



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Nathália Curty de Andrade


**Estudo proteômico da interação do *Aspergillus fumigatus* com
células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)**

Rio de Janeiro

2012

Nathália Curty de Andrade

**Estudo proteômico da interação do *Aspergillus fumigatus* com células
endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)**



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

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

Rio de Janeiro

2012

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

A554 Andrade, Nathália Curty de.
Estudo proteômico da interação do *Aspergillus fumigatus* com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) / Nathália Curty Andrade. – 2012.
116f.

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

1. *Aspergillus fumigatus* – Teses. 2. Células endoteliais da veia umbilical humana. 3. Galectina 1. 4. Anexina 2. 5. Aspergilose pulmonar invasiva. I. Bezerra, Leila Maria Lopes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 582.282.123

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

Assinatura

Data

Nathália Curty de Andrade

**Estudo proteômico da interação do *Aspergillus fumigatus* com células
endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)**

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

Aprovada em 12 de abril de 2012.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Profa. Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dra Luciana Pizzatti Barboza
Instituto Nacional do Câncer - INCA

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Leila Lopes Bezerra, por ter compartilhado seu conhecimento científico e me dado oportunidade de desenvolver este trabalho. Também pela preocupação contínua em me tornar uma boa profissional dando apoio, tendo paciência em ensinar e orientar e pelas ideias e conselhos científicos.

Ao Dr. Jean-Paul Latgé por fornecer a cepa mutante utilizada neste trabalho.

À Dr^a Concha Gil por ter disponibilizado seu laboratório para os ensaios de nano-LC MS/MS.

À Dr^a. Alessandra Mattos, pela revisão final deste trabalho. Obrigada pela compreensão.

À toda equipe do Laboratório de Micologia Celular e Proteômica, pelo apoio, ajuda, amizade, companheirismo e os bons momentos de descontração.

À Dr^a. Paula Kubitschek-Barreira e às doutorandas Rafaela Castro e Gabriela Neves pela ajuda e orientação pessoal e profissional que contribuíram para a elaboração deste trabalho. Além disso, pela amizade que cresceu durante estes quatro anos e que, por muitas vezes, ajudou nesta caminhada.

Ao Diego, cuja ajuda neste trabalho foi imprescindível.

Aos meus amigos e familiares de fora do laboratório pela amizade, momentos de descontração e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

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

Ao Guto, pela paciência, compreensão, respeito, amor e companheirismo.

À Deus, pela força e amor em todos os dias da minha vida.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito nos aproxima
Louis Pasteur (1822-1895).

RESUMO

ANDRADE, Nathália Curty. *Estudo proteômico da interação do Aspergillus fumigatus com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)*. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O *Aspergillus fumigatus* é o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, uma infecção fúngica oportunista que acomete, principalmente, pacientes de Unidades Hematológicas, como aqueles com neutropenia profunda e prolongada. Após a filamentação este fungo angioinvasivo é capaz de ativar e causar danos em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) que passam a expressar um fenótipo pró-trombótico. A ativação destas células, dependente de contato célula-célula, é mediada por TNF- α e caracterizada pela expressão de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Recentemente, nosso grupo comparou a ativação endotelial de HUVECs desafiadas com cepas selvagens e uma cepa mutante para o gene *UGM1*. Nestes experimentos a cepa mutante $\Delta ugm1$, que apresenta um fenótipo de maior produção de galactosaminogalactana (GAG) na parede celular, mostrou um fenótipo hiperadesivo e uma capacidade maior de ativar células endoteliais. Entretanto, os receptores e as vias de sinalização envolvidos nesta ativação permanecem desconhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as proteínas envolvidas nestes processos através do estudo das proteínas diferencialmente expressas nas HUVECs após a interação com *A. fumigatus*, usando a técnica proteômica 2D-DIGE. Brevemente, as HUVECs foram infectadas com tubos germinativos da cepa selvagem (AF293) e da cepa $\Delta ugm1$ de *A. fumigatus*. Em seguida, as proteínas foram marcadas com diferentes fluorocromos e separadas por eletroforese bidimensional. A análise quantitativa foi realizada utilizando o *software DeCyder*. Foram identificadas por MS/MS cinco proteínas diferencialmente expressas, incluindo a galectina-1 e a anexina A2, ambas mais expressas após a interação, sendo a primeira ~25% mais expressa após a interação com a mutante $\Delta ugm1$. Este trabalho propõe que a galectina-1 poderia ser o receptor endotelial para polímeros de galactose presentes na parede celular do *A. fumigatus*, e que a Anexina A2 poderia estar envolvida na sinalização intracelular em resposta a este patógeno. No entanto, experimentos complementares, em curso, são necessários para comprovar esta hipótese.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*. $\Delta ugm1$. HUVEC. Galectina-1. Anexina A2.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is the main etiological agent of invasive aspergillosis, the main opportunistic fungal infection of Hematological Unity's patients, especially those with long-term neutropenia. Upon filamentation, this angioinvasive fungus can activate and damage the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which in response switch to a pro-thrombotic phenotype. HUVEC activation is mediated by TNF- α once cell-cell contact occurs. This activation is characterized by the expression of pro-inflammatory molecules such cytokines, chemokines and adhesion molecules. Recently, our group performed the comparison of HUVEC activation upon interaction with a wild type and the *UGM1* mutant strains of *A. fumigatus*. The Δ *ugm1* strain, which presents an increased production of the cell wall galactosaminogalactan, showed a hyper adherent phenotype and an increased capability to cause endothelial cell stimulation and activation, when compared with the wild type strain. The receptors involved in the pathogen-host interaction or the signaling pathways after endothelial activation by *A. fumigatus* remain unknown. Thus, the aim of this study was to investigate the differentially expressed proteins in HUVECs upon interaction with *A. fumigatus*, using the 2D-DIGE proteomic approach. Briefly, HUVECs were challenged with germlings of *A. fumigatus* wild type Af293 and Δ *ugm1* strains and then submitted to protein extraction. The total HUVEC protein extracts were labeled with different *CyDyes* and fractionated by 2D electrophoresis. Quantitative analysis to determine the differences in protein abundance amongst interacted cells vs. control endothelial cells was performed using the software *DeCyder*. Five differentially expressed proteins were identified by MS/MS including galectin-1 and annexin A2, both overexpressed after the interaction. These two proteins are described elsewhere to be associated with host-pathogen interaction. Besides, galectin-1 showed an ~25% increase after interaction with the Δ *ugm1* strain and it is plausible that this particular protein could be a putative receptor for galactose-containing polymers of the *A. fumigatus* cell wall and annexin A2 could be involved in signaling pathways upon interaction. However, other experimental evidences, under development, are necessary to confirm this hypothesis.

Keywords: *Aspergillus fumigates*. Δ *ugm1*. HUVEC. Galectin-1. Annexin A2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do conidióforo dos <i>Aspergilli</i>	18
Figura 2.	Diagrama da germinação do conídio do <i>Aspergillus nidulans</i>	19
Figura 3.	Representação diagramática das doenças atribuídas às espécies de <i>Aspergillus</i>	22
Figura 4.	Representação esquemática dos componentes da resposta do hospedeiro contra os conídios de <i>Aspergillus</i>	28
Figura 5.	Modelo de interação do <i>A. fumigatus</i> com células epiteliais pulmonares e células vasculares.....	30
Figura 6.	A parede celular de <i>A. fumigatus</i> como uma estrutura dinâmica.....	34
Figura 7.	Classificação das galectinas com relação ao DCR.....	36
Figura 8.	Galectina-1 e a sinalização celular.....	38
Figura 9.	Diagrama da estrutura da anexina A2.....	40
Figura 10.	Ativação endotelial por anticorpos anti- β_2 GPI.....	41
Figura 11.	Diagrama da obtenção do mapa proteômico de HUVEC.....	47
Figura 12.	Perfil de bandeamento por SDS-PAGE 12 % dos extratos proteicos de HUVECs.....	56
Figura 13.	Mapas bidimensionais dos extratos proteicos de HUVEC.....	57
Figura 14.	Distribuição das 1010 proteínas das HUVECs agrupadas de acordo com o processo biológico.....	59
Figura 15.	Distribuição das 1010 proteínas das HUVECs agrupadas de acordo com sua localização celular.....	60
Figura 16.	Distribuição das 1010 proteínas das HUVECs agrupadas de acordo com sua função molecular.....	61
Figura 17.	Análise das interações proteína-proteína das 1010 proteínas identificadas no extrato total de HUVECs.....	63
Figura 18.	Interatoma de proteínas do grupo funcional 6.....	66
Figura 19.	2-D DIGE dos extratos de HUVEC controle e controle 0h $\Delta ugm1$	68
Figura 20.	2-D DIGE dos extratos controle e interação AF293.....	70

Figura 21.	2-D DIGE dos extratos controle e interação $\Delta ugm1$	70
Figura 22.	2-D DIGE comparando o extrato controle com o extrato de HUVEC após a interação com a cepa selvagem	73
Figura 23.	2-D DIGE comparando o extrato controle com o extrato de HUVEC após a interação com a cepa $\Delta ugm1$	74
Figura 24.	Gráficos 3D da quantificação relativa da expressão de galectina-1 em HUVEC após a interação com <i>A. fumigatus</i>	76
Figura 25.	Gráfico 3D da quantificação relativa da expressão da anexina A2 em HUVEC após a interação com <i>A. fumigatus</i>	77
Figura 26.	Análise das interações proteína-proteína existentes entre a galectina-1 e a anexina A2.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características morfológicas macro e microscópicas dos principais <i>aspergilli</i>	20
Tabela 2.	Resumo da patogenicidade dos principais <i>aspergilli</i>	21
Tabela 3.	Incidência e mortalidade de grupos de pacientes de risco para aspergilose.....	24
Tabela 4.	Interação entre polissacarídeos da parede celular de fungos e PRRs ligados à membrana ou solúveis.....	35
Tabela 5.	Desenho experimental do ensaio de DIGE dos extratos controle de HUVEC.....	52
Tabela 6.	Desenho experimental do ensaio de DIGE da interação de HUVEC com <i>A. fumigatus</i> cepa AF293.....	52
Tabela 7.	Desenho experimental do ensaio de DIGE da interação de HUVEC com <i>A. fumigatus</i> cepa Δ ugm1.....	52
Tabela 8.	Rendimento proteico nos extratos totais das HUVECs obtidos a partir de diferentes protocolos de extração.....	55
Tabela 9.	Grupos de proteínas por processos biológico selecionado, analisadas no <i>Osprey 1.2.0</i>	64
Tabela 10.	Proteínas diferencialmente expressas nas HUVECs após a interação com tubos germinativos de <i>A. fumigatus</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABPA - Aspergilose broncopulmonar alérgica
- ACN - Acetonitrilo
- ADP - Adenosina difosfato
- Ambic - Bicarbonato de amônio
- API - Aspergilose pulmonar invasiva
- A2t - Anexina A2 na forma heterotetramérica
- BioGRID - *Biological General Repository for Interactions Datasets*
- CD2 - Grupamento de diferenciação 2, antígeno de leucócito.
- CD4 - Grupamento de diferenciação 4, antígeno de leucócito.
- CD7 - Grupamento de diferenciação 7, antígeno de leucócito.
- CD45 - Proteína tirosino fosfatase, antígeno de leucócito.
- CEACAM1 - Antígeno relacionado à molécula de adesão celular 1 carcinoembriogênica.
- CHAPS - 3-(3-colaminodropropil) dimetilamônio-1-propano sulfonato
- CLR - Lectina tipo C
- CR3 - Receptor celular para C3
- CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato
- DIGE - *2-D Differential Gel Electrophoresis*
- Da - Dalton
- DIA - *Difference In-gel analysis*
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ExpASY - *Expert Protein Analysis System*
- FDR - *False Discovery Rate*
- GAG - Galactosaminogalactana
- Galf - Galactofuranose
- Galp - Galactopiranosose
- GEMIN1 - Componentes de germes 1
- GM - Galactomanana
- GPI - Glicosilfosfatidil inositol
- HBV - vírus da hepatite B

