoral. No segundo grupo, a API é caracterizada por um infiltrado inflamatório piogranulomatoso e necrose inflamatória, sendo observada em pacientes não-neutropênicos expostos a tratamentos com corticosteroides, em não-neutropênicos submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas e naqueles com um quadro severo de doença de reação aguda do enxerto contra o hospedeiro (*GVHD*), além de HIV positivos. A progressão é mais lenta que na forma angioinvasiva (Young *et al.*, 1970; Denning, 1998; Hope *et al.*, 2005).

A avaliação radiológica do pulmão continua sendo o método de diagnóstico mais usado para API. A tomografia computadorizada de alta resolução (*HRCT*) da cavidade peitoral, realizada sistemática e periodicamente, constitui um método sensível de diagnóstico precoce para o grupo de risco hematológico (Thomas *et al.*, 2003).

AI disseminada

É considerada quando há a demonstração de *Aspergillus* spp. em pelo menos duas áreas não-contínuas, supondo que a infecção endovascular ou da corrente sanguínea é implícita nesta patologia. O diagnóstico para este tipo pode ser provado ou provável. O diagnóstico provado requer exame citopatológico e histopatológico, onde se podem observar hifas em um material aspirado por seringa ou em espécimens de biópsia, com a presença de danos teciduais associados, outra prova é uma cultura positiva de amostra obtida de forma estéril a partir de um sítio consistente com a infecção, incluindo urina e mucosas. O diagnóstico provável é realizado em pacientes de risco onde não se podem realizar procedimentos invasivos, algumas vezes necessários para o diagnóstico provado. O provável é aceito quando o paciente apresenta três critérios: um fator do hospedeiro (neutropenia, febre resistente a antibióticos por mais de 8 dias, tratamento com esteróides), um critério microbiológico (cultura positiva, presença de antígenos, detecção em microscopia) e um critério clínico (infecção do trato respiratório inferior, seios nasais ou SNC) (Hope *et al.*, 2005; Maschmeyer *et al.*, 2007).

Sinusite aguda invasiva

Doença de progressão rápida que ocorre principalmente em pacientes neutropênicos e naqueles submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (Hope *et al.*, 2005). Ela se desenvolve com a inalação e deposição de conídios nas passagens e seios nasais. A infecção é seguida de pansinusite destrutiva, espalhamento para estruturas adjacentes como a órbita, osso frontal, seio cavernoso, artéria carótida e fossa cranial média e anterior [Breen *et al.*, 1993; Adler *et al.*, 1997; deShazo *et al.*, 1997(I)]. Os sintomas incluem dor facial, congestão nasal, coriza, úlceras nasais e a presença de uma cicatriz inestética necrótica (quelóide) no nariz ou no palato [deShazo *et al.*, 1997 (II); deShazo *et al.*, 1998].

Aspergilose do sistema nervoso central

A infecção pode ocorrer por disseminação hematogênica, inoculação direta durante neurocirurgia ou disseminação de áreas contíguas como os seios faciais. Na forma cerebrovascular, ocorre infarto tecidual e necrose e/ou hemorragia resultantes de invasão

vascular e trombose. É mais comum em pacientes que realizaram transplante alogênico de células tronco hematopoéticas e naqueles que sofreram transplante de órgãos sólidos. O abscesso cerebral é outra forma de aspergilose no SNC, e consiste numa área de necrose liquefativa onde os elementos de hifa estão dispersos ou ausentes, Esta área é cercada por outra de necrose hemorrágica com um infiltrado contendo muitos elementos de hifa. Não há sintomas ou sinais clínicos específicos para este caso; os pacientes que a desenvolvem são transplantados de órgãos sólidos, com DGC ou HIV positivos (Hope *et al.*, 2005).

1.3 – Fatores de virulência

Segundo o postulado de Koch, só poderão ser considerados fatores de virulência legítimos moléculas que sejam originadas de genes de virulência encontrados exclusivamente em microorganismos patogênicos. Estes genes estarão inativos ou inexistentes em organismos não patogênicos. A perda funcional destes genes resultará na formação de organismos avirulentos. Se reintroduzidos, estes genes resultarão na recuperação da virulência e devem estar expressos no curso da infecção (Falkow, 1988).

Segundo Casadevall e Pirofski (1999), uma doença infecciosa decorre do que eles denominam “damage-framework response”, onde fatores do hospedeiro e/ou do patógeno determinam a evolução da infecção para a não eliminação do microrganismo e o estabelecimento da doença, ou seja, dano ao hospedeiro. Portanto, vários fatores, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, contribuem para o estabelecimento e agravamento das infecções fúngicas, levando à invasão dos órgãos e tecidos do hospedeiro. Os fatores de virulência do patógeno auxiliam na adesão, colonização, disseminação e imunomodulação, ou seja, na habilidade do fungo em escapar dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 1999).

Diversos fatores de virulência já foram descritos para fungos patogênicos como o *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *A. fumigatus* (Gale *et al.*, 1998; Kauffman, 1999; Latge, 1999; Finkel-Jimenez *et al.*, 2001; Idnurm *et al.*, 2005). Um destes fatores é a termotolerância que garante a infecção de muitos mamíferos pela capacidade de multiplicação do fungo em temperaturas mais elevadas (37°C) (Kobayashi, 2003). A resistência a altas temperaturas foi relacionada com a expressão de

determinadas proteínas, conhecidas como *heat-shock* (Kauffman, 1990).

Um dos eventos centrais no estabelecimento de uma infecção é a adesão do microrganismo ao(s) tecido(s) do hospedeiro. Neste sentido, cada vez mais a adesão endotelial e os eventos decorrentes desta interação (produção de citocinas, processo inflamatório e expressão de moléculas de adesão) vêm sendo estudados em infecções fúngicas causadas por fungos angioinvasivos (Filler e Sheppard, 2006). Sabe-se, por exemplo, que os conídios do *A. fumigatus* aderem especificamente à laminina e ao fibrinogênio. A aderência a estas proteínas matriciais está relacionada com componentes presentes na camada externa da célula conidial. A capacidade de interação decresce progressivamente com a germinação (Annaix *et al.*, 1992; Larcher *et al.*, 1992; Tronchin *et al.*, 1993; Coulot *et al.*, 1994).

Embora o *A. fumigatus* seja um fungo angioinvasivo, muito pouco é conhecido sobre a sua interação com células endoteliais (Lopes Bezerra e Filler, 2003).

O caráter angioinvasivo de *A. fumigatus* foi observado em modelos *in vivo* e *in vitro*. Análise histopatológica de camundongos imunossuprimidos, infectados com conídios de *A. fumigatus*, demonstra a presença de hifas invadindo a parede dos vasos sanguíneos pulmonares após cinco dias de infecção (Sheppard *et al.*, 2004). O primeiro modelo de estudo da interação de hifas de *A. fumigatus* com células endoteliais (HUVECs) foi descrito por Lopes-Bezerra e Filler (2004), sendo observada a capacidade de hifas de *A. fumigatus* invadirem as células endoteliais causando injúria endotelial e ativação celular, com consequente expressão de fator tecidual (CD142). Os conídios viáveis ou inviáveis não ativaram as células endoteliais a um fenótipo protrombótico, enquanto a hifa, nas duas condições, estimulou significativamente a expressão na superfície endotelial de CD142. Os autores sugerem que este pode ser um mecanismo utilizado pelo patógeno para invadir os vasos sanguíneos e induzir a trombose vascular observada nos pacientes com aspergilose invasiva. Além disso, foi demonstrado que os conídios inviáveis não causaram injúria nas células endoteliais. Os tubos germinativos (TGs) do *A. fumigatus* induziram danos estando viáveis ou não, sugerindo que estas células danifiquem a monocamada endotelial por mecanismos alternativos: provavelmente os TGs expressam na superfície um fator responsável por esta injúria.

A habilidade de fungos em invadir tecidos subcutâneos pode estar relacionada com a secreção de proteinases no sítio da infecção. Proteinases exercem papel fundamental na patogênese fúngica, participando do processo de nutrição, diferenciação, adesão, penetração, proliferação, sobrevivência intracelular e escape (Munro e Hube, 2002). Em *C. albicans*, as aspartil-proteases secretadas (SAPs) são importantes fatores de virulência e participam

ativamente na causa de danos teciduais em um modelo de candidíase oral (Schaller *et al.*, 1999; Munro e Hube, 2002). *C. albicans* também expressa uma metalopeptidase capaz de degradar proteínas constitutivas da matriz extracelular da célula hospedeira, tais como colágenos I e IV, laminina e fibronectina. Além disso, esta metalopeptidase é capaz de degradar proteínas do soro humano como IgG, albumina e Hgb (Rodier *et al.*, 1999; dos Santos *et al.*, 2006). Para outros fungos esse tipo de atividade também já foi descrito. Serino-proteinases do *C. neoformans* são capazes de clivar fibronectina humana e peptidases extracelulares em *Fonsecaea pedrosoi* são capazes de clivar fibronectina, laminina, albumina e IgG (Rodrigues *et al.*, 2003; Palmeira *et al.*, 2006).

O tecido pulmonar é constituído de cerca de 30% de elastina, e há evidências de elastase envolvida na patogênese da aspergilose. Em 1984, Kothary e colaboradores encontraram elastase em 71 das 75 cepas ambientais de *A. fumigatus*. As cepas negativas para elastase foram testadas em modelos murinos de API e foram consideradas menos virulentas quando comparadas às positivas. Entretanto, esta atividade proteolítica não é regra em todos os casos descritos de API. Denning e colaboradores, em 1992, demonstraram ausência desta atividade em blocos de tecido pulmonar retirados de nove pacientes com API.

Dois tipos de elastase são produzidos pelo *A. fumigatus*: uma metaloprotease e uma serino-protease, ambas já sequenciadas e clonadas (Manod *et al.*, 1993; Markaryan *et al.*, 1994; Sirakova *et al.*, 1994). Já foi demonstrado que cepas mutantes com gene não funcional para a serino protease (alcalina), não apresentaram diferenças significativas quanto à virulência quando comparadas às cepas parentais (Manod *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1993). A metaloprotease ainda não foi extensivamente estudada como fator de virulência.

As proteases produzidas pelo *A. fumigatus* degradam fibrinogênio e laminina, componentes da lâmina basal, sendo que a serino-protease de 33 kDa é a principal responsável pela degradação do fibrinogênio (Larcher *et al.*, 1992; Tronchin *et al.*, 1993). O *A. fumigatus* também possui uma protease (ácida) aspártica e sua secreção *in vivo* foi demonstrada por imunofluorescência no pulmão de um paciente com API (Reichard *et al.*, 1994).

Além disso, as proteases do *A. fumigatus* já foram descritas: (a) promovendo indução de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e em células epiteliais alveolares; (b) realizando modificação dos microfilamentos de actina do citoesqueleto das células epiteliais alveolares, levando à morte celular num processo dependente de proteases; (c) sendo secretadas *in vivo* pelo micélio, em pacientes e camundongos, conforme já demonstrado com o uso de anti-soro protease específico; (d) no caso da elastase, cepas mutantes de *A. fumigatus*

para esta protease se mostraram menos virulentas; (e) quando infectados via intratraqueal com a protease ALP1 purificada, camundongos apresentaram um significativo grau de destruição do trato respiratório inferior (Kolattukudy *et al.*, 1993; Tomee *et al.*, 1997; Iadarola *et al.*, 1998; Kauffman *et al.*, 2000; Monod *et al.*, 2002; Kogan *et al.*, 2004).

Como não é tecnicamente viável deletar mais do que alguns poucos genes para proteases, Sharon e colaboradores, em 2009, estudaram uma cepa mutante para o fator de transcrição PrtT. Este fator controla a expressão de seis proteases secretadas pelo *A. fumigatus*, incluindo ALP (serino-protease alcalina) e MEP (metaloprotease), e o mutante apresentou um declínio acentuado da expressão destas proteases. Tendo em vista este resultado, o grupo analisou a cepa mutante $\Delta prtT$ e uma selvagem (AF293) quanto à virulência. O resultado das análises demonstrou, pela primeira vez na literatura, uma correlação entre atividade proteolítica e hemólise: o filtrado de cultura derivado da cepa mutante provocou apenas uma atividade hemolítica residual e o filtrado de cultura derivado da cepa selvagem, quando tratado com inibidores de protease, teve uma significativa redução de sua atividade hemolítica. Porém, quando camundongos imunossuprimidos foram infectados com a mutante $\Delta prtT$, não foi constatada diminuição na virulência da cepa quando comparada à cepa selvagem, levando em consideração a curva de mortalidade. Entretanto, em 2011, Sharon e colaboradores demonstram que as proteínas reguladas pelo fator PrtT, quando secretadas pelo *A. fumigatus*, são capazes de ativar a via de sinalização MAPK em células de epitélio alveolar A549, levando estas células à morte por necrose. Portanto, devido à provável importância das proteases secretadas para a virulência em *A. fumigatus*, a caracterização do secretoma deste fungo também foi alvo de análise durante a composição da presente tese.

O *A. fumigatus* produz catalase, responsável pela degradação de H₂O₂ em água e oxigênio. A forte associação de aspergilose com doença granulomatosa crônica (DGC) mostra uma evidência indireta de que a catalase seria um fator de virulência (Cohen *et al.*, 1981). Os neutrófilos de pacientes com DGC são incapazes de efetuar um *burst* respiratório eficiente, deixando-os mais suscetíveis a contrair infecções causadas por microorganismos positivos para catalase (Dinauer, 1993; Roos, 1994). Quando o microorganismo é negativo para catalase, os neutrófilos dos pacientes com DGC conseguem utilizar a H₂O₂ produzida pelo microorganismo e, assim, contornar o problema de sua produção deficiente de peróxido de hidrogênio. Como os microorganismos positivos para catalase degradam a H₂O₂ produzida, eles privam os fagócitos de sua H₂O₂ endógena (Hogan *et al.*, 1996).

Em *A. fumigatus*, a melanina dihidroxinaftaleno, encontrada na parede celular do conídio, desempenha um papel importante na patogenicidade e já foi reconhecida como fator

de virulência (Tsai *et al.*, 1999; Langfelder *et al.*, 2003). Este pigmento hidrofóbico funciona como quelante de espécies reativas de oxigênio, protegendo o patógeno contra o estresse oxidativo causado pelas células do sistema imune inato. Além disso, este fungo, como outros microorganismos patogênicos, expressa uma rede de oxidoredutases para neutralizar intermediários reativos de oxigênio produzidos por fagócitos (Jahn *et al.*, 2000; Tekaia e Latgé, 2005).

A presença de bombas de efluxo na superfície da célula fúngica é importante para fornecer resistência a moléculas tóxicas que entram de forma passiva na célula. Mais de 40 bombas pertencentes à superfamília de transportadores ABC (*ATP Binding Cassetes*) são produzidas pelo *A. fumigatus*, o que equivale a mais que o dobro de homólogos produzidos por leveduras. O grande número de transportadores que este fungo possui pode ser devido ao seu nicho ecológico natural, onde plantas e microorganismos presentes nos solos podem secretar uma grande quantidade de compostos tóxicos (Sanglard, 2002; Lage, 2003; Tekaia e Latgé, 2005).

O *A. fumigatus* é produtor de gliotoxina, um metabólito com propriedades imunossupressoras. Ela inibe a fagocitose por macrófagos e a ativação de células T (Eichner *et al.*, 1986; Sutton *et al.*, 1994). Além disso, induz fragmentação de ácido desoxirribonucleico (ADN) e apoptose em macrófagos por mecanismos distintos de suas propriedades antifagocíticas (Braithwaite *et al.*, 1987; Waring *et al.*, 1988; Waring, 1990).

Além da gliotoxina, o *A. fumigatus* produz uma citotoxina de 18 kDa que atua clivando uma ponte de fosfodiéster presente na subunidade 28S RNAr de ribossomos eucarióticos. A literatura se refere a esta nuclease como restrictocina, antígeno 18-kDa e Aspfl. A restrictocina é produzida *in vivo*, conforme demonstrado por sua detecção na urina de pacientes com AI e em regiões de necrose em torno das colônias do fungo em camundongos infectados. Além disso, a restrictocina parece ser um antígeno principal que se liga à IgE em pacientes alérgicos e à IgG naqueles com aspergiloma (Latge *et al.*, 1991; Arruda *et al.*, 1992; Paris *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993).

1.4 – Parede celular de fungos

A parede celular é a camada mais externa da célula fúngica. É o elo da célula com o meio onde ela se encontra, possui várias funções como a de dar proteção, forma e resistência à célula fúngica, ajudando na resistência à pressão de turgor. Com essa definição, a parede celular dos fungos parece ser estática; entretanto, trata-se de uma estrutura dinâmica cuja biogênese acompanha o crescimento da célula. Além disso, componentes da parede celular participam dos processos de interação entre o parasito e o hospedeiro, reconhecimento antigênico, transição morfológica, entre outros [Klis *et al.*, 2001; Sundstrom, 2002; Pitarch *et al.*, 2003a; Klis *et al.*, 2007(I)].

Estudos utilizando microscopia revelaram que esta estrutura é composta por diversas camadas que podem ser distinguidas por elétron-densidade conforme mostrado na Figura 1. Os modelos de parede celular de fungos baseiam-se fundamentalmente nos estudos com *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* (Chaffin *et al.*, 1998; Smits *et al.*, 1999, De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006 Ruiz-Herrera *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 2006). A parede de *S. cerevisiae* corresponde a cerca de 10-25 % do total de massa celular, e, portanto, representa um investimento metabólico substancial para a célula. A parede celular é formada por três grupos principais de polissacarídeos: polímeros de manose (manoproteínas, \cong 40 % do peso seco de parede celular), polímeros de glicose (β -glucanas, \cong 60 % do peso seco da parede celular) e polímeros de N-acetilglicosamina (quitina, \cong 2 % do peso seco da parede celular) (Aguilar-Uscanga e François, 2003). As β -glucanas se dividem em dois subtipos de acordo com o tipo de ligação de glicose: cadeias longas de β -1,3-glucanas que representam 85 % do total, e cadeias curtas de β -1,6-glucanas (Klis *et al.*, 2002; Klis *et al.*, 2006). No entanto, β -1,4 glucanas também estão presentes na parede celular de algumas espécies, como é o caso de *A. fumigatus* (Bernard e Latgé, 2001).

As moléculas de β -1,3-glucana estão associadas localmente por meio de pontes de hidrogênio, resultando na formação de uma rede tridimensional contínua. Esta rede é altamente elástica e extensa sob condições osmóticas normais. Sob condições hipertônicas ela se retrai em até 60%, sendo esta retração totalmente reversível. Na face externa da rede de β -1,3-glucana, cadeias altamente ramificadas (polares) de β -1,6-glucana são encontradas e podem estar ligadas a manoproteínas GPI-modificadas. No interior da rede de β -1,3-glucana,

estão ligadas cadeias de quitina. Porém, quitina também pode estar ligada à β -1,6-glucana em resposta a condições de estresse na parede celular (Klis *et al.*, 2006).

A parte mais externa é composta principalmente de proteínas ou glicoproteínas ligadas à malha de β -glucanas (figura 2). As proteínas GPI-ancoradas são descritas como proteínas estruturais da parede celular (CWPs) que estão covalentemente ligadas às glucanas por um resquício de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). As Pir-CWPs são proteínas com repetições internas, ligadas à β -1-3-glucanas. As CWPs sofrem modificações pós-traducionais durante a secreção, sendo altamente manosiladas (De Groot *et al.*, 2004; Weig *et al.*, 2004).

Quantitativamente, as GPI-CWP respondem por cerca de 88 % das proteínas covalentemente ligadas à parede. Elas se ligam às β -1,6-glucanas que, por sua vez, estão

ligadas à rede de β -1,3-glucanas (90 %) ou à quitina (10 %) (Marcilla *et al.*, 1991; Smits *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2002).

Além das GPI-CWPs, existe um grupo menor de proteínas que está ligado diretamente às β -1,3-glucanas através de uma ligação ainda não identificada e sensível a tratamento alcalino moderado. Essas proteínas são denominadas de ASL (ligação alcalino-sensível)-CWP, e incluem a família das Pir-CWP (De Groot *et al.*, 2005). Entretanto, algumas Pir-CWPs estão retidas na parede exclusivamente por pontes dissulfeto e podem ser liberadas pelo uso de agentes redutores (Toh-e *et al.*, 1993; Castillo *et al.*, 2003).

As GPI-CWPs possuem vários atributos. Estão envolvidas na biossíntese e remodelamento da parede celular, determinação antigênica e hidrofobicidade de superfície, podendo desempenhar importante papel na adesão e virulência (Hoyer, 2001; Klis *et al.*, 2001; Sundstrom, 2002).

A parede celular dos fungos também é composta por peptídeo-polissacarídeos e glicoproteínas que se localizam mais externamente e, por isso, parecem ter um papel relevante na interação parasita-hospedeiro (Klis *et al.*, 2002). Verifica-se ainda, na parede celular dos fungos, a presença de pequenas quantidades de proteínas livres (6 a 25%) e de lipídios (1 a 7%). Estes últimos apresentam-se na forma de triglicerídios, esteróides, fosfolipídios e glicolipídios (Chaffin *et al.*, 1998; Lipke e Ovalle, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000).

A expressão de proteínas na parede celular é altamente regulada por diversos fatores. O ciclo celular, as condições de cultivo, a disponibilidade de nutrientes, a esporulação e possíveis condições de estresse podem afetar a biossíntese dessas moléculas (Smits *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2001).

A parede celular pode variar em espessura e composição dependendo do meio de cultura, temperatura de crescimento, pH externo e do nível de oxigênio (Klis *et al.*, 2006). Quando crescidas em um meio rico, por exemplo, o teor de β -glucanas em relação ao teor de mananas é maior do que quando a célula é cultivada em um meio sintético definido (Aguilar-Uscanga e François, 2003).

Foi descrita a presença de proteínas atípicas na parede celular (Pitarch *et al.*, 2002). Estas proteínas são reconhecidas, primariamente, como de origem citoplasmática e não possuem características de uma verdadeira proteína secretada (peptídeo sinal) (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

Em 2006, Nombela e colaboradores propuseram uma via de secreção não convencional de proteínas em leveduras. Neste trabalho, eles discutem que algumas proteínas de superfície com ausência de peptídeo sinal para secreção, as denominadas proteínas atípicas, podem chegar à parede celular e permanecer fracamente ligadas a esta estrutura. A identificação na parede celular de proteínas intracelulares sugere que elas poderiam ser proteínas multifuncionais. A existência destas proteínas atípicas na parede celular de fungos já foi demonstrada através de técnicas proteômicas (Angiolella *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2000; Angiolella *et al.*, 2002; Pitarch *et al.*, 2002; Crowe *et al.*, 2003). Algumas destas proteínas atípicas como enolase, actina e GAPDH foram localizadas na superfície celular de protozoários (Hernández-Romano *et al.*, 2011), bactérias (Alvarez *et al.*, 2003; Castaldo *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2009) e fungos (Barbosa *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2010) através de técnicas de microscopia.

A ligação entre proteínas de superfície não convencionais, identificadas através das técnicas proteômicas, com a virulência microbiana reforça o interesse no fenômeno da via alternativa de secreção. Em *C. albicans*, a identificação de proteínas ligantes à plasmina e plasminogênio na superfície revelou várias enzimas, como a enolase, e um fator de elongação transcricional (Crowe *et al.*, 2003; Jong *et al.*, 2003). A enolase de *C. albicans* também já foi descrita como uma importante proteína imunomoduladora quando presente na parede celular deste fungo (Pitarch *et al.*, 2006).

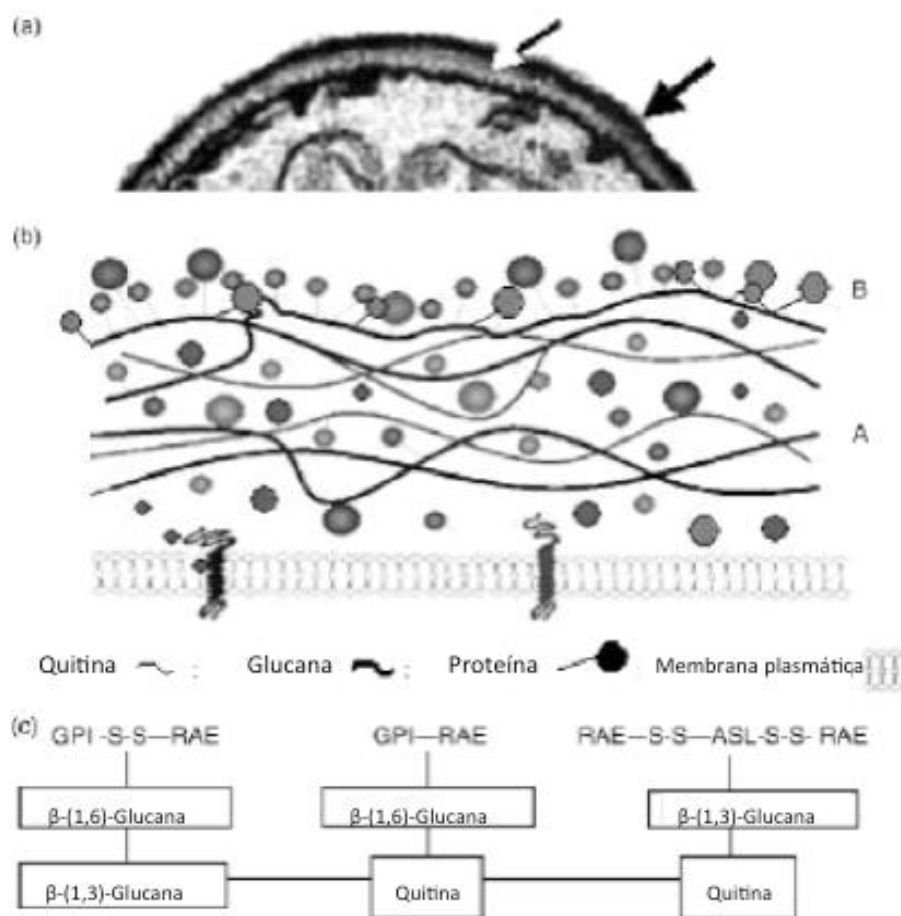


Figura 2. Estrutura e representação esquemática da arquitetura da parede celular de *C. albicans*. (a) Micrografia eletrônica de uma secção média celular. A camada da parede mais interna, elétron-transparente (seta preta e branca) é composta principalmente de polissacarídeos (β -glucanas e quitina) e de pequenas quantidades de proteínas. A camada mais externa, elétron-densa (seta negra), é constituída por diversos tipos de manoproteínas

(b) Esquema da parede celular. Cadeias de β -1,3/1,6 glucana estão conectadas através de ligações covalentes a microfibrilas de quitina e, junto com algumas proteínas, formam a composição básica (A). A superfície mais externa (B) é rica em diversos tipos de proteínas que se encontram associadas por meio de ligações covalentes ou não covalentes.

(c) Representação esquemática da organização molecular da parede celular. Proteínas da parede celular estão ligadas principalmente a cadeias curtas de β -1,6 glucana, a quitina via β -1,6 glucana, ou diretamente a quitina. GPI, proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol; ASL, proteínas conectadas através de ligações sensíveis a tratamentos alcalinos; RAE, proteínas ligadas por pontes de dissulfeto (adaptada de Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

Em 2008, Rodrigues e colaboradores demonstraram que as vesículas extracelulares de *C. neoformans* formam uma população heterogênea de “sacos de virulência”, com várias moléculas associadas à sobrevivência do fungo e patogenicidade no hospedeiro. Foram caracterizadas as proteínas presentes nestas vesículas sendo descritas chaperonas, superóxido dismutase, reguladores de tradução, antioxidantes e outras proteínas classicamente citosólicas. Algumas destas proteínas já foram descritas com função de virulência neste patógeno (Cox *et al.*, 2003; Moyrand e Janbon, 2004; Missall *et al.*, 2005; Missall e Lodge, 2005; Collopy-Junior *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2006).

Em 2008, Albuquerque e colaboradores descreveram o transporte extracelular vesicular de macromoléculas em *Histoplasma capsulatum*. Uma análise proteômica dessas vesículas revelou a presença de proteínas envolvidas em diversos processos como metabolismo, manutenção, sinalização e virulência. Uma análise de microscopia de transmissão eletrônica de sobrenadantes coletados de culturas de *C. albicans*, *Candida parapsilopsis*, *S. schenckii* e *S. cerevisiae* documentou que este tipo de vesículas é produzido de forma similar nestes organismos. As vesículas de *H. capsulatum* foram capazes de reagir com soro imune de pacientes com histoplasmose. Com isso, foi feita uma associação entre os produtos vesiculares e a patogênese. Esses achados endossam a proposta de que a secreção vesicular é um mecanismo geral em fungos para transporte de macromoléculas ligadas a virulência e, portanto, poderiam ser um alvo para novas alternativas terapêuticas (Casadevall *et al.*, 2009).

A presença de vesículas na parede celular fúngica explicaria a abundância de proteínas atípicas caracterizadas nesta organela. Estas vesículas funcionariam como “sacos de virulência”, onde as proteínas estariam relacionadas à patogênese (Nombela *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Nosanchuk *et al.*, 2008; Casadevall *et al.*, 2009).

1.5 – Parede Celular de *A. fumigatus*

A parede celular do *A. fumigatus* corresponde a 30% do peso seco celular e consiste principalmente de polissacarídeos (90%) ligados covalentemente para formar o arcabouço celular. Essa estrutura encontra-se coberta por glicoproteínas (Gastebois *et al.*, 2009).

Há diferenças estruturais na composição da parede celular de conídios e da fase filamentosa (hifa) do *A. fumigatus*. A parede conidial é pigmentada e apresenta uma superfície altamente hidrofóbica. Esta característica é conferida pela presença de melanina e de proteínas denominadas hidrofobinas (Benard e Latgé, 2001; Latgé, 2005). As hidrofobinas de classe I, com baixo peso molecular (10 a 20 kDa) estão organizadas na superfície dos conídios de *A. fumigatus* formando uma estrutura denominada de *rodlet* (Girardin *et al.*, 1999). Esta estrutura é característica dos conídios “dormentes”. As hidrofobinas podem estar envolvidas em várias funções, como adesão a células do hospedeiro, proteção contra agentes químicos, enzimáticos e células fagocíticas e, além disso, facilitam a dispersão dos conídios por correntes de ar (Dague *et al.*, 2008).