HCMV - Citomegalovírus humano
HIV- vírus da imunodeficiência humana
HUVEC - Célula endotelial de veia umbilical humana
IAA - Iodoacetamida
ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1
Ig - Imunoglobulina
IL-1 - Interleucina 1
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
iTRAQ - *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*
kDa - Quilodalton
Langerina - Lectina tipo C expressa em células de Langerhans
LPS - Lipopolissacarídeo
LC - Cromatografia líquida
MALDI - Ionização por desorção a laser auxiliada por matriz
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
MP - Membrana plasmática
MS - espectro de massas
MUC16 - Antígeno de carcinoma ovariano CA125
NADP - Nicotinamida adenina Dinucleotídeo fosfato
NADPH - Nicotinamida adenina Dinucleotídeo fosfato reduzida
NFκB - Fator nuclear kappa B
NL - Não linear
ORF - *open reading frame*
P11- proteína de 11 kDa (S100A10)
PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno
PBS - Tampão fosfato/salina
PC - Parede celular
PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PMN - Polimorfonucleares

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPM1B - protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1B

PRR - Receptor de reconhecimento de padrão

RNA - Ácido Ribonucléico

Scavenger - Receptor presente em células dendríticas

SAB - Soro adulto bovino

SDS - Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SFB - Soro fetal bovino

SIB - *Swiss Institute of Bioinformatics*

SIDA- Síndrome da imunodeficiência humana

SOS1 - Homólogo 1 *Son of sevenless*

SIP1 - Proteína que interage com a proteína de sobrevivência de neurônio motor

SNRNPB - Proteína B e B associada a ribonucleoproteína nuclear

SUSD2 - Proteína contendo domínio sushi 2

S100A10 - Proteína codificada pelo gene S100A10 (proteína p11)

TCA - Ácido tricloroacético

TFA - Ácido trifluoracético

TGF- β - Fator de crescimento tecidual beta

Th1 - Linfócitos T helper 1

TLR - Receptor do tipo *Toll*

TNF - α - Fator de necrose tumoral alfa

TOF - tempo de voo

tPA - Ativador de plasminogênio tecidual ou PLAT

Tris - Tris(hidroximetil)-aminoetano

TRPV5 - Canal catiônico transiente, subfamília V membro 5

UniProt - *Universal Protein Resource*

VCAM-1 - Molécula de adesão para a célula vascular

Vhs - Volts/hora

VS - Vesículas secretoras

Δ *ugm1*- Cepa mutante para o gene *UGM1*

β 2GPI - β -2- glicoproteína I

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	ASPERGILLUS FUMIGATUS	17
2	ASPERGILOSES	21
2.1	Aspergilose invasiva	23
3	INTERAÇÃO ASPERGILLUS-HOSPEDEIRO	27
3.1	Interação <i>Aspergillus</i>-endotélio	29
3.2	Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs)	32
3.3	Galectina-1 e Anexina A2	36
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo geral	43
4.2	Objetivos específicos	43
5	METODOLOGIA	44
5.1	Obtenção das células endoteliais	44
5.2	Padronização da extração de proteínas totais de HUVECs	45
5.3	Mapa de referência de HUVECs SDS-PAGE/nano-LC-MS/MS	46
5.3.1	<u>Eletrforese unidimensional (SDS-PAGE)</u>	46
5.3.2	<u>Digestão tríplica e extração dos peptídeos trípticos</u>	46
5.3.3	<u>Separação e análise dos peptídeos no Nano-LC-MADI-TOF/TOF</u>	48
5.3.4	<u>Bioinformática (<i>in silico</i>)</u>	49
5.4	Mapa da interação de HUVECs com <i>A. fumigatus</i>	49
5.4.1	<u>Cultivo de <i>A. fumigatus</i></u>	49
5.4.2	<u>Ensaio de interação de HUVECs com <i>A. fumigatus</i></u>	50
5.4.3	<u>2D-DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)</u>	51
5.4.4	<u>Análise de imagens 2D-DIGE</u>	53
5.4.5	<u>Digestão tríplica e identificação dos spots proteicos diferencialmente</u>	53

	<u>expressos</u>	
6	RESULTADOS	55
6.1	Capítulo 1. Mapa proteômico de referência de HUVEC	55
6.1.1	<u>Diferenças qualitativas e quantitativas dependentes do método de extração proteica</u>	55
6.1.2	<u>Análise das proteínas identificadas de HUVECs pelo Genecode 2.0</u>	57
6.1.3	<u>Predição <i>in silico</i> das interações proteína-proteína pelo Osprey 1.2.0</u>	62
6.2	Capítulo 2. Estudo proteômico de HUVECs após a interação com <i>A. fumigatus</i>	67
6.2.1	<u>Análise do extrato controle de HUVECs</u>	67
6.2.2	<u>Proteínas diferencialmente expressas em HUVECs após a interação com cepa selvagem de <i>A. fumigatus</i></u>	68
6.2.3	<u>Proteínas diferencialmente expressas em HUVECs após a interação com cepa mutante (Δ<i>ugm1</i>) de <i>A. fumigatus</i></u>	69
6.2.4	<u>Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos mapas 2-DE DIGE</u>	70
6.2.5	<u>Interações proteína-proteína</u>	77
7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A - Manuscrito em preparação - The overexpression of a cell wall galactosaminogalactan by the <i>ugm1</i> mutant of <i>Aspergillus fumigatus</i> activates human endothelial cells.....	98
	APÊNDICE B - Manuscrito em preparação - Discovery of putative drug targets in <i>Aspergillus fumigatus</i> morphotypes by a 2D-DIGE proteomic approach.....	100
	APÊNDICE C - Manuscrito em preparação - Large-scale identification of proteins expressed by non-stimulated human umbilical vein endothelial cells using gel and non-gel proteomics approaches.....	101
	ANEXO A - Banco de dados <i>Proteopathogen</i>	110
	ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética 1.....	115
	ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética 2.....	116

INTRODUÇÃO

O *Aspergillus fumigatus* é o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, uma infecção fúngica oportunista que acomete, principalmente, pacientes de Unidades Hematológicas, como aqueles com neutropenia profunda e prolongada. Após a filamentação este fungo angioinvasivo é capaz de ativar e causar danos em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) que passam a expressar um fenótipo pró-trombótico. A ativação destas células, dependente de contato célula-célula, é mediada por TNF- α e caracterizada pela expressão de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Recentemente, nosso grupo comparou a ativação endotelial de HUVECs desafiadas com cepas selvagens e uma cepa mutante para o gene *UGM1*. Nestes experimentos a cepa mutante $\Delta ugm1$, que apresenta um fenótipo de maior produção de galactosaminogalactana (GAG) na parede celular, mostrou um fenótipo hiperadesivo e uma capacidade maior de ativar células endoteliais. Entretanto, os receptores e as vias de sinalização envolvidos nesta ativação permanecem desconhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as proteínas envolvidas nestes processos através do estudo das proteínas diferencialmente expressas nas HUVECs após a interação com *A. fumigatus*, usando a técnica proteômica 2D-DIGE. Brevemente, as HUVECs foram infectadas com tubos germinativos da cepa selvagem (AF293) e da cepa $\Delta ugm1$ de *A. fumigatus*. Em seguida, as proteínas foram marcadas com diferentes fluorocromos e separadas por eletroforese bidimensional. A análise quantitativa foi realizada utilizando o software *DeCyder*. Foram identificadas por MS/MS cinco proteínas diferencialmente expressas, incluindo a galectina-1 e a anexina A2, ambas mais expressas após a interação, sendo a primeira ~25% mais expressa após a interação com a mutante $\Delta ugm1$. Este trabalho propõe que a galectina-1 poderia ser o receptor endotelial para polímeros de galactose presentes na parede celular do *A. fumigatus*, e que a Anexina A2 poderia estar envolvida na sinalização intracelular em resposta a este patógeno. No entanto, experimentos complementares, em curso, são necessários para comprovar esta hipótese.

1 *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Aspergillus fumigatus é um fungo filamentososo que pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem do *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*, cujas espécies são caracterizadas por diferentes tipos de revestimento do asco¹ (Rippon, 1974).

O gênero *Aspergillus* aproxima-se filogeneticamente do gênero *Penicillium* e possui aproximadamente 100 espécies descritas (Alexopoulos *et al.*, 1996; Sharon *et al.*, 2009). Estes fungos são saprófitos e possuem um papel essencial na reciclagem de carbono e nitrogênio, por isso estão entre os microrganismos mais comuns em todos os ambientes. Podem ser encontrados no solo, plantas em decomposição e qualquer tipo de matéria orgânica (Rippon, 1974; Bossche, *et al.*, 1988; Pitt, 1994; Hamilton, *et al.*, 1995).

As espécies da família *Trichocomaceae* estão entre as mais amplamente distribuídas dentre os fungos e despertam interesse industrial. Na indústria alimentícia, por exemplo, membros dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são importantes no processamento de diversos alimentos e bebidas, como presunto, salame, saquê, dentre outros. O ácido cítrico, utilizado na produção de refrigerante, é formado a partir da sacarose pelo *Aspergillus niger*, de forma mais simples e barata do que a partir do suco de limão. No entanto, espécies deste grupo também apresentam um aspecto antagônico (não produtivo) por destruírem bens industrializados como couros (ex: sapatos) e tecidos (ex: roupas) ou ainda por produzirem diversas micotoxinas em alimentos estocados, como cereais, soja, amendoins, e que, ao serem consumidos, podem causar danos à saúde de animais e seres humanos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

O micélio dos membros da família *Trichocomaceae* é semelhante ao de muitos outros ascomicetos filamentosos. A hifa é bem desenvolvida, profusamente ramificada, septada, hialina e suas células são multinucleadas. Mesmo jovem, o micélio do *Aspergillus* produz um número abundante de conidióforos. Estes surgem a partir da hifa somática, cuja célula especializada, denominada célula pé, se ramifica para dar origem ao conidióforo. Os conidióforos completamente desenvolvidos são

¹ Estrutura onde são produzidos e armazenados os esporos de reprodução sexuada denominados ascósporos (Rippon, 1974).

em geral, longos, eretos e cada um tem em sua porção terminal uma célula bulbosa denominada vesícula. Uma vez que a vesícula está formada, o desenvolvimento do conidióforo pode prosseguir de duas maneiras, de forma bisseriada ou uniseriada como ilustrado na figura 1. Na forma bisseriada, as células medulares surgem a partir da superfície da vesícula, cobrindo-a totalmente e, a partir destas células, surgem células conidiogênicas ou fiálides que dão origem aos conídios. Na forma uniseriada, as células medulares não estão presentes e as fiálides se desenvolvem a partir da vesícula. Assim que as fiálides do *Aspergillus* estão maduras, cada conídio se desenvolve a partir de uma protusão esférica na extremidade das mesmas. O núcleo da fiálide se divide mitoticamente, um dos núcleos migra para o conídio em desenvolvimento e forma-se, então, um septo que delimita o conídio e a fiálide. Quando o conídio está maduro, outro se desenvolve logo abaixo e, como a parede dos conídios adjacentes permanece fisicamente conectada, uma corrente de conídios se forma e acumula na superfície da fiálide (Alexopoulos *et al.*, 1996). O conídio do *Aspergillus* varia de globoso a ovóide, lembrando pérolas de vidro, e tem diâmetro de 2 a 5 μm , sendo facilmente dispersos pelas correntes de ar. Esta dispersão do conídio do *Aspergillus* é facilitada pela presença de proteínas de superfície hidrofóbicas, denominadas hidrofobinas, que mantêm os esporos secos, permitindo a formação de aerossóis. Desse modo, esporos já foram recuperados por balões meteorológicos a metros de altitude, da neve na Antártica e do vento no Saara (Rippon, 1974; Latgé, 1999; Larone, 2002; Osherov, 2009).

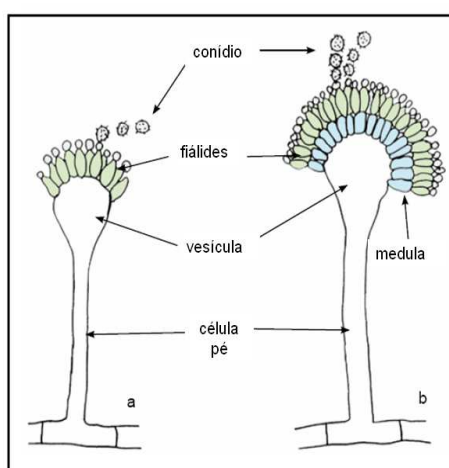


Figura 1. Estrutura do conidióforo dos *Aspergilli*. (A) Uniseriado; (B) Bisseriado (extraído de Ellis *et al.*, 2007).

A reprodução assexuada do fungo se completa com a germinação dos conídios uninucleares assexuados, desde que haja o ambiente apropriado, com

nutrientes e água (figura 2). Após a dormência, estes conídios passam por um período de crescimento isotrópico (*swelling*) antes de sofrerem a primeira mitose. Após esta primeira divisão celular, é estabelecido um eixo de polaridade que dá início à produção do tubo germinativo. O eixo de polaridade se mantém enquanto o tubo germinativo cresce apicalmente e, após aproximadamente três mitoses, é formado o primeiro septo. Um segundo tubo germinativo emerge do esporo, a maioria das vezes em um ângulo de 180° com relação ao primeiro, em um arranjo bipolar. Estes tubos germinativos crescem até se tornarem hifas, que podem formar conidióforos, reiniciando o ciclo (Momany & Taylor, 2000; Rhodes, 2006).

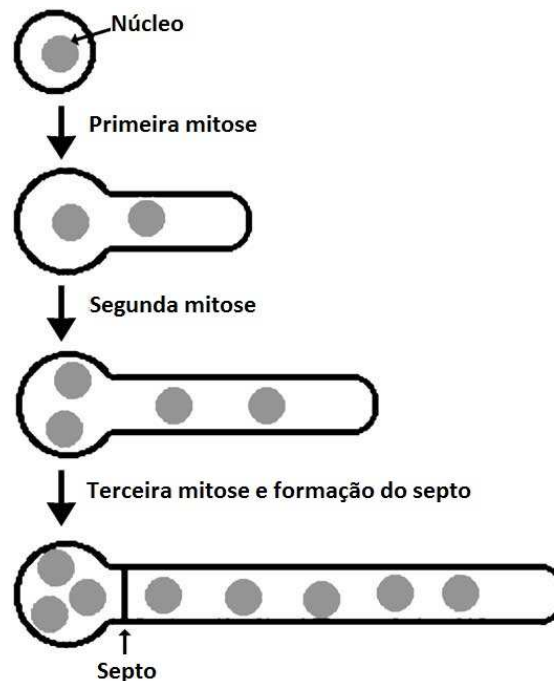


Figura 2. Diagrama da germinação do conídio de *Aspergillus nidulans*. A formação do septo ocorre após a terceira mitose próximo ao corpo do conídio. Adaptado de Kim *et al.*, (2006).

O *A. fumigatus* é uma espécie termofílica e consegue crescer em temperaturas acima de 55°C, sobrevivendo a temperaturas acima de 70°C (Latgé, 1999). A colônia dos membros do gênero *Aspergillus* cresce rapidamente, estando madura em três dias. A mesma é inicialmente branca e, conforme os conidióforos e conídios são produzidos, a cor da colônia muda, conferindo-lhe tons que dependem da espécie e do meio onde o fungo é cultivado. Existem colônias com pigmento

marrom, preto, amarelo, alaranjado, verde, dentre outros, e a aparência pode ser aveludada ou algodoadada (tabela 1) (Alexopoulos *et al.*, 1996; Larone, 2002).

Tabela 1. Características morfológicas macro e microscópicas dos principais *Aspergilli*.

<i>A. fumigatus</i> ^a	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. glaucus</i> group	<i>A. terreus</i>	<i>A. clavatus</i>
MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DA CULTURA^b							
Aveludada, começa branca e se torna verde oliva	Lanosa, começa branca amarelada e se torna preta	Aveludada, amarela esverdeada ou marrom	Aveludada, começa branca, depois amarela, laranja e assim verde ou rosada	Aveludada, usualmente verde, mas se torna acastanhada onde a cleistotecia se forma	Aparência de feltro, verde com áreas amarelas	Usualmente aveludada, marrom-canela	Aparência de feltro, verde-azulada
MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DO CONIDIÓFORO							
Curto (<300 µm) e liso	Longo e liso	Comprimento variável, rugoso e espinhoso	Longo e liso	Curto (<250 µm), liso e marrom	Comprimento variável e liso	Curto (<250 µm) e liso	Longo e liso
MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DAS FIÁLIDES							
Unisseriada; paralelas ao eixo do conidióforo	Bisseriada; cobrindo toda vesícula (formando uma cabeça radiada)	Unisseriada e Bisseriada; cobrindo toda vesícula	Bisseriada; cobrindo toda vesícula	Bisseriada; Pequena, colunar e cleistotecia usualmente presente	Unisseriada; frouxamente radiada, cobre toda vesícula e cleistotecia geralmente presente	Bisseriada; colunar e compactas	Unisseriada; aglomeradas bem próximas à vesícula alongada

Adaptado de Larone, 2002.

^a *A. fumigatus* cresce a 45 °C ou mais.

^b Estudadas em Czapek-Dox; em Sabouraud dextrose agar, a maior parte das espécies de *Aspergillus* cresce abundantemente, mas nem sempre caracteristicamente.

Sabe-se que, em condições favoráveis, os fungos pertencentes ao filo *Ascomycota* desenvolvem, a partir do micélio, estruturas sexuais denominadas ascocarpos, dos quais se desenvolvem o asco e os ascósporos. Apesar de evidências acumuladas a partir de estudos genéticos e análises genômicas apontarem para a presença de genes relacionados à reprodução sexuada, o ciclo sexual do *A. fumigatus* permaneceu desconhecido durante muitos anos, fato que ocorre com a maior parte das espécies anamorfias (Alexopoulos *et al.*, 1996; O’Gorman *et al.*, 2008). Recentemente, em 2008, O’ Gorman e colaboradores demonstraram que *A. fumigatus* possui um ciclo sexual reprodutivo que envolve a produção de cleistotecia e ascósporos, e descreveram o teleomorfo deste fungo, denominado *Neosartorya fumigata*.

2 ASPERGILOSES

Os *aspergilli*, por serem fungos saprofíticos, possuem características que os tornam capazes de sobreviver no competitivo nicho ocupado por decompositores, como germinação rápida e eficiente em temperaturas altas e resposta metabólica a várias fontes de carbono e nitrogênio, com diferentes níveis qualitativos e quantitativos. Por este motivo, estes fungos apresentam características que os tornam importantes patógenos oportunistas (Rhodes, 2006).

Deste modo, os fungos do gênero *Aspergillus* podem causar uma série de doenças coletivamente denominadas como aspergiloses. Esta designação dos membros do gênero como agentes causadores de doenças é relativamente recente, com o primeiro relato de necropsia de um caso de aspergilose descrito em 1856. A diversidade e a importância da aspergilose só foram reconhecidas a partir de 1952. Desde então, vários estudos clínicos foram reportados (Rippon, 1974).

As aspergiloses não são enfermidades que atingem apenas os humanos, mas também diferentes animais domésticos, como cachorros; animais agrícolas, como equinos, bovinos, aves de capoeira e abelhas; além de animais de zoológicos ou selvagens, como golfinhos e outras espécies aquáticas (Stevens, 2009).

Apesar de estarem frequentemente presentes no ambiente, apenas 20 espécies pertencentes a este gênero foram descritas como agentes infecciosos, das quais destacam-se o *A. fumigatus*, *A. flavus* e o *A. niger* (tabela 2) (Alexopoulos *et al.*, 1996, Larone, 2002). Entretanto, o *A. fumigatus* tornou-se, nos últimos anos, um dos fungos patogênicos oportunistas mais prevalentes, causando infecções fatais em hospedeiros imunodeprimidos, especialmente em pacientes de unidades hematológicas (Groll *et al.*, 1996).

Tabela 2. Resumo da patogenicidade dos principais *aspergilli*.

<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. versicolor</i>
Agente mais comum na Aspergilose disseminada (AD) e Sinusite.	Agente comum em infecções de ouvido, aspergiloma e poucas vezes na AD.	Envolvido em infecções pulmonares, sistêmica, sinusites, de ouvido dentre outras; produz aflatoxinas.	Envolvido ocasionalmente em infecções em unhas e invasivas.
<i>A. nidulans</i>	<i>A. glaucus group</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. clavatus</i>
Pode causar infecções em vários sítios; já foi visto em pacientes com granulomatose crônica.	Raramente envolvido em infecções em unhas, ouvidos e doenças sistêmicas.	Envolvido em infecções em unhas, pele, olhos, ouvidos e sistêmicas.	Agente da aspergilose alérgica, raramente em infecções em unhas e pulmões.

Adaptado de Larone, 2002.

O tipo de aspergilose, bem como a gravidade da doença, depende do estado imune do hospedeiro. Como o *Aspergillus spp.* é ubíquo, seus conídios são constantemente inalados e eliminados pelos mecanismos da imunidade inata do hospedeiro prevenindo a doença. No entanto, em indivíduos não hígidos, a inalação dos conídios pode resultar em reação alérgica, colonização do fungo em espaços aeróbicos do corpo ou invasão dos tecidos (Alexopoulos *et al.*, 1996, Latgé, 1999). Deste modo, o *Aspergillus* pode causar infecções que se enquadram em três categorias (figura 3): 1) doenças alérgicas, como a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e doenças alveolares alérgicas; 2) colonização dos espaços aéreos, como as bolas fúngicas nos pulmões ou seios nasais, colonização endobronquial ou associada a doenças de ouvido; 3) infecções invasivas, iniciadas ou não nos pulmões (Stevens, 2009; Park & Mehrad, 2009).

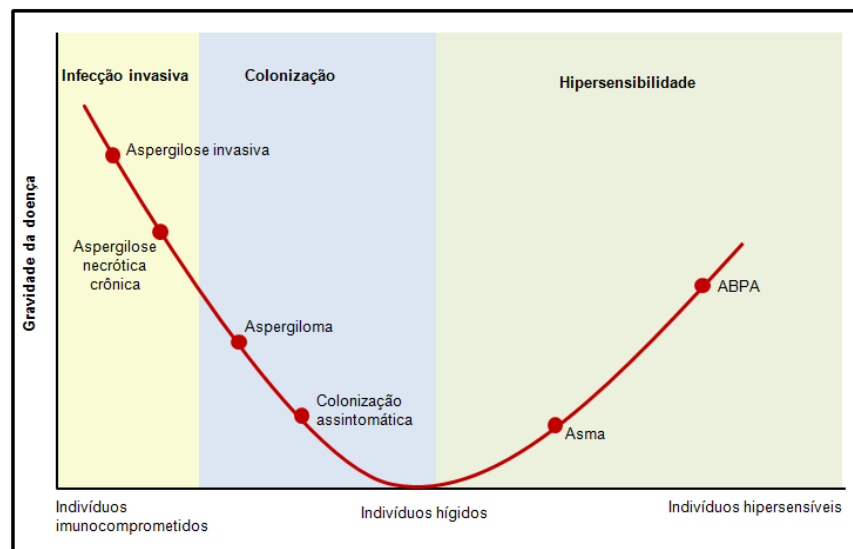


Figura 3. Representação diagramática das doenças atribuídas às espécies de *Aspergillus* em função do estado imune do hospedeiro. ABPA- aspergilose broncopulmonar alérgica (Park & Mehrad, 2009).