Em condições de crescimento adequadas, os conídios “dormentes” se diferenciam em hifas septadas, com aproximadamente 3-6 μm de diâmetro, apresentando crescimento bifurcado em ângulo de 45° (Momany e Taylor, 2000; Larone, 2002). Os conídios em crescimento perdem a camada de hidrofobina e melanina, apresentando α -(1,3)-glucana, galatosaminogalactana e proteínas N-glicosiladas na superfície. A apresentação de α -(1,3)-glucanas na camada mais externa da parede celular está associada à fase infectiva de *H. capsulatum* e *P. Brasiliensis* (Latgé, 2010).

Os principais componentes da parede celular do micélio do *A. fumigatus* são polissacarídeos subdivididos em dois grupos: a fração álcali-solúvel e a álcali-insolúvel. A fração álcali-insolúvel é responsável pela rigidez e forma celular e é composta principalmente por β (1,3)-glucana, galactomanana e quitina. Uma glucana linear β (1,3)/(1,4) também é componente da parede celular do *A. fumigatus*. A β (1,3)-glucana é um polímero ramificado com cerca de 4% destas ramificações em β (1,6)-glucana, formando a glucana ramificada β (1,3)/(1,6). Os resíduos terminais não-redutores de β (1,3)-glucana estão ligadas à quitina, galactomanana e a uma glucana linear β (1,3)/(1,4) (Bernard e Latgé, 2001). Sob condições especiais do ambiente, a camada mais externa da parede celular pode se expandir em uma matriz extracelular (MEC). Em *A. fumigatus*, esta MEC “cola” as hifas juntas em um tapete de colônias (Latgé, 2010).

Tanto no conídeo quanto no micélio, existem várias proteínas que transitam na estrutura da parede celular antes de serem secretadas para o espaço extracelular. A maioria destas proteínas estão ligadas de forma não covalente aos polissacarídeos da parede, pois estes possuem grande capacidade de realizar ligações não covalentes, do tipo iônica ou ponte de hidrogênio, com as proteínas que ficam retidas na rede de polissacarídeos. Estas proteínas não

possuem função estrutural e podem ser extraídas quimicamente, por tratamento com SDS-mercaptoetanol, por exemplo. Algumas destas proteínas têm função transglicolase ou fenoloxidase, capazes de modificar a estrutura da parede celular (Morelle *et al.* 2005; Mouyna *et al.*, 2005; Eisenman *et al.*, 2007; Latgé *et al.*, 2007; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009).

Poucas proteínas ligam-se covalentemente à parede celular do *A. fumigatus*, as quais precisam estar ligadas desta forma para permanecer na parede e realizar sua função, como as hidrofobinas, floculinas e adesinas clássicas. Essas proteínas são inicialmente ancoradas à membrana plasmática por uma âncora de GPI e, em seguida, se ligam covalentemente às glucanas (Klis *et al.*, 2001).

Em *A. fumigatus* não existem longas cadeias de N-manana, e as N-mananas e O-mananas existentes são frequentemente terminadas com resíduos de galactofuranose em sua porção não redutora. Estas mananas, neste fungo, estão ligadas covalentemente ao centro fibrilar de glucanas, ao contrário do que ocorre em leveduras (Leitão *et al.*, 2003; Morelle *et al.*, 2005; Latgé, 2010). Um esquema da parede celular do *A. fumigatus* está ilustrado na figura 3.

Muitas modificações ocorrem principalmente na camada mais externa da parede celular de acordo com o morfotipo, o ciclo celular e em resposta ao ambiente. As evidências relativas às alterações de superfície que ocorrem durante a morfogênese de *A. fumigatus* são baseadas em grande parte na análise morfológica, não havendo até o momento descrição precisa de quais componentes seriam expressos diferencialmente na superfície durante este processo. As primeiras evidências de alterações na superfície celular relacionadas à morfogênese foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (Rohde *et al.*, 2002), conforme ilustra a figura 4.

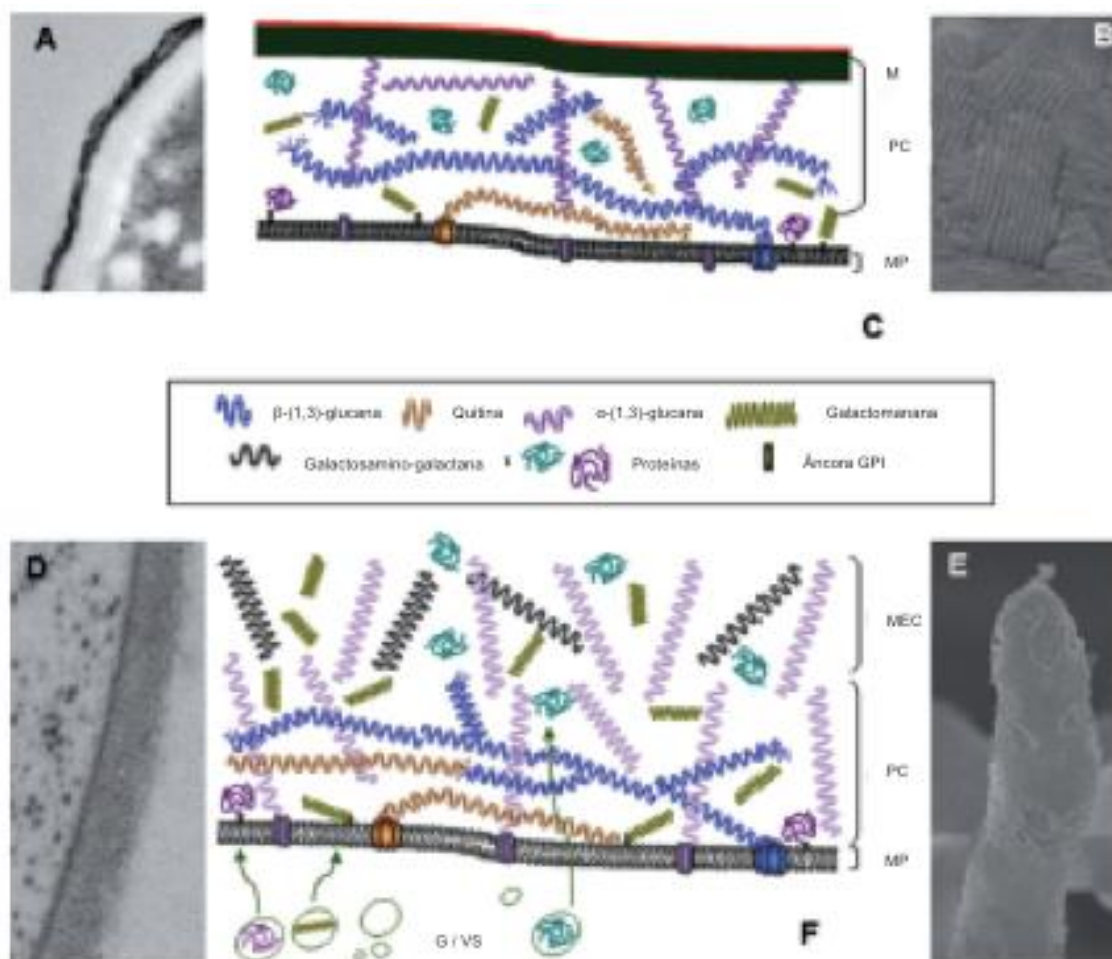


Figura 3. Parede celular de *A. fumigatus*. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de uma secção da parede celular do conídio mostrando a melanina, que é elétron densa, na face mais externa desta estrutura; (B) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando *rodlets* na superfície do conídio; (C) Esquema mostrando a suposta organização de polímeros na parede celular do conídio. Neste esquema, a camada amorfa composta de α -(1,3)-glucana liga a melanina à superfície celular do conídio; (D) MET mostrando a parede celular do micélio cultivado em meio líquido; (E) MEV mostrando o aparecimento de uma matriz extracelular (MEC) envolvendo a hifa cultivada em meio sólido (ausente em culturas de hifas em meio líquido); (F) Esquema da suposta organização dos polímeros da parede celular do micélio. Neste esquema, proteínas ancoradas à âncoras de GPI e alguns polissacarídeos como mananas são sintetizados intracelularmente e transportados para a parede celular pelo via Golgi/Vesículas secretoras. M = melanina; PC = parede celular; MP = membrana plasmática; G = golgi; VS = vesículas secretoras. (adaptada de Latgé, 2010)

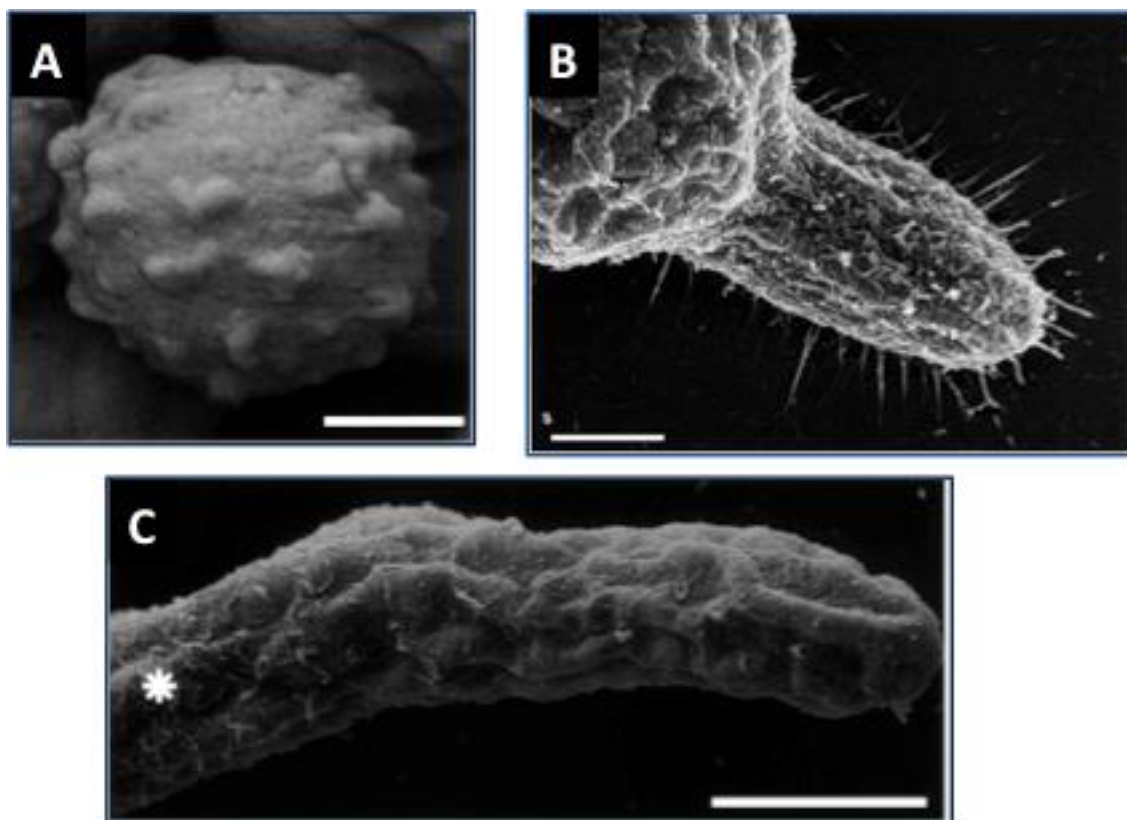


Figura 4. Morfotipos do *A. fumigatus* analisados por microscopia eletrônica de varredura. (A) Típica morfologia equinulada do conídio dormente (*rodlet*) ; (B) Apêndices filamentosos proeminentes são observados na superfície do tubo germinativo estendendo-se radialmente na forma de estruturas espiculares; (C) Extremidade de uma hifa madura, livre de apêndices. O asterisco mostra a região dos apêndices presentes somente no tubo germinativo. Barra representa 1 μ m (Adaptado de Rohde *et al.*, 2002).

2 - OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi utilizar uma abordagem proteômica para estudar proteínas de superfície e secretadas em *Aspergillus fumigatus* durante o processo de filamentação, na busca por possíveis fatores envolvidos na virulência do fungo e na sua interação com o hospedeiro.

2.1 - Objetivos específicos

1. Estabelecer protocolos de cultivo e isolamento dos diferentes morfotipos de *A. fumigatus* – diferentes estágios de filamentação e padronizar protocolo de extração de proteínas de superfície utilizando extração química com agente redutor (DTT).
2. Comparar os mapas 2D dos extratos de superfície celular de tubos germinativos (TG_{6h}) e hifas (H_{12h} e H_{72h}), utilizando a plataforma de eletroforese bidimensional clássica.
3. Identificar as proteínas diferencialmente expressas nos extratos de tubos germinativos e hifas de *A. fumigatus* utilizando a técnica de 2D-DIGE.
4. Realizar a análise do secretoma de *A. fumigatus*, utilizando a cepa selvagem AF293 como referência e uma cepa mutante $\Delta prtT$.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Preparação dos morfotipos do *Aspergillus fumigatus*

Colônias de micélio da cepa de *A. fumigatus* AF293 foram cultivadas em Sabouraud Agar (Difco) por sete dias a 37°C. Estas colônias foram lavadas com 50 mM de tampão fosfato 0,15M de NaCl, 0,01% de Tween 80, pH 7,4 (PBS-T) e a superfície da colônia foi raspada com o auxílio de um *cell scraper* para retirada dos conídios. A suspensão de conídios contendo fragmentos de hifa foi filtrada a vácuo em um sistema de filtração utilizando-se membrana de *nylon* do tipo Nitex 03-28/17 (Sefar, Switzerland). Os conídios assim separados foram sedimentados por centrifugação a 4000 x g por 5 min, a 4°C. A seguir, foram lavados duas vezes em 50 mM de PBS, pH 7,4, ressuspensos em 1 mL da mesma solução e contados em câmara de Neubauer. Quinhentos mililitros de Sabouraud (Difco) foram inoculados com 10⁷ conídios/mL sendo incubados em agitador rotatório a 150 rpm, a 37°C durante 6, 12 ou 72 horas para a obtenção de células do *A. fumigatus* em diferentes estágios de filamentação, conforme demonstrado na figura 5. As células nas diferentes fases foram monitoradas através de microscopia óptica.

3.2 - Obtenção do secretoma

A cepa selvagem AF293 e a mutante para o fator de transcrição PrtT, denominada $\Delta prtT$, foram crescidas em meio *Skim milk* [0,1% de glicose; 1% de leite desnatado (Difco); 0,1% de ácido casamino (Difco); 7 mM de KCl; 2 mM de MgSO₄; tampão 50 mM de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 5,3; 0,05% de Triton-X-100; suplementado com vitaminas e elementos traços], por 48 horas, na concentração de 10⁶ conídios/ml. As amostras foram então filtradas em membrana de poliéster (*Mira cloth*, Calbiochem, USA), e o filtrado de cultura (FC; secretoma) de cada amostra foi coletado para análises posteriores. Os extratos foram preparados pelo grupo do Dr. Osherov, Tel-Aviv University, sendo enviados como extratos liofilizados.

Estes extratos (secretoma) foram suspensos em água ultrapura (*Milli-Q Synthesis System*), precipitados em 10% TCA/Acetona e resuspensos inicialmente no tampão 30 mM de Tris, 4% de CHAPS, pH 8,0. A quantificação foi realizada pelo método BCA (Pierce, Rockford, Ill).

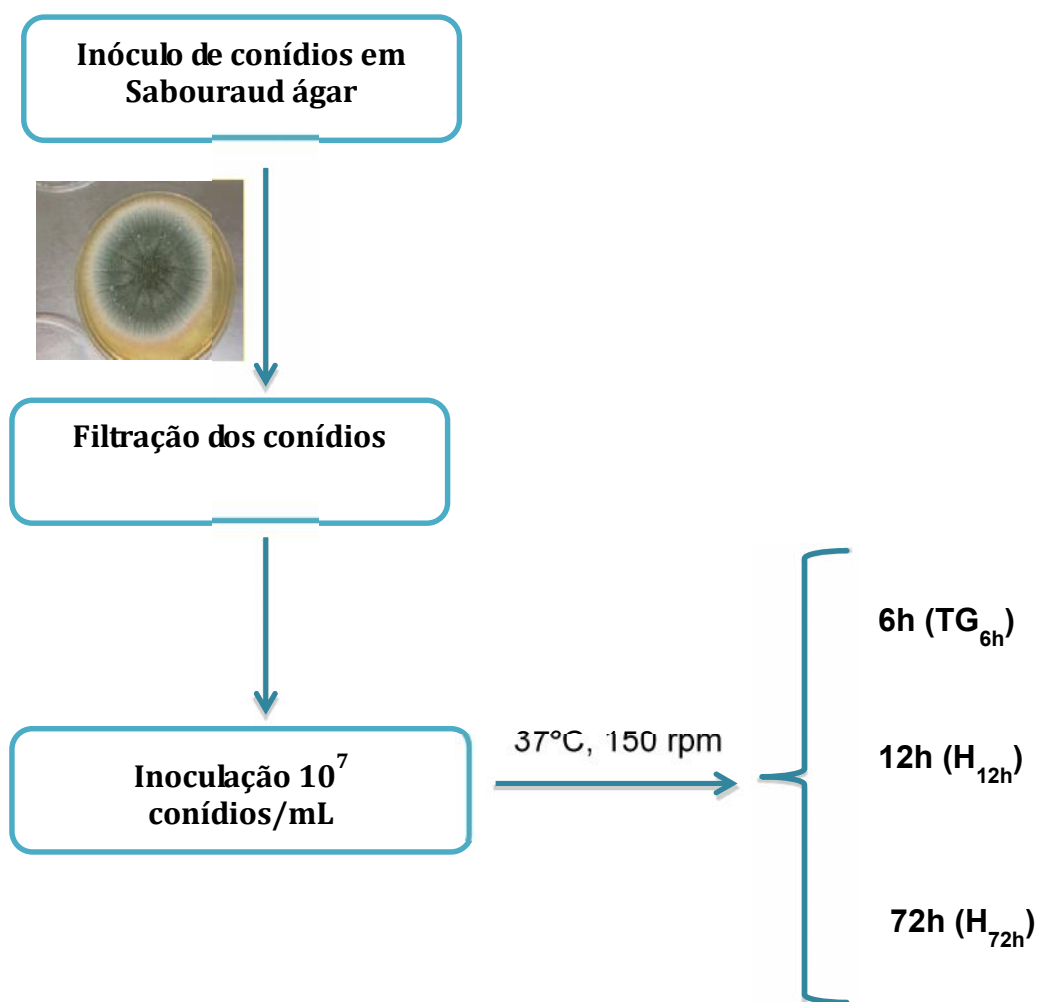


Figura 5. Esquema experimental da obtenção de células de *A. fumigatus*.

3.3- Obtenção dos extratos de superfície celular

Foi usado o método de extração química, a partir de células intactas descrito por Lopes-Ribot *et al.* (1996) e posteriormente validado por Klis *et al.* (2007). Os tubos germinativos de 6 horas e as hifas de 12 e 72 horas foram coletados por filtração a vácuo em funil de Büchner com membrana de *nylon* do tipo Sefar Nitex 03-28/17. As células retidas na membrana foram coletadas e lavadas três vezes em 25 mM de Tris-HCl, pH 8,5. Cada 0,7 g de células (peso úmido) foi ressuspensa em 5 mL de solução 25 mM de Tris-HCl, pH 8,5 contendo 2 mM de DTT 1 mM de PMSF e 5 mM de EDTA. Essa suspensão foi incubada durante 2 horas a 4°C sob agitação branda. As proteínas extraídas foram separadas por filtração no sistema descrito acima para separação das células fúngicas (não foi utilizada a centrifugação em decorrência da particular dificuldade de sedimentação de hifas deste fungo). A seguir, as amostras correspondentes aos extratos proteicos da superfície das células em diferenciação cultivadas por 6, 12 e 72 horas foram liofilizadas e estocadas em *freezer* -80°C e, as células correspondentes foram submetidas a ensaios de viabilidade celular (ilustrado na figura 6). Estes extratos foram suspensos em água ultrapura (Milli-Q Synthesis System), precipitados com 10% de TCA/Acetona e ressuspensas em tampão de reidratação (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% de CHAPS, traços de azul de bromofenol) para eletroforese bidimensional convencional ou no tampão de amostra para DIGE (30 mM de Tris, 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% de CHAPS). Posteriormente, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BIO-RAD, CA) ou pelo método do ácido bincinonínico (BCA, Thermo scientific,II), quando pertinente.

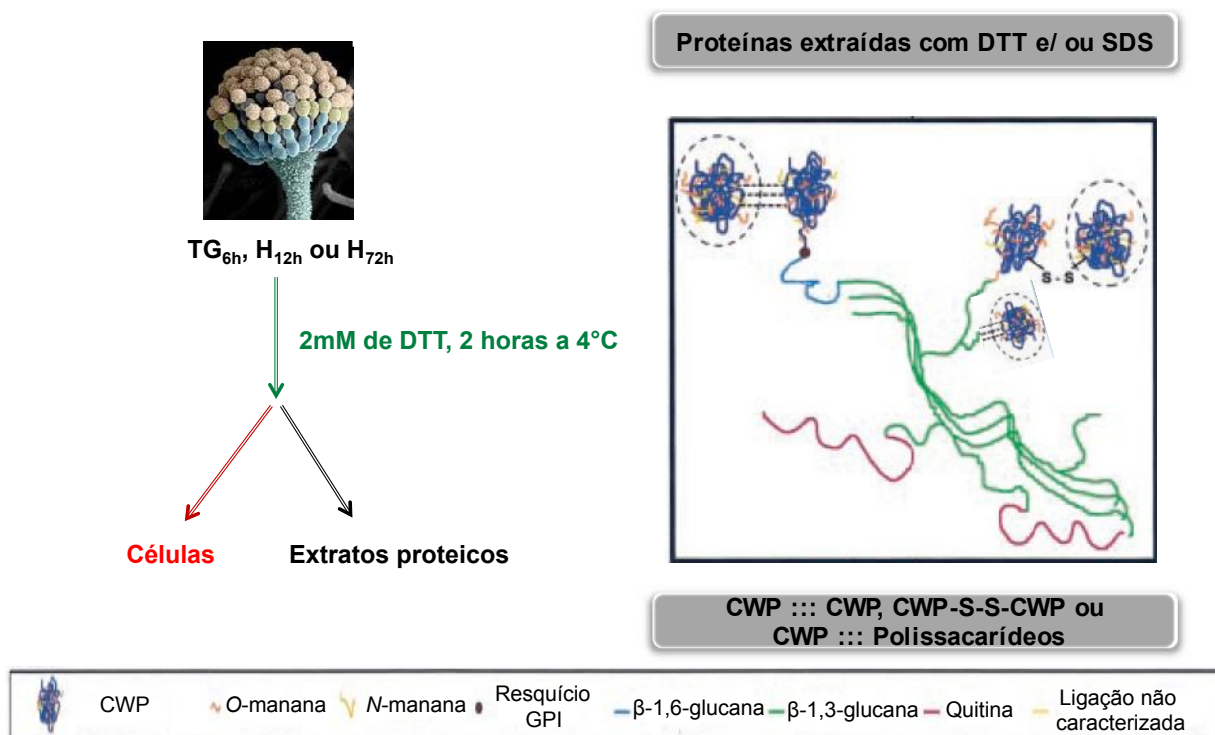


Figura 6. Esquema da obtenção de extratos proteicos a partir dos morfotipos do *A. fumigatus*, com ênfase no tipo de proteína extraída pela ação do agente químico DTT.

3.4 – Ensaio de viabilidade celular

Este ensaio foi realizado utilizando o *LIVE/DEAD Yeast Viability Kit* (Molecular Probes, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram realizados ensaios utilizando-se apenas um morfotipo, tubo germinativo (TG_{6h}), obtido como descrito anteriormente, cujas células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 2% de D-(+)-glucose e 10 mM de HEPES, pH 7,2. Após contagem, realizou-se uma suspensão final de 10⁶ células/mL. Estas células foram misturadas às soluções corantes nas concentrações 20 µM de FUN-1 e 25 µM de Calcofluor White M2R, incubando-se a 30°C por 30 min, no escuro. As células foram então lavadas duas vezes com tampão HEPES, montadas em lâminas e visualizadas em microscópio confocal LSM 510-META (Zeiss).

3.5 – Ensaio de biotinição

As células na fase de tubo germinativo foram obtidas conforme descrito anteriormente, sendo separadas por centrifugação, lavadas duas vezes com água destilada e duas vezes com tampão 50 mM de fosfato de potássio, pH 8,0 (tampão K-fosfato). As células foram ressuspensas em 40 ml do mesmo tampão contendo 20 mg do reagente *NHS-LC-Biotin* (sulfosuccinimidil-6-(biotinamido) hexanoato (Pierce, Rockford, USA) e incubadas por 90 min em banho de gelo, a ~4°C. Após esta etapa, igual volume de tampão 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5/50 mM de MgCl₂ foi adicionado à suspensão celular, seguindo-se uma centrifugação a 3000 g por 10 min. As células foram lavadas três vezes com tampão K-fosfato, pH 8,0.

3.6- SDS-PAGE e *Western blotting*

As amostras foram submetidas a fracionamento por SDS-PAGE conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida a 12% (1,5 mm espessura). Após a eletroforese, os géis foram corados por prata amoniacal ou por *Coomassie* coloidal. Amostras transferidas para uma membrana de nitrocelulose foram reveladas pelo Amersham *ECL Hybound* (GE Healthcare).

Os géis corados pela prata amoniacal foram primeiramente fixados com 40% metanol e 10% ácido acético por 1 hora e então pós-fixados com 5% metanol e 5% ácido acético, *overnight*. Os géis foram então lavados com água ultrapura durante 10 min e incubados com uma solução contendo 0,5 M de acetato de sódio e 1% de glutaraldeído durante 30 min. Em seguida, os géis foram lavados abundantemente com água ultrapura e incubados com uma solução de prata amoniacal por 30 min. Posteriormente, foram lavados com água ultrapura e a revelação desenvolvida em solução de 0,01% de ácido cítrico e 0,1% de formalina. A reação foi interrompida com 5% de Tris e 2% de ácido acético.

A transferência eletroforética (*Western blotting*) das proteínas a partir dos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose foi realizada com tampão de transferência 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol, aplicando-se uma corrente de 150 mA por 2 horas. As proteínas biotinizadas eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose foram processadas conforme descrito a seguir: as membranas foram bloqueadas com 5% de caseína em tampão 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBS-T) *overnight* a 4°C. Subsequentemente, as membranas foram lavadas 10 vezes com TBS-T contendo 1% caseína e incubadas com um complexo estreptavidina-*HRP* em TBS-T por 2 horas, após o que foram lavadas 10 vezes com TBS. A detecção das proteínas biotinizadas foi feita utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e visualizadas num escâner tipo *Typhoon Trio variable mode Imager* (GE Healthcare) utilizando-se resolução de 100 µm.

Para a coloração por *Coomassie* coloidal, os géis foram fixados em 50% de etanol e 2% de ácido fosfórico durante 90 min, sendo então lavados com 2% de ácido fosfórico por 1 hora. A seguir, foram incubados com uma solução contendo 17% de sulfato de amônia, 3% de ácido fosfórico e 20% de metanol durante 45 min. Posteriormente, *Coomassie* G-250 foi colocado numa proporção de 66 mg%, seguindo-se incubação *overnight*.

3.7- Eletroforese bidimensional (2DE)

3.7.1- Dos extratos de superfície celular dos morfotipos

Os extratos proteicos de 6, 12 e 72h foram submetidos a uma eletroforese bidimensional em géis analíticos, usados para obtenção de imagem, e em géis preparativos, para identificação proteica. Para os géis analíticos, 150 µg de proteínas de cada extrato foram aplicadas, já para os preparativos a quantidade utilizada foi de 500 µg. O método *Silver Quest* de coloração por prata, compatível com *MS*, foi utilizado para corar géis com 150 µg de proteínas quando o objetivo era identificar as mesmas. Os extratos proteicos foram solubilizados em tampão de reidratação (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4 % de CHAPS, traços de azul de bromofenol, 1,2% de DeStreak, 1% de IPG Buffer 3-10 NL). As amostras foram focalizadas isoelectricamente em fitas *Immobiline* pH 3-11 NL de 18 cm, no sistema *IPGphor*TM II (GE Healthcare) a 20°C, aplicando-se o seguinte programa: 30 V/12 horas, 200 V/1 hora, 500 V/1 hora, 1000 V/1 hora, 1000-10000 V/2 horas, 10000 V/10 horas ou até ser atingido um total de 120000 Vhs. Após a focalização, as amostras foram reduzidas com 1,5% de ditionitrito (DTT), 15 min, e alquiladas com 2,5% de iodoacetamida (IAA), por 20 min, em tampão de equilíbrio (6 M de uréia, 50 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 30% de glicerol, 2% de SDS) (Bjellqvist *et al.*, 1993). A segunda dimensão foi realizada em um sistema *PROTEAN*[®] II *xi Cell* (Bio-Rad), utilizando géis de poliacrilamida a 12%, na presença de SDS. Nesta etapa utilizamos 5 mA/gel por 30 min, 8 mA/gel por 1 hora e 60 mA/gel por 3:30 horas ou até o final da corrida. Os valores de pI foram estimados usando um gráfico de calibração fornecido pela GE Healthcare.

Os géis foram revelados pela coloração com prata ou com *Coomassie* coloidal, dependendo da finalidade. Para géis analíticos foi usado o método da prata amoniacal, conforme descrito anteriormente. Alternativamente, foi utilizado o *kit Silver Quest* (Invitrogen, CA), que é um método de coloração por prata compatível com espectrometria de massas. Para esta coloração, seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Os géis preparativos contendo 500 µg de proteínas foram corados conforme descrito anteriormente.

3.7.2- Secretoma

Para a eletroforese bidimensional destes extratos, foram utilizados 100 µg do secretoma da cepa selvagem e da mutante $\Delta prtT$. Neste caso foi utilizada fita com pH imobilizado NL 3-11 de 7 cm. A seguinte programação foi usada para a focalização a 20 °C: 30 V/12 horas, 200 V/30min, 500 V/30min, 1000 V/30min, 1000-8000 V/2 horas, 8000 V até ser atingido um máximo de 90000 Vhs. Após a focalização, as amostras foram reduzidas e alquiladas conforme descrito anteriormente e a segunda dimensão foi realizada no sistema miniPROTEAN (Bio-Rad) em géis de poliacrilamida a 12%, com as seguintes condições de corrida: 50 V por 15 min e 75 V por 1 hora e 30 min.

Os géis foram corados por prata amoniacal ou por *Coomassie* coloidal, conforme detalhado anteriormente.

3.8- 2D-DIGE

Para análise proteômica diferencial por DIGE foram utilizadas somente extratos dos morfotipos TG_{6h} e H_{72h}. Foi realizada uma marcação mínima (*minimum labelling*) com 50 µg de proteína de cada amostra para marcação com *CyDyes* (Cy3 ou Cy5), de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). Um padrão interno gerado com um *pool* de todas as amostras experimentais foi marcado com Cy2. Este padrão interno combinava quantidades iguais dos extratos das quatro réplicas biológicas de TG_{6h} e H_{72h}. Para evitar qualquer tendência derivada da eficácia da marcação, a técnica de *dye-swap* foi empregada. A marcação foi realizada em banho de gelo por 30 min (no escuro), sendo a reação interrompida pela adição 10 mM de lisina, seguindo-se uma incubação por 10 min em banho de gelo, no escuro. Quantidades equimolares (50 µg) das amostras marcadas com Cy2 (padrão interno), Cy3 e Cy5 foram focalizados usando em *IPG strips* (GE Healthcare, *Immobiline DryStrip* 3-11 NL, 18 cm) com a adição de 1,2% de *DeStreak* (GE Healthcare) e 1% de IPG buffer 3-11 (GE Healthcare). Em seguida, as amostras foram reduzidas com 1,5% ditiotretitol e alquiladas com 2,5% de iodocetamida em tampão de equilíbrio (6 M de uréia, 50 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 30% de glicerol, 2% de SDS). As fitas foram então colocadas em géis homogêneos de poliacrilamida 12% (1,5 mm de espessura), os quais foram fixados com agarose e separados em sistema *Ettan DALTsix* com placas de vidro de baixa fluorescência (GE Healthcare). A

condição de corrida foi de 3 mA por gel, *overnight*. Em paralelo, um gel preparativo foi feito adicionando-se um *pool* de amostras de extratos do TG_{6h} e H_{72h} totalizando 550 µg. Todos os géis, após a análise de imagem, foram corados por *Coomassie* coloidal, conforme descrito anteriormente. Para análise do secretoma, o protocolo foi similar, sendo a única diferença relativa ao gel preparativo no qual foi utilizado um *pool* de extratos para um total de 300 µg de proteína.

3.9- Análise de imagens

3.9.1- Eletroforese clássica

As imagens dos mapas 2DE foram capturadas no *ImageScanner* (GE Healthcare) e analisadas pelo *software ImageMaster 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare). As análises incluíram detecção de *spots*, *matching*, análise estatística e calibração de pI para determinação do pI experimental de cada proteína identificada.

Para determinação dos *spots*, três critérios foram ajustados: área mínima, suavização e saliência. Depois de feita a detecção automática e uma vez feito o ajuste, os mapas foram verificados manualmente, conforme necessidade. Os géis foram pareados dois a dois e alguns *spots* em comum foram detectados, marcados e descritos como *Landmarks*. O alinhamento foi feito de acordo com a posição das *Landmarks*. Não foram realizadas, para este estudo, as análises comparativas com base nos volumes de cada *spot* para géis de *Coomassie*. Somente os géis de prata foram analisados com este programa, para uma análise apenas qualitativa.

3.9.2- DIGE

Os *spots* foram visualizados usando o escâner *Typhoon Trio variable mode Imager* (GE Healthcare) com uma resolução final de 100 µm. As imagens foram pré-processadas, para remover áreas fora do interesse, pelo *software ImageQuant v7.0*. A quantificação da expressão proteica foi realizada pelo *software DeCyder 7.0* e a análise intra-gel foi realizada no módulo *DeCyder DIA (Difference In-gel Analysis)*. *DIA* utiliza um modelo de distribuição

normal para determinar *spots* diferencialmente expressos. O limite foi ajustado para um volume máximo de 2.0. Cada proteína na amostra individual está representada no padrão interno; logo, uma comparação entre a proteína na amostra individual e a mesma proteína no padrão interno foi usada para gerar uma razão relativa de expressão. O canal Cy2 de cada gel foi usado para normalizar as intensidades dos *spots*. Para cada *spot*/gel, o *software* reporta um abundância padronizada [*standardized abundance* (SA)] como uma relação entre o volume na amostra marcada com Cy3 (ou Cy5) e o volume do *spot* na amostra marcada com Cy2. A avaliação Inter-gel com análise estatística foi realizada usando o módulo *DeCyder BVA* (*Biological Variance Analysis*) (Ge Healthcare). O gel referência foi escolhido automaticamente, especificamente, o gel com o maior número de *spots* detectados. O canal Cy2 de cada gel também foi usado para o pareamento automático entre géis. No *BVA*, cada comparação foi filtrada para encontrar *spots* validados para um valor de $p \leq 0,05$ e (b) uma alteração de expressão maior que 1,5 vezes entre grupos. Também foi utilizado o módulo *EDA* do *DeCyder* (*Extended Data Analysis*), para análises estatísticas. Neste módulo, quatro tipos de análises foram realizadas: (a) análise de expressão diferencial para encontrar proteínas diferencialmente expressas com diferença significativa ($p \leq 0,05$). Além disso, as proteínas deveriam estar presentes em no mínimo 80% dos mapas proteicos; (b) análise dos componentes principais, para identificar fontes de variação; (c) análise de padrão de expressão (*heat maps*) para agrupar as informações; (d) análise discriminante para identificar possíveis biomarcadores.

3.10- Identificação das proteínas por espectrometria de massas

3.10.1- Digestão trípica

Os *spots* ou bandas de interesse foram cortados manualmente. Aqueles corados por prata compatível foram incubados com uma solução composta por 100 mM de tiosulfato sódico e 30 mM de ferricianeto de potássio durante 15 min. Em seguida, foram lavados com água ultrapura (Milli-Q Synthesis System) e incubados com uma solução de 25 mM de bicarbonato de amônio (AmBic), 50% de acetonitrilo (ACN). Posteriormente, foram desidratados com 100% de ACN e secos em uma *Savant SpeedVac* por 15-20 min. Alternativamente, os *spots* provenientes de géis corados por *Coomassie* G-250 foram

incubados *overnight* com água ultrapura e lavados com a solução 25 mM de AmBic, 50% de ACN. Após este processo, foram desidratados com 100% de ACN e secos a vácuo.

Os *spots* ou bandas descorados foram incubados com uma solução de tripsina modificada para sequenciamento (marca Promega) a 20 ng/μL em 25 mM de AmBic, durante 1 hora em gelo (etapa de reidratação), sendo posteriormente incubados *overnight* a 37°C (digestão *in gel*). Após a digestão, os sobrenadantes foram retirados e transferidos para novos microtubos. Os peptídeos trípticos foram extraídos com uma solução de 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 50% de ACN durante 1 hora e, em seguida, 100% de ACN por 30 min. Todos os sobrenadantes de cada *spot* foram reunidos e o volume reduzido no *SpeedVac*. Os peptídeos trípticos foram analisados por espectrometria de massas.

3.10.2- Análise de MALDI-ToF-ToF e sequenciamento de peptídeos

Alíquotas dos peptídeos trípticos (0,3 μL) foram misturadas a uma matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) diluída em uma solução 50% de acetonitrilo/água ultrapura contendo 0,1% de TFA e aplicadas diretamente na placa de MALDI (Applied Biosystems). Durante o desenvolvimento deste trabalho, por razões de disponibilidade, foram utilizados três equipamentos do tipo MALDI-ToF/ToF. As massas dos peptídeos trípticos foram obtidas usando analisadores do tipo 4700 Proteomics Analyzer, 4800 Plus MALDI/TOF/TOF™ Analyzer ou AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System (Applied Biosystems, Foster City, CA) em modo automático (sistemas 4700 e 4800) e modo manual (sistema 5800). Inicialmente, um espectro MALDI MS foi obtido de cada *spot* (700-1000 tiros de laser por espectro), e os picos com sinal-ruído maior que 15 foram selecionados para análise MS/MS (4000-7500 tiros/espectro). A energia de colisão foi de 1 keV. Todos os espectros foram calibrados externamente usando o 4700 Proteomics Analyzer Mass Standards Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). A lista de picos gerados de todos os espectros MS/MS foi submetida a uma busca contra o banco de dados NCBI não-redundante utilizando-se software MASCOT (www.matrixscience.com). Foi admitida apenas uma clivagem perdida e até quatro modificações variáveis: carbamidometil (C), glu→pyro-glu (N-termE), oxidações (HW e M), propionamida (C). A tolerância da massa peptídica foi de 0,05 Da para MS e 0,2 Da para íons MS/MS. Para probabilidade de identidade proteica, foi utilizado o Ions Score como parâmetro. Ions score é definido como $-10 \cdot \log(P)$, em que P é a probabilidade de que o *match* observado seja um evento aleatório. Para as amostras analisadas, Ions score maior que 40

indicaram identidade ou extensiva homologia ($p \leq 0,05$). O número de acesso proteico e o nome da *ORF* (*open reading frame*) foi retirado do servidor *UniProt* (*Universal Protein Resource*) utilizando o banco de dados *UniProt Knowledgebase/Swiss-Prot*. Além disso, para a análise de algumas das proteínas diferencialmente expressas identificadas, a presença (predição) de peptídeos sinal (SignalP) assim como de possíveis adesinas foram investigados usando o Fungal Secretome Knowledge Base (FunSecKB) (Lum e Min, 2011) e o preditor de adesinas FungalRV (<http://fungalrv.igib.res.in/query.php>) (Chaudhuri *et al.*, 2011).

4- RESULTADOS

4.1- Obtenção de diferentes morfotipos de *Aspergillus fumigatus*

Inicialmente, foi necessário estabelecer todas as condições de cultivo visando obter uma massa de células considerável em meio líquido, com morfologias definidas e relativamente homogêneas, na impossibilidade de obtermos culturas sincronizadas. Foram padronizados todos os parâmetros básicos, como tamanho do inóculo (10^6 a 10^9 conídios/ml), meio de cultivo (por exemplo, meio com ou sem soro) e condições ambientais (temperatura, velocidade de agitação, etc.). Destacamos que havia grande variabilidade no tempo de diferenciação e na homogeneidade das culturas quando inóculos iniciais mais concentrados eram utilizados. Desta forma, os resultados apresentados a seguir referem-se às condições previamente padronizadas descritas na metodologia.

Desta forma, conídios da cepa AF293 do *Aspergillus fumigatus* foram inoculados em meio Sabouraud líquido e cultivados por 6, 12 e 72 horas sob agitação. A uniformidade celular e a morfologia foram monitoradas por microscopia óptica. As imagens apresentadas na figura 5 mostram que no cultivo por 6 horas (figura 5A) a cultura apresentava células nos estágios iniciais de germinação, com presença abundante de tubos germinativos, os quais foram denominados TG_{6h}. No cultivo por 12 horas (figura 5B) e 72 horas (figura 5C) já são observadas hifas em dois estágios de crescimento celular. Em 12 horas, pode-se observar uma cultura com a presença de células em diferentes estágios de filamentação, onde algumas células apresentam-se em estágios iniciais relativos ao estabelecimento de crescimento polarizado - em especial, nos *clusters* - enquanto a maioria das células apresenta-se diferenciada, com hifas curtas e septadas. Em 72 horas, pode-se observar cultura com predominância de hifas septadas maduras.

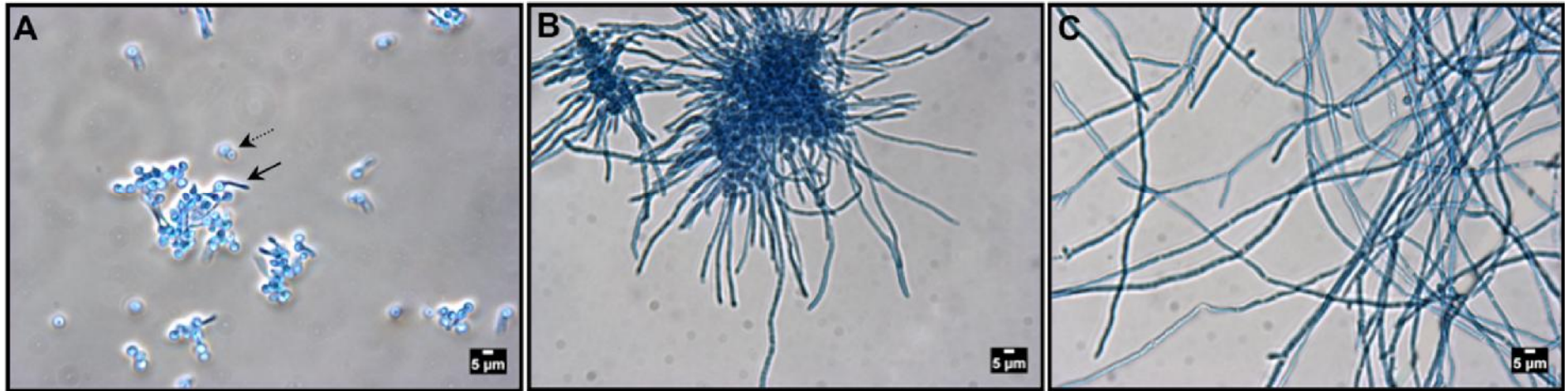


Figura 7. Células de *A. fumigatus* cultivadas por diferentes tempos em meio Sabouraud a 37°C por: (A) 6 horas. A seta pontilhada aponta para *clumps* de conídios. A seta preta, para tubos germinativos. (B) 12 horas. Pode-se visualizar células em diferentes estágios de filamentação, além da presença de *clusters* (C) 72 horas. Observa-se uma cultura com 100% de hifas maduras, apresentando dicotomia e ângulos de 45°. As células foram coradas com azul de algodão e foram visualizadas com lente objetiva 40 X.

4.2 - Ensaio de viabilidade celular

Foi utilizado o *kit LIVE/DEAD® Yeast Viability* da Molecular Probe, que combina dois corantes vitais, FUN[®]1 e Calcofluor[™] White M2R (CFW), permitindo o monitoramento da parede celular, da integridade da membrana plasmática e a viabilidade metabólica de células fúngicas. Visamos com isso comprovar que as condições experimentais utilizadas para a extração de proteínas de superfície dos diferentes morfotipos de *A. fumigatus*, utilizando células inteiras, não levava a contaminações oriundas de componentes intracelulares, seja pela falta de integridade celular ou por vazamento do conteúdo de células inviáveis.

FUN-1 atravessa a membrana plasmática de leveduras e fungos filamentosos, dando origem a estruturas intravacuolares cilíndricas (EIVC) (Millard *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 2011). A conversão intracelular de FUN-1 de coloração verde difusa para formas compactas constituídas de estruturas intravacuolares de cor avermelhada requer tanto a integridade da membrana plasmática quanto a viabilidade celular. Realizamos ensaios com morfotipo TG_{6h} de *A. fumigatus* antes (controle) e após o tratamento das células com 2mM de DTT, conforme descrito na metodologia. Após tratamento das células com o agente redutor, observamos a formação das EIVCs de coloração avermelhada, similar à ao controle (figura 6). Este resultado demonstra que não houve extravasamento de proteínas intracelulares decorrentes do tratamento com DTT, em condições suaves de extração. Além disto, as células se mantiveram viáveis metabolicamente após o tratamento com DTT, evidenciado pelas estruturas intravacuolares. Células com membrana intacta, mas pouca ou nenhuma atividade metabólica, apresentam coloração difusa verde-amarelada e ausência das EIVCs, o que não foi observado nas nossas condições de extração.

Já o CFW é um corante ultravioleta que se liga à quitina da parede celular de fungos, emitindo uma fluorescência azul (Shaw *et al.*, 1991). As células controles e as experimentais mostraram diferentes padrões para CFW. Pode ser visualizado na figura 6 que as células tratadas com DTT apresentam uma fluorescência azul mais intensa e, aparentemente, uma superfície enrugada. Este resultado pode refletir a perda de parte dos componentes da parede celular, proteínas extraídas pelo DTT, levando conseqüentemente a alterações da parede e à maior exposição da quitina que é marcada pelo CFW. Na figura 7, a sobreposição das marcações foi ampliada digitalmente.

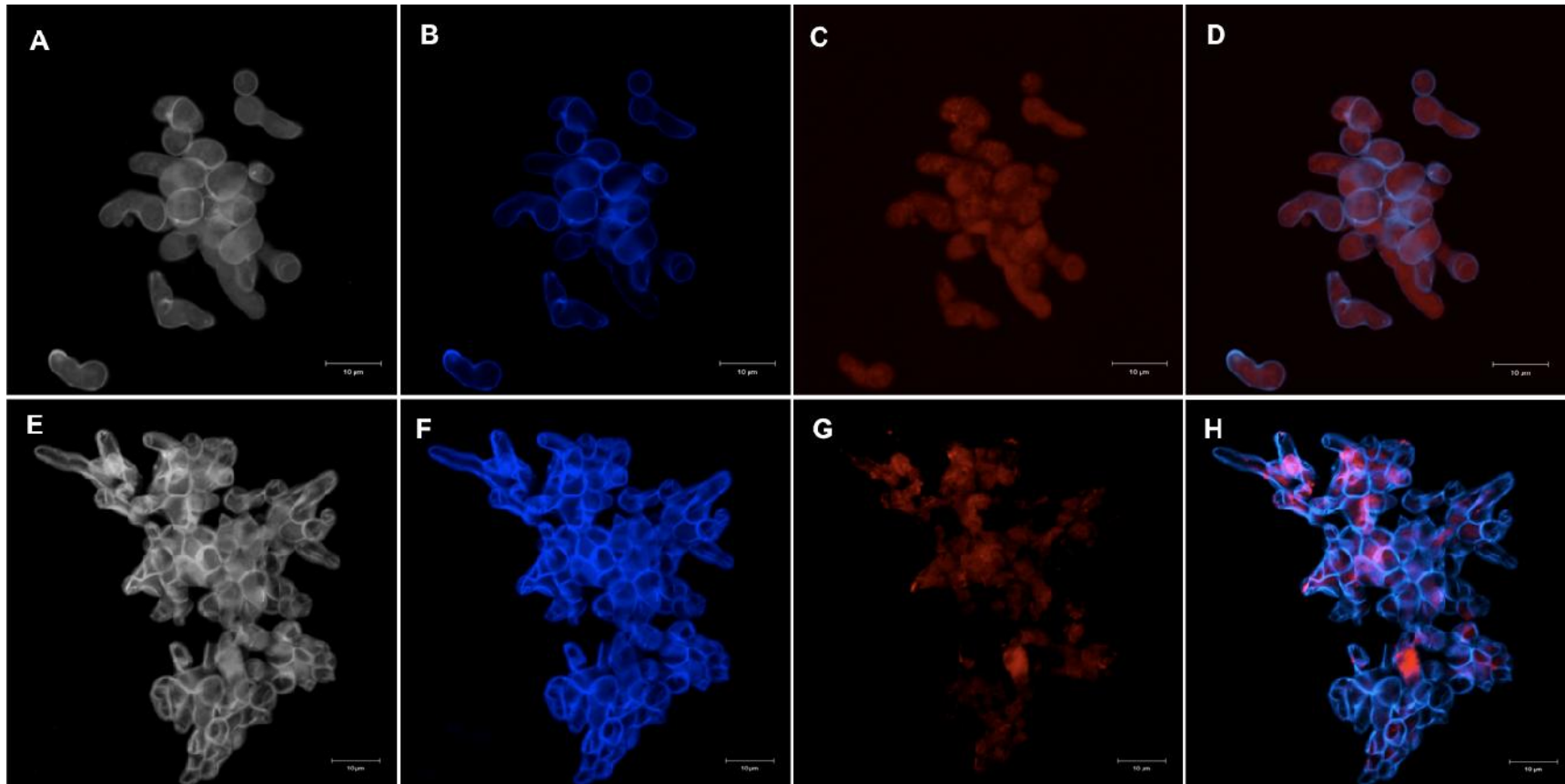


Figura 8. Teste de viabilidade realizado com células de TG_{6h} usando o kit *LIVE/DEAD® Yeast Viability*. Este teste utiliza Calcofluor white (azul) para corar a parede celular e FUN-1(vermelho) para verificar a viabilidade metabólica e a integridade de membrana. As células foram coradas antes (A, B, C, D) e após a extração química com DTT (E, F, G, H). (A, E) Micrografia em escala de cinza; (B,F) canal do Calcofluor White MR2; (C, H) canal do FUN-1; (D, H) imagens sobrepostas dos dois corantes. As imagens foram visualizadas usando um microscópio de fluorescência confocal com contraste por interferência diferencial (DIC). Ampliação 63X. Barra de 10 µm.

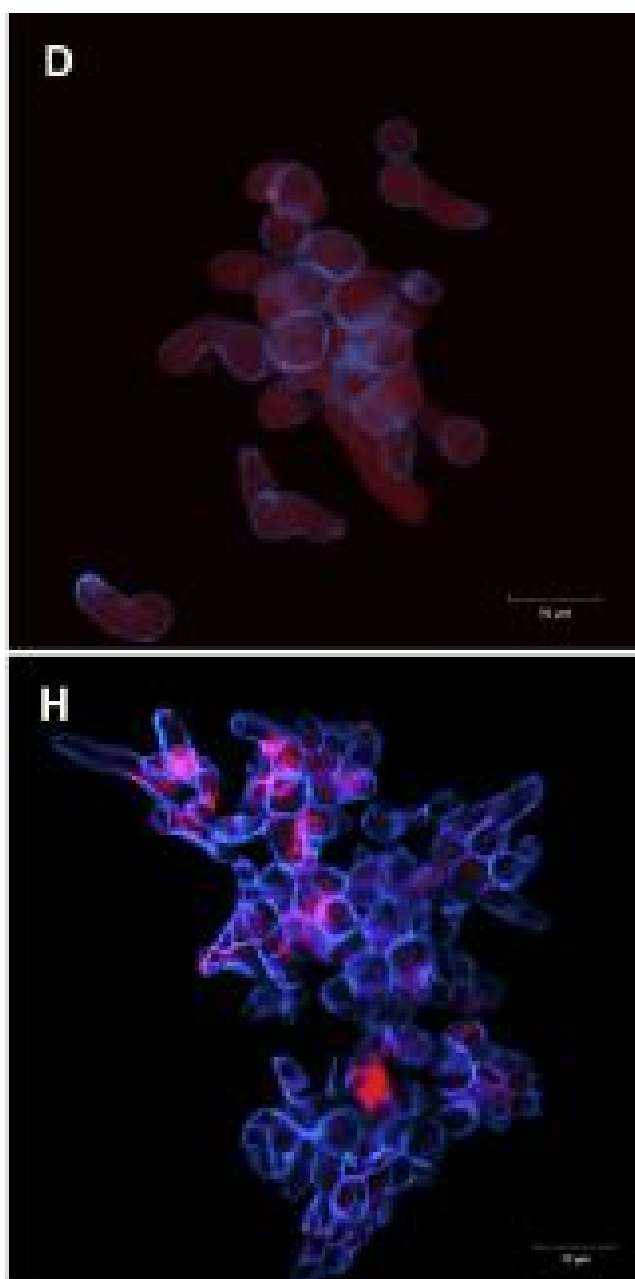


Figura 9. Ampliação das imagens sobrepostas para marcação com Calcofluor White e com FUN-1 antes (D) e após (H) o tratamento de células intactas de TG_{6h} com DTT.

4.3 – Marcação das proteínas de superfície por biotina para avaliação qualitativa dos extratos de *A. fumigatus*

Para confirmar se havia ou não contaminação de proteínas intracelulares (ex., citoplasmáticas) no extrato relativo às proteínas de superfície, foram realizados ensaios de biotinição das células seguindo-se a extração por DTT. A Sulfo-NHS-LC-Biotina se dissolve em soluções polares adquirindo carga pelo grupo sulfóxido de sódio. Portanto, não pode difundir-se ou atravessar a membrana plasmática. A especificidade deste reagente em marcar componentes da superfície celular foi demonstrada por Daniels e Amara (1998).

Nossos ensaios foram realizados com células intactas previamente marcadas com biotina seguindo-se extração pelo DTT, como descrito em metodologia. Como controle foram usadas células não biotiniladas. Como apresentado na figura 8, não houve diferença no padrão de bandejamento proteico nos géis de SDS-PAGE comparativamente ao *Western blot*, o qual revelou quais proteínas encontravam-se marcadas por biotina. Os extratos controle foram negativos em *Western blot*. O resultado deste experimento indica que as proteínas presentes nos extratos DTT são proteínas localizadas na superfície celular, confirmando ainda os resultados de viabilidade celular.

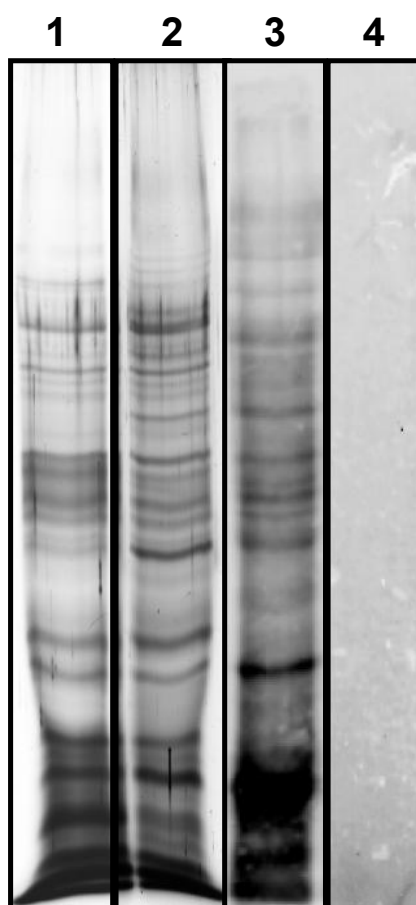


Figura 10. Perfil de bandeamento por SDS-PAGE corado por prata amoniacal e *Western blot* dos extratos proteicos de células TG_{6h} biotiniladas e não-biotiniladas (controle) antes da extração química com DTT. (1) Perfil em SDS-PAGE de extrato biotinilado de TG_{6h}; (2) Perfil em SDS-PAGE de extrato não-biotinilado de TG_{6h}; (3) *Western blot* de extrato biotinilado revelado com o conjugado estreptavidina-*HRP* e; (4) *Western blot* do extrato controle, células não-biotiniladas.

4.4- Mapeamento das proteínas da superfície de TG_{6h}, H_{12h} e H_{72h} por eletroforese bidimensional

As proteínas de superfície celular dos morfotipos TG_{6h}, H_{12h} e H_{72h} foram separadas por eletroforese bidimensional usando-se fitas de gradiente de pH imobilizado não linear com intervalo de 3-11 (IPG *strip* NL 3-11). O resultado apresentado na figura 9 (A-C) corresponde ao gel de referência (*master*) para TG_{6h}, H_{12h} e H_{72h}, correspondendo à análise de três amostras biológicas independentes para cada morfotipo e géis 2D em triplicata para cada amostra. Pela análise de imagens utilizando-se o programa *ImageMaster 2D Platinum*, foram detectados uma média de 661 *spots* para TG_{6h}, 782 para H_{12h} e 729 para H_{72h}. Após a detecção dos *spots*, os mapas foram alinhados e os *spots* então pareados. Na figura 9D pode-se verificar uma das áreas dos géis 2D pareadas evidenciando as diferenças entre os mapas dos morfotipos. O resultado numérico do pareamento entre os géis *master* de cada morfotipo pode ser aferido pelos Diagramas de Venn (figura 10A – C). Observa-se uma boa resolução dos mapas 2D e um percentual de reprodutibilidade de 65% para TG_{6h}, 60% para H_{12h} e 69% para H_{72h}. Estas observações revelam uma maior quantidade de *spots* comuns entre os mapas dos extratos de H_{12h} e H_{72h}, enquanto as diferenças entre estes em relação a TG_{6h} foram mais significativas. Levando-se em consideração a menor reprodutibilidade em H_{12h}, os ensaios posteriores de proteômica diferencial (DIGE) foram realizados comparando-se TG_{6h} e H_{72h}.

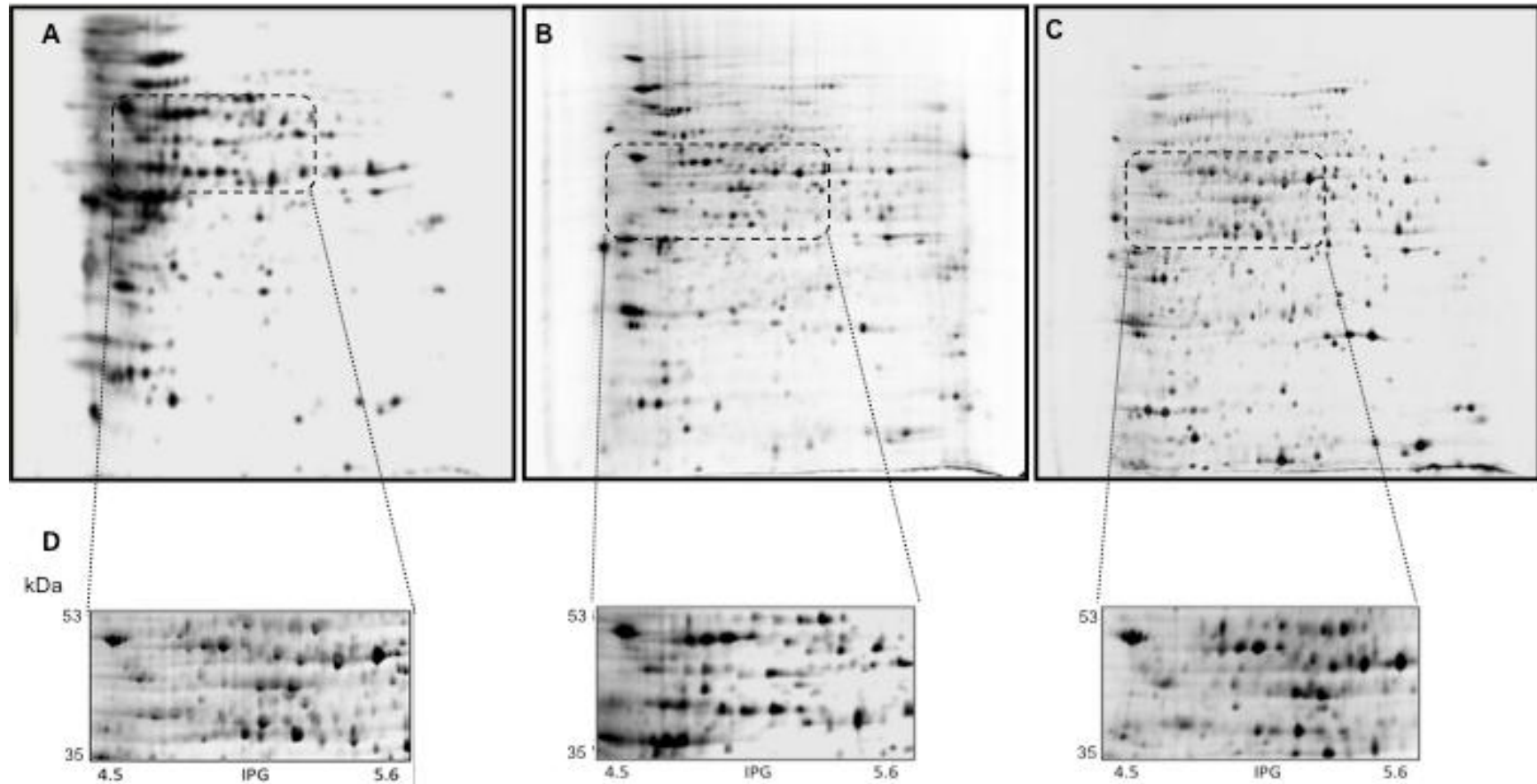


Figura 11. Mapas bidimensionais dos morfotipos de *A. fumigatus*. (A) TG_{6h}, (B) H_{12h} e (C) H_{72h}. Os extratos de superfície celular (150 µg) foram focalizados isoelétricamente em fitas NL 3-11 de 18 cm. Para a segunda dimensão foram utilizados géis de poliacrilamida homogêneos a 12% e posteriormente revelados pela prata amoniacal. (D) Ampliação de regiões equivalentes dos três mapas (A, B, C) demonstrando diferenças e/ou similaridades entre o perfil proteico dos morfotipos.