Dentre as aspergiloses não invasivas, destacam-se a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e o aspergiloma. A primeira é uma doença de hipersensibilidade nos pulmões que afeta pacientes asmáticos, dependentes de esteróides ou não, e pacientes com fibrose cística. Já os aspergilomas são massas de hifas, fibrina, muco e *debris* celulares, conhecidos como bola fúngica, que se

desenvolvem em uma cavidade pré-existente² no parênquima pulmonar. É normalmente benigno, mas pode ocorrer invasão, irritação do tecido pulmonar adjacente ou reações inflamatórias e alérgicas, que podem levar à hemorragia e/ou ter consequências fatais (Zmeili & Soubani, 2007 e Stevens, 2009).

2.1 Aspergilose invasiva

A aspergilose invasiva normalmente é iniciada após a infecção primária nos pulmões, sendo conhecida como aspergilose pulmonar invasiva (API). Embora menos comum, este processo também pode se iniciar em outros sítios, como seios nasais, trato gastrointestinal e pele, neste último caso, através de cateteres intravenosos, contato prolongado com fitas adesivas ou queimaduras (Zmeili & Soubani, 2007; Stevens, 2009). Em indivíduos com neutropenia profunda e prolongada, uma vez que os conídios alcançam os alvéolos, estes não são eficientemente eliminados por células da imunidade inata, iniciando o processo de germinação (figura 2) e produzindo hifas que invadem o parênquima pulmonar (Alexopoulos *et al.*, 1996, Latgé, 1999). A infecção pode disseminar-se hematologicamente para outros órgãos, mais comumente para o cérebro e, com menos frequência, para os rins, pleura, coração, esôfago e fígado (Zmeili & Soubani, 2007; Stevens, 2009).

A aspergilose é, hoje, motivo de grande preocupação, pois é a micose nosocomial mais frequente em diferentes grupos de pacientes imunodeprimidos, em especial pacientes de Unidades Hematológicas. A disfunção dos neutrófilos e a neutropenia de qualquer etiologia determina os principais grupos de risco para a aspergilose invasiva: pacientes com doença granulomatosa crônica e pacientes submetidos a transplantes de medula óssea, respectivamente (tabela 3). Neste último grupo, a neutropenia se deve às variadas terapias preventivas de rejeição, como o uso de corticosteróides, ciclosporina e/ou anti-TNF. Contudo, a lista de fatores de risco também inclui: linfomas, diabetes, queimaduras, alcoolismo, estado neonatal, tuberculose, terapias imunossupressoras para doença subjacente (p. ex. anticitocinas para doenças reumáticas), traumas, falha hepática, procedimentos operatórios e gravidez. E, ao contrário de outras micoses invasivas, a aspergilose é

² Cavidades pré-existentes ocorrem normalmente em pacientes que tiveram tuberculose ou pacientes com sarcoidose (Stevens, 2009).

relativamente incomum em pacientes HIV positivos, especialmente naqueles que fazem uso de terapia antirretroviral (Zmeili & Soubani, 2007; Stevens, 2009).

Tabela 3. Incidência e mortalidade de grupos de pacientes de risco para aspergilose invasiva

Grupo de pacientes	Incidência (%)	Mortalidade (%)
Doença Granulomatosa Crônica	25-40%	80 - 90 %
Transplante de medula óssea	5-26%	60%
Leucemia aguda	5-34%	30-40%
Transplante de órgãos sólidos	11-14%	50-60%
Outras causas de imunossupressão*	4-7%	70-85%

*queimaduras, SIDA, terapia imunossupressora para tratamento de linfoma e doenças autoimunes, pacientes de Unidades de Tratamento Intensivo, dentre outros (Groll *et al.*, 1996; Zmeili & Soubani, 2007).

O diagnóstico para a aspergilose invasiva normalmente é feito após o aparecimento dos sinais clínicos e sintomas, que são facilmente confundidos com infecções bacterianas, seguido da cultura positiva ou microscopia direta, radiografia e tomografia computadorizada sugestiva, sorologia e histopatologia. Este último, apesar de ser o padrão ouro, é um exame pouco específico, pois outras espécies de fungos possuem similaridade morfológica e microscópica com *Aspergillus spp.* Além disso, os métodos de coleta do tecido para análise são muito invasivos (toracoscopia ou biópsia) e representam risco para os pacientes debilitados (hipóxicos, com diátese hemorrágica e sépticos) (Zmeili & Soubani, 2007; Stevens, 2009).

O teste sorológico através da detecção de antígenos do *Aspergillus*, como a galactomanana (GM)³, no soro de pacientes antes dos sinais clínicos, corresponde a um dos mais recentes avanços no diagnóstico da aspergilose invasiva, além de ser o que permite o diagnóstico mais precoce atualmente. Além disto, este teste pode ser utilizado para monitorar a evolução da doença durante o tratamento. No entanto, falsos positivos são frequentes, já que a galactomanana é encontrada em alguns alimentos e medicamentos, como antibióticos β -lactâmicos. Recentemente, a detecção de (1,3)- β -D-glucana, outro constituinte de parede celular, foi proposto em

³ Este antígeno é um polissacarídeo da parede celular secretado pelo fungo durante seu crescimento (Latgé, 2010).

associação à GM, o que seria um teste de alta sensibilidade e especificidade para micoses invasivas sistêmicas, incluindo candidíases, fusarioses e aspergiloses. No entanto, o teste sorológico continua sendo restrito a laboratórios especializados e não pode ser considerado um exame de rotina (Zmeili & Soubani, 2007; Stevens, 2009).

Outro possível método diagnóstico para aspergilose invasiva é a detecção de DNA de *Aspergillus* no soro de pacientes pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Este teste possui sensibilidade de 64 a 100 % e especificidade de 64 a 98 %. No entanto, é frequente a ocorrência de falsos positivos, uma vez que não discrimina entre colonização e infecção. Desse modo, os métodos disponíveis são limitados, alguns por não serem rápidos e sensíveis o suficiente e outros por serem muito invasivos, e o diagnóstico precoce para a aspergilose invasiva ainda é uma meta a ser alcançada (Wheat, 2006; Zmeili & Soubani, 2007; Stevens, 2009).

O tratamento da aspergilose invasiva aumenta a sobrevivência do paciente, porém o sucesso da terapia depende de fatores do hospedeiro, fatores microbiológicos e critérios clínicos. Além disso, normalmente a terapia gera efeitos colaterais agressivos. As três classes de drogas anti-*Aspergillus* incluem: 1) polienos, como a anfotericina B, que afetam os sítios de ergosterol na membrana fúngica, formando poros na mesma e levando ao extravasamento do conteúdo celular; 2) triazóis, como o itraconazol, voriconazol e posaconazol, que inibem enzimas da via de síntese do ergosterol, como a 4-alfa esterol dimetilase dependente do citocromo P450, e levam à formação de membranas alteradas e disfuncionais; e 3) equinocandinas, como a caspofungina, micafungina e anidulafungina que inibem a síntese de β -1,3-glucana e comprometem a estrutura da parede celular, alterando a morfogênese, a divisão e o crescimento celular. No entanto, estas drogas apresentam problemas, como o aparecimento de multirresistência, alta toxicidade e interações prejudiciais com outras classes de drogas (Stevens, 2009).

A anfotericina B foi durante muitos anos a principal alternativa de terapia para API. Entretanto, esta droga pode causar sérios efeitos colaterais e, por isso, novas preparações lipídicas, como a anfotericina B lipossomal e o complexo lipídico anfotericina B, são utilizadas para reduzir sua toxicidade. Melhor tolerado que esta droga é o voriconazol, que é utilizado no tratamento inicial da aspergilose. Esta droga é um novo triazol, de amplo-espectro, que tem efeitos colaterais mais brandos

que a anfotericina B. No entanto, o voriconazol apresenta possíveis interações medicamentosas com ciclosporina, varfarina, quinidina, dentre outros. Outros antifúngicos, como o posaconazol, outro azol de amplo espectro, bem como derivados das equinocandinas, podem ser utilizados alternativamente em pacientes refratários. Existem ainda relatos de casos onde a combinação de um ou mais antifúngicos foi eficiente como, por exemplo, a combinação de anfotericina B lipossomal e caspofungina, cujo sinergismo foi descrito em testes *in vitro* (Zmeili & Soubani, 2007).

Frente a tantos desafios relacionados ao diagnóstico e ao tratamento da aspergilose, uma alternativa para a prevenção da doença seria a utilização de fluxos laminares ou filtros de alta eficiência para retirar conídios do *Aspergillus* de ambientes hospitalares, tais como salas de cirurgia, enfermarias e quartos de pacientes. Além disso, é importante afastar os pacientes imunossuprimidos de locais próximos a construções ou em reforma e de outras fontes de dispersão de conídios, como plantas, e manter uma rotina constante de limpeza de filtros de ar-condicionado. Estas medidas protegeriam os pacientes no momento em que eles estão mais susceptíveis, durante a internação hospitalar. No entanto, pacientes com imunossupressão crônica, como os que apresentam doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD), correm riscos fora deste ambiente. Outra alternativa de prevenção envolve a utilização de drogas antifúngicas em abordagens profiláticas, terapia empírica, terapia preventiva e terapia precoce. Isto consistiria em prevenir a micose através da administração de antifúngicos em pacientes de risco. Porém, isto envolve custo, possíveis interações medicamentosas e o efeito da toxicidade destas drogas, além de levar à seleção de cepas multirresistentes. Dada a importância clínica da aspergilose invasiva, existe um grande esforço para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas para melhorar os métodos diagnósticos e para criar novas alternativas terapêuticas, como o uso de imunidade passiva ou vacinas em pacientes de alto risco (Chauhan *et al.*, 2006).

3 INTERAÇÃO *ASPERGILLUS*-HOSPEDEIRO

A principal porta de entrada do *Aspergillus* no hospedeiro é a inalação dos conídios dispersos no ambiente. A imunidade inata não-específica possui um papel crucial nas defesas contra o *A. fumigatus*, o que inclui: barreiras anatômicas, fatores humorais, como o sistema complemento, e células fagocíticas e seus agentes antimicrobianos (Latgé, 1999; Filler & Sheppard, 2006).

A primeira defesa do hospedeiro contra o conídio são as barreiras físicas do trato respiratório. As vias aéreas superiores, a traquéia e brônquios possuem diferentes tipos celulares, incluindo células ciliares e células que secretam muco, que transportam o conídio ativamente, através dos batimentos ciliares, até a junção orofaríngea, onde os conídios podem ser expectorados. Contudo, o *A. fumigatus* é capaz de produzir moléculas tóxicas que destroem as células epiteliais e inibem esta atividade ciliar (Balloy & Chignard, 2009).

O próximo passo é a ativação de mecanismos efetores da imunidade inata. Isto inclui os mecanismos microbicidas de leucócitos residentes, como os macrófagos e células dendríticas alveolares (Park & Mehrad, 2009). Estas células compreendem a primeira linha de defesa celular do hospedeiro contra os conídios inalados, prevenindo sua germinação. Em adição, proteínas surfactantes facilitam a aglutinação, fagocitose e eliminação dos conídios por estas células efetoras. Os conídios que escapam, germinam formando hifas que são combatidas principalmente por neutrófilos que foram recrutados para o sítio de infecção. Estes, junto aos macrófagos alveolares, irão atuar através de vias microbicidas oxidativas (ex. atividade NADPH-oxidase), prevenindo a proliferação e invasão das hifas (figura 4). Por este motivo, a neutropenia, a doença granulomatosa crônica e o uso extenso de corticoesteróides, que atrasam o recrutamento de células polimorfonucleares, são fatores importantes de predisposição à aspergilose invasiva (Bossche *et al.*, 1988; Latgé, 1999; Erjavec *et al.*, 2009).

O conídio que alcança os alvéolos adere às células epiteliais. Foi visto, através de testes *in vitro*, que os conídios de *A. fumigatus* são internalizados por três tipos de fagócitos não profissionais: células epiteliais traqueais, células alveolares de tipo II e células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs). Esta internalização pode ser um dos mecanismos de evasão do conídio, dos fagócitos profissionais pulmonares, até que o mesmo colonize e invada os tecidos. No entanto,

várias perguntas permaneciam em aberto. Se estas células poderiam ser reservatórios de conídios, protegendo-os dos macrófagos ou se teriam a capacidade de matar o conídio? Se o conídio seria capaz de danificar estas células? (Paris *et al.*,1997).

Wasylnka & Moore (2002), em ensaios *in vitro* semelhantes aos anteriores, confirmaram que o conídio é internalizado por células epiteliais, endoteliais e macrófagos. Também demonstraram, em ensaios com pneumócitos tipo II (linhagem A549), que o conídio é internalizado por fagocitose, através do rearranjo dos microfilamentos e microtúbulos da célula hospedeira, e que as células fagocitadas têm sua germinação atrasada, sugerindo que a fagocitose dos conídios poderia ser um mecanismo de escape do fungo frente à resposta imune hospedeira.

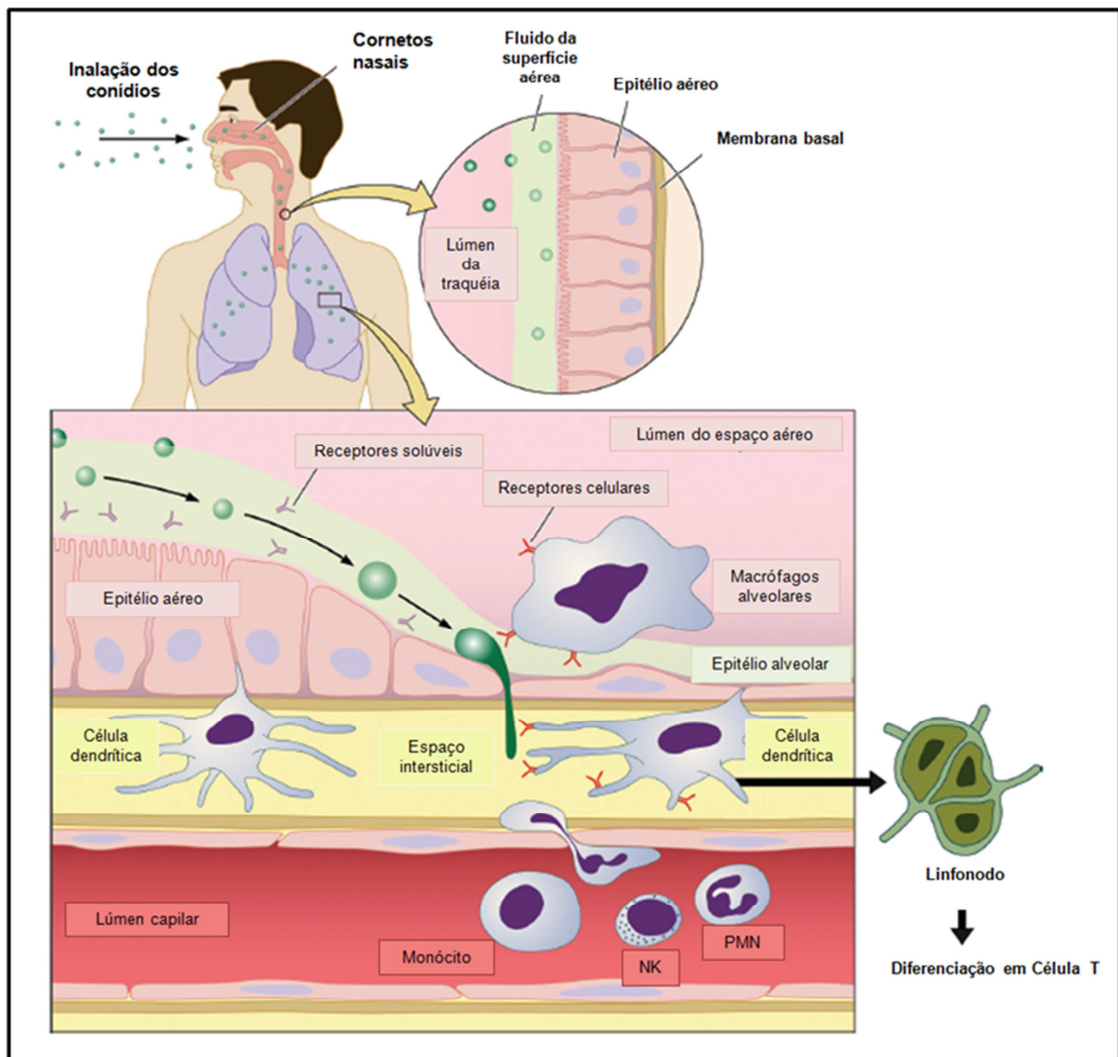


Figura 4. Representação esquemática dos componentes da resposta do hospedeiro contra os conídios de *Aspergillus*. Aerossóis de conídios de *A. fumigatus* são

inalados e alcançam os alvéolos. Em hospedeiros saudáveis, macrófagos alveolares e células dendríticas fagocitam e eliminam os conídios antes do *swelling*, um estágio essencial para a germinação. Ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos e as células polimorfonucleares (PMN) contribuindo para a atividade microbicida (adaptado de Park & Mehrad, 2009).

Assim, os conídios parecem estimular sua própria endocitose por pneumócitos tipo II e células epiteliais traqueais. Uma vez que o conídio do *A. fumigatus* entra em contato com estas células, induz a formação de pseudópodes que engolfam o micro-organismo, que, uma vez internalizado, é transportado em vesículas acídicas, via endossomo/lisossomo. Embora este conídio endocitado tenha sua germinação atrasada, muitos germinam e a hifa escapa do endossomo e atravessa/penetra na membrana plasmática, causando dano às células hospedeiras. Além disso, o conídio inibe a apoptose nestas células através de um mecanismo ainda desconhecido, que parece depender da viabilidade do mesmo, já que conídios mortos não possuem esta capacidade. Foi proposto que o conídio pode usar os pneumócitos como santuário, contribuindo para a virulência do fungo (Filler & Sheppard, 2006).

3.1 Interação *Aspergillus*-endotélio

A capacidade das hifas invadirem as células endoteliais dos vasos pulmonares é processo chave na aspergilose invasiva. Durante a aspergilose pulmonar, os conídios inalados formam hifas, que possuem um forte tropismo pelos vasos sanguíneos. Esta angioinvasão contribui para a necrose do tecido no foco de infecção o que reduz a penetração de leucócitos e o acesso das drogas antifúngicas ao sítio de infecção (Kamai *et al.*, 2006).

Na aspergilose invasiva ocorrem dois tipos de interação do micro-organismo com as células endoteliais polarizadas *in vivo*, durante o processo de angioinvasão (figura 5). A primeira ocorre nos pulmões, após a hifa de *A. fumigatus* ter penetrado o epitélio pulmonar. A hifa invade a vasculatura através da interação com a face abluminal das células endoteliais pulmonares, em um processo que resulta em destruição da monocamada endotelial e trombose intravascular. Este tipo de angioinvasão é mais comum do que o segundo, que ocorre somente em indivíduos profundamente imunocomprometidos. Neste caso, algumas hifas se rompem, e os

fragmentos circulam na corrente sanguínea. Estes fragmentos podem alcançar órgãos distantes, como cérebro, rins, coração e olhos, causando uma aspergilose disseminada hematologicamente. Neste caso, os fragmentos aderem na superfície luminal e penetram nas células endoteliais da superfície luminal para a abluminal (Filler & Sheppard, 2006).

O primeiro modelo de estudo comparando a interação de conídios e hifas de *A. fumigatus* com células endoteliais (HUVECs) foi estabelecido por Lopes-Bezerra & Filler (2004). Nestes ensaios, foi observada a capacidade das hifas invadirem a monocamada endotelial, causando injúria e ativação celular, com consequente expressão de fator tecidual (CD 142). Na infecção por *A. fumigatus* esta expressão de fator tecidual na superfície endotelial pode resultar em trombose intravascular e infarto tecidual, levando a uma área tecidual morta que serve como fonte de nutrientes para o fungo (Lopes-Bezerra & Filler, 2003). Os conídios são capazes de causar danos às células endoteliais associados ao processo de germinação. Além disso, o dano celular depende do contato entre os fungos e a monocamada endotelial, e provavelmente é mediado por moléculas presentes na superfície do fungo (Lopes-Bezerra & Filler, 2004; Kamai *et al.*, 2006).

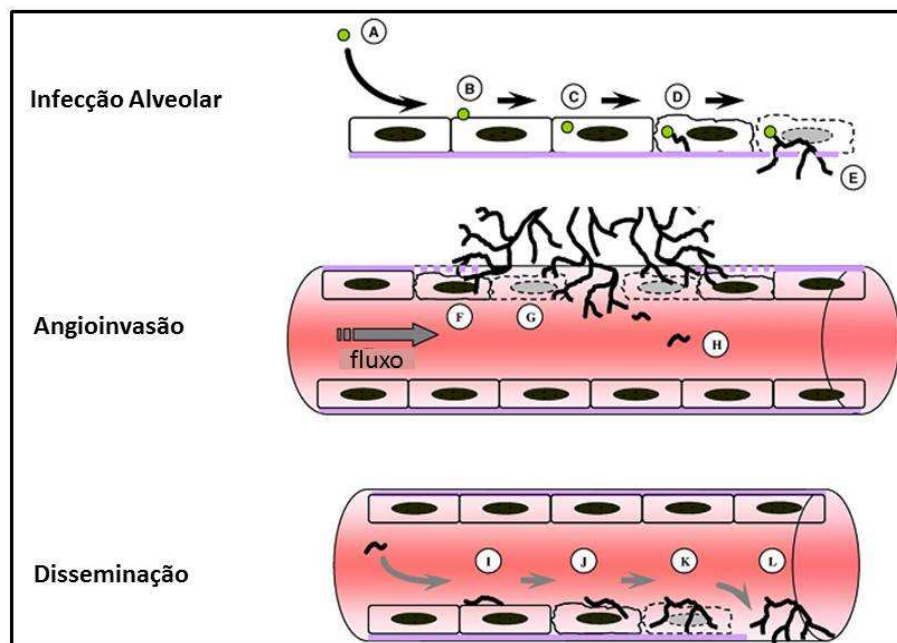


Figura 5. Modelo de interação do *A. fumigatus* com células epiteliais pulmonares e células vasculares. A angioinvasão e a disseminação da aspergilose invasiva envolvem: A. Inalação; B. Adesão; C. Endocitose; D. Germinação; E. Escape; F. Penetração na superfície abluminal; G. Indução de dano celular; H. Disseminação hematogênica; I. Adesão à superfície luminal do endotélio; J. Invasão; K. Dano ao

endotélio; L. Invasão extravascular órgãos internos. Os passos de (A–E) ocorrem no alvéolo pulmonar; (F–H) nos vasos sanguíneos pulmonares e (I–L) nos vasos sanguíneos sistêmicos (adaptado de Filler & Sheppard, 2006).

Chiang e colaboradores (2008) compararam o modelo *in vitro* com modelos murinos de aspergilose invasiva, usando animais neutropênicos (imunossuprimidos com ciclofosfamida e acetato de cortisona) e não-neutropênicos (imunossuprimidos apenas com acetato de cortisona). Neste trabalho, as células endoteliais desafiadas com *A. fumigatus* também responderam às hifas, e não aos conídios, expressando moléculas de adesão a leucócitos (E-selectina e VCAM-1), quimiocinas (IL-8) e citocinas próinflamatórias (TNF α). O estímulo de células endoteliais também foi observado *in vivo* nos dois modelos e associado ao aumento da carga fúngica e angiogênese. No entanto, nos animais neutropênicos este estímulo só foi detectado na fase tardia da infecção (Chiang *et al.*, 2008).