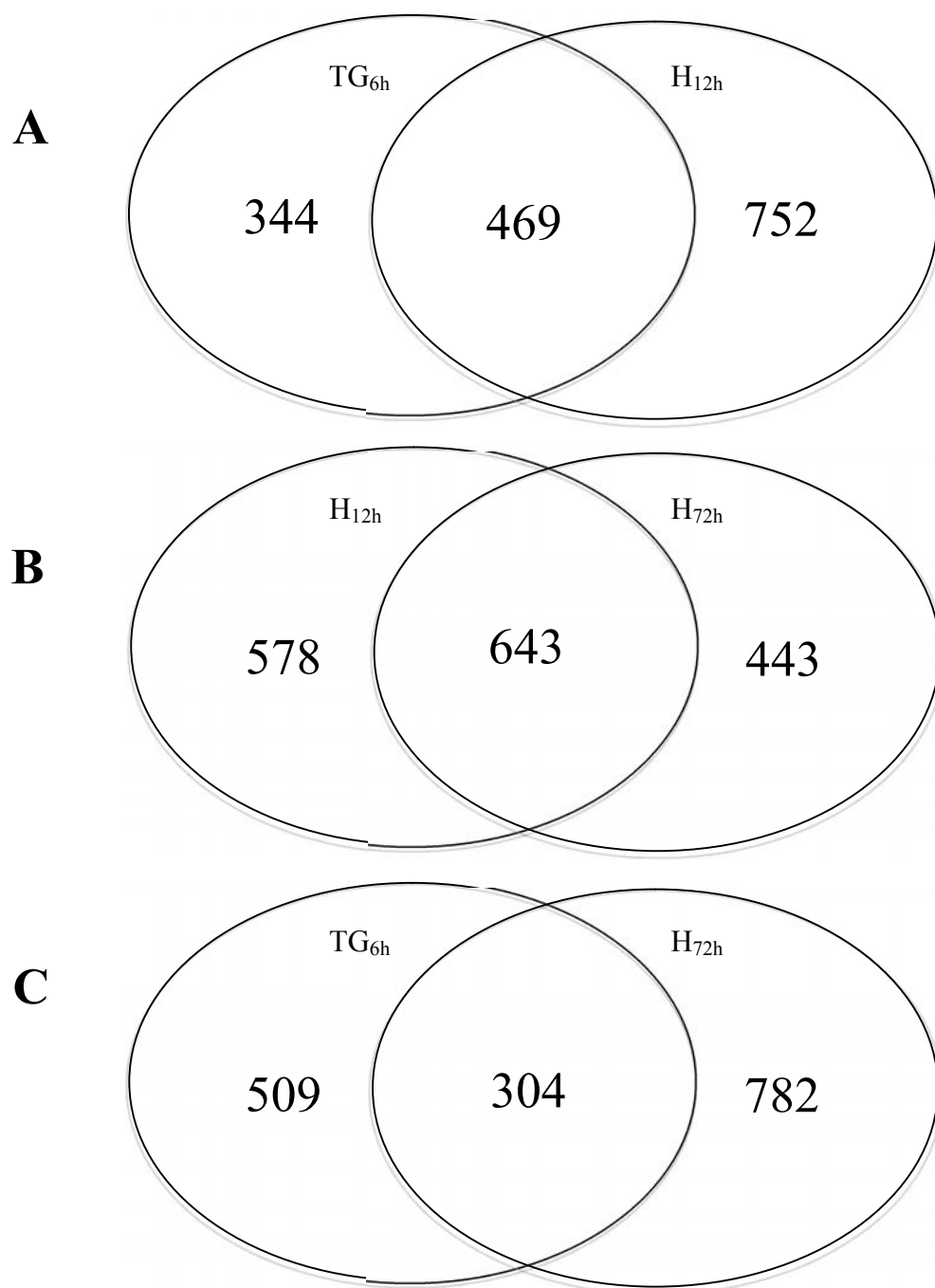


Figura 12. Diagrama de Venn mostrando o número de *spots* detectados nos géis *master* para cada morfotipo de *A. fumigatus*. A detecção automática foi feita com o auxílio do programa *ImageMaster 2D Platinum* sobrepondo os *spots* detectados entre (A) TG_{6h} e H_{12h}, (B) H_{12h} e H_{72h} e (C) TG_{6h} e H_{72h}, respectivamente, após alinhamento e pareamento dos géis.

4.5- Identificação de proteínas nos mapas 2-DE de TG_{6h}, H_{12h} e H_{72h}

Com a finalidade de identificarmos as proteínas presentes nos mapas 2D dos extratos TG_{6h}, H_{12h} e H_{72h}, géis preparativos carregados com 500 µg de proteína de cada extrato foram corados com *Coomassie* coloidal, e os *spots* de interesse tripsinizados para identificação por *MS/MS*, conforme descrito em metodologia.

Testamos ainda, alternativamente nestes experimentos de identificação, uma metodologia de coloração pela prata compatível com a espectrometria de massas. Neste caso, géis carregados com 150 µg de proteínas foram revelados pelo *kit Silver Quest* (Invitrogen). Desta forma, foi possível comparar os dois métodos de revelação em relação à sensibilidade e compatibilidade na obtenção dos dados de identificação por espectrometria de massas (*MS*). Nesta fase inicial do trabalho, várias metodologias analíticas foram avaliadas no laboratório.

No caso dos géis de TG_{6h}, foram cortados 96 *spots* do gel revelado por *Coomassie* coloidal e 141 do gel corado com o *kit Silver Quest*. Para o extrato H_{12h}, foram cortados 75 e 97 *spots*, respectivamente, sendo que para o extrato H_{72h}, foram cortados 50 e 140 *spots*, respectivamente. Todos os experimentos de identificação foram realizados em duplicata. Os peptídeos trípticos de cada *spot* foram então analisados por *MALDI-ToF/MS*. A busca pelo *software* Mascot contra o banco de dados *NCBI* não redundante resultou na identificação de 108 proteínas correspondentes a 92 *spots* do extrato de TG_{6h} (figura 11, Tabela 1). Na identificação das proteínas de TG_{6h}, o espectrômetro utilizado foi o *4800 Plus MALDI/TOF/TOF™ Analyzer* enquanto nas demais identificações foi utilizado o *4700 Proteomics Analyzer*. Neste último caso, foi observada equivalência entre o número de *spots* e de proteínas identificadas, sendo 61 proteínas no extrato H_{12h} (figura 12, Tabela 2) e 87 proteínas no H_{72h} (figura 13, Tabela 3). A taxa de cobertura das proteínas identificadas variou entre 30 a 87% em TG_{6h}; entre 4 a 73% em H_{12h} e; entre 4 a 55% em H_{72h}. Para probabilidade de identidade proteica de todos os *spots* foi utilizado o *Ions Score* do *MASCOT* que é definido como $-10 \cdot \log(P)$, em que P é a probabilidade de que o *match* observado seja um evento aleatório. Para as amostras analisadas, *ions scores* maiores que 40 indicaram identidade ou extensiva homologia ($p < 0,05$). Ou seja, foram consideradas como identificadas corretamente as proteínas com pelo menos uma sequência de aminoácidos contanto que atendessem a duas condições: *score* maior que 40 e uma sequência com mais de 15 aminoácidos.

As proteínas identificadas em cada extrato foram agrupadas de acordo com a sua função biológica (figura 14). Verificamos que algumas diferenças são observadas na atividade celular e metabólica, correlacionadas com o estágio de diferenciação (filamentação). Destacamos que para TG_{6h}, as proteínas relativas à biossíntese eram percentualmente mais abundantes se comparadas aos demais morfotipos. Paralelamente, corroborando observações anteriores, o perfil funcional das proteínas expressas por H_{12h} e H_{72h} foi similar, com exceção de proteínas relacionadas à resposta ao estresse.

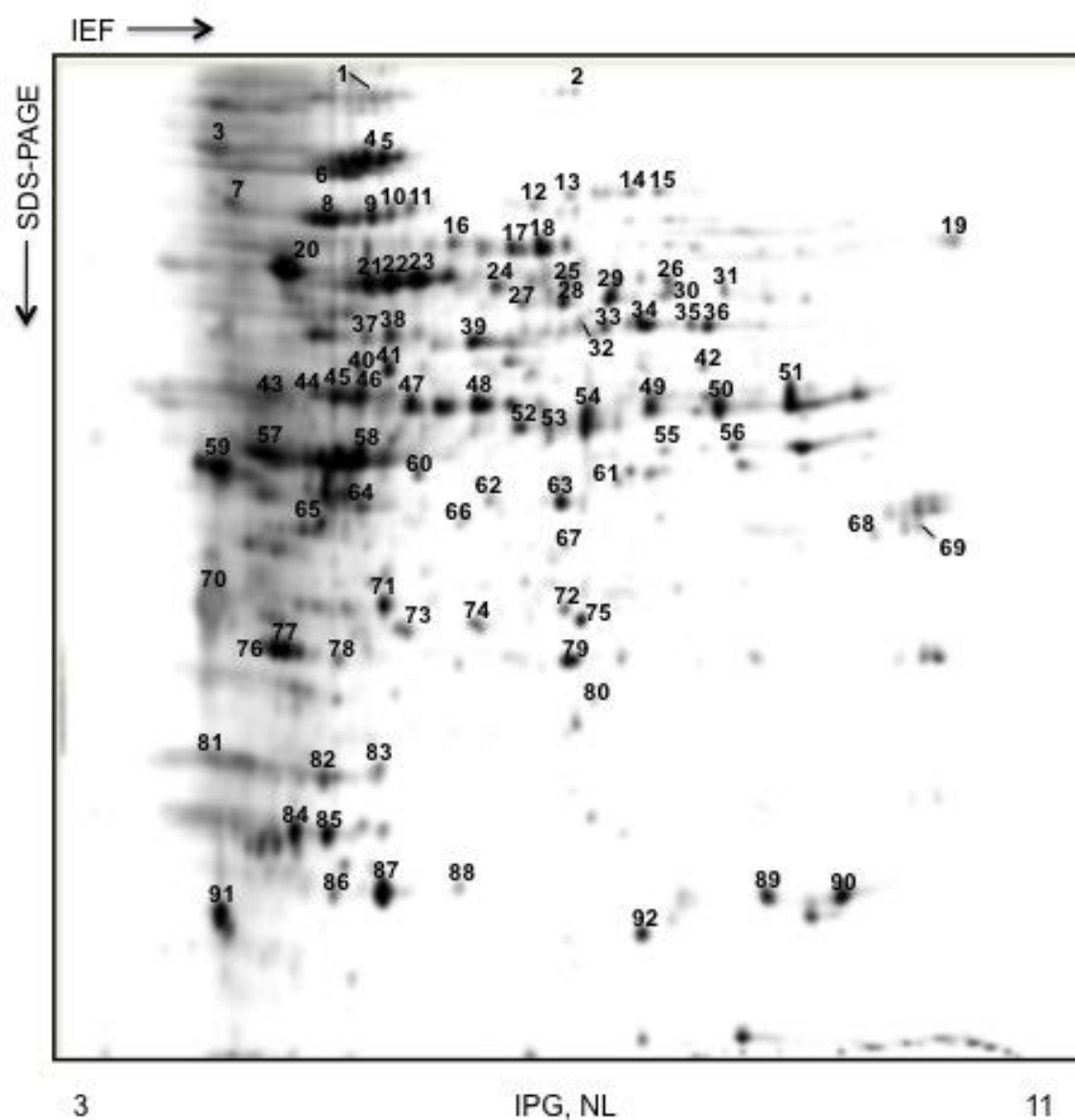


Figura 13. Mapa bidimensional representativo do extrato de superfície TG_{6h} com as proteínas identificadas representadas por algarismos arábicos. As proteínas foram identificadas por *MS* ou *MS/MS*.

Tabela 1. Proteínas do extrato de superfície celular do TG_{6h} do *A. fumigatus* identificadas por MS ou MS/MS.

Tabela 1. Continuação.

Spot	NºAcesso ^a	ORF	<i>pI</i> / peso molecular teórico (kDa)	<i>pI</i> experimental	Nº peptídeos	Taxa Cobertura (%)	Proteína
1	B0XR33	AFUB_012080	5,08/80,1	5,12	12	40	Hsp88
	B0Y324	AFUB_052690	4,95/80,6	5,12	12	25	Hsp90
2	Q4WLN1	AFUA_6G12930	6,26/85,9	5,74	14	35	Aconitato hidratase
3	Q4WJ30	AFUA_1G07440	5,09/69,7	4,30	11	55	Hsp70 chaperona molecular
4	Q4X1H5	AFUA_2G09960	6,02/74,4	5,11	13	48	Ssc70
5	Q4X1H5	AFUA_2G09960	6,02/74,4	5,17	11	49	Ssc70
6	Q4WCM2	AFUA_8G03930	5,30/67,1	4,85	11	52	Hsp70 chaperona (HscA)
7	B0Y891	AFUB_076520	4,58/53,6	4,33	6	29	Proteína ZPR1
8	Q4X1P0	AFUA_2G09290	5,53/62,1	4,91	7	51	HSP60 antigênica mitocondrial
9	Q4WGP1	AFUA_7G05720	6,25/52,0	5,18	8	55	Complexo piruvato desidrogenase
10	Q4WGP1	AFUA_7G05720	6,25/52,0	5,25	7	51	Complexo piruvato desidrogenase

Tabela 1. Continuação.

11	Q4WXF1	AFUA_3G09290	5,44/57,4	5,32	9	49	Fosfoglicerato mutase
	Q4WGP1	AFUA_7G05720	6,25/52,0	5,32	9	40	Complexo piruvato desidrogenase
12	Q4X099	AFUA_2G14210	7,55/64,8	5,60	6	26	Dihidróxi-ácido desidratase Ilv3
13	Q4X099	AFUA_2G14210	7,55/64,8	5,72	8	31	Dihidróxi-ácido desidratase Ilv3
14	Q4WHZ9	AFUA_2G03610	6,25/58,2	5,89	10	41	IMP desidrogenase
15	Q4WHZ9	AFUA_2G03610	6,25/58,2	5,99	10	34	IMP desidrogenase
16	B0XZ89	AFUB_043550	5,47/53,0	5,46	11	54	Glutamato carboxipeptidase
						29	
	Q4WM98	AFUA_6G10660	5,88/52,9		7		ATP citrato liase (Acl)
17	Q4WM98	AFUA_6G10660	5,88/52,9	5,54		35	ATP citrato liase (Acl)
18	Q4WM98	AFUA_6G10660	5,88/52,9	5,63		39	ATP citrato liase (Acl)
19	Q4WC88	AFUA_8G05320	9,14/60,1	9,45	11	55	F1 ATPase, sub alfa
20	Q4WV25	AFUA_5G10550	5,30/55,5	5,67	9	49	F1 ATP sintase, sub beta
21	Q6MY69	AfA33H4.125c	5,90/53,2	5,11	7	47	Peptidase processadora mitocondrial, sub beta
	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,4		8	54	Enolase/Asp F 22

Tabela 1. Continuação.

22	Q6MY69	AfA33H4.125c	5,90/53,2	5,19	7	23	Peptidase processadora mitocondrial, sub beta
							Enolase/Asp F 22
	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,4		8	60	
23	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,4	5,27	9	67	Enolase/Asp F 22
24	Q4WVQ8	AFUB_063700	5,79/49,6	5,49	6	57	Glutamato/ Leucina / Fenilalanina/ Valina desidrogenase
25	Q4WAR5	AFUA_7G02230	5,56/44,81	5,70	4	41	RNA-ligante Csx1
	B0Y6A6	AFUB_066240	6,09/49,1		9	31	L-ornitina aminotransferase Car2
26	Q4WDF5	AFUA_6G04570	7,18/54,3	6,02	9	36	Fator de alongamento eEF-1
27	Q4WT69	AFUA_1G10350	6,31/44,73	5,56	2	8	Fosfoglicerato quinase
28	Q4WJ77	AFUA_1G06940	6,12/44,6	5,69	7	35	Corismato sintase
29	Q4WT69	AFUA_1G10350	6,31/44,73	5,83	10	52	Fosfoglicerato quinase
	Q4WDF5	AFUA_6G04570	7,18/54,3		9	43	Fator de alongamento eEF-1
30	Q4WAR5	AFUA_7G02230	5,56/44,81	5,99	4	37	RNA-ligante Csx1
	Q4WDF5	AFUA_6G04570	7,18/54,3		6	26	Fator de alongamento eEF-1

Tabela 1. Continuação.

31	Q4WDF5	AFUA_6G04570	7,18/54,3	6,32	9	47	Fator de alongamento eEF-1
32	Q8TGG6	AFUA_1G12170	6,70/48,25	5,74	8	46	Fator de alongamento Tu
33	Q4WCL5	AFUA_8G04000	6,41/40,88	5,81	6	62	acetyl-CoA acetiltransferase
34	Q4WCL5	AFUA_8G04000	6,41/40,88	5,94	4	68	acetyl-CoA acetiltransferase
							Complexo redutase ubiquinol-cit C
	Q4WEU3	AFUA_5G04210	8,89/48,06		7	50	
35	Q4WEU3	AFUA_5G04210	8,89/48,06	6,08	7	49	Complexo redutase ubiquinol-cit C
36	Q4WEU3	AFUA_5G04210	8,89/48,06	6,17	7	51	Complexo redutase ubiquinol-cit C
37	Q4WDH2	AFUA_6G04740	5,87/44,3	5,08	8	56	Actina Act1
38	Q4WDH2	AFUA_6G04740	5,87/44,3	5,17	8	56	Actina Act1
39	B0XQI2	AFUB_010050	5,67/42,2	5,42	6	56	S-adenosilmetionina sintetase
40	Q4WQ26	AFUA_4G11330	5,68/42,38	5,06	6	63	Proteína de domínio Aha1
41	Q4WQ26	AFUA_4G11330	5,68/42,38	5,16	5	63	Proteína de domínio Aha1
42	B0XZX8	AFUB_034740	9,32/56,3	6,12	11	37	Cetol-ácido redutoisomerase
43	Q4WYK1	AFUA_3G13320	4,81/32,3	4,59	3	66	S0 proteína ribossomal 40S

Tabela 1. Continuação.

44	Q4WYK1	AFUA_3G13320	4,81/32,3	4,86	5	38	S0 proteína ribossomal 40S
45	Q4WTX0	AFUA_5G06390	5,02/36,8	4,98	4	54	Adenosina quinase
	Q4WYK1	AFUA_3G13320	4,81/32,3		4	30	S0 proteína ribossomal 40S
46	Q4WTX0	AFUA_5G06390	5,02/ 36,8	5,06	4	54	Adenosina quinase
47	B0XXC0	AFUB_037530	5,69/38,5	5,22	7	49	Homoserina desidrogenase
							Frutose-bifosfato aldolase, classe II
	Q4WY39	AFUA_3G11690	5,55/39,9		4	63	
48	Q4WY39	AFUA_3G11690	5,55/39,9	5,44	4	74	Frutose-bifosfato aldolase, classe II
49	Q4WE70	AFUA_5G01970	6,96/36,5	5,93	5	63	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
	Q4WQK8	AFUA_4G13170	6,06/35,3				Complexo Proteína G, sub beta (CpcB)
					5	33	
50	Q4WE70	AFUA_5G01970	6,96/36,5	6,23	4	53	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
51	Q4WE70	AFUA_5G01970	6,96/36,5	7,14	6	55	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
52	Q4WQK8	AFUA_4G13170	6,06/35,3	5,55	3	87	Complexo Proteína G, sub beta (CpcB)
53	Q4WQK8	AFUA_4G13170	6,06/35,3	5,60	3	87	Complexo Proteína G, sub beta (CpcB)

Tabela 1. Continuação.

54	Q4WQK8	AFUA_4G13170	6,06/35,3	5,74	3	87	Complexo Proteína G, sub beta (CpcB)
55	Q4WGP3	AFUA_6G05210	9,08/35,9	5,98	5	74	Malato desidrogenase. NAD dependente
56	Q4WGP3	AFUA_6G05210	9,08/35,9	6,39	6	79	Malato desidrogenase. NAD dependente
57	B0YD68	AFUB_094480	4,85/21,95	4,60	4	61	NAC
58	Q4WJR3	AFUA_1G05080	5,11/33,5	5,01	5	58	P0 proteína ribossomal 60S
59	Q4WSY6	AFUA_1G11190	4,42/25,23	4,20	3	77	Fator de alongamento1, eucariótico, sub beta
60	Q4WWK6	AFUA_3G06210	5,51/33,3	5,25	6	68	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintase
61	B0Y2U8	AFUB_052040	6,00/35,5	5,83	5	38	Proteína hipotética conservada
62	Q4WK69	AFUA_1G03510	8,31/32,35	5,46	7	43	ATP sintase gama
	B0XP55	AFUB_006000	9,18/29,2		6	44	S3 proteína ribossomal 40S
63	Q4WK69	AFUA_1G03510	8,31/32,5	5,67	5	63	ATP sintase, cadeia gama
64	Q6MYD1	AFUA_1G13490	5,33/33,8	5,06	4	46	Espermidina sintase
65	Q4WB00	AFUA_8G00550	5,21/29,5	4,74	2	35	Metiltransferase SirN-like
66	Q4WPF8	AFUA_4G09110	8,64/40,35	5,38	5	43	Citocromo c peroxidase, (Ccp1)

Tabela 1. Continuação.

67	B0XMN4	AFUB_003360	5,58/28,8	5,68	5	53	6-Fosfogluconolactonase
68	Q4WNT7	AFUA_4G06910	9,47/37,0	8,34	6	30	Porina de membrana externa mitocondrial
69	Q4WNT7	AFUA_4G06910	9,47/37,0	8,93	5	33	Porina de membrana externa mitocondrial
70	Q4WW00	AFUA_5G13920	4,36/22,2	4,04	4	51	Co-chaperona Hsp90 ligante (Sba1)
71	Q4WT47	AFUA_1G10570	5,48/ 25,6	5,13	4	72	Glicerol-3-fosfato fosfatase
	B0Y1N9	AFUB_049970	5,27/25,0		3	41	Família ThiJ/Pfpl
72	Q4X141	AFUA_2G11290	6,13/26,0	5,67	5	68	Orotato fosforibosiltransferase
73	Q4WVV5	AFUA_5G13450	5,87/28,3	5,20	4	22	Triosefosfato isomerase
74	Q4WVV5	AFUA_5G13450	5,87/28,3	5,43	4	37	Triosefosfato isomerase
75	Q4WYW9	AFUA_3G14540	6,09/20,45	5,71	6	55	Hsp30/Hsp42
76	Q4WRB8	AFUA_1G16840	4,82/20,3	4,48	4	49	Família TCTP
77	Q4WRB8	AFUA_1G16840	4,82/20,3	4,60	4	49	Família TCTP
78	B0XT98	AFUB_028670	7,85/28,4	4,95	6	44	Co-chaperone GrpE
79	Q4WV31	AFUA_5G10610	9,20/33,1	5,68	3	48	Redutase ubiquinol-cit c, sub ferro-enxofre

Tabela 1. Continuação.

80	Q4WD80	AFUA_6G03810	9,11/28,6	5,75	5	37	ATP sintase D
	B0XQ05	AFUB_008250	6,86/25,5		5	35	Guanilato quinase
81	Q4WDL9	AFUA_6G05200	10,83/17,07	4,42	3	62	L28 proteína ribossomal 60S
82	Q4WK14	AFUA_1G04070	5,58/21,5	4,95	2	48	Fator de iniciação de tradução eIF-5 ^a
83	Q4WK14	AFUA_1G04070	5,58/21,5	5,11	3	39	Fator de iniciação de tradução eIF-5 ^a
84	O43099	AFUA_6G02280	5,36/18,55	4,66	2	57	Alergeno Asp F3
85	O43099	AFUA_6G02280	5,36/18,55	4,85	1	70	Alergeno Asp F3
86	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,1	4,88	4	62	Cofilina
87	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,1	5,10	4	64	Cofilina
88	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,1	5,35	4	62	Cofilina
89	Q4WWX5	AFUA_3G07430	7,74/17,8	6,61	4	67	Ciclofilina
90	Q4WWX5	AFUA_3G07430	7,74/17,8	7,70	3	73	Ciclofilina
91	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,1	4,15	3	47	Cofilina
92	Q4WWI8	AFUA_3G06030	6,40/16,7	5,85	2	55	Proteína carreadora de ubiquitina

a Número de acesso do banco de dados *NCBI blast* do *A. fumigatus* (<http://www.expasy.org/tools/blast/>)

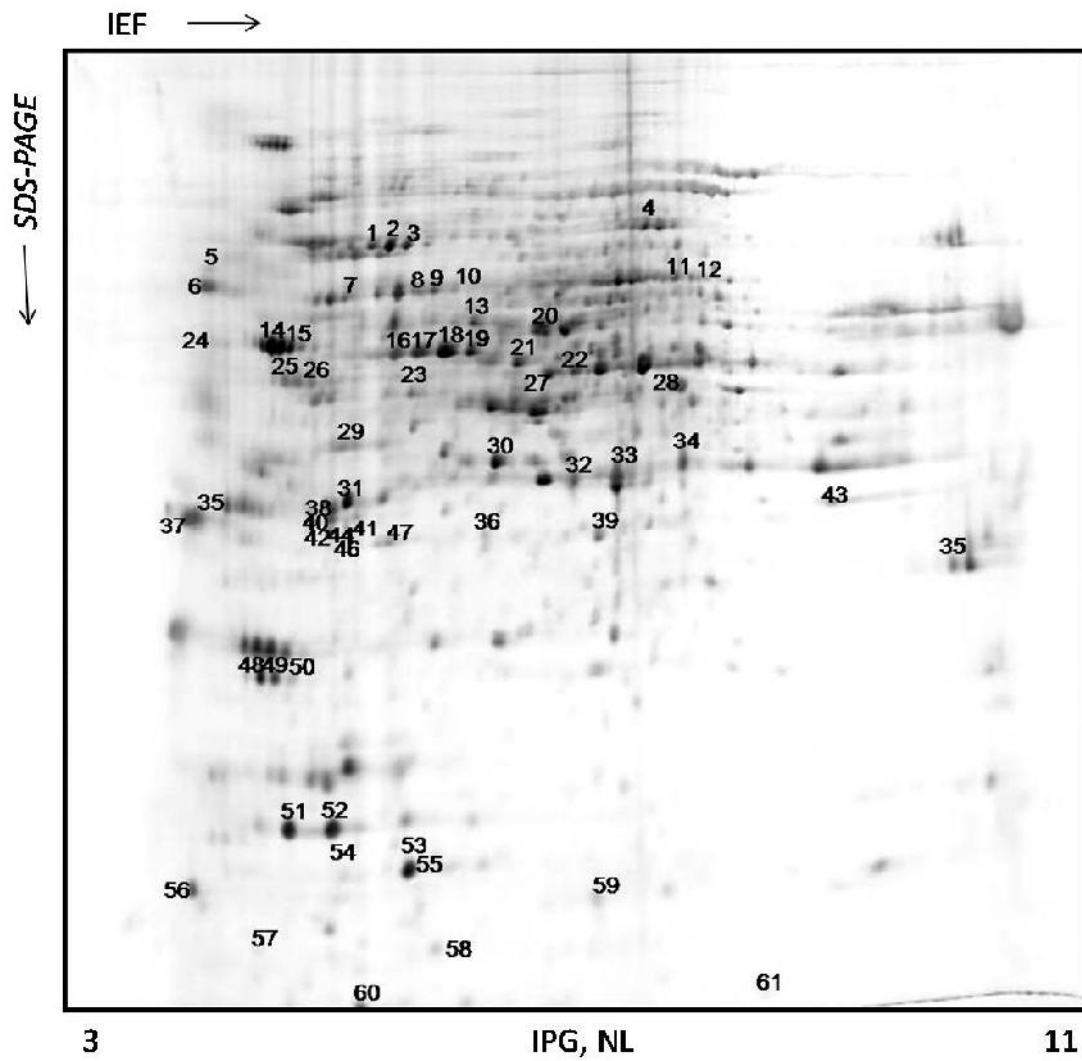


Figura 14. Mapa bidimensional representativo do extrato de superfície H_{12h} demonstrando as proteínas identificadas marcadas por números. A identificação foi feita por *MS* ou *MS/MS*.

Tabela 2. Proteínas do extrato de superfície celular H_{12h} do *A. fumigatus* identificadas por MS/MS.

Spot	NºAcesso^a	ORF	pI / peso molecular teórico (kDa)	pI experimental	Nº peptídeos	Taxa Cobertura (%)	Proteína
1	Q4X1H5	AFUA_2G09960	6,02/72	5,13	5	9	Ssc70
2	Q4X1H5	AFUA_2G09960	6,02/72	5,20	5	11	Ssc70
3	Q4X1H5	AFUA_2G09960	6,02/72	5,27	7	13	Ssc70
4	Q4WX09	AFUA_3G07810	6,50/71	6,28	6	17	Succinato desidrogenase, sub Sdh1
5	Q4WNY2	AFUA_4G07360	6,33/86,8	4,27	4	7	Metionina sintase independente de cobalamina
6	Q4WH99	AFUA_2G06150	4,58/56,1	4,25	3	6	Dissulfeto isomerase Pdi1
7	Q4X1P0	AFUA_2G09290	5,53/61,9	4,98	2	5	HSP60 mitocondrial antigênica
8	Q4WXF1	AFUA_3G09290	5,44/57,41	5,23	2	4	Fosfoglicerato mutase
9	Q4WXF1	AFUA_3G09290	5,44/57,41	5,29	5	11	Fosfoglicerato mutase
10	Q4WXF1	AFUA_3G09290	5,44/57,41	5,36	3	7	Fosfoglicerato mutase
11	Q4WXX9	AFUA_3G11070	6,08/ 62,9	6,49	3	7	Piruvato descarboxilase

Tabela 2. Continuação.

12	Q4WXX9	AFUA_3G11070	6,08/ 62,9	6,62	5	12	Piruvato descarboxilase
13	Q4WFW0	AFUA_3G00840	6,52/ 54,9	5,65	2	5	Oxigenase FAD dependente
14	Q4WV25	AFUA_5G10550	5,30/55,58	4,69	7	19	ATP sintase F1,sub beta
15	Q4WV25	AFUA_5G10550	5,30/55,58	4,74	6	17	ATP sintase F1,sub beta
16	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	5,20	5	20	Enolase
17	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	5,28	5	18	Enolase
18	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	5,47	5	20	Enolase
19	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	5,63	5	20	Enolase
20	Q4WM98	AFUA_6G10660	5,88/ 52,9	5,99	3	10	ATP citrato liase
21	Q4WT69	AFUA_1G10350	6,31/44,73	5,88	2	8	Fosfoglicerato quinase
22	Q4WAR5	AFUA_7G02230	5,56/44,81	6,1	3	7	RNA-ligante Csx1
23	Q6MY69	AfA33H4.125c	5,90/53,23	5,37	7	24	Peptidase processadora mitocondrial, sub beta
24	O60024	AFUA_2G03830	4,64/ 30	4,21	2	28	Alergeno Aspf4
25	Q4WY41	AFUA_3G11710	5,22/41,19	4,84	4	21	Sacaropina desidrogenase

Tabela 2. Continuação

26	Q4WY41	AFUA_3G11710	5,22/41,19	4,94	2	8	Sacaropina desidrogenase
27	Q8TGG6	AFUA_1G12170	6,70/48,25	5,95	5	18	Fator de alongamento Tu
28	Q4WCL5	AFUA_8G04000	6,41/40,88	6,45	2	11	Acetil-CoA acetiltransferase
29	Q4WTX0	AFUA_5G06390	5,02/ 36,8	5,02	3	14	Adenosina quinase
30	Q4WY39	AFUA_3G11690	5,55/39,76	5,81	2	16	Frutose bifosfato aldolase, II
31	Q4WND4	AFUA_6G06750	4,74/ 30,1	5,05	2	13	Proteína família 14-3-3
32	Q4WUP8	AFUA_5G09230	6,04/35,42	5,93	2	7	Transaldolase
33	Q4WUP8	AFUA_5G09230	6,04/35,42	6,15	3	10	Transaldolase
34	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	6,5	5	20	Enolase
35	Q4WEP6	AFUA_5G03750	4,39/ 28,4	4,44	4	17	Proteína domínio WW
36	Q4WWK6	AFUA_3G06210	5,51/ 33,2	5,71	1	8	Fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintase
37	Q4WSY6	AFUA_1G11190	4,42/25,23	4,16	5	40	Fator de alongamento1, eucariótico, sub beta
38	Q4X0G7	AFUA_2G13530	6,51/ 93,1	6,04	1	4	Fator de alongamento 2
39	Q4WI29	AFUA_2G03290	4,79/ 29,1	4,98	3	17	Proteína ArtA família 14-3-3

Tabela 2. Continuação

40	Q4X0G7	AFUA_2G13530	6,51/ 93,1	6,08	1	4	Fator de alongamento 2
41	Q6MYD1	AFUA_1G13490	5,33/33,42	4,98	4	22	Espermidina sintase
42	Q6MYD1	AFUA_1G13490	5,33/33,42	5,07	2	12	Espermidina sintase
43	B8NTB5	AFLA_053980	8,44/15,12	8,12	3	30	Proteína domínio DUF636 (<i>A. flavus</i>)
44	Q4WT47	AFUA_1G10570	5,48/ 25,6	5,02	1	8	Glicerol 3-fosfato fosfatase
45	Q9Y760	-----	5,76/ 21,5	9,42	1	12	Quitosanase
46	Q4WPA3	AFUA_4G08580	5,38/ 23,4	5,03	3	18	Peroxiredoxina mitocondrial
47	Q4WVV5	AFUA_5G13450	5,83/28,05	5,13	2	9	Triosefosfato isomerase
48	Q4WW75	AFUA_5G14680	4,82/25,42	5,13	4	33	Proteína não caracterizada
49	Q4WW75	AFUA_5G14680	4,82/25,42	4,52	2	13	Proteína não caracterizada
50	Q4WW75	AFUA_5G14680	4,82/25,42	4,59	4	33	Proteína não caracterizada
51	O43099	AFUA_6G02280	5.36/18.44	4,75	4	34	Peroxiredoxina pmp20/ Aspf3

Tabela 2. Continuação

52	O43099	AFUA_6G02280	5,36/18,44	4,95	1	10	Peroxiredoxina pmp20/ Aspf3
53	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,01	5,19	2	25	Cofilina
54	Q4WYM9	AFUA_3G13620	4,87/13,96	5,08	2	41	Proteína de domínio <i>cupin</i>
55	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,01	5,22	2	22	Cofilina
56	Q9UUZ6	AFUA_2G10100	4,29/ 11,1	4,27	2	73	Alergeno Aspf8
57	Q4WXR8	AFUA_3G10460	4,63/ 14,2	4,67	1	10	Fator de transporte nuclear NTF2
58	Q4X164	AFUA_2G11060	5,71/ 17,3	5,31	2	42	Proteína ligante de acil-CoA
59	Q4WUQ8	AFUA_5G09330	5,84/15,04	6,01	3	32	CipC
60	Q4WA10	AFUA_4G03050	5,87/14,48	5,31	2	30	Profilina
61	Q4WLV6	AFUA_6G12170	6,56/12,12	6,40	3	40	FKBP PPlase

a Número de acesso do banco de dados *NCBI blast* do *A. fumigatus* (<http://www.expasy.org/tools/blast/>)

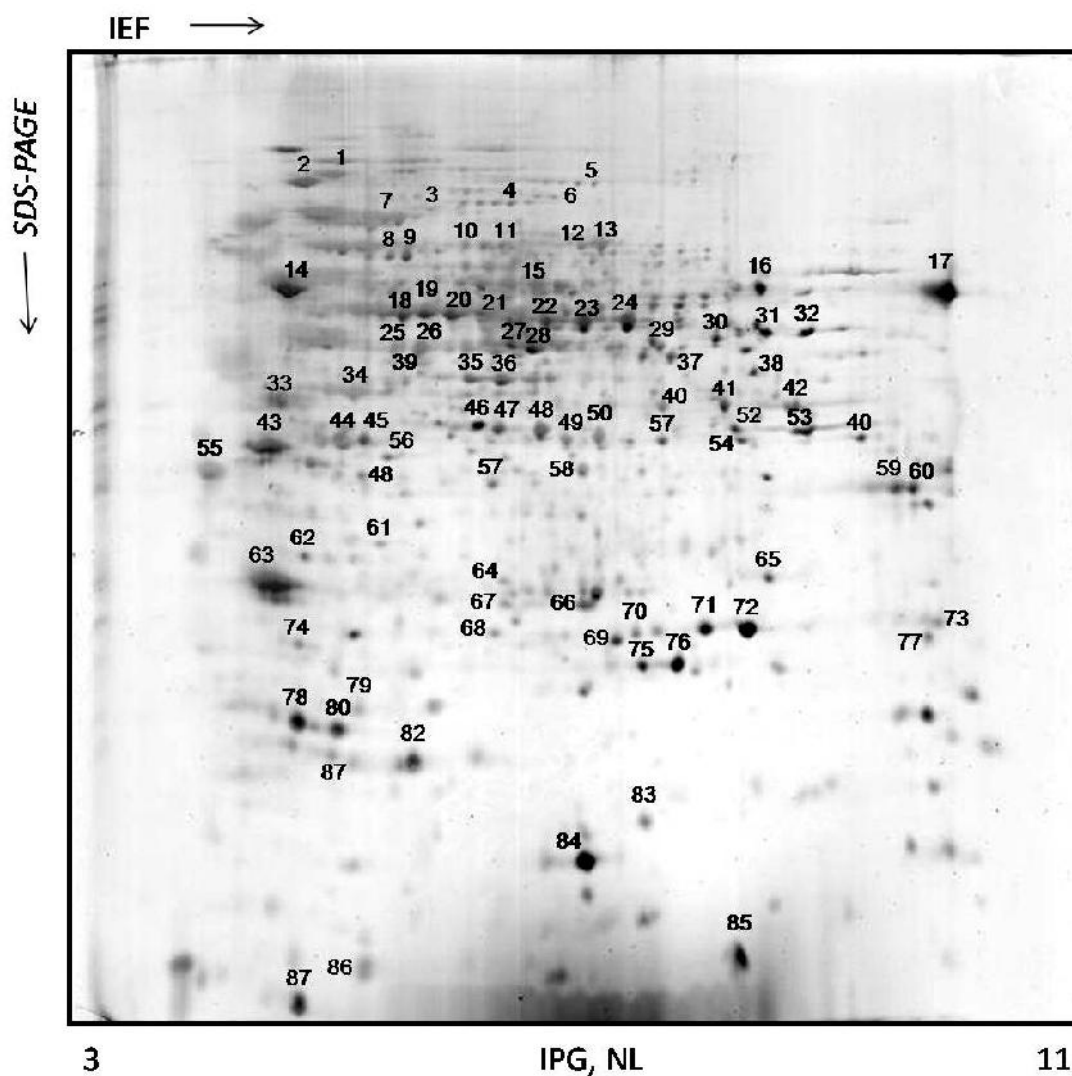


Figura 15. Mapa bidimensional representativo do extrato de superfície H_{72h}. As proteínas identificadas encontram-se numeradas, e foram identificadas por *MS* ou *MS/MS*.

Tabela 3. Proteínas do extrato de superfície celular H_{72h} do *A. fumigatus* identificadas por MS/MS.

Spot	NºAcesso^a	ORF	pl / peso molecular teórico (kDa)	pl experimental	Nº peptídeos	Taxa Cobertura (%)	Proteína
1	B0XR33	AFUB_012080	5,08/80	5,1	6	13	Hsp88
2	B0Y324	AFUB_052690	4,95/ 80,6	4,95	7	15	Mod-E/Hsp90/Hsp1
3	Q4X1H5	AFUA_2G09960	6,02/ 72	5,19	5	11	Ssc70
4	Q4WCM2	AFUA_8G03930	5,30/67	5,13	6	19	HscA
5	Q4WLN1	AFUA_6G12930	6,10/85	5,78	4	8	Aconitato hidratase, mitocondrial
6	Q4WX09	AFUA_3G07810	6,50/71	5,72	6	14	Succinato desidrogenase
7	Q4WCM2	AFUA_8G03930	5,30/66,93	5,28	5	15	HscA
8	Q4WGP1	AFUA_7G05720	6,25/52	5,3	4	14	Complexo piruvato desidrogenase
9	Q4WGP1	AFUA_7G05720	6,25/52	5,38	5	19	Complexo piruvato desidrogenase

Tabela 3. Continuação.

10	Q4WXF1	AFUA_3G09290	5,44/57,4	5,37	3	7	Fosfoglicerato mutase
11	Q4WN39	AFUA_6G07720	5,79/66,7	5,52	3	8	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
12	P20359	AN6542	5,23/41,6	5,77	2	7	Actina, gama (<i>A. nidulans</i>)
13	Q4WXX9	AFUA_3G11070	6,08/62,9	5,85	5	12	PdcA
14	Q4WV25	AFUA_5G10550	5,30/55,58	4,85	4	20	ATP sintase F1,sub beta
15	Q4WGH6	AFUA_7G05070	5,70/51,2	5,58	3	8	Oxirredutase dependente de FAD
16	Q4WTZ9	AFUA_5G06680	8,86/55,17	7,78	3	13	Transaminase GatA
17	Q4WJD2	AFUA_1G06390	9,19/53,80	10,28	4	20	Fator de alongamento1-alfa
18	Q6MY69	AfA33H4.125c	5,90/53,23	5,37	7	24	Peptidase processadora mitocondrial, sub beta
19	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	5,45	4	20	Enolase
20	Q96X30	AFUA_6G06770	5,39/47,27	5,54	4	23	Enolase
21	B0Y5K4	AFUB_063700	5,79/49,3	5,52	4	13	Glutamato/Leucina/ Fenialanina/ Valina desidrogenase

Tabela 3. Continuação.

22	Q4WT69	AFUA_1G10350	6,31/44,73	5,87	5	15	Fosfoglicerato quinase
23	Q4WT69	AFUA_1G10350	6,31/44,73	6,02	7	25	Fosfoglicerato quinase
24	Q4WT69	AFUA_1G10350	6,31/44,73	6,22	6	19	Fosfoglicerato quinase
25	Q4WDH2	AFUA_6G04740	5,87/ 43,9	5,22	3	11	Actina Act1
26	Q4WDH2	AFUA_6G04740	5,87/ 43,9	5,30	5	14	Actina Act1
27	Q4W9X3	AFUA_4G03410	5,72/45,58	5,74	4	32	Flavohemoproteína
28	Q8TGG6	AFUA_1G12170	6,70/48,25	5,82	3	22	Fator de alongamento Tu
29	Q4WEU3	AFUA_5G04210	8,89/48,06	6,37	4	18	Complexo redutase ubiquinol-cit C
30	Q4WEU3	AFUA_5G04210	8,89/48,06	7,03	4	18	Complexo redutase ubiquinol-cit C
31	Q4WEU5	AFUA_5G04230	8,69/52,07	7,86	5	15	Citrato sintase
32	Q4WEU5	AFUA_5G04230	8,69/52,07	8,44	3	8	Citrato sintase
33	Q4WVI1	AFUA_5G12180	4,93/27,62	4,81	2	18	GAP1 Ran específica
34	Q4WTX0	AFUA_5G06390	5,02/ 36,8	5,09	2	10	Adenosina quinase
35	Q4WY39	AFUA_3G11690	5,55/39,76	5,6	4	25	Frutose bifosfato aldolase,

Tabela 3. Continuação.

							II
36	Q4WY39	AFUA_3G11690	5,55/39,76	5,7	2	10	Frutose bifosfato aldolase, II
37	Q4WDJ0	AFUA_6G04920	8,42/45,71	6,54	5	17	Acia/Fdh
39	Q4WQK3	AFUA_4G13120	5,48/ 39,9	5,31	1	4	Glutamina sintetase
40	Q4WE70	AFUA_5G01970	6,96/36,29	6,44	3	13	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
41	Q4WE70	AFUA_5G01970	6,96/36,29	7,19	4	18	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
42	Q4WE70	AFUA_5G01970	6,96/36,29	8,27	3	13	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
43	B0YD68	AFUB_094480	4,85/21,95	4,46	2	12	NAC
44	Q4WX65	AFUA_3G08380	7,63/43,59	5,11	4	22	Difosfatase inorgânica
45	Q4WJR3	AFUA_1G05080	5,11/33,47	5,22	3	16	P0 proteína ribossomal 60S
46	Q4WUP8	AFUA_5G09230	6,04/35,42	5,63	2	7	Transaldolase
47	Q4WUP8	AFUA_5G09230	6,04/35,42	5,7	4	20	Transaldolase
48	Q4WUP8	AFUA_5G09230	6,04/35,42	5,87	4	25	Transaldolase

Tabela 3. Continuação.

49	Q4X1G7	AFUA_2G10030	5,93/28,24	5,96	2	11	VIP1
50	Q4WQK8	AFUA_4G13170	6,06/34,95	6,09	6	32	CpcB
51	Q4WDM0	AFUA_6G05210	6,77/34,78	6,44	3	23	Malato desidrogenase, NAD dependente
52	Q4WDM0	AFUA_6G05210	6,77/34,78	7,36	5	36	Malato desidrogenase, NAD dependente
53	Q4WDM0	AFUA_6G05210	6,77/34,78	8,49	5	40	Malato desidrogenase, NAD dependente
54	Q4WDM0	AFUA_6G05210	6,77/34,78	7,46	4	30	Malato desidrogenase, NAD dependente
55	Q4WSY6	AFUA_1G11190	4,42/25,23	4,26	4	51	Fator de alongamento1, eucariótico, sub beta
56	Q6MYD1	AFUA_1G13490	5,33/33,42	5,3	3	13	Espermidina sintase
57	Q4WPF8	AFUA_4G09110	8,64/40,35	5,67	3	18	Ccp1
58	Q4WK69	AFUA_1G03510	8,31/32,35	6,03	4	42	ATP sintase, gama
59	A1CXT7	NFIA_109330	8,99/30	9,91	5	32	Porina de membrana externa mitocondrial (<i>Neosartorya fisheri</i>)

Tabela 3. Continuação.

60	A1CXT7	NFIA_109330	8,99/30	10,1	5	32	Porina de membrana externa mitocondrial (<i>N. fisheri</i>)
61	Q4WDU8	AFUA_5G00720	5,23/29,04	5,27	2	20	Acetiltransferase família GNAT
62	Q4WHD2	AFUA_2G05820	4,97/23,35	4,94	2	23	Riboflavina quinase
63	Q4WW75	AFUA_5G14680	4,82/25,42	4,75	4	48	Proteína não caracterizada
64	Q4WV5	AFUA_5G13450	5,83/28,05	5,7	5	29	Triosefosfato isomerase
65	Q4WUL0	AFUA_5G08830	8,83/61,36	7,91	3	8	HexA
66	Q4WV31	AFUA_5G10610	9,20/32,58	6,03	4	26	Redutase ubiquinol-cit c, sub ferro-enxofre
67	Q4WYW9	AFUA_3G14540	6,09/20,45	5,7	4	42	Hsp30/Hsp42
68	Q4WCF1	AFUA_8G04650	5,57/21,69	5,68	4	28	HAD-1
69	Q4WD80	AFUA_6G03810	9,11/28,67	6,17	4	31	ATP sintase, D
70	Q4WC76	AFUA_8G05440	9,36/29,70	6,28	4	19	ATPase MIT, sub ATP4
71	B0XMT3	AFUB_014080	7,29/23,4	6,89	3	22	Superóxido dismutase
72	B0XMT3	AFUB_014080	7,29/23,4	7,51	1	6	Superóxido dismutase
73	Q4WRU9	AFUA_1G15020	9,35/25,71	10,2	2	9	S5 proteína ribossomal40S

Tabela 3. Continuação.

74	Q4WZW7	AFUA_2G15510	4,91/18,16	4,91	3	50	Proteína de domínio DUF866
75	Q4WQ18	AFUA_4G11250	8,62/30,8	6,31	4	32	Anidrase carbônica Nce103
76	Q4WQ18	AFUA_4G11250	8,62/30,8	6,56	4	28	Anidrase carbônica Nce103
77	Q4X0T1	AFUA_2G12400	9,65/24,37	10,2	2	11	ATP sintase
78	O43099	AFUA_6G02280	5,36/18,44	4,89	4	34	Peroxiredoxina pmp20/ Aspf3
79	Q4WK14	AFUA_1G04070	5,58/21,15	5,18	2	28	Fator de iniciação eucariótico eIF-5A
80	O43099	AFUA_6G02280	5,36/18,44	5,09	3	24	Peroxiredoxina pmp20/ Aspf3
81	Q4WYM9	AFUA_3G13620	4,87/13,96	5,08	2	41	Proteína de domínio <i>cupin</i>
82	Q4WV27	AFUA_5G10570	5,47/17,01	5,39	3	35	Cofilina
83	Q4WWI8	AFUA_3G06030	6,04/16,38	6,32	1	19	Proteína carreadora de ubiquitina
84	Q4WUQ8	AFUA_5G09330	5,84/15,04	6,04	3	31	CipC
85	Q4WLV6	AFUA_6G12170	6,56/12,12	7,46	3	55	FKBP PPIase

Tabela 3. Continuação.

86	Q4WA10	AFUA_4G03050	5,87/14,48	5,21	2	30	Profilina
87	Q4WV97	AFUA_5G11320	5,14/11,96	4,9	3	40	Tioredoxina

a Número de acesso do banco de dados *NCBI blast* do *A. fumigatus* (<http://www.expasy.org/tools/blast/>)

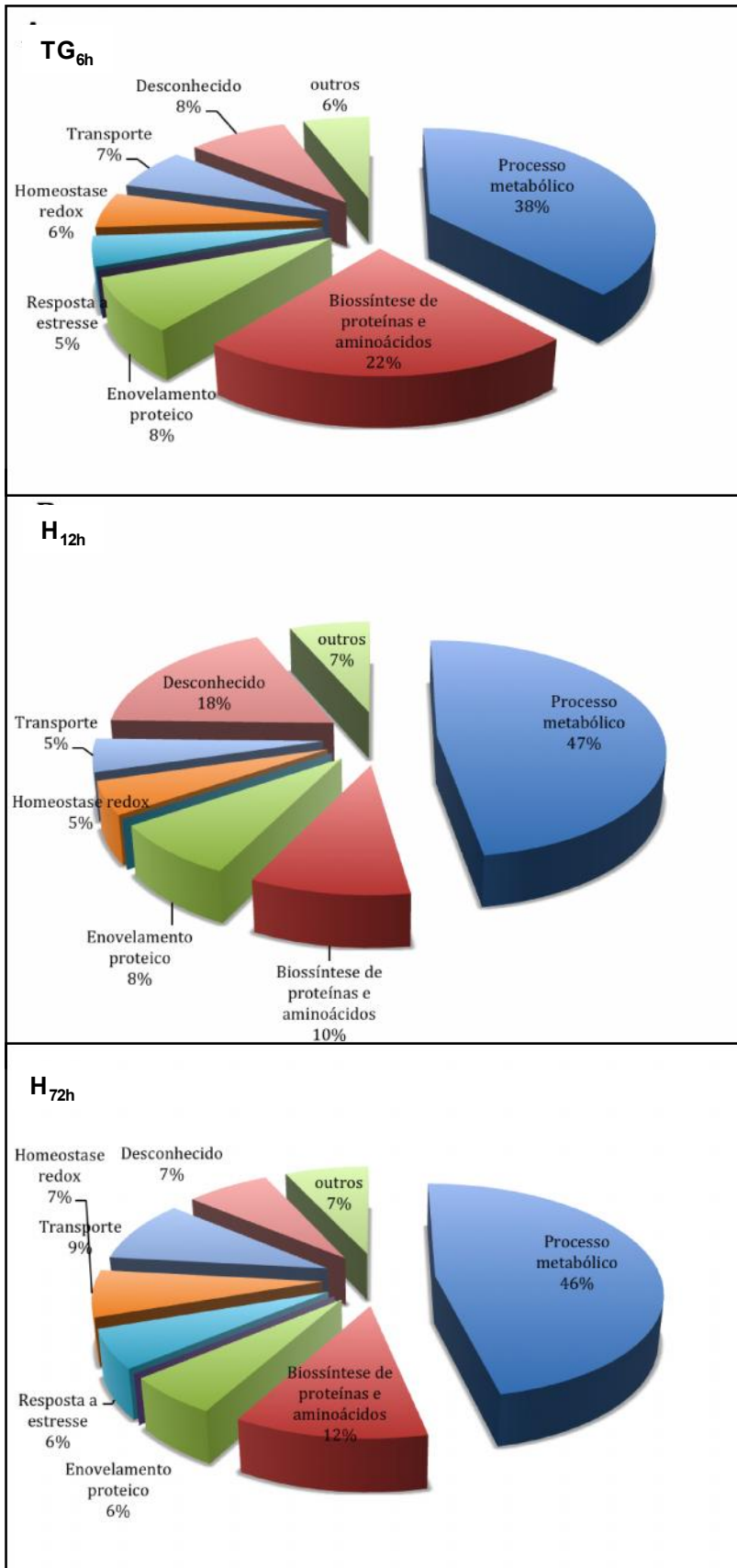


Figura 16. Classificação funcional de todas as proteínas identificadas nos extratos de superfície celular do *A. fumigatus* nos três estágios de filamentação.

4.6 – Expressão diferencial de proteínas de TG_{6h} e H_{72h}

A revelação por prata é um método que possui um baixo intervalo dinâmico linear (menor que uma ordem de magnitude) e, além disso, não possui um ponto terminal de saturação, com isso os géis revelados por esta técnica perdem em reprodutibilidade e não podem ser utilizados em estudos quantitativos. Portanto, com o objetivo de realizar uma análise comparativa entre as proteínas expressas na fase de germinação (TG_{6h}) e na hifa (H_{72h}) utilizamos a técnica de DIGE.

A abordagem por DIGE possui alta sensibilidade e, por isso, foi aplicada para este estudo quantitativo entre os dois morfotipos. Esta técnica usa corantes fluorescentes espectralmente distintos (Cy2, Cy3 e Cy5), permitindo a mistura de amostras em um mesmo gel bidimensional. A técnica de DIGE resolve antigos problemas associados à eletroforese bidimensional convencional, como variação de gel para gel e intervalo dinâmico limitado, permitindo a obtenção de resultados mais acurados e sensíveis.

Nesta etapa do estudo, foram utilizadas quatro réplicas biológicas para cada condição experimental. As amostras de TG_{6h} e H_{72h} foram marcadas com Cy3 ou Cy5 alternadamente, utilizando-se o protocolo de *dye swap* para evitar interferências derivadas da eficiência da marcação por cada fluorocromo. A figura 15 mostra um gel representativo com a marcação de TG_{6h} por Cy3 e H_{72h} por Cy5 e a correspondente imagem de sobreposição das marcações. O corante Cy2 foi usado para marcação dos padrões internos, constituído pelo *pool* de quantidades iguais das amostras totais empregadas nesta análise (figura 15). Foram detectados uma média de 992 *spots* em ambos os morfotipos (marcação Cy2) e destes, 600 foram pareados. Esta diferença entre detectados e pareados deve-se ao fato de que o módulo DIA detecta artefatos. Este e os demais módulos de análise do programa DeCyder encontram-se detalhados em metodologia.

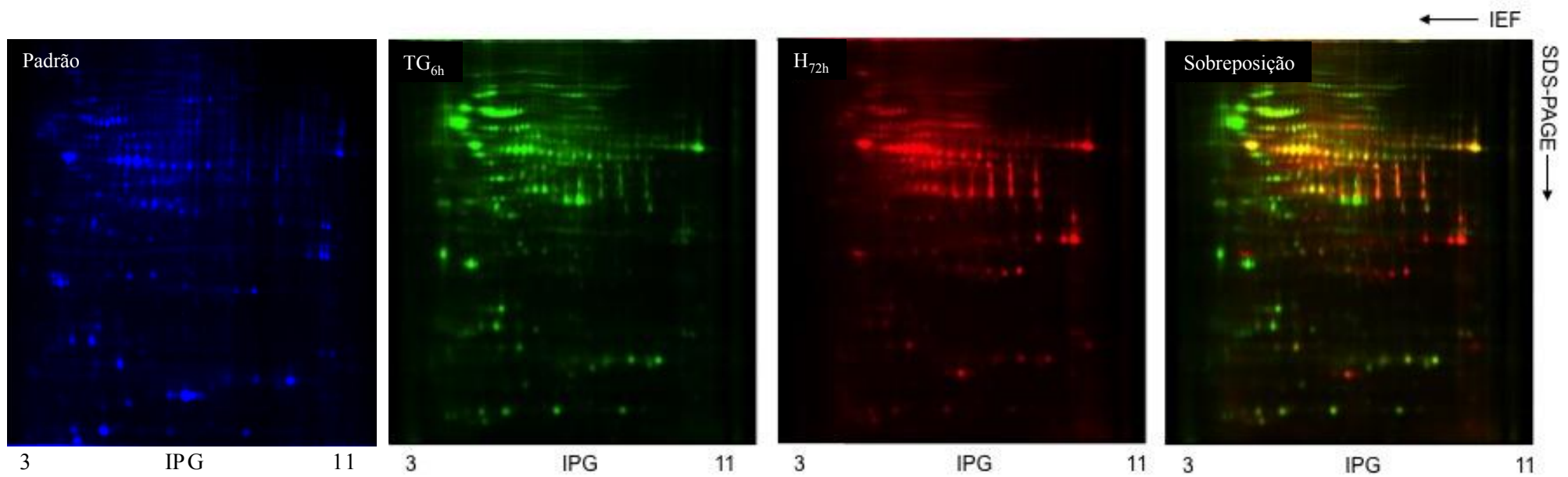


Figura 17. 2D-DIGE dos extratos de superfície celular dos morfotipos TG_{6h} e H_{72h}, de *A. fumigatus*. Neste experimento: O extrato TG_{6h} foi marcado com Cy3 (verde), e o extrato H_{72h} foi marcado com Cy5 (vermelho). O padrão interno foi marcado com Cy2 (azul). A imagem da sobreposição foi formada pelos mapas das proteínas marcadas com Cy3 e Cy5.

Aplicando uma taxa de abundância diferencial $\geq 1,5$ vezes ($p \leq 0,05$), detectamos 296 *spots*. Destes, foram selecionados para identificação apenas aqueles com variação no padrão de expressão de pelo menos 2,0 vezes ($p \leq 0,05$). Seguindo este critério, 210 *spots* foram considerados diferencialmente expressos entre os morfotipos estudados sendo que TG_{6h} apresentou 127 *spots* com expressão aumentada e 83 com supressão de expressão em relação a H_{72h}. Considerando que na análise por DIGE aquelas proteínas que apresentarem uma diferença de expressão de pelo menos 10 vezes são consideradas exclusivas de um morfotipo, três *spots* foram encontrados exclusivamente em TG_{6h} e oito em H_{72h}.