O modelo *in vitro* de interação entre *A. fumigatus* e monocamadas endoteliais corresponde à interação do fungo com a superfície luminal do endotélio. Como o endotélio é polarizado, Kamai e colaboradores (2009) estabeleceram um modelo de interação em que as células endoteliais são desafiadas com *A. fumigatus*, tanto na superfície abluminal quanto na superfície luminal da monocama de HUVECs, utilizando HUVECs cultivadas em membranas suspensas do tipo *Nunc CC inserts* (Thermo). Foi observado que a infecção abluminal difere da luminal no mecanismo de invasão, na magnitude da ativação endotelial e no curso temporal do dano endotelial. No entanto, a resposta endotelial é similar nos dois casos. As observações sugerem que possam existir diferenças na patogênese da aspergilose invasiva comparada à hematologicamente disseminada. Além disso, também foi observado que o TNF- α derivado das células endoteliais desafiadas por *A. fumigatus* é essencial para a ativação do endotélio vascular, e que fatores solúveis produzidos pelo fungo regulam negativamente a expressão de E-selectina e IL-8, enquanto induzem o dano endotelial (Kamai *et al.*, 2009). Recentemente, nosso grupo observou que, entre componentes da parede celular, um polissacarídeo contendo resíduos de galactofuranose e galactosamina parece mediar a adesão do fungo ao endotélio e, conseqüentemente, induzir a ativação endotelial (Neves, 2012).

Ben-Ami e colaboradores (2009) demonstraram, em ensaios *in vitro*, que *A. fumigatus* inibe a migração de HUVECs e a formação de tubos capilares, processo conhecido como angiogênese. Além disso, em modelos murinos *A. fumigatus* suprime a angiogênese em *matrigel* aplicada no sítio de infecção cutânea em modelos murinos. Também demonstraram que a deleção de um gene regulador global de metabólitos secundários (*laeA*) abole a atividade antiangiogênica de *A. fumigatus*, e identificou a gliotoxina como um dos metabólitos antiangiogênicos. Neste trabalho, também foi observada a regulação negativa de genes associados à angiogênese no pulmão de camundongos imunossuprimidos com acetato de cortisona e ciclofosfamida, durante a fase inicial de aspergilose invasiva experimental. Estes resultados mostram que a modulação da angiogênese por metabólitos secundários participa da patogênese da aspergilose invasiva, e que estes fatores constituem um possível alvo para intervenções terapêuticas com o objetivo de melhorar a penetração de células efetoras do sistema imune e drogas antifúngicas no tecido infectado por *A. fumigatus* (Ben-Ami *et al.*, 2009).

3.2 Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs).

Na superfície dos fungos patogênicos, assim como na superfície de vírus e bactérias, existem moléculas que são essenciais para o reconhecimento dos mesmos pelo sistema imune inato do hospedeiro. Deste modo, entender a organização estrutural da parede celular dos fungos pode ajudar a determinar PAMPs capazes de disparar a resposta do hospedeiro, assim como os PRRs envolvidos nestes processos (Latzgé, 2010, Sheppard, 2011).

Apesar de ser uma estrutura que confere aos fungos proteção e resistência ao turgor, a parede celular não é uma estrutura estática, sendo sua organização e composição dependente do ambiente, do morfotipo, do estágio de crescimento e da espécie fúngica (figura 6). Sabe-se que 90% da parede celular são polissacarídeos aparentemente separados em duas camadas: um esqueleto fibrilar alcalino-insolúvel, localizado próximo à membrana plasmática, e um cemento amorfo alcalino-solúvel que se estende por toda parede, concentrando-se na parte externa. A fração alcalino-solúvel varia entre as espécies. Em *Candida albicans*, por exemplo, é composta principalmente por β -1,6 glucana e α - e β -manana, enquanto que, em *A.*

fumigatus, é composta por α -1,3- glucana com 1 % de ligações α -1-4. Além disso, como mostrado na figura 6, a parede do conídio de *A. fumigatus* é rica em hidrofobinas e melanina, enquanto que a parede do tubo germinativo possui β -1,3 glucanas, galactomanana e proteínas N-glicosiladas, incluindo galactomanoproteínas (Latgé, 2010).

A porção central da parede é composta por β -1,3 glucana ligada à quitina, formando um complexo glucana-quitina ligado covalentemente a outros polissacarídeos, cuja composição também varia entre diferentes espécies (Latgé, 2007). Em *A. fumigatus*, os principais polissacarídeos são a galactomanana e a β -1,3-1,4-glucana, enquanto em *C. albicans* o principal polissacarídeo é a β -1,6 glucana (Fontaine *et al.*, 2000; Latgé, 2010). Além dos polissacarídeos, na parede celular estão presentes proteínas não estruturais, e proteínas estruturais. Um exemplo de proteína estrutural é a hidrofobina expressa na superfície dos conídios de *A. fumigatus* (Latgé, 2007; Sheppard, 2011).

O principal componente da parede celular de *A. fumigatus* é a galactomanana, também presente na matriz extracelular deste fungo. Este polissacarídeo possui resíduos de galactofuranose (Galf), um monossacarídeo sintetizado a partir da galactopiranosose (Galp), através da enzima UDP-galactopiranosose mutase, que é codificada pelo gene *UGM1* (Lamarre *et al.*, 2009). A galactosaminogalactana (GAG) também está presente na superfície de *A. fumigatus*, mas, diferente da galactomanana, é um polímero que possui resíduos de galactopiranosose (Galp) (Lousserte *et al.*, 2010). Lamarre e colaboradores (2009), em estudos com uma cepa mutante de *A. fumigatus* para o gene *UGM1*, verificaram que a deleção deste gene bloqueia a síntese de Galf e leva a uma menor expressão de galactomanana e uma maior expressão de moléculas de GAG. Além disso, os autores mostraram que o fungo Δ *ugm1* adere mais a superfícies inertes e a células epiteliais de pulmão (Lousserte *et al.*, 2010).

Em concordância com estes resultados, o estudo da interação de conídios e hifas da cepa Δ *ugm1* de *A. fumigatus* com HUVECs revelou que estes organismos aderem mais às células endoteliais. Também foi observado que as hifas desta cepa mutante são capazes de estimular a secreção de TNF- α e IL-6 e a expressão de fator tecidual (CD-142) pelas células endoteliais. Além disso, este estudo mostrou que mutantes deficientes na síntese de GAG apresentam um fenótipo hipoaderente às células endoteliais e uma menor capacidade de ativar essas células, quando

comparadas às cepas selvagens, sugerindo que o polímero de superfície GAG pode ter papel importante na ativação endotelial durante a interação de *A. fumigatus* com HUVECs (Neves, 2012).

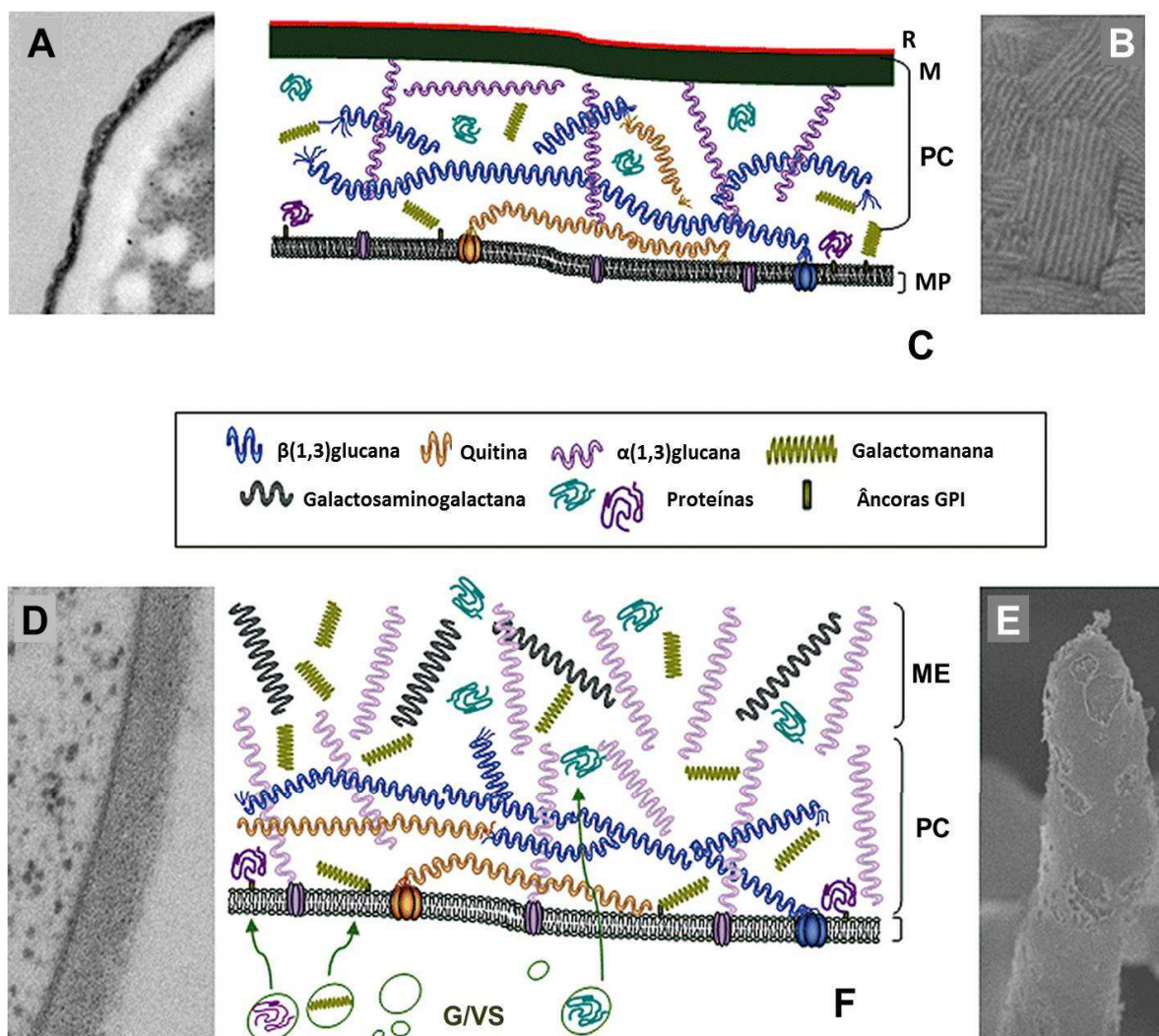


Figura 6. A parede celular de *A. fumigatus* como uma estrutura dinâmica. A. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de uma seção da parede celular (PC) do conídio de *A. fumigatus*, mostrando a camada externa de melanina (M) na parede. B. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando os *rodlets* (R) na superfície do conídio. C. Diagrama hipotético mostrando a possível organização dos polímeros na parede celular do conídio. Neste, α -1,3-glucana fixa a melanina na superfície do conídio. MP. Membrana plasmática. D. Imagem de MET do micélio cultivado em meio de cultura líquido. E. Imagem de MEV mostrando a matriz extracelular (ME) cobrindo a hifa cultivada em meio ágar (ausente em hifas cultivadas sob agitação em meio líquido). F. Diagrama da possível organização dos polímeros da parede celular do micélio. Neste, proteínas solúveis ou GPI ancoradas e alguns polissacarídeo, como as mananas, são sintetizadas intracelularmente e transportadas para o espaço extracelular através do sistema Golgi/vesículas secretadas (G/VS). Em contraste, β -1,3-glucana e quitina são sintetizadas como

cadeias lineares por polissacarídeo sintases; as cadeias individuais são estabilizadas por hélices triplas através de ligações não covalentes (adaptado de Latgé, 2010).

Muitos polissacarídeos da parede são PAMPs reconhecidos pelo hospedeiro através de PRRs como receptores do tipo *Toll* (TLR) e receptores lectinas tipo C (CLR) (tabela 4). Estes receptores possuem um ou múltiplos domínios de reconhecimento de carboidrato (CRD). Dentre os receptores, um dos mais estudados é a dectina-1, um receptor de lectina tipo C não clássico que reconhece β -1,3 glucana. Outros PRRs, como a proteína Ym1 e a lectina REGIIIg, reconhecem quitina. No entanto, ainda não foram descritos receptores para outros polissacarídeos, como quitosana, α -1,3 glucana e galactomanana (Latgé, 2010).

Tabela 4. Interação entre polissacarídeos da parede celular de fungos e PRRs ligados à membrana ou solúveis (adaptada de Latgé, 2010).

Polissacarídeos da parede celular	Ligantes solúveis	Receptores ligados à membrana
Manana heterogênea ^a , α -1,3-glucana, Quitosana, Galactana	Ig ^c	?
β -1,3-glucana	Ig Ficolina-2 ^d Fragmentos C3	Dectina-1 \pm TLR Langerina CR3 (CD11b/ CD18) Receptor <i>scavenger</i> (CD5, CD36, SCARF1)
β -1,6-glucana	Fragmentos C3	CR3
Quitina	Ig Ficolina-2 ^d	FIBCD1, REGIIIg ^d
O-manana ^b	?	TLR4 (+CD14)
N-manana ^b	Ig Colectinas (MBL, Spa, SpD)	DC SIGN Receptor de manose Dectina-2 + TLR2 Mincle ^d
β -1,2-manana ^b	Ig	Galectina-3 + TLR2

- a. Heteropolímero de manana contendo resíduos de ácido glucurônico, xilose ou galactose;
- b. Homopolímeros de manose;
- c. Imunoglobulinas;
- ? Desconhecido.

As células endoteliais possuem um papel essencial na iniciação e regulação da resposta do hospedeiro a infecções. Durante a infecção, estas células participam da dilatação das arteríolas, capilares e vênulas, com o aumento da permeabilidade e fluxo sanguíneo e a exsudação de fluidos, e produzem fatores que influenciam a atividade microbida de leucócitos e a migração dos mesmos para o sítio de infecção (Michiels, 2003). Estes fatores incluem citocinas pro-inflamatórias, como

TNF- α , IL-1 e IL-6, quimiocinas IL-8 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), e moléculas de adesão a leucócitos como P-selectina, E-selectina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e VCAM-1 (Michiels, 2003; Phan & Filler, 2008). Neste sentido, o estudo do comportamento da célula endotelial desafiada por *A. fumigatus* representa uma grande contribuição para a compreensão da patogênese.

3.3 Galectina-1 e Anexina A2

Nos últimos anos, diversas proteínas foram descritas como candidatas a PRR para diferentes patógenos. Dentre elas, está a galectina-1 que, junto à galectina-3, foi uma das primeiras lectinas descritas em mamíferos capazes de reconhecer reversivelmente β -galactosídeos. Esta família de lectinas possui um CRD conservado com aproximadamente 130 aminoácidos, que pode estar ativo na forma de homoligômeros ou heteroligômeros (Camby *et al.*, 2006; Vasta, 2009).

Até hoje, foram descritas 15 galectinas em mamíferos, que podem ser classificadas de acordo com a homologia da sequência de seus aminoácidos. A figura 7 mostra a classificação em: i) Prototípicas, que formam homodímeros não-covalentes e apresentam apenas um CRD (Galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15); ii) Quimeras, que apresentam um CRD e um domínio N-terminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, responsável pela sua oligomerização (Galectina-3); e iii) Repetições *tandem*, que possuem dois CRDs distintos unidos por um peptídeo ligante (Galectinas: 4, 6, 8, 9 e 12) (Cummings & Liu, 2009).

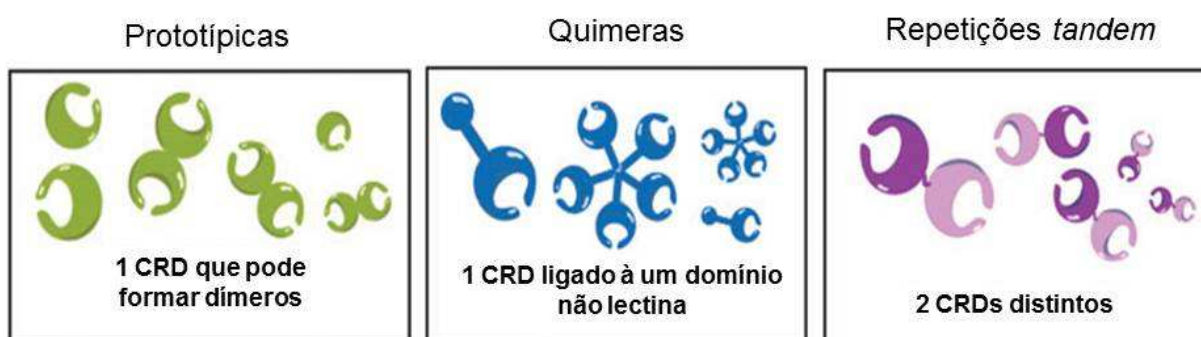


Figura 7. Classificação das galectinas com relação ao CRD. As galectinas podem ser classificadas em três grupos de acordo com suas características estruturais: prototípicas, quiméricas e repetições *tandem*. Estão representados os CRDs (formas elípticas coloridas) (Adaptado Liu & Rabinovich, 2010).

As galectinas são proteínas solúveis que podem ser encontradas tanto no espaço intracelular quanto no extracelular, dependendo do estado em que a célula se encontra (figura 8). Apesar disto, estas proteínas apresentam características típicas de uma proteína citoplasmática: não apresentam glicosilações ou peptídeo sinal de secreção, apresentam acetilação na porção N-terminal e não passam pela via retículo/Golgi. Desta forma, sua presença no espaço extracelular da membrana, bem como na matriz extracelular, provavelmente está associada a um mecanismo secretório não convencional (Liu & Rabinovich, 2010).

Dependendo do compartimento onde se encontram, as galectinas desempenham funções celulares distintas e algumas vezes antagônicas (Yang *et al.*, 1996). No meio extracelular, as galectinas exercem sua atividade lectínica e podem promover o intercruzamento de glicoconjugados na superfície da célula e induzir eventos de transdução de sinal por meio da formação destes complexos galectina-receptor. No meio intracelular, as galectinas não dependem de sua atividade lectínica e exercem funções biológicas como processamento de RNA e regulação da homeostasia celular (Cedeno-Laurent & Dimitroff, 2012).

A galectina-1, um homodímero de 28 kDa associado de modo não covalente, é expressa em diferentes tecidos em condições fisiológicas, tais como: músculos, timo, próstata, fígado, baço, endotélio, pele e cérebro em desenvolvimento (Thijssen *et al.*, 2008); está relacionada ao desenvolvimento embrionário e adulto; a homeostase e sobrevivência de células do sistema imune; a adesão, motilidade e na transmigração de leucócitos no endotélio vascular (Dias-Baruffi *et al.*, 2010). Esta proteína também é expressa em condições patológicas como carcinomas de tireóide, cólon, ovário, melanoma e linfoma e patologias do sistema nervoso. No entanto, no crescimento celular esta proteína possui um papel paradoxal, pois, pode ativar ou inibir este processo dependendo do tipo e *status* celular, da estrutura quaternária em que se encontra e de sua localização subcelular (Camby *et al.*, 2006).

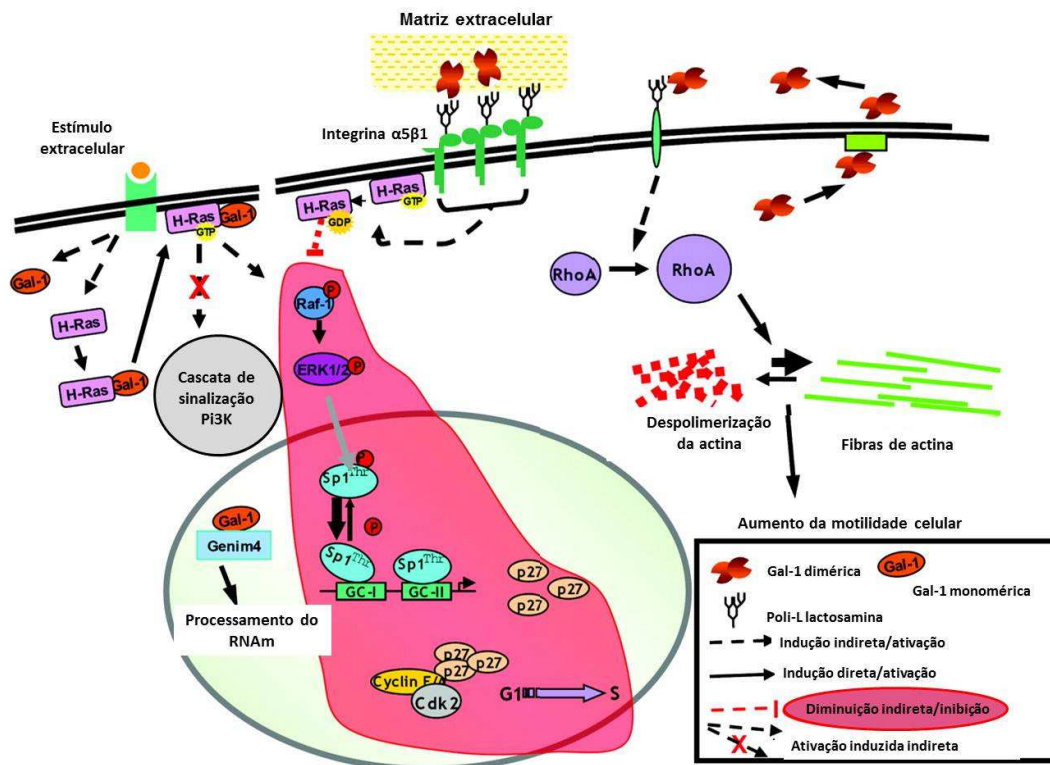


Figura 8. Galectina-1 e a sinalização celular. A galectina-1 (Gal-1) está presente no espaço intracelular, onde independe de sua atividade lectínica, e extracelular, onde depende de sua atividade lectínica. A Gal-1 inibe o crescimento celular, interagindo com a integrina $\alpha 5\beta 1$. O efeito antiproliferativo é resultado da inibição da via Ras-MEK-ERK e da indução de p27. Além disso, a Gal-1 induz a transcrição de p21, que aumenta a estabilidade de p27. Este acúmulo de p21 e p27 inibe a atividade Cdk2, resultando na paralisação do ciclo celular. A Gal-1 aumenta a motilidade celular, induzindo a expressão de RhoA e alterando a polimerização do citoesqueleto. Gal-1 é recrutada do citosol para a membrana através do H-Ras-GTP, em um processo independente de lactose, resultando na formação de um *cluster* dos dois em microdomínios *non-raft*. Subsequentemente, ocorre a ligação a Raf-1 e a ativação da sinalização ERK. A Gal-1 nuclear interage com a gemina 4 e é co-immunoprecipitada com o complexo SMN, envolvendo a via *splicing* (Adaptado Camby *et al.*, 2006).

Recentemente, a galectina-1 foi descrita como PRR, sendo capaz de participar da defesa antiviral, ao reconhecer e bloquear a fusão de glicoproteínas do envelope do herpesvirus 1 e do vírus Epstein-Barr. Sabe-se que a galectina-1 se liga a oligossacarídeos N-ligados no capsídeo do vírus Nipah e do vírus Hendra, causando uma oligomerização aberrante que bloqueia a fusão capsídeo-célula. Em ensaios *in vitro* de infecção de células gástricas com *Helicobacter pylori*, as galectinas-1 e 3 são superexpressas (Camby *et al.*, 2006).