4.7- Análise multivariada dos géis de DIGE

O *DeCyder* possui um módulo estatístico avançado que permite o agrupamento de dados e de fontes de variações experimentais, o módulo *Extended Data Analysis* (EDA). Nesta análise complementar, além da variação de no mínimo 1,5 vezes ($p \leq 0,05$) na expressão, os *spots* diferenciais deveriam ser detectados em pelo menos 80% dos mapas proteicos em uma mesma amostra biológica. Ainda neste módulo, o *Principal Component Analysis* (PCA) descreve a porcentagem da variância total dos dados, identificando fontes de variação dentro do *dataset*. No resultado do PCA (figura 16A), os dados mostram uma clara separação entre os mapas de TG_{6h} (quadrantes esquerda) e os mapas de H_{72h} (quadrantes da direita), assegurando alta reprodutibilidade entre as réplicas biológicas para cada condição. Além destas validações, realizamos a denominada *Hierarchical Clustering Analysis* (HCA). Os valores encontrados para os dois grupos experimentais foram agrupados e estão mostrados numa matriz de expressão (*heat maps*) (figura 16B) que usa uma escala logarítmica padronizada de abundância que varia de -1 (verde) a +1 (vermelha).

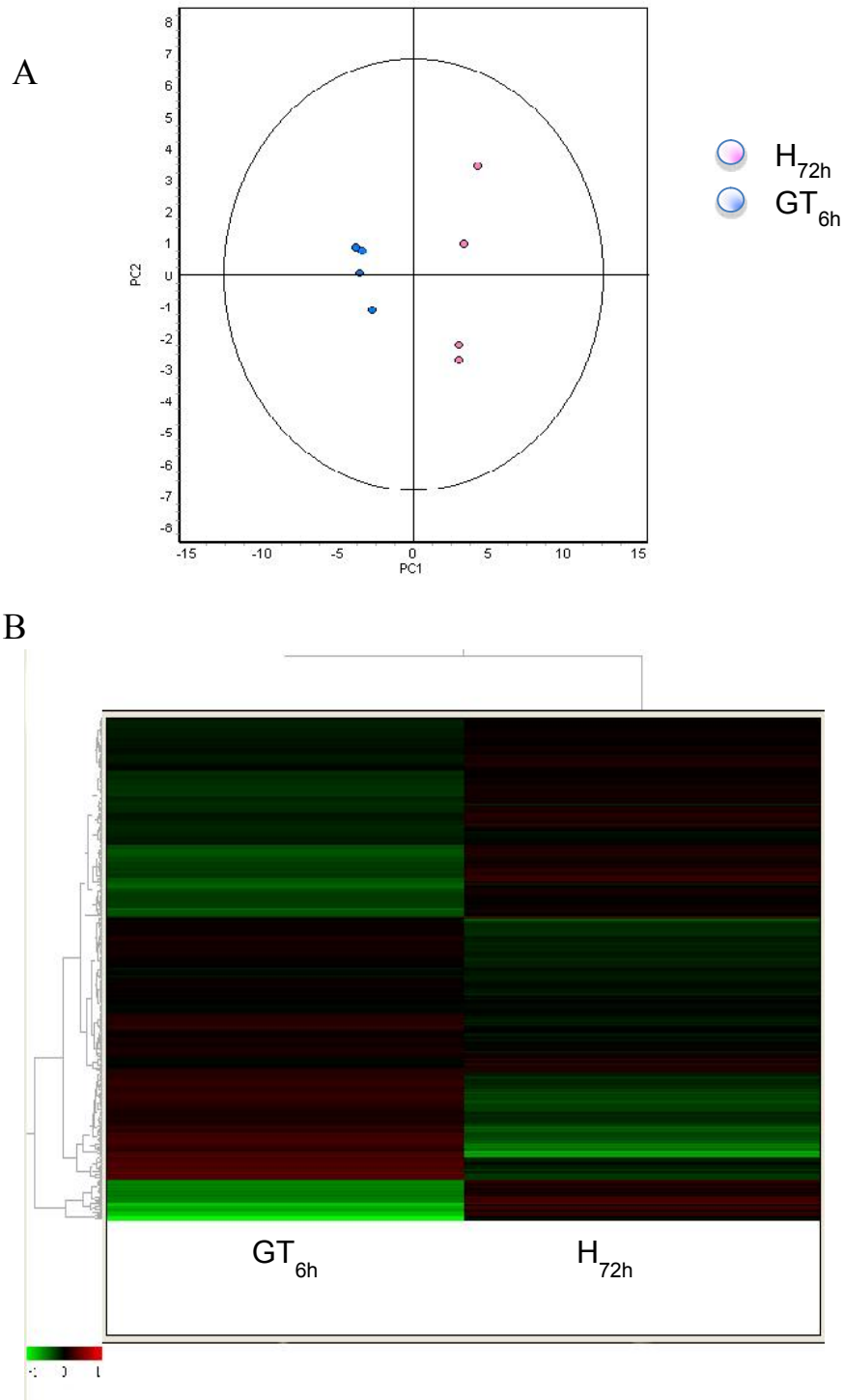


Figura 18. Análise estatística dos géis de 2D-DIGE (foram utilizadas quatro réplicas biológicas de cada morfotipo). Em (A) PCA mostrando o agrupamento de mapas individuais de DIGE e (B) HCA dos grupos experimentais. Está mostrado um dendrograma de proteínas individuais na esquerda com os valores de expressão relativos mostrados como um *heat map*.

4.8- Identificação de proteínas diferencialmente expressas entre TG_{6h} e H_{72h}

A identificação do número de *spots* diferencialmente expressos e validados como anteriormente descrito teve como fator limitante a necessidade de ser realizada a coloração dos géis de DIGE por *Coomassie* coloidal para ensaios de *MS/MS*. Desta forma, uma média de 70 *spots* foram cortados dos géis, submetidos à digestão trípica e os correspondentes peptídicos analisados por *MS* e/ou *MS/MS*. Foi possível a identificação de 63 *spots* correspondendo a 39 proteínas, já que para algumas destas foram identificadas múltiplas isoformas como indicado na figura 17 e Tabela 4.

A Tabela 4 mostra as proteínas identificadas com os respectivos números de acesso, taxa de abundância, e adicionalmente, a análise de dois bancos de dados especializados para sinal de secreção e predição de adesina, o *Fungal Secretome KnowledgeBase* (FunSecKB) e o FungalRV, respectivamente. Esta análise revelou que somente uma proteína típica de parede celular, a PhiA, apresentava sinal para secreção e, apenas duas proteínas identificadas, a enolase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ambas superexpressas na hifa (H_{72h}), foram identificadas como possíveis adesinas. Conforme será considerado na Discussão, uma sequência sinal pode não ser necessária para a localização de proteínas na superfície celular.

As proteínas identificadas neste estudo como presentes na superfície celular de *A. fumigatus* estão envolvidas em processos metabólicos, síntese de proteínas (tradução), endereçamento proteico, defesa, transporte, transdução de sinal e algumas ainda sem função caracterizada.

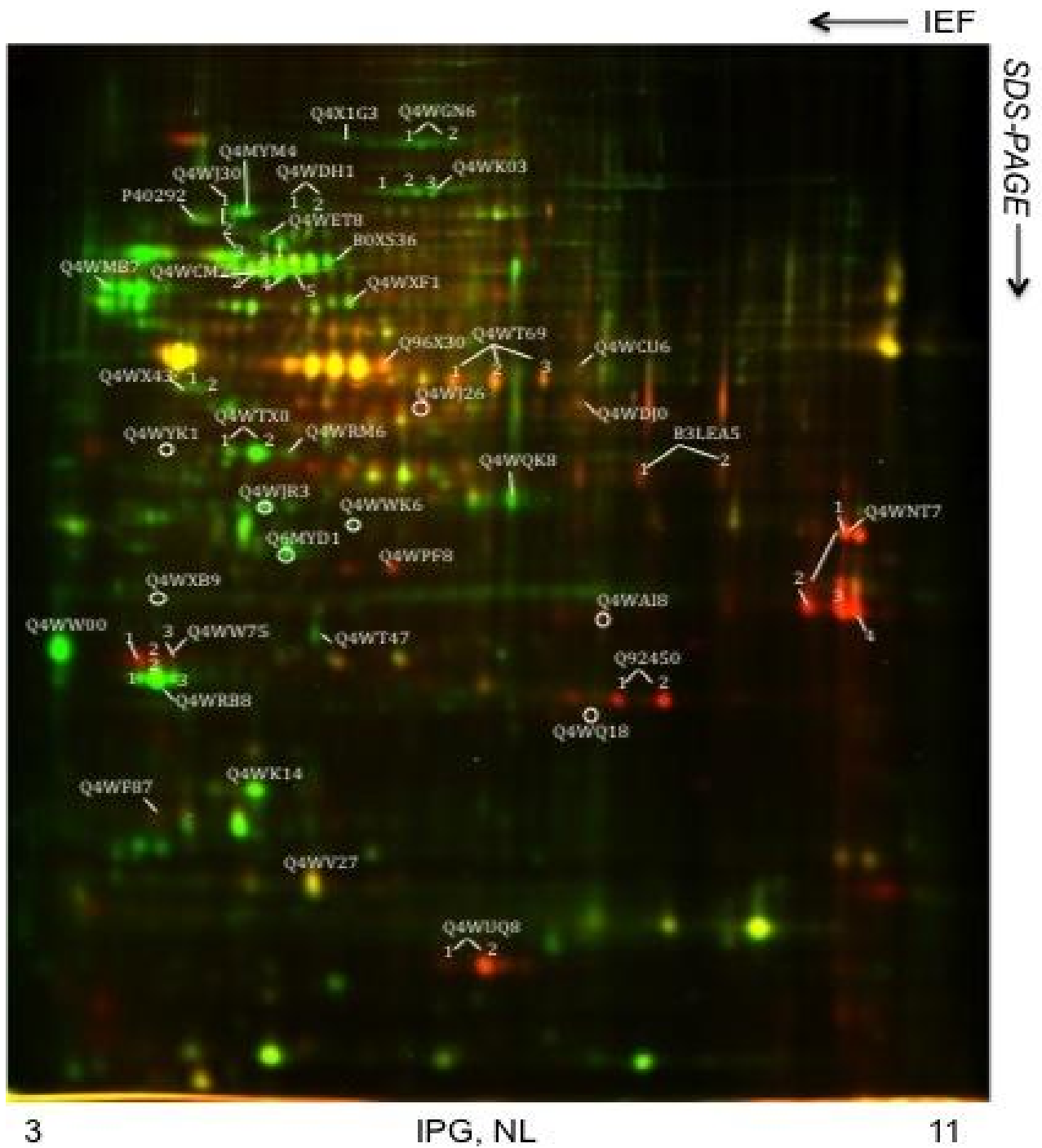


Figura 19. Imagem da sobreposição de um gel preparativo de *DIGE* onde as proteínas identificadas estão marcadas com o número de acesso (*UniprotKB*) e suas isoformas com algarismos arábicos.

Tabela 4. Proteínas identificadas na superfície celular de *A. fumigatus* nos morfotipos GT_{6h} e H_{72h}. Identificação por *MS* ou *MS/MS*.

Master (DeCyder)	Número acesso^a	ORF	Iso	pI/ peso molecular teórico (kDa)	Taxa Expressão (H_{72h}/TG_{6h})	% Cob	Proteína
54	Q4X1G3	AFUA_2G10070	---	5,87/129,7	-4,61	19	Carbamoil-fosfato sintase
44	Q4WGN6	AFUA_7G05660	1	5,84/118,5	-7,78	26	Fator de alongação eEF-3
55	Q4WGN6	AFUA_7G05660	2	5,84/118,5	-8,08	18	Fator de alongação eEF-3
125	Q4WK03	AFUA_1G04190	1	5,74/81,6	-7,38	30	Poliadenilato-ligante
127	Q4WK03	AFUA_1G04190	2	5,74/81,6	-8,61	39	Poliadenilato-ligante
128	Q4WK03	AFUA_1G04190	3	5,74/81,6	-8,16	36	Poliadenilato-ligante

Tabela 4. Continuação.

169	P40292	AFUA_5G04170	1	4,95/80,6	-2,47	26	Hsp90/Hsp1
153	Q4WJ30	AFUA_1G07440	1	5,09/69,8	-2,95	42	Chaperona molecular Hsp70
151	Q6MYM4	AfA5C5.047	---	5,08/80,3	4,06	43	Hsp70 chaperone Hsp88
143	Q4WDH1	AFUA_6G04730	1	5,31/86,9	-3,59	23	Bifuncional purina biosintética Ade1
149	Q4WDH1	AFUA_6G04730	2	5,31/86,9	-2,49	26	Bifuncional purina biosintética Ade1
173	Q4WJ30	AFUA_1G07440	2	5,09/69,8	-3,06	42	Chaperona molecular Hsp70
180	Q4WET8	AFUA_5G04160	---	5,12/57,0	-4,47	14	Domínio NTF2 e RRM
203	Q4WCM2	AFUA_8G03930	1	5,30/67,1	-2,70	44	Chaperona Hsp70 (HscA)

Tabela 4. Continuação.

232	Q4WJ30	AFUA_1G07440	3	5,09/69,8	-2,49	35	Chaperona molecular Hsp70
246	B0XS36	AFUB_025800	---	5,86/71,9	-2,42	49	Chaperona Hsp70 (Ssc70)
265	Q4WCM2	AFUA_8G03930	2	5,30/67,1	-3,63	43	Chaperona Hsp70 (HscA)
266	Q4WCM2	AFUA_8G03930	3	5,30/67,1	-4,09	41	Chaperona Hsp70 (HscA)
283	Q4WCM2	AFUA_8G03930	4	5,30/67,1	-4,00	39	Chaperona Hsp70 (HscA)
270	Q4WCM2	AFUA_8G03930	5	5,30/67,1	-5,01	49	Chaperona Hsp70 (HscA)
301	Q4WMB7	AFUA_6G10470	---	4,58/54,2	-5,58	34	<i>zinc finger</i> ZPR1
341	Q4WXF1	AFUA_3G09290	---	5,44/57,5	-2,15	30	Fosfoglicerato mutase, 2,3-bisfosfoglicerato- independente

Tabela 4. Continuação.

492	Q96X30	AFUA_6G06770	---	5,39/47,4	2,37	39	Enolase/alergeno Asp F 22 ^c
523	Q4WT69	AFUA_1G10350	1	6,31/44,8	2,49	37	Fosfoglicerato quinase PgkA
522	Q4WT69	AFUA_1G10350	2	6,31/44,8	3,58	45	Fosfoglicerato quinase PgkA
512	Q4WT69	AFUA_1G10350	3	6,31/44,8	3,76	58	Fosfoglicerato quinase PgkA
501	Q4WCU6	AFUA_6G02470	---	9,10/63,5	2,18	26	Fumarato hidratase
532	Q4WX43	AFUA_3G08160	1	5,06/45,9	-2,44	43	Fator 4 eucariótico de iniciação da tradução
535	Q4WX43	AFUA_3G08160	2	5,06/45,9	-2,00	56	Fator 4 eucariótico de iniciação da tradução
550	Q4WJ26	AFUA_1G07480	---	7,22/50,5	3,04	37	Coproporfirinogênio III
563	Q4WDJ0	AFUA_6G04920	---	8,42/46,0	3,95	53	NAD-dependente Formate desidrogenase AciA/Fdh
609	Q4WYK1	AFUA_3G13320	---	4,81/32,3	-2,01	62	S0 proteína ribossomal

Tabela 4. Continuação.

605	Q4WTX0	AFUA_5G06390	1	5,02/37,3	-2,12	42	Adenosina quinase
610	Q4WTX0	AFUA_5G06390	2	5,02/37,3	-2,94	42	Adenosina quinase
606	Q4WRM6	AFUA_1G15780	---	5,32/39,3	-2,06	53	3-isopropilmalato desidrogenase Leu2A
679	Q4WJR3	AFUA_1G05080	---	5,11/33,5	-4,72	61	P0 proteína ribossomal 60S
667	Q4WQK8	AFUA_4G13170	---	6,06/35,4	-2,08	79	Complexo Proteína-G subunidade beta CpcB
640	B3LEA5	AFUA_5G01970	1	7,66/36,6	2,83	60	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ^c
636	B3LEA5	AFUA_5G01970	2	7,66/36,6	2,49	52	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ^c
705	Q4WNT7	AFUA_4G06910	1	9,47/37,0	5,40	30	Porina de membrana externa mitocondrial

Tabela 4. Continuação.

696	Q4WWK6	AFUA_3G06210		5,51/33,3	-2,63	42	Fosforibosil- aminoimidazol- succinocarboxamida sintase
714	Q6MYD1	AfA34E6.060		5,33/33,8	-2,99	46	Espermidina sintase
728	Q4WPF8	AFUA_4G09110		8,64/40,5	4,59	48	Citocromo c peroxidase Ccp1
764	Q4WXB9	AFUA_3G08940		4,90/31,2	-2,39	65	Regulatória de proteassomo (RpnL)
786	Q4WAI8	AFUA_7G01460		10,54/28,3	3,47	31	S5 proteína ribossomal
776	Q4WNT7	AFUA_4G06910	2	9,47/37,0	5,94	26	Porina de membrana externa mitocondrial
777	Q4WNT7	AFUA_4G06910	3	9,47/37,0	5,06	39	Porina de membrana externa mitocondrial
783	Q4WNT7	AFUA_4G06910	4	9,47/37,0	5,51	33	Porina de membrana externa mitocondrial

Tabela 4. Continuação.

796	Q4WT47	AFUA_1G10570	---	5,48/25,8	-2,54	66	Glicerol-3-fosfato fosfatase (GppA)
808	Q4WW00	AFUA_5G13920	---	4,36/22,2	-11,39	60	Co-chaperona Hsp90 ligante (Sba1)
819	Q4WW75	AFUA_5G14680	1	4,82/25,5	10,68	52	Proteína conservada hipotética
820	Q4WW75	AFUA_5G14680	2	4,82/25,5	4,02	83	Proteína conservada hipotética
817	Q4WW75	AFUA_5G14680	3	4,82/25,5	2,92	63	Proteína conservada hipotética
828	Q4WW75	AFUA_5G14680	4	4,82/25,5	-2,58	47	Proteína conservada hipotética
832	Q4WRB8	AFUA_1G16840	1	4,82/20,3	-3,31	51	Família TCTP
833	Q4WRB8	AFUA_1G16840	2	4,82/20,3	-2,81	26	Família TCTP

Tabela 4. Continuação.

849	Q92450	AFUA_1G14550	1	7,14/23,4	8,92	41	Mn superóxido dismutase MnSOD
851	Q92450	AFUA_1G14550	2	7,14/23,4	9,67	34	Mn superóxido dismutase MnSOD
865	Q4WQ18	AFUA_4G11250	---	8,62/30,8	8,26	32	Anidrase carbônica Nce 103
893	Q4WK14	AFUA_1G04070	---	5,58/21,5	-2,25	34	Factor eIF-5A eucariótico iniciação de tradução
900	Q4WF87	AFUA_3G03060	---	5,20/19,7	2,28	65	PhiA de parede celular ^b
925	Q4WV27	AFUA_5G10570	---	5,47/17,1	2,58	73	Cofilina
963	Q4WUQ8	AFUA_5G09330	1	5,84/15,0	21,92	96	CipC-like
967	Q4WUQ8	AFUA_5G0933	2	5,84/15,0	28,08	70	CipC-like

(a) Número de acesso do banco de dados *NCBI blast* do *A. fumigatus* (<http://www.expasy.org/tools/blast/>); (b) *Fungal Secretome Knowledge Base (FunSecKB)*; (c) *FungalRV* (<http://fungalrv.igib.res.in/query.php>)

Os processos e funções biológicas foram analisados utilizando-se primeiramente a informação do *Gene Ontology* (GO) disponível no UniProtKB e, complementarmente, descrições da literatura. A figura 18 mostra o gráfico de distribuição das proteínas de acordo com sua função biológica para os dois morfotipos de *A. fumigatus*. Na comparação entre eles observa-se que proteínas associadas com síntese proteica ou com múltiplas funções foram superexpressas em TG_{6h}. Esses achados reforçam a hipótese de que em estágios iniciais do desenvolvimento deste patógeno há um aumento nas vias ligadas ao crescimento celular.

A figura 19 mostra alguns gráficos 3D ilustrando proteínas com diferença de abundância relativa entre os morfotipos - módulo *BVA* do *DeCyder*. Destacamos uma proteína, o fator de alongação da tradução eEF-3, que apresentou expressão aumentada em oito vezes no TG_{6h}, sendo descrita em fungos e não em mamíferos. A proteína *CipC-like*, apresentou valores de expressão aumentada em 28 vezes, sendo portanto considerada como exclusivamente expressa na fase de hifa madura (H_{72h}). Proteínas *CipC-like* ainda não têm função caracterizada. Outra diferença observada diz respeito a proteínas de resposta a *stress*. Enquanto para H_{72h} observou-se uma maior expressão de MnSOD, em TG_{6h} observou-se superexpressão de HSPs, ilustrada pela HSP90 (figura 19).

As proteínas mais abundantes encontradas na hifa madura correlacionaram-se predominantemente a processos metabólicos (figura 18, Tabela 4), sendo algumas delas consideradas proteínas *moonlighting*, envolvidas em processos de adesão e imunomodulação, como a enolase e a GAPDH. Outras classes de proteínas envolvidas em processos de transporte e, um grupo de proteínas com função ainda não caracterizada também foram encontradas superexpressas na hifa (Tabela 4).

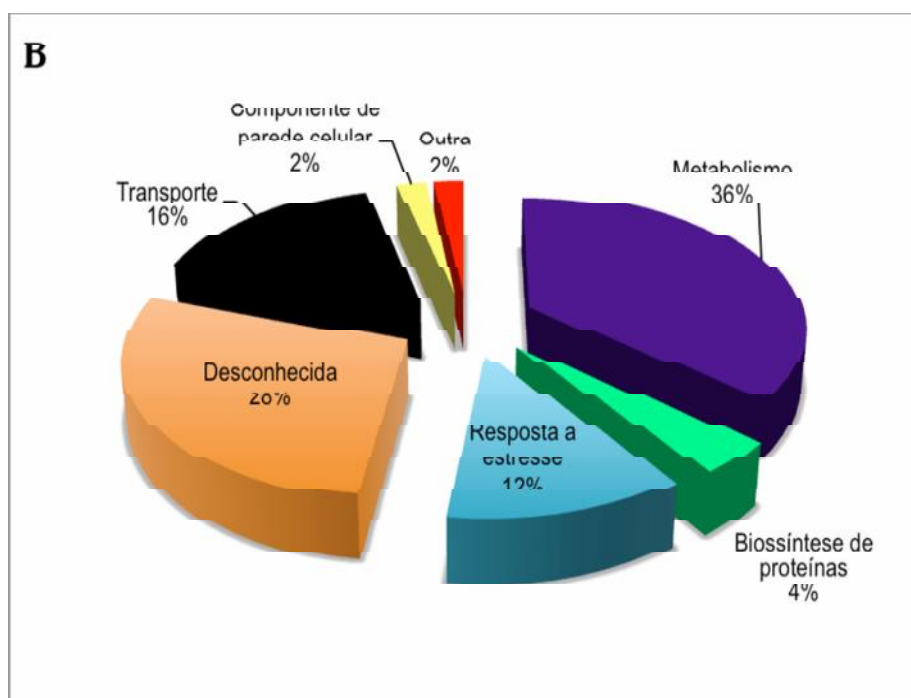
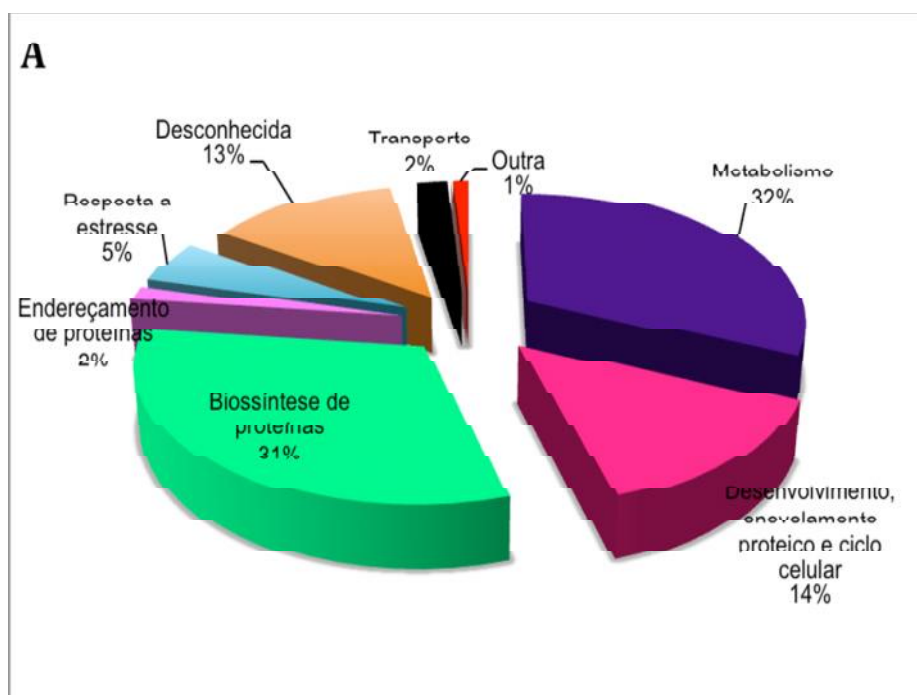
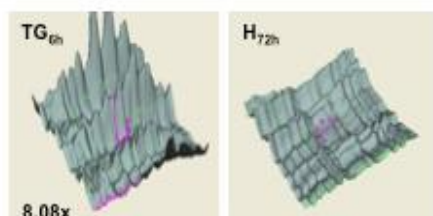
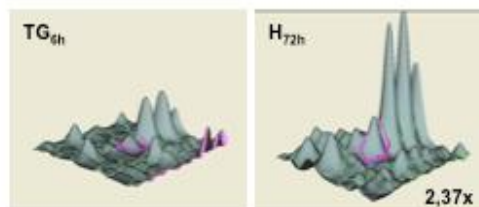


Figura 20. Classificação funcional das proteínas superexpressas identificadas nos extratos de superfície celular do *A. fumigatus* nos dois estágios de filamentação. (A) TG_{6h}; (B) H_{72h}.

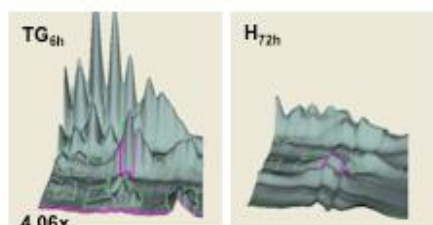
Fator de elongação traducional eEF-3



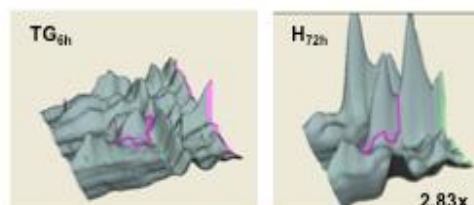
Enolase/alergeno Asp F 22



Alergeno Mod-E/Hsp90/Hsp1



Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase



Proteína de parede PhiA



CipC-like

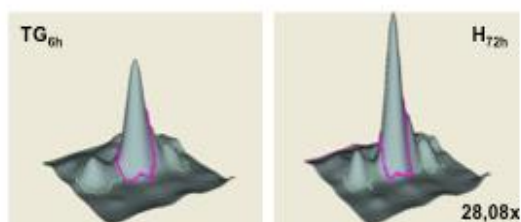


Figura 21. Gráfico 3D de quantificação relativa da abundância de proteínas. O nome da proteína está indicado acima de cada gráfico, e o morfotipo a que ele pertence também. Os valores da quantificação estão indicados na porção inferior do gráfico do morfotipo que apresentou superexpressão da proteína correspondente.

4.9 – Análise do secretoma do *A. fumigatus*

Uma vez que poucas proteínas com sinal de secreção foram encontradas na superfície celular de *A. fumigatus*, como descrito acima (Tabela 4), interessou-nos verificar se algumas destas proteínas eram encontradas no secretoma deste fungo. Paralelamente, comparamos o secretoma da cepa selvagem utilizada neste estudo (AF293) com o de uma cepa mutante com aparente deficiência na secreção de fatores de virulência já conhecidos, especificamente, proteases extracelulares.

Uma triagem preliminar do padrão de proteínas presentes no secretoma da cepa selvagem (AF293) e na cepa mutante $\Delta prtT$ foi realizada primeiramente por SDS-PAGE. O padrão de bandamento mostrou baixa complexidade do secretoma deste fungo. Neste experimento observou-se ainda a ausência de uma banda majoritária na cepa mutante, de cerca de 32 kDa, conforme ilustra a figura 20. Os pesos moleculares (PM) experimentais, referentes às bandas indicadas na figura, foram calculados pelo *software* de análise de imagem *ImageMaster 2D Platinum* com base no padrão de peso molecular *Full Range Rainbow Molecular*.

Algumas das proteínas fracionadas no SDS-PAGE foram identificadas. Neste caso foi utilizada a seguinte estratégia: (1) corte das bandas (figura 20, caracteres negros) ou de segmentos dos géis (figura 20, caracteres brancos). O procedimento 2 foi adotado garantir a análise de proteínas minoritárias ou que não são bem coradas pelo *Coomassie*. Os resultados da identificação das proteínas apresentados na Tabela 5 revelou que uma serino protease alcalina, ALP1 estava ausente no secretoma da cepa mutante $\Delta prtT$.

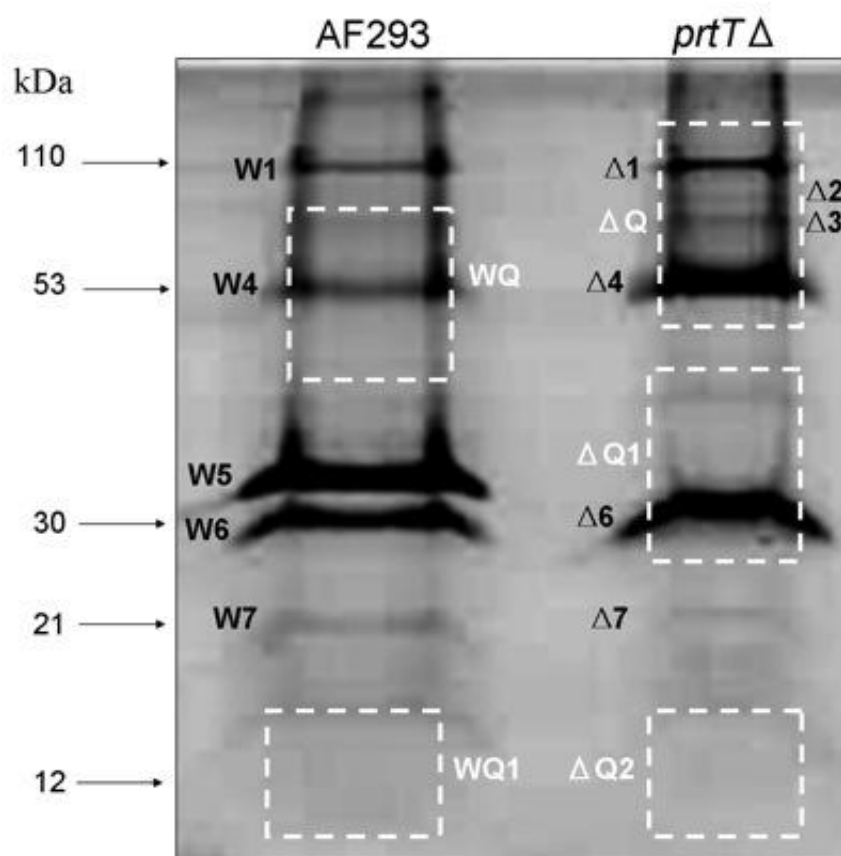


Figura 22. SDS-PAGE 12% de proteínas secretadas das cepas AF293 and *ΔprtT*. Bandas e quadrantes foram cortados dos géis e estão indicadas por caracteres negros e brancos, respectivamente. Gel corado por *Coomassie* coloidal.

Tabela 5. Proteínas do secretoma de uma cepa selvagem (AF293) e uma mutante ($\Delta prtT$) identificadas por *MS* ou *MS/MS*. Proteínas obtidas a partir de géis unidimensionais.

1-DE banda ou quadrante	Número de Acesso ^a	ORF	Proteína	Sinal para secreção ^b
WT1/ Δ 1	P0C959	AFUA_2G09030	Dipeptidil peptidase secretada Dpp V	S
Δ 3	Q5VJG7	AFUB_020580	Carboxipeptidase (Sxa2)	S
W4/ Δ 4/WQ/ Δ Q	Q4WFW0	AFUA_3G00840	Oxigenase FAD-dependente	S
W4/ Δ 4/WQ/ Δ Q	Q4WFW0	AFUA_3G00840	Oxigenase FAD-dependente	S
Δ 2	Q4WSV9	AFUA_1G11460	1,3-beta-glucanosiltransferase Bgt1	S
WQ/ Δ Q	Q4WG16	AFUA_3G00270	Beta-1,3-endoglucanase GPI-ancorada EglC	S
W5	P28296	AFUB_068800	Serino protease alcalina Alp1	S
W6/ Δ 6	Q9Y760	---	Quitosanase	---
W7/ Δ 7	Q4W9T1	AFUA_4G03830	Proteína hipotética conservada	S
Δ Q1	Q4W930	AFUA_6G00770	Arabinanase extracelular	S ^c
WQ1/ Δ Q2	P67875	AFUA_5G02330	Antígeno 18-kDa (ribonuclease mitogilina)	S
Δ Q1	Q4WK08	AFUA_1G04130	Proteína de repetição FG – GAP	S
Δ Q2	Q4W8X0	AFUA_6G00180	Proteína não caracterizada	N

- (a) Número de acesso do banco de dados *NCBI blast* do *A. fumigatus* (<http://www.expasy.org/tools/blast/>); (b) *Fungal Secretome Knowledge Base (FunSecKB)*; (c) Proteína identificada com somente um peptídeo

4.10 – Análise do secretoma do *A. fumigatus* por 2D-DIGE

Para verificar com precisão quais proteínas estavam presentes no secretoma do *A. fumigatus*, se havia isoformas presentes e/ou as diferenças na expressão proteica entre o secretoma da cepa selvagem e da mutante $\Delta prtT$, foi utilizada a técnica de DIGE. Foram utilizadas quatro réplicas biológicas de cada cepa, selvagem e mutante, seguindo a estratégia de *dye-swap* para marcação com Cy3 ou Cy5. Na figura 21 podemos observar um gel de referência para a cepa selvagem, para a mutante e a sobreposição das imagens destes dois mapas. O padrão interno, constituído do *pool* de todas as amostras utilizadas foi marcado com Cy2 (figura 21). A análise pelo software *DeCyder* foi aplicada de forma idêntica à anteriormente descrita para os extratos de superfície. A detecção automática de spots pelo *DIA* mostrou uma média de 480 *spots*, dentre os quais apenas 94 foram validados no módulo *BVA*. A validação dos spots seguiu o critério de variação na expressão de no mínimo 1,5 vezes ($p \leq 0,05$). Segundo esta análise, 63,8% do total de proteínas diferencialmente expressas encontravam-se superexpressas no secretoma da cepa mutante.

Cinquenta e seis *spots* foram cortados, tripsinizados e analisados por espectrometria de massa. Destes, apenas 23 spots foram identificados, correspondendo a 10 proteínas (Tabela 6). As proteínas identificadas são mostradas na figura 22, sendo representadas pelo número de acesso (*UniProtKB*) e as respectivas isoformas estão assinaladas por algarismos arábicos. Além disso, também foi realizada uma análise pelo *FunSecKB* (Tabela 6) sendo verificado, neste caso, que todas as proteínas apresentavam sinal de secreção.

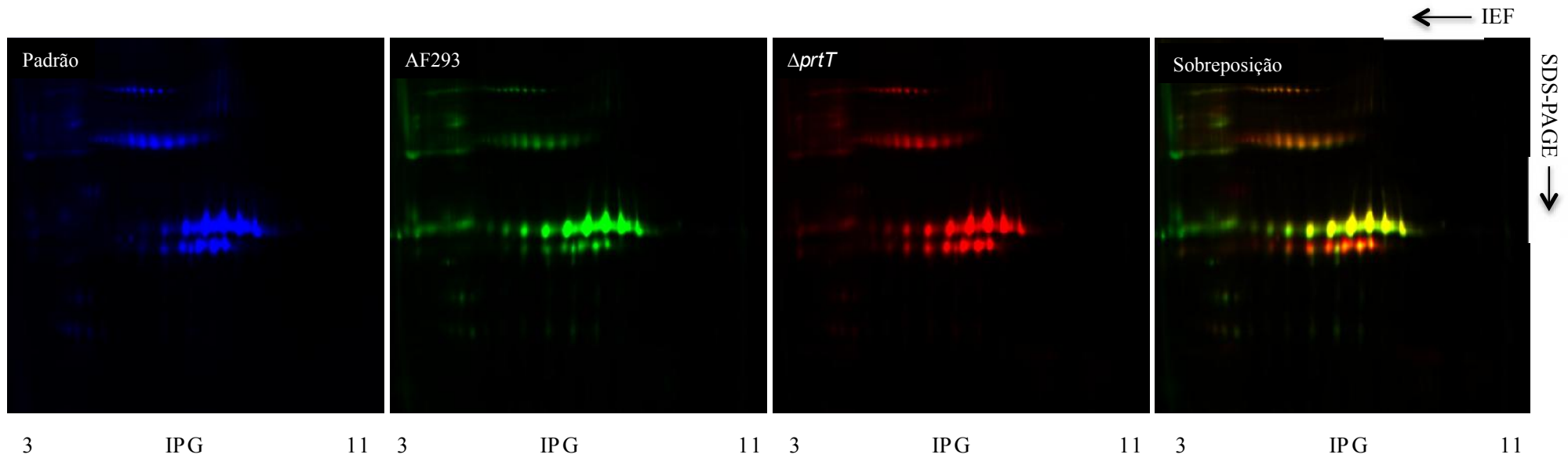


Figura 23. 2-D DIGE comparando o secretoma das cepas selvagem e $\Delta prtT$. Neste experimento o secretoma da AF293 foi marcado com Cy3 (verde) e o da mutante marcado com Cy5 (vermelho). A Sobreposição foi feita com as imagens de Cy3 e Cy5. O padrão está marcado com Cy2 (azul).

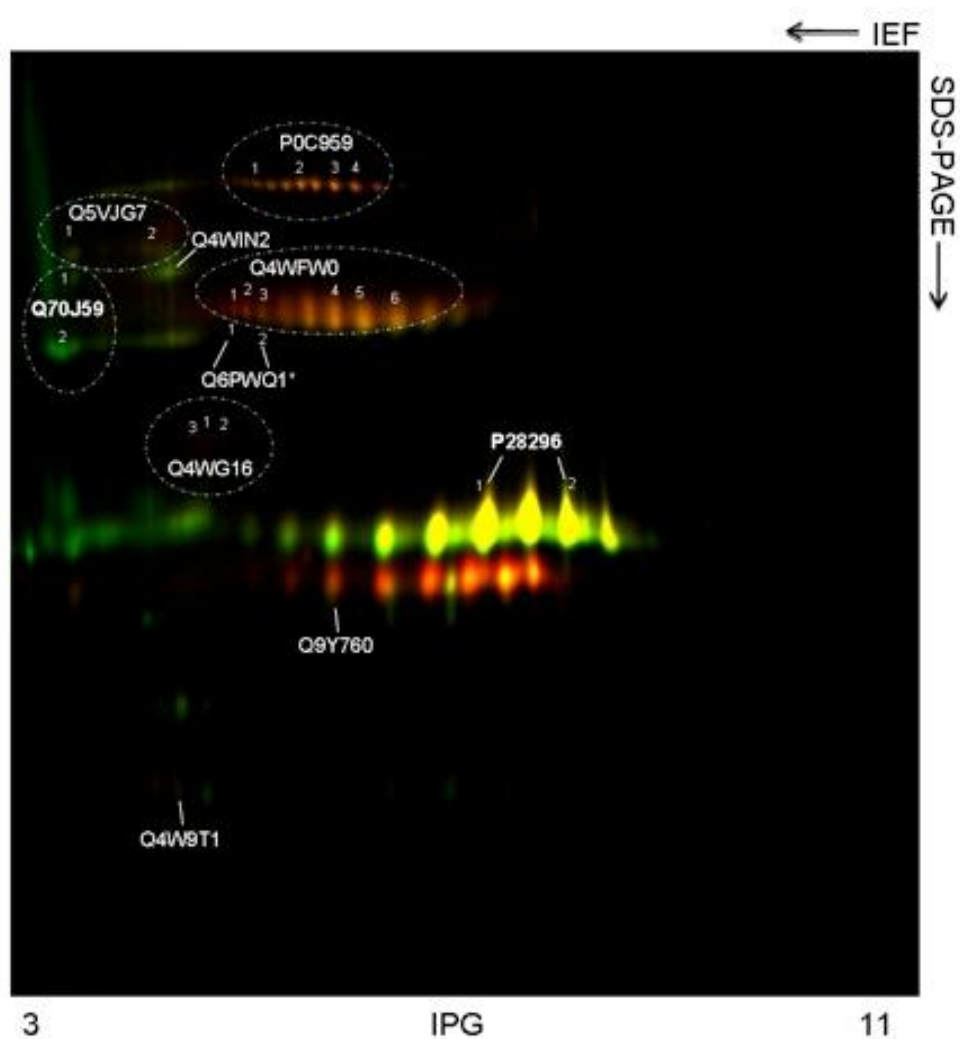


Figura 24. Gel representativo da sobreposição do secretoma das cepas selvagem e mutante ($\Delta prtT$) de *A. fumigatus*. Os spots identificados estão indicados pelo número de acesso da proteína (*UniprotKB*) e suas isoformas estão representadas por algarismos arábicos.

Tabela 6. Proteínas do secretoma de *A. fumigatus* identificadas por MS ou MS/MS. Proteínas extraídas de gel preparativo de DIGE.

Master (DeCyder)	Número Acesso ^a	Isoforma	ORF	<i>pI</i> / peso molecular teórico (kDa)	Taxa Expressão (Δ pT/WT)	Proteína	Signal para secreção ^b
32	P0C959	1	AFUA_2G09030	79,6/5,59	---	Dipeptidil peptidase secretada Dpp V	S
35	P0C959	2	AFUA_2G09030	79,6/5,59	---	Dipeptidil peptidase secretada Dpp V	S
30	P0C959	3	AFUA_2G09030	79,6/5,59	---	Dipeptidil peptidase secretada Dpp V	S
21	P0C959	4	AFUA_2G09030	79,6/5,58	---	Dipeptidil peptidase secretada Dpp V	S
94	Q5VJG7	1	AFUB_020580	59,7/4,77	---	Carboxipeptidase (Sxa2)	S
	Q70J59	1	AFUB_099560	65,7/5,3		Tripeptidil-peptidase (TppA)	S

Tabela 6. Continuação.

87	Q5VJG7	2	AFUB_020580	59,7/4,77	---	Carboxipeptidase (Sxa2)	S
110	Q4WIN2	--a	AFUA_2G01250	58,5/4,86	-1,95	Serine peptidase	S
168	Q6PWQ1	1	----	55,4/5,14	3,58	Mannosidase I	S
	Q4WFW0	1	AFUA_3G00840	54,9/6,52		Oxigenase FAD- dependente	S
163	Q4WFW0	2	AFUA_3G00840	54,9/6,52	2,67	Oxigenase FAD- dependente	S
164	Q4WFW0	3	AFUA_3G00840	54,9/6,52	3,09	Oxigenase FAD- dependente	S
	Q6PWQ1	2	----	55,4/5,14		Manosidase I	---
148	Q4WFW0	4	AFUA_3G00840	54,9/6,52	2,02	Oxigenase FAD- dependente	S
187	Q4WFW0	5	AFUA_3G00840	54,9/6,52	1,82	Oxigenase FAD- dependente	S
188	Q4WFW0	6	AFUA_3G00840	54,9/6,52	1,89	Oxigenase FAD- dependente	S
211	Q70J59	2	AFUB_099560	65,7/5,30	-5,23	Tripeptidil-peptidase (TppA)	S

Tabela 6. Continuação.

236	Q4WG16	1	AFUA_3G00270	44,6/4,90	2,96	Beta-1,3-endoglucanase GPI-ancorada EglC	S
	Q4WSV9	1	AFUA_1G11460	33/5,02		1,3-beta- glucanosiltransferase Bgt1	S
237	Q4WG16	2	AFUA_3G00270	44,6/4,90	5,13	Beta-1,3-endoglucanase GPI-ancorada EglC	S
231	Q4WG16	3	AFUA_3G00270	44,6/4,9	2,75	Beta-1,3-endoglucanase GPI-ancorada EglC	S
318	P28296	1	AFUB_068800	42,1/6,32	-3,48	Serino protease alcalina Alp1	S
334	P28296	2	AFUB_068800	42,1/6,32	-3,46	Serino protease alcalina Alp1	S
407	Q9Y760	--	----	21,5/5,76	2,34	Quitosanase	---
489	Q4W9T1	--	AFUA_4G03830	15,9/5,71	4,35	Proteína hipotética conservada	S

a) Número de acesso do banco de dados *NCBI blast* do *A. fumigatus* (<http://www.expasy.org/tools/blast/>); (b) *Fungal Secretome Knowledge Base (FunSecKB)*

5 – DISCUSSÃO

A germinação é um processo chave para o desenvolvimento e estabelecimento da infecção causada pelo *A. fumigatus*. Entretanto, muito pouco se conhece sobre este processo em nível molecular. Infere-se que a emergência do tubo germinativo seja um processo similar ao brotamento em leveduras, com algumas das moléculas envolvidas desempenhando o mesmo papel nos dois sistemas, porém com mecanismos de regulação distintos (Momany, 2002). Algumas características únicas das hifas, como a organização celular e a capacidade de estabelecer e manter múltiplos eixos de polaridade, assim como uma taxa acelerada de extensão, implicam diretamente na existência de diferentes vias regulatórias (Harris e Momany, 2004).

Poucas são as proteínas de superfície descritas em *A. fumigatus*, especialmente se associadas ao processo de diferenciação, ou seja, formação da hifa a partir dos conídios em germinação. Nosso trabalho teve como uma das metas caracterizar proteínas da superfície celular deste patógeno utilizando como estratégia o isolamento, a partir de células inteiras, de proteínas extraídas por tratamento com agente redutor. Foi escolhido um protocolo recentemente validado para este tipo de abordagem metodológica (Klis *et al.*, 2007). Foram utilizadas células de *A. fumigatus* em dois morfo tipos, tubos germinativos (TG_{6h}) e hifas em dois estágios de diferenciação (H_{12h} e H_{72h}).

A germinação no *A. fumigatus* começa quando os conídios saem do período de latência em resposta à múltiplos fatores ambientais e expandem-se isotropicamente. Um estudo proteômico recente foi realizado com estas células em período de latência e revelou que elas eram enriquecidas em proteínas relacionadas à via de biossíntese de melanina, proteção contra EROs e na hidrofobina RodA (Teutschbein *et al.*, 2010). Este grupo realizou estudos comparativos do proteoma de células inteiras de conídios dormentes e de hifas. Algumas das proteínas descritas como superexpressas nos conídio em relação às hifas foram no presente trabalho encontradas somente nos extratos de TG_{6h}, ou seja, nos estágios iniciais da diferenciação dos conídios em hifas. Estas proteínas, da família ThiJ/PfpI e a metiltransferase SirN-like, não têm função biológica bem caracterizada, todavia podemos inferir a partir dos nossos dados que elas estejam envolvidas no processo inicial de germinação.

Recentemente, foi demonstrado que transcritos do *A. fumigatus* representando 27% do genoma total deste fungo encontram-se prontos no conídio dormente e que a sua tradução é ativada tão logo o fungo encontra um ambiente favorável ao seu crescimento (Lamarre *et al.*, 2008). Além disto, durante o crescimento isotrópico do conídio, os substratos e enzimas necessárias para síntese da parede celular encontram-se dispersos no córtex celular, concentrando-se no ponto de emergência do tubo germinativo. Nos fungos filamentosos, as moléculas continuam sendo direcionadas para o ponto de extensão apical do tubo germinativo, as células adjacentes permanecem ligadas e um novo ponto de polarização emerge, formando as ramificações. O crescimento polarizado continua ao longo da hifa que se ramifica, no caso do *Aspergillus*, em ângulos de 45° (Momany, 2002). Rohde e colaboradores (2002) analisaram as alterações morfológicas que ocorriam na superfície celular durante este processo de diferenciação, utilizando microscopia eletrônica de varredura. Os dados obtidos mostram vários apêndices filamentosos expressos na superfície dos tubos germinativos em formação (como ilustrado na figura 4). Essas estruturas estavam ausentes na superfície da hifa e do conídio dormente. A alta expressão destas estruturas na superfície deste morfotipo sugeriu que elas poderiam ter papel importante durante este estágio inicial de desenvolvimento e, portanto, seriam um alvo potencial para futuras terapias antifúngicas contra o *A. fumigatus*. No entanto, os componentes específicos relacionados a estes apêndices nunca foram estudados ou identificados.

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de DIGE para verificar quais proteínas poderiam ter sua expressão diferenciada na superfície da célula fúngica durante o processo de filamentação, visando melhor entender este processo em nível molecular.

Inicialmente, tentamos padronizar condições de cultivo para obtenção de massa celular, onde estivessem representadas culturas relativamente homogêneas de *A. fumigatus* nos diferentes estágios de diferenciação. Nas condições de cultivo utilizadas, constatamos que os organismos cultivados por 12 horas já apresentavam hifas diferenciadas e não mais tubos germinativos. Com estes dados experimentais resolvemos cultivar o fungo em tempo menores de 6 horas, logrando sucesso em obter culturas ricas em tubos germinativos, ou seja, nos estágios iniciais da fase de filamentação. Para obtenção de massa celular diferenciada em hifas “maduras” optamos por tempos mais longos de cultivo, 72 horas, após realizarmos monitoramento por 24 e 48 horas. Desta forma, optamos por estudar as células nos três estágios 6 horas (TG_{6h}), 12 horas (H_{12h}) e 72 horas (H_{72h}).

Está claro, entretanto, que independente do estágio estudado, os morfotipos requerem remodelamento da parede celular e, portanto, são esperadas alterações nas proteínas expressas na superfície no fungo. Essas proteínas, assim como as demais proteínas celulares, estão em constante alteração em resposta a fatores ambientais e aos diferentes estágios do ciclo celular do fungo. Destacamos a parede celular por ser a estrutura responsável pelos sinais de sensoriamento entre o microrganismo e o ambiente, bem como por ter papel relevante nas interações fungo-hospedeiro, incluindo o reconhecimento de receptores, adesão, colonização, invasão e imunomodulação (Pitarch *et al.*, 2002; Glaser *et al.*, 2009).

Serão discutidos os papéis das proteínas mais importantes identificadas nos morfotipos estudados ou que possuíam níveis diferenciados de expressão entre TG_{6h} e H_{72h}.

A proteína característica de parede celular PhiA, também descrita como sendo específica de fungos, é essencial para o desenvolvimento das fiálides e esporulação em Ascomycetes filamentosos. Recentemente, também foi descoberto um alérgeno em *A. fumigatus* que é homólogo à PhiA (Melin *et al.*, 2003; Glaser *et al.*, 2009). Esta proteína foi identificada em hifas, sendo a única listada que se considerou como típica de parede celular, além de possuir sinal para secreção de acordo com o *FunSecKB* (Lum e Min, 2011).

De acordo com o preditor de adesinas em fungos, o FungalRV (Chaudhuri *et al.*, 2011), duas das proteínas identificadas neste trabalho são possíveis adesinas, a enolase e a GAPDH. Esta predição não foi surpreendente, mesmo em se tratando de enzimas da via glicolítica. A enolase já havia sido relatada como uma proteína de superfície com características de adesina em fungos patogênicos como o *P. brasiliensis* (Donofrio *et al.*, 2009), e em algumas bactérias, mesmo não possuindo peptídeo sinal para a secreção (Esgleas *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011). Enolase também já foi descrita como tendo um importante papel imunomodulador protetor para o hospedeiro, em pacientes com infecção sistêmica por *C. albicans* e em infecções pelo protozoário *Plasmodium falciparum* (Pal-Bhowmick *et al.*, 2007; Pitarch *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). Além disto, já foi relatada a expressão da enolase durante a aspergilose invasiva e, assim como em *C. albicans*, o homólogo em *A. fumigatus* pode ter um papel imunomodulador (Denikus *et al.*, 2005).

Na predita adesina GAPDH também falta o sinal para secreção. Todavia esta enzima foi descrita como adesina em alguns fungos como *C. albicans*, *P. brasiliensis* e em bactérias (Gozalbo *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006; Kinoshita *et al.*, 2008).

A proteína fungo-específica eEF3 é uma ATPase e pertence à família *ATP binding cassette* (ABC). Foi proposto que eEF3 catalisa a liberação do tRNA desacetilado do sítio-E ribossomal em células fúngicas e interage com a GTPase aminoacil-tRNA ligante do fator de alongação 1A (eEF1A). O processo de tradução dos fungos é totalmente dependente da presença de eEF3. Por estar ausente em células de mamíferos, esta proteína poderia ser explorada como um potencial alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos (Anand *et al.*, 2006).

Alguns fatores de alongação em eucariotos superiores demonstraram possuir outras funções não relacionadas ao processo de tradução (Olarewaju *et al.*, 2004; Amiri *et al.*, 2006). A eEF3 interage fortemente com Cch1, um canal de Ca^{2+} de grande afinidade, presente na membrana do fungo patogênico *C. neoformans*. Este canal também está presente na membrana plasmática de outros fungos, incluindo *A. fumigatus*, participando de distintos processos celulares. A regulação do Cch1 ainda não está completamente compreendida, porém, já foi demonstrado que a repressão do mRNA do *EF3* resultou em erros na localização de Cch1, sugerindo que eEF3 possui um papel chave no endereçamento do Cch1 à membrana do *C. neoformans*. Além disso, a repressão do *EF3* resultou em células com crescimento deficiente em meio pobre em Ca^{2+} (Liu e Gelli, 2008). A importância da sinalização do Ca^{2+} para a virulência de fungos patogênicos, resposta ao estresse contra mecanismos de defesa do hospedeiro, regulação do ciclo celular e morfogênese reforça a possibilidade de eEF3 ser explorado como um importante alvo para antifúngicos (Dayton *et al.*, 1997; Joseph e Means, 2000; Sebghati *et al.*, 2000; Blankeship *et al.*, 2003; Sanglard *et al.*, 2003; Bencina *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Hallen e Trail, 2008).

Além desta proteína que foi superexpressa na fase inicial da germinação (TG_{6h}) e da PhiA, superexpressa na hifa (H_{72h}) foi identificada a CipC-like. Observamos que no *A. fumigatus* esta proteína foi expressa somente na hifa madura, corroborando observações anteriores da literatura (Bauer *et al.*, 2010).

Apesar de ser uma proteína com função ainda não caracterizada na fisiologia dos fungos, alguns papéis foram sugeridos para a CipC-like. Já foi sugerido que ela participa de interações fungo-hospedeiro, encontrando-se superexpressa na fase filamentosa do fitopatogênico *Ustilago maydis* (Böhmer *et al.*, 2007). Em *C. neoformans*, durante a infecção meningeal, os níveis desta proteína encontram-se significativamente aumentados (Steen *et al.*, 2003). Esses achados sugerem que homólogos da CipC são requeridos durante o curso da

infecção ou durante o crescimento polarizado. Como mencionado, CipC foi descrita como exclusivamente expressa na hifa de *A. fumigatus*. Os autores apontam para um possível papel desta proteína no crescimento polarizado (Bauer *et al.*, 2010).

Além destas proteínas, foram identificadas neste trabalho proteínas de resposta a estresse com expressão diferencial entre os morfotipos. No TG_{6h}, por exemplo, observamos a HSP90/Mod1 sendo superexpressa em relação à hifa. Hsp90 é uma chaperona altamente conservada, que desempenha papel central na resistência a drogas antifúngicas. Hsp90 medeia a resistência a azólicos em *C. albicans* e a equinocandinas em *Aspergillus terreus* (Cowen e Lindquist, 2005; Cowen *et al.*, 2009). Em *A. fumigatus*, a inibição farmacológica da Hsp90 aumentou a eficácia do voriconazol contra um isolado clínico quando testado sob condições experimentais determinadas, sugerindo seu papel na resistência à azólicos (Cowen *et al.*, 2009; Shapiro e Robbins, 2011).

Como espécies reativas de oxigênio são produzidas pelos fagócitos profissionais que eliminam o *A. fumigatus*, as superóxido dismutases (SODs) são considerados possíveis fatores de virulência para este patógeno. Quatro genes codificando possíveis SODs foram identificados no genoma deste fungo: a citoplasmática Cu/ZnSOD (AfSod1p), a mitocondrial MnSOD (AfSod2p), a citoplasmática MnSOD (AfSod3p) e a AfSod4 com um domínio C-terminal (Lambou *et al.*, 2010). Durante o crescimento, AfSod1p e AfSod2p se mostraram mais abundantes no conídio, enquanto a MnSOD (AfSod3p) estava fortemente expressa no micélio (Lambou *et al.*, 2010). Em consonância com esses dados, no extrato de superfície da H_{72h} encontramos somente a MnSOD AfSod3p citoplasmática como umas das proteínas superexpressas neste morfotipo. AfSod3p também é conhecida como alérgeno Asp f6 e é prontamente reconhecida pela IgE em pacientes alérgicos (Cramer *et al.*, 1996; Schwienbacher *et al.*, 2005). Lambou e colaboradores (2010) produziram mutantes para cada uma das enzimas SOD separadamente e um triplo mutante para esta proteína. Os resultados revelaram que a mutante $\Delta sod3$ apresentou apenas um pequeno declínio na taxa de crescimento em altas temperaturas. A deleção do gene da AfSod4 gerou células inviáveis, sugerindo ser essencial. Já o triplo mutante foi testado para uma possível atenuação de virulência, sendo observado que não havia diferenças significativas entre a mortalidade de camundongos expostos à cepa selvagem ou a esta triplo mutante. Os autores demonstraram que somente as enzimas AfSod1 e AfSod2 possuem função detoxificante de íons superóxido no ambiente intracelular. Como os íons superóxido extracelulares não atravessam a membrana plasmática, as SODs intracelulares não poderiam atuar nestes íons. Uma vez que

encontramos a AfSod3 na superfície celular, nossa hipótese é de que esta possua um papel de detoxificação dos íons superóxido extracelulares.

Proteínas típicas de superfície covalentemente ligadas a polímeros da parede celular carregam intrinsicamente um peptídeo sinal na região N-terminal da sua sequência, o sítio ômega, responsável pelo endereçamento destas para a superfície celular. Além disso, algumas proteínas apresentam sinais para a secreção pela via clássica, retículo endoplasmático-Golgi. Algumas destas proteínas, programadas para a secreção, poderiam associar-se aos componentes da parede celular ficando retidas nesta estrutura, como é o caso das proteases ácidas da *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2003). Existem vários relatos de proteínas sem sinal de secreção na região N-terminal, presentes na superfície celular, como já demonstrado nos fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *H. capsulatum* (Eroles *et al.*, 1997; Gozalbo *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2000; Pitarch *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). Alguns destes trabalhos, inclusive, sugerem que estas proteínas poderiam ter um papel central na virulência de fungos e/ou atuarem como imunomoduladores.

Em 1997, Eroles e colaboradores sugeriram que a enolase e a Hsp70 em *C. albicans* poderiam estar presentes na parede celular deste organismo simplesmente pela associação fraca destas com componentes da superfície, em decorrência da lise celular durante o procedimento de extração. Para elucidar esta questão em nosso modelo experimental, pois também encontramos a enolase e a Hsp70 nos extratos DTT do *A. fumigatus*, realizamos ensaios para verificar a integridade e a viabilidade celular. E, ainda, experimentos de biotinylação da superfície celular como evidência de que as proteínas identificadas nos extratos estavam localizadas externamente à célula, e não nos compartimentos intracelulares. Estes ensaios mostraram que as células de *A. fumigatus* tratadas com DTT mantêm tanto a integridade da membrana quanto a atividade metabólica. E, que somente as proteínas de superfície foram extraídas, como pode ser aferido nos ensaios de *Western* com o extrato biotinilado.

A hipótese de que proteínas atípicas estariam presentes em extratos de superfície celular devido a danos na integridade da membrana gerados pelo procedimento de extração proteico havia sido testada por Klis e colaboradores (2007) para extração com DTT e beta-mercaptoetanol a partir de células íntegras. Os resultados experimentais não evidenciaram dano celular, pelo uso do DTT na extração. Desta forma, é plausível pensar que um processo

não convencional de secreção, seja responsável pela presença destas proteínas atípicas na superfície celular.

Delgado e colaboradores (2003) estudaram a secreção da GAPDH e propõem mecanismos de translocação desta proteínas através da membrana plasmática, com proteínas auxiliares. Posteriormente, outros autores sugeriram várias rotas para o transporte destas proteínas. Existem dados em *S. cerevisiae* indicando que este fungo pode utilizar um transportador da família ABC para exportação de proteínas. Outra hipótese refere-se a possibilidade de que algumas proteínas intracelulares tenham afinidade pelas vesículas secretórias e, portanto, possam se aderir a estas ou, que sejam inseridas em vesículas endossomais, levando à sua exportação indireta (Nombela *et al.*, 2006). Nos patógenos *C. neoformans* e *H. capsulatum* foi proposto transporte vesicular para exportar proteínas para a parede celular e, é sugerido pelos autores que este possa ser um evento comum em muitos outros fungos (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Casadevall *et al.*, 2009).

As vesículas associadas à superfície de *C. neoformans* e *H. capsulatum* são descritas como “bolsas de virulência” porque contêm numerosas moléculas associadas à sobrevivência fúngica, imunomodulação e virulência (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). Essas moléculas são chamadas de proteínas *moonlighting*, porque elas possuem uma função dupla: função conhecida que desempenham no ambiente intracelular (em geral, atividade enzimática), e uma função alternativa que desempenham na superfície celular (por ex., como adesina). Algumas proteínas da via glicolítica, HSPs e fatores de alongação traducional fazem parte deste grupo (Nombela *et al.*, 2006).

É importante reforçar que durante o processo de filamentação, o tráfego de vesículas têm um papel chave no endereçamento de moléculas para os sítios de crescimento e de ramificação da hifa. Este processo é complexo e envolve um *cluster* apical de vesículas, elementos de citoesqueleto e outras proteínas essenciais para a extensão da hifa. Este *cluster* foi chamado de Spitzenkörper, e é o centro organizador do crescimento e da morfogênese no *A. fumigatus* (Bartnicki-Garcia, 2002). Acredita-se que o Spitzenkörper recebe vesículas derivadas do Golgi e exocita estas vesículas de maneira controlada, gerando um gradiente de exocitose que determina a forma do ápice da hifa (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989). O Spitzenkörper também possui ribossomos, e portanto, ocorre síntese proteica nesta estrutura (Howard e Aist, 1979).

Os micologistas sempre deram muita ênfase ao fato de que, o crescimento das hifas ocorreria somente nas extremidades, célula polarizada. Muito já foi escrito sobre a exocitose de enzimas na região apical do micélio. Entretanto, Read em 2009 discutiu que este é um processo intercalar, que também ocorre em regiões subapicais. Não existem evidências por microscopia eletrônica comprovando este fato, provavelmente porque este processo se dá de forma muito rápida impossibilitando sua detecção, a não ser por ensaios de microscopia intravital. Técnicas de *live-cell imaging* como o FLIM e o FRET, permitiram demonstrar a formação do complexo SNARE ao longo da membrana plasmática em compartimentos subapicais de *Trichoderma reesei*, por exemplo (Valkonen *et al.*, 2007). Atualmente, é evidente que ocorra o crescimento intercalar em uma grande variedade de sistemas fúngicos e, portanto, a secreção de vesículas não estaria limitada às extremidades do micélio. A vantagem para este tipo de crescimento seria o de acelerar o crescimento das hifas, em mais de um local simultaneamente (Voisey, 2010).

Neste trabalho, não foram evidenciadas proteínas envolvidas neste processo na superfície da hifa ou do tubo germinativo.

Paralelamente ao trabalho de análise das proteínas de superfície, analisamos o secretoma do *A. fumigatus* da cepa selvagem e de uma mutante $\Delta priT$, descrita por Sharon *et al.*, 2009; em colaboração com este grupo. Fôra descrito que esta mutante exibe uma redução da atividade proteolítica no filtrado de cultura, há redução na morte de células epiteliais alveolares de linhagem A549 quando infectadas e, a atividade de lise de eritrócitos é reduzida (Sharon *et al.*, 2009). Entretanto, a virulência *in vivo* para camundongos imunossuprimidos infectados, foi similar para a cepa mutante e a selvagem AF293 (Bergman *et al.*, 2009; Sharon *et al.*, 2011).

De forma interessante, somente a quitosanase e a FAD oxigenase foram encontradas na superfície celular do *A. fumigatus* e no secretoma deste fungo. As proteínas identificadas no secretoma apresentavam peptídeo sinal e, além disto, nenhuma das proteínas atípicas de parede celular foi identificada no filtrado de cultura do micélio. O fato da maioria das proteínas encontradas no secretoma não serem encontradas na superfície do fungo, reforça a hipótese de existir mecanismos de transporte que direcionem de forma ordenada proteínas atípicas para a parede celular onde podem atuar em resposta à estresse, na virulência, na resistência a drogas e como imunomoduladores.

O secretoma da cepa selvagem foi analisado de forma pareada ao de cepa mutante, em experimentos de DIGE. A cepa selvagem superexpressou proteases notadamente ligadas à

virulência como a ALP1, relacionada à destruição do trato respiratório inferior de camundongos infectados (Iadarola *et al.*, 1998), uma serino peptidase, e também proteases como a TppA relacionadas a crescimento celular e filamentação (Tomkinson, 1999; Yun *et al.*, 2001).

Na defesa contra o *A. fumigatus*, a imunidade inata desempenha um papel fundamental e, se estiver ativa e funcional impede que o fungo germine e que a infecção se dissemine. O sistema complemento representa um fator importante na resposta imune. Recentemente, em 2010, Behnsen e colaboradores descobriram que os filtrados de cultura de hifas, mas não de conídios, de *A. fumigatus* clivaram de maneira eficaz componentes do sistema complemento humano, como o C3, C4, C5 e C1q, além de imunoglobulina G. A análise do secretoma deste fungo e ensaios utilizando inibidores de protease identificaram que o maior componente responsável por este processo era a ALP1. Um mutante para ALP1 foi gerado e para o filtrado de cultura obtido deste mutante, a degradação de componentes do sistema complemento foi mínima. Os autores concluíram que a ALP1 é capaz de degradar vários substratos distintos, incluindo as proteínas do sistema complemento humano.

O presente trabalho gerou dois manuscritos que estão em processo de submissão à publicação.

6 – CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados indicam que em *A. fumigatus* há possibilidade de proteínas intracelulares estarem presentes na parede celular por rotas não clássicas já que não possuíam sinal de secreção
- ✓ Os dados do secretoma corroboram esta hipótese uma vez que todas as proteínas identificadas neste apresentavam sinal de secreção e eram distintas das proteínas atípicas de superfície
- ✓ Dentre as proteínas identificadas de hifa e de tubo germinativo estavam presentes proteínas ainda não descritas para este fungo (anidrase carbônica), potenciais alvos para drogas (eEF3) e de função desconhecida com possível papel relevante na morfogênese (*CipC-like*)

REFERÊNCIAS

- Adler SC, Isaacson G, Sasaki CT. (1997) Invasive aspergillosis of the paranasal sinuses and orbit: can you save the eye? *Am J Otolaryngol.* 18: 230-234.
- Agarwal R. (2009) Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest.* 135: 805-826.
- Aguilar-Uscanga B, François JM. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 37: 268-274.
- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, *et al.* (2008) Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol.* 10: 1695-1710.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. (1996). *Introductory Mycology.* 4th ed. New York. John Wiley & Sons.
- Amiri A, Noei F, Jeganathan S, Kulkarni G, Pinke DE, Lee JM. (2007) eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene.* 26: 3027-3040.
- Anand M, Balar B, Ulloque R, Gross SR, Kinzy TG. (2006) Domain and nucleotide dependence of the interaction between *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factors 3 and 1A. *J Biol Chem.* 281: 32318-32326.
- Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti M, Cassone A. (1996) Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis.* 173: 684-690.
- Angiolella L, Micocci MM, DiAlessio S, Girolamo A, Mares B, Cassone A. (2002) Identification of major glucan-associated cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1688-1694.
- Annaix V, Bouchara JP, Larcher G, Chabasse D, Tronchin G. (1992) Specific binding of human fibrinogen fragment D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun.* 60: 1747-1755.
- Arruda LK, Mann BJ, Chapman MD. (1992) Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol.* 149: 3354-3359.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, *et al.* (2006) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 74: 382-389.

- Bartnicki-Garcia, S, Hergert F, Gierz G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma* 153: 46-57.
- Bartnicki-Garcia, S. (2002). Hyphal tip growth: outstanding questions, p. 29–58 In H. D. Osiewacz (ed.), *Molecular biology of fungal development*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Bauer B, Schwienbacher M, Broniszewska M, Israel L, Heesemann J *et al.* (2010) Characterisation of the CipC-like protein AFUA_5G09330 of the opportunistic human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. 53: 296-304.
- Behnsen J, Lessing F, Schindler S, Wartenberg D, Jacobsen ID, *et al.* (2010) Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infect Immun*. 78: 3585-3594.
- Benard M, Latgè JP. (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol*. 39: 9-17.
- Bencina M, Legisa M, Read ND. (2005) Cross-talk between cAMP and calcium signalling in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol*. 56: 268-281.
- Bergmann A, Hartmann T, Cairns T, Bignell EM, Krappmann S. (2009) A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Infect Immun*. 77: 4041-4050.
- Blankenship JR, Wormley FL, Boyce MK, Schell WA, Filler SG, *et al.* (2003) Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot Cell*. 2: 422-430.
- Böhmer M, Colby T, Böhmer C, Bräutigam A, Schmidt J, *et al.* (2007) *Proteomics*. 7: 675-685.
- Braithwaite AW, Eichner RD, Waring P, M, llbacher A. (1987) The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation. *Mol immunol*. 24: 47-55.
- Breen DJ, Clifton AG, Wilkins P, Uttley D, Westmore G. (1993) Invasive aspergilloma of the skull base. *Neuroradiology*. 35: 216-217.
- Casadevall A, Pirofski LA. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*. 67: 3703-3713.
- Casadevall A, Nosanchuk JD, Williamson P, Rodrigues ML. (2009) Vesicular transport across fungal cell wall. *Trends Microbiol*. 17: 158-162.
- Castillo L, Martinez AI, Garcera A, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast*. 20: 973-83.

- Chaffin WJ, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol.* 62: 130-180.
- Chaudhuri R, Ansari FA, Raghunandan MV, Ramachandran S. (2011) FungalRV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens. *BMC Genomics.* 12: 192.
- Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, et al. (1998) Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol.* 36: 1494-1500.
- Chen H, Yu S, Shen X, Chen D, Qiu X, et al. (2011) *Microb Pathog.* [Epub ahead of print]
- Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, et al. (1981) Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *Am J Med.* 71: 59-66.
- Collopy-Junior I, Esteves FF, Nimrichter L, Rodrigues ML, Alviano CS, et al. (2006) An ectophosphatase activity in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 6: 1010-1017.
- Coulot P, Bouchara JP, Renier G, Annaix V, Planchenaut C, et al. (1994) Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immun.* 62: 2169-2177.
- Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, et al. (2003) Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun.* 71: 173-180.
- Cowen, L. E., and S. Lindquist. (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309:2185–2189.
- Cowen LE, Singh SD, K hler JR, Collins C, Zaas AK, Schell WA, et al. (2009). Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:2818–2823.
- Cramer R, Faith A, Hemmann S, Jaussi R, Ismail C, et al. (1996) Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 184: 265–270.
- Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA. (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol.* 47: 1637-1651.
- Dague E, Alsteens D, Latg  JP, Dufrine YF. (2008) High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophys J.* 94: 656-660.
- Daniels GM, Amara SG. (1998) Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface. *Methods Enzymol.* 296: 307-318.

- Dayton JS, Sumi M, Nanthakumar NN, Means AR. (1997) Expression of a constitutively active Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase in *Aspergillus nidulans* spores prevents germination and entry into the cell cycle. *J Biol Chem.* 272: 3223-3230.
- Delgado ML, Gil ML, Gozalbo D. (2003) *Candida albicans* TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. *Yeast.* 20: 713-722.
- De Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, *et al.* (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell.* 3: 955-65.
- De Groot PW, Ram AF, Klis FM. (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol.* 42: 657-75.
- Denikus N, Orfaniotou F, Wulf G, Lehmann PF, Monod M, Reichard U. (2005) Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. *Infect Immun.* 73: 4704-4713.
- Denning DW, Ward PN, Fenelon LE, Benbow EW. (1992) Lack of vessel wall elastolysis in human invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 60: 5153-5156.
- Denning DW. (1998) Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 26: 781-805.
- _____. (2001) Chronic forms of pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 7: 25-31.
- deShazo RD, Chapin K, Swain RE (I). (1997) Fungal sinusitis. *N Engl J Med.* 337: 254-259.
- deShazo RD, O'Brien M, Chapin K, Soto-Aguilar M, Gardner L, Swain R (II). (1997) A new classification and diagnostic criteria for invasive fungal sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 123: 1181-1188.
- deShazo RD. (1998) Fungal sinusitis. *Am J Med Sci.* 316: 39-45.
- Dinauer MC. (1993) The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Cri Rev Clin Lab Sci.* 30: 329-369.
- Donofrio FC, Calil AC, Miranda ET, Almeida AM, Benard G, Soares CP, Veloso SN, Soares CM, Mendes Giannini MJ. (2009) *J Med Microbiol.* 58: 706-713.
- Dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS, de Araujo Soares RM. (2006) Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46: 209-20.
- Dyer PS, Paoletti M. (2005) Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med Mycol.* 43: 7-14.

- Edwards SR, Braley R, Chaffin WL. (1999) Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 177: 211-216.
- Eichner RD, Al Salami M, Wood PR, Mullbacher A. (1986) The effect of gliotoxin upon macrophage function. *Int J Immunopharmacol.* 8: 789-797.
- Eisenman HC, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, *et al.* (2007) *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology* 153: 3954–3962.
- Eroles P, Sentandreu M, Elorza MV, Sentandreu R. (1997) The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology.* 143: 313-20.
- Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M. (2008) Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology.* 154: 2668-2679.
- Falkow S. (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis.* 10: 274-276.
- Finkel-Jimenez B, Wuthrich M, Brandhorst T, Klein BS. (2001) The WI-1 adhesin blocks phagocyte TNF-alpha production, imparting pathogenicity on *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol.* 166 : 2665-2673.
- Filler SG, Shepard DC. (2006) Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog.* 2: e129.
- Fraser RS. (1993) Pulmonary aspergillosis: pathologic and pathogenetic features. *Pathol Annu.* 28: 231-277.
- Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, *et al.* (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science.* 279: 1355-1358.
- Gastebois A, Clavaud C, Aimanianda V, LatgÈ JP. (2009) *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol.* 4: 583-595.
- Girardin H, Paris S, Rault J, Bellon-Fontaine MN, LatgÈ JP. (1999) The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus conidia*. *Lett Appl Microbiol.* 29: 364-369.
- Giles SS, Stajich JE, Nichols C, Gerrald QD, Alspaugh JA, *et al.* (2006) The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot Cell.* 5: 1447-1459.
- Glaser AG, Kirsch AI, Zeller S, Menz G, Rhyner C, Cramer R. Molecular and immunological characterization of Asp f 34, a novel major cell wall allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Allergy.* 64:1144-1151.

- Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorín I, Renau-Piqueras J, Martínez JP, Gil ML. (1998) *Infect Immun.* 66: 2052-2059.
- Greenberger PA. (2003) Clinical aspects of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Front Biosci.* 8: 119-127.
- Hallen HE, Trail F. (2008) The L-type calcium ion channel *cch1* affects ascospore discharge and mycelial growth in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryot Cell.* 7: 415-424.
- Harris SD, Momany M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol.* 41: 391-400.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. (1996) Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev.* 9: 469-488.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005) The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol.* 43: 207-238.
- Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1998) Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol.* 36: 165-168.
- Hoyer LL. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9: 176-180.
- Howard, RJ, Aist JR. (1979). Hyphal tip cell ultrastructure of the fungus *Fusarium*: improved preservation by freeze-substitution. *J. Ultrastruct. Res.* 66: 224-234.
- Hua SS, Brandl MT, Hernlem B, Eng JG, Sarreal SB. (2011) Fluorescent viability stains to probe the metabolic status of aflatoxigenic fungus in dual culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. *Mycopathologia.* 171: 133-138.
- Iadarola, P, Lungarella G, Martorana PA, Viglio S, Guglielminetti M, *et al.* (1998). Lung injury and degradation of extracellular matrix components by *Aspergillus fumigatus* serine proteinase. *Exp. Lung Res.* 24: 233–251.
- Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. (2005) Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol.* 3: 753-764.
- Jahn B, Boukhallouk F, Lotz J, Langfelder K, Wanner G *et al.* (2000) Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect Immun.* 68: 3736-3739.
- Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH. (2003) Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol.* 52: 615-622.
- Joseph JD, Means AR. (2000) Identification and characterization of two Ca²⁺/CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* 275: 38230-38238.

- Kauffman SHE. (1990) Heat shock proteins and the immune response. *Immunol today*. 11: 129-136.
- Kauffman CA. (1999) Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 29: 231-237.
- Kauffman, HF., Tomee JF, van de Riet MA, Timmerman AJ, Borger P. (2000). Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol*. 105:1185–1193.
- Kinoshita H, Wakahara N, Watanabe M, Kawasaki T, Matsuo H, *et al.* (2008) *Res Microbiol*. 159: 685-691.
- Klis FM, De Groot P, Hellingwerf K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 39: 1-8.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 26: 239-256.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 23: 185-202.
- Klis FM, Ram AFJ, De Groot PWJ. (I) (2007) A molecular and genomic view of the fungal cell wall. *Biology of the fungal cell wall*, 2nd Edition. RJ Howard and NAR Gow (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Klis FM, de Jong M, Brul S, de Groot PW. (II) (2007) Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast*. 24: 253-258.
- Kobayashi GS. (2003) The changing clinical presentation of fungal infections. *Jpn J Med Mycol*. 44: 3-5.
- Kogan TV, Jadoun J, Mittelman L, Hirschberg K, Osherov N. (2004) Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. *J Infect Dis*. 189: 1965-1973.
- Kolattukudy, PE., Lee JD, Rogers LM, Zimmerman P, Ceselski S, *et al.* (1993). Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect. Immun*. 61: 2357–2368.
- Kothary MH, Chase Jr T, McMillan JD. (1984) Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun*. 43: 320-325.
- Kraus PR, Nichols CB, Heitman J. (2003) Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryot Cell*. 4: 1079-1087.
- Kurup VP. (2005) *Aspergillus* antigens: which are important? *Med Mycol*. 43: 189-196.

- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
- Lage H. (2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Microbiol Agents*. 22: 188-199.
- Lamarre C, Sokol S, Debeaupuis JP, Henry C, Lacroix C, *et al.* (2008) Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics*. 9: 417-431.
- Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N e Latge JP. (2010) Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*. 75: 910–923.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 38: 143-158.
- Larcher G, Bouchara JP, Annaix V, Symoens F, Chabasse D, Tronchin G. (1992) Purification and characterization of a fibrinolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. *Biol Cell*. 77: 201-208.
- Larone DH. (2002) *Medically important fungi*, 4th edition. ASM Press.
- Latge JP, Moutaouakil M, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Haynes K, Prevost MC. (1991) The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 59: 2586-2594.
- Latge JP, Mouyna I, Tekaiia F, Beauvais A, Debeaupuis JP, Nierman W. (2005) Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*. 43: 15-22.
- Latgé JP. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66: 279–290.
- Latgé JP. (2010) Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*. 12: 863-872.
- Leitao EA, Bittencourt VC, Haido RM, Valente AP, Peter-Katalinic J, Letzel M, *et al.* (2003) Betagalactofuranose- containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology* 13: 681–692.
- Levitz SM. (1989) Aspergillosis. *Infect Dis Clin North Am*. 3: 1-8.
- Li WQ, Hu XC, Zhang X, Ge Y, Zhao S, Hu Y, Ashman RB. (2011) *Vaccine*. 29: 5526-5533.
- Liu M, Du P, Heinrich G, Cox GM, Gelli A. (2006) Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryot Cell*. 5: 1788-1796.
- Liu M, Gelli A. (2008) Elongation factor 3, EF3, associates with the calcium channel Cch1 and targets Cch1 to the plasma membrane in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 7: 1118-1126.

- Lipke PN, Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structures and new challenges. *J Bacteriol.* 180: 3735-3740.
- Lopes-Bezerra LM, Filler SG. (2003) Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. *Braz J Med Biol Res.* 36: 987-991.
- Lopes-Bezerra LM, Filler SG. (2004) Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood.* 103: 2143-2149.
- López-Ribot JL, Alloush HM, Masten BJ, Chaffin WL. (1996) Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infect Immun.* 64: 3333-3340
- Lum G, Min XJ. (2011) FunSecKB: the Fungal Secretome KnowledgeBase. Database (Oxford).
- Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M, Kataoka K, Nishida N, Tanaka M, Shizukuishi S. (2004) *Infect Immun.* 72: 1341-1348.
- Manod M, Paris S, Sarfati J, Jatton-Ogay K, Ave P, Latge JP. (1993). Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 80: 39-46.
- Marcilla A, Elorza MV, Mormeneo S, Rico H, Sentandreu R. (1991) *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch Microbiol.* 155: 312-319.
- Markaryan A, Morakova I, Yu H, Kolattukudy PE. (1994) Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infect Immun.* 62: 2149-2157.
- Melin P, Schnürer J, Wagner EG. (2003) Characterization of *phiA*, a gene essential for phialide development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 40: 234-241.
- Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Haugland RP. (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2897-2905.
- Missall TA, Lodge JK. (2005) Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. *Mol Microbiol.* 57: 847-858.
- Missall TA, Moran JM, Corbett JA, Lodge JK. (2005) Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryot Cell.* 4: 202-208.
- Momany M, Taylor I. (2000) Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation.

Microbiology. 146: 3279-3284.

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

Monod M., Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 405–419.

Morelle W, Bernard M, Debeaupuis JP, Buitrago M, Tabouret M, and Latgé J. (2005) Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4: 1308–1316.

Mouyna I, Morelle W, Vai M, Monod M, Lechenne B, Fontaine T, et al. (2005) Deletion of GEL2 encoding for a beta(1–3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 56:1675–1688.

Moyrand F, Janbon G. (2004) UGD1, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37 degrees C and for capsule biosynthesis. *Eukaryot Cell.* 3: 1601-1608.

Munro Munro CA, Hube B. (2002) Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol.* 10: 173-177.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 400-428

Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J et al. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 438: 1151-1156. Erratum in: *Nature.* (2006) 439: 502.

Nombela C, Gil C, Chaffin WL. (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 14: 15-21.

Nosanchuk JD, JD, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML. (2008) A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Commun Integr Biol.* 1: 37-39.

O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 457: 471-474.

Olarewaju O, Ortiz PA, Chowdhury WQ, Chatterjee I, Kinzy TG. (2004) The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway. *RNA Biol.* 1: 89-94.

Pal-Bhowmick I, Mehta M, Coppens I, Sharma S, Jarori GK. (2007) Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Infect Immun.* 75: 5500-5508.

Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, dos Santos AL. (2006) The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition:

implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46: 21-29.

Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, et al. (2005) Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol.* 15: 1242-1248.

Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sanchez M, Gil C, Nombela C. (1999) Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast.* 15: 459-472.

Pardo M, Ward M, Bains S, Molina M, Blackstock W, Gil C, Nombela C. (2000) A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis.* 21: 3396-410.

Paris S, Manod M, Diaquin M, Lamy D, Arruda LK et al. (1993) A transformant of *Aspergillus fumigatus* deficient in the antigenic cytotoxin ASPFI. *FEMS Microbiol Lett.* 111: 31-36.

Pitarch A, Sanchez M, Nombela C, Gil C. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics.* 1: 967-982.

_____. (2003) (a) Analysis of the *Candida albicans* proteome. a. Strategies and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 787: 101-128.

Pitarch , JimÈnez A, Nombela C, Gil C. (2006) Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics.* 5: 79-96.

_____. (2008) Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin Appl.* 2: 596-618.

Read ND. (2011) Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Mol Microbiol.* 81: 4-7.

Reichard U, Eiffert H, Rùchel R. (1994) Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol.* 32: 427-436.

Rhodes JC, Oliver BG, Askew DS, Amlung TW. (2001) Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. *Med Mycol.* 39: 253-260.

Rippon, J.W. (1988). *Medical Mycology.* 3rd Edition. Philadelphia. W.B. Saunders Co.

Riscili BP, Wood KL. (2009) Noninvasive pulmonary *Aspergillus* infections. *Clin Chest Med.* 30: 315-335.

Rodier MH, el Moudni B, Kauffmann-Lacroix C, Danialt G, Jacquemin JL. (1999) A *Candida albicans* metalloproteinase degrades constitutive proteins of extracellular matrix.

FEMS Microbiol Lett. 177: 205-210.

Rodrigues ML, Travassos LR, Miranda KR, Franzen AJ, Rozental S, de Souza W, *et al.* (2000) Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibits cell budding and fungal growth. *Infect Immun.* 68: 7049-7060.

Rodrigues ML, dos Reis FC, Puccia R, Travassos LR, Alviano CS. (2003) Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microb Pathog.* 34: 65-71.

Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A. (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contains protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell.* 7: 58-67.

Roos D. (1994) Genetic basis of chronic granulomatus disease. *Immunol Rev.* 138: 121-157.

Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation with pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6: 14-29.

Sanglard D. (2002) Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol.* 5: 379-385.

Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. (2003) Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol.* 48: 959-976.

Schaffner A, Douglas H, Braude A. (1982) Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest.* 69: 617-631.

Schmalzer-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T, e Brakhage AA. (2009) Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 75: 493–503.

Schwienbacher M, Israel L, Heesemann J e Ebel F. (2005) Asp f6, an *Aspergillus* allergen specifically recognized by IgE from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis, is differentially expressed during germination. *Allergy* 60: 1430–1435.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. (2011) Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75: 213-267.

Sharon H, Hagag S, Osherov N. (2009) Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 77: 4051-60

Sharon H, Amar D, Levdansky E, Mircus G, Shadkchan Y, Shamir R, Osherov N. (2011) PrtT-regulated proteins secreted by *Aspergillus fumigatus* activate MAPK signaling in exposed A549 lung cells leading to necrotic cell death. *PLoS One.* 6: e17509.

- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A., and Cabib E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 114: 111–123.
- Sheppard DC, Rieg G, Chiang LY, Filler SG, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. (2004) Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Anticomb Agents Chemother.* 48: 1908-1911.
- Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE. (2000) Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science.* 290: 1368-1372.
- Sirakova TD, Markaryan A, Kolattukudy PE. (1994) Molecular cloning and sequencing of cDNA and gene for a novel elastolytic metalloproteinase from *Aspergillus fumigatus* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 62: 4208-4218.
- Smith JM, Davies JE, Holden DW. (1993) Construction and pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants that do not produce the ribotoxin restrictocin. *Mol Microbiol.* 9: 1071-1077.
- Smith JM, Tang CM, Van Noorden S, Holden DW. (1994) Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restriction and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 62: 5247-5254.
- Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM. (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol.* 2: 348-352.
- Sohn K, Schwenk J, Urban C, Lechner J, Schweikert M, Rupp S. (2006) Getting in touch with *Candida albicans*: the cell wall of a fungal pathogen. *Curr Drug Targets.* 7: 505-512.
- Steen BR, Zuyderduyn S, Toffaletti DL, Marra M, Jones SJ, Perfect JR, Kronstad J. (2003) *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryot Cell.* 2: 1336-1349.
- Sundstrom P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol.* 4: 461-469.
- Sutton P, Newcombe NR, Waring P, Müllbacher A. (1994) In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun.* 62: 1192-1198.
- Tang CM, Cohen J, Krausz T, Van Noorden S, Holden DW. (1993) The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 61: 1650-1656.
- Tekaia F, Latgé JP. (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol.* 8: 385-392.
- Teutschbein J, Albrecht D, Pötsch M, Guthke R, Aimanianda V, Clavaud C, et al. (2010) Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the

human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *J Proteome Res* 9: 3427-3442.

Thomas KE, Owens CM, Veys PA, Novelli V, Costoli V. (2003) The radiological spectrum of invasive aspergillosis in children: a 10-year review. *Pediatr Radiol.* 33: 453-460.

Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T, Matsui Y. (1993) Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast.* 9: 481-494.

Tomkinson B. (1999) Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem Sci.* 24: 355-359.

Tomee, JF, Wierenga AT, Hiemstra PS, Kauffman HK. (1997). Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J. Infect. Dis.* 176:300–303.

Tronchin G, Bouchara JP, Larcher G, Lissitzky JC, Chabasse D. (1993) Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. *Biol Cell.* 77: 201-218.

Tsai HF, Wheeler MH, Chang YC, Kwon-Chung KJ. (1999) A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol.* 181: 6469-6477.

Valkonen M, Kalkman ER, Saloheimo M, Penttilä M, Read ND e Duncan R. (2007) Spatially segregated SNARE protein interactions in living fungal cells. *J Biol Chem* 31: 22775–22785.

Varga J, Tóth B. (2003) Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Genet Evol.* 3: 3-17.

Voisey, C.R. (2010) Intercalary growth in hyphae of filamentous fungi. *Fungal Biol Rev* 30: 1–9.

Waring P, Eichner RD, Müllbacher A, Sjaarda A. (1988) Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. *J Biol Chem.* 263: 18493-18499.

Waring P. (1990) DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J Biol Chem.* 265: 14476-14480.

Weig M, Jänsch L, Gross U, De Koster CG, Klis FM, De Groot PW. (2004) Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology.* 150: 3129-3144.

Young RC, Bennett JE, Vogel CL, Carbone PP, DeVita VT. (1970) Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine (Baltimore).* 49: 147-173.

Yun SI, Yahya AR, Malten M, Cossar D, Anderson WA, Scharer JM, *et al.* (2001) Peptidases affecting recombinant protein production by *Streptomyces lividans*. *Can J Microbiol.* 47: 1137-1140.