A anexina A2 também é descrita como proteína receptora ou mediadora na interação de diferentes patógenos com células hospedeiras. Esta proteína, também

chamada de anexina II, calpactina 1, ou ANXA2, pertence a uma família de proteínas hidrofílicas que se ligam a fosfolípidos negativamente carregados, de forma dependente de Ca^{2+} . Nesta família, foram descritas 12 subfamílias de anexinas em vertebrados, dentre as quais 10 em mamíferos, e que podem ser encontradas como monômeros ou oligômeros (Gerke e Moss, 2002).

Na forma monomérica, as anexinas possuem de 30-40 kDa, com exceção da anexina A6, que tem 68 kDa. No caso da anexina A2, a mesma pode apresentar-se na forma de monômero (A2m, com 36 kDa), heterodímero (A2d) e heterotetrâmero (A2t). O heterodímero é composto de uma subunidade de anexina A2m e uma subunidade de 3-fosfogliceratoquinase. O heterotetrâmero é composto de duas subunidades de anexina A2m e duas subunidades de p11⁴ (Deora *et al.*, 2004).

As anexinas podem ser encontradas tanto no citoplasma quanto na membrana plasmática, e esta localização parece ser regulada pela flutuação na concentração de Ca^{2+} intracelular. No caso da anexina A2, em particular, a mesma já foi encontrada no citoplasma, na membrana plasmática e na membrana de endossomos primários (Backes *et al.*, 2010). No citoplasma, a anexina A2 apresenta-se majoritariamente na forma de monômeros, e na membrana, normalmente está na forma heterotetramérica, formando um complexo com a proteína S100A10 (p11). O heterodímero desta proteína já foi associado ao núcleo onde regula a DNA polimerase α (Dassah *et al.*, 2009).

Em sua estrutura, as anexinas apresentam um domínio C-terminal conservado, onde encontram-se os sítios de ligação aos íons Ca^{2+} . Este domínio também está envolvido no seu ancoramento à membrana plasmática. Apresenta, ainda, um domínio N-terminal variável. No caso da anexina A2, o domínio variável contém sítios de fosforilação e o sítio para ligação da subunidade p11 (figura 9) (Hajjar *et al.*, 1996).

⁴ p11, proteína de 11 kDa que pertence a uma família de pequenas proteínas (aproximadamente 10 kDa) denominada, S100, sendo também denominada S100A10 (Gerke e Moss, 2002).

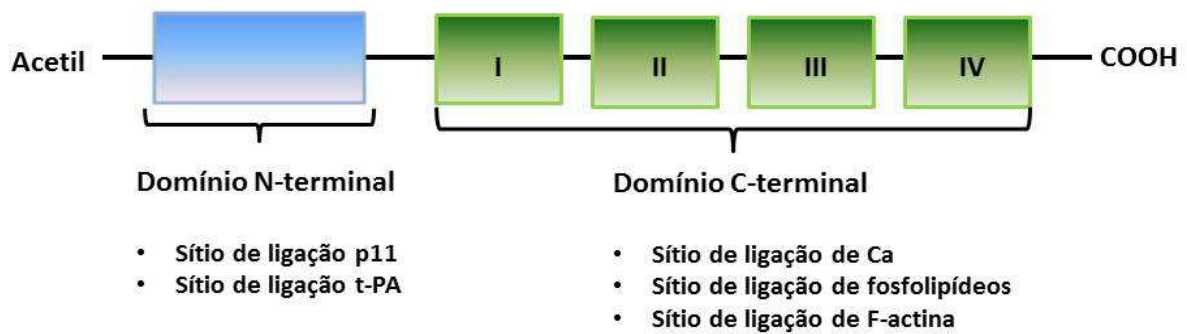


Figura 9. Diagrama da estrutura da anexina A2. A região N-terminal apresenta o sítio de ligação à proteína p11 e ao ativador de plasminogênio tecidual (tPA). A região C-terminal possui quatro domínios repetidos, cada um contendo a sequência consenso da anexina A2. Este é o sítio de ligação de cálcio, fosfolipídeos e F-actina.

A anexina A2 é expressa *in vivo* em diferentes tecidos ou órgãos, como o intestino, pulmão e vasos sanguíneos, e pode desempenhar várias funções biológicas *in vitro*, todas dependentes de Ca^{2+} , incluindo a internalização e o transporte de colesterol esterés, a biogênese de corpos multivesiculares, a reciclagem de receptores da membrana plasmática e a exocitose de grânulos secretados (Backes *et al.*, 2010).

Nas células endoteliais, a anexina A2t descrita como receptor para diversas moléculas, como o plasminogênio e o tPA, o que leva à indução da formação de plasmina (Hajjar e Krishnan, 1999). No entanto, há outras proteínas capazes de se ligar a anexina A2 na superfície endotelial, como a tenacina C (TN-C), uma proteína solúvel envolvida no processo de migração celular (Chung & Erickson, 1994) e β -glicoproteína I (β 2GPI), uma glicoproteína plasmática que corresponde a um autoantígeno na síndrome do anticorpo anti-fosfolipídio e induz a ativação endotelial através da formação do complexo anti- β 2GPI- β 2GPI-anexina A2t (figura 10) (Meroni *et al.*, 2011).

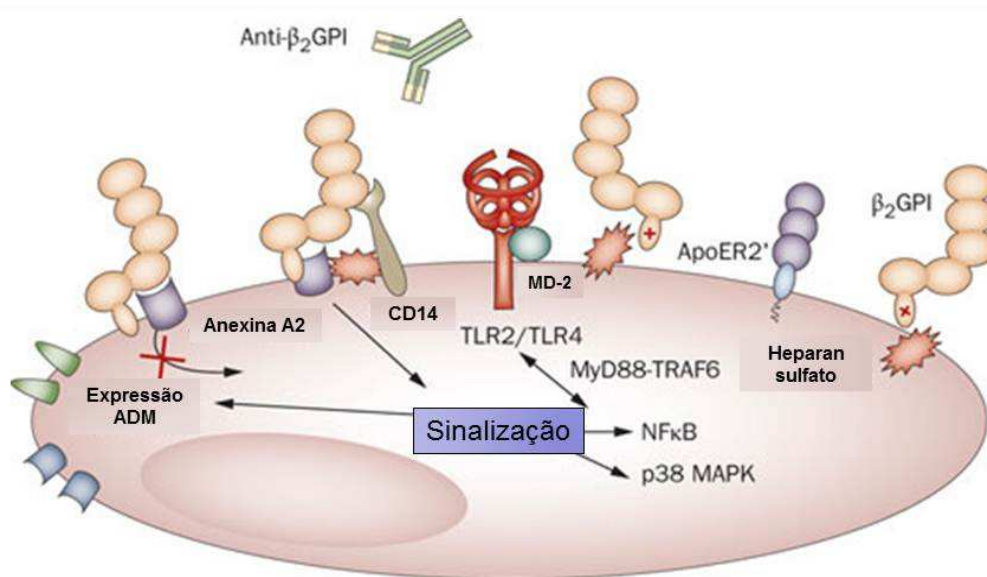


Figura 10. Ativação endotelial por anticorpos anti- β_2 GPI. No diagrama é possível observar que o aPL reage à β_2 GPI expressa na membrana endotelial e induz a sinalização celular. Posteriormente, a β_2 GPI adere à membrana endotelial (i) através de ligação eletroestática entre sítios de ligação catiônica de fosfolipídeos a estruturas aniônicas, como heparano, ou (ii) como um ligante de anexina A2. A ligação do anticorpo anti- β_2 GPI leva à formação de *clusters* de β_2 GPI com possíveis receptores e induz a sinalização celular, resultando na ativação de NF κ B e/ou p38 MAPK. A interação de β_2 GPI com TLR2/TLR4 pode ser responsável pela sinalização dependente de MyD88 e TRAF6. Abreviações: aPL, anticorpos anti-fosfolipídeos; ApoER2', receptor de apolipoproteína E2'; β_2 GPI, glicoproteína β_2 I; MyD88, proteína de diferenciação primária mielóide MyD88; NF κ B, fator nuclear κ B; TLR, receptor tipo Toll; TRAF6, receptor TNF associado 6 (adaptado Meroni *et al.*, 2011).

Além de receptor para diversas moléculas, a anexina A2 também foi descrita como receptor para patógenos virais, como citomegalovírus humano (HCMV), sendo capaz de induzir a fusão desta partícula à membrana de células endoteliais (Wright *et al.*, 1994; Raynor *et al.*, 1999). Em células epiteliais, esta proteína foi descrita como receptor para *Pseudomonas aeruginosa*, contribuindo parcialmente para a internalização desta bactéria (Kirschnek *et al.*, 2005), e *H. pylori*, estando 2,5 vezes mais expressas nas células infectadas (Das *et al.*, 2005).

Apesar de todos estes avanços, são necessárias investigações adicionais para entender os mecanismos pelos quais a hifa de *A. fumigatus* estimula o endotélio, provendo novas descobertas sobre o processo de angiogênese e a resposta inflamatória vascular, que são mecanismos centrais na patogênese da

aspergilose invasiva disseminada. Para tanto faz-se necessário conhecer tanto as moléculas da superfície do fungo (PAMPs) quanto os receptores do hospedeiro (PRRs) envolvidos na interação fungo-célula hospedeira, bem como, conhecer os mecanismos de sinalização na interação e ativação endotelial. Visando contribuir para o entendimento de como se dá a invasão e ativação do endotélio, evento chave na fisiopatologia da aspergilose invasiva, o presente trabalho tem como objetivo dar continuidade ao estudo de interação de *A. fumigatus* com o endotélio vascular (Lopes-Bezerra *et al.*, 2004) utilizando a tecnologia proteômica para identificar as proteínas endoteliais cuja expressão é modulada nesta interação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificação das proteínas diferencialmente expressas pela célula endotelial humana após a interação com *germlings* (morfotipo: tubo germinativo) das cepas selvagem e mutante $\Delta ugm1$ de *A. fumigatus*.

4.2 Objetivos específicos

- 1- Predizer *in silico* através de ferramentas de bioinformática, as proteínas relevantes na biologia do endotélio e nos processos de homeostase que pudessem ter correlação com a fisiopatologia da aspergilose invasiva, a partir de um mapa proteômico de referência da célula endotelial não ativada (em quiescência) estabelecido por 1D-nanoLC-MS/MS;
- 2- Analisar, utilizando o software *Osprey 1.2.0*, o mapa de interação das proteínas endoteliais identificadas nas HUVECs não ativadas, cuja função foi associada aos processos de homeostase (objetivo 1), com as proteínas disponíveis no banco de dados *BioGrid*;
- 3- Anotar e depositar num banco de dados, *Web Proteopathogen*, o mapa proteômico da célula endotelial de referência.
- 4- Avaliar as proteínas diferencialmente expressas pelas HUVECs após interação com *A. fumigatus*, cepas selvagem e $\Delta ugm1$, utilizando a técnica de 2D-DIGE e o software *DeCyder*;
- 5- Identificar as proteínas de interesse mapeadas na etapa anterior (objetivo 4), por espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS);
- 6- Avaliar as possíveis vias e processos celulares relacionados com as proteínas identificadas por MS/MS (objetivo 5), utilizando o software *Osprey 1.2.0*, construindo os respectivos mapas de interação.

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção das células endoteliais

As células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foram isoladas através do método descrito por Jaffe *et al.*, (1973). Seguindo este método, os cordões umbilicais recém coletados foram lavados com tampão cordão (NaCl 125 mM, KCl 4 mM, tampão fosfato 0,65 mM e glicose 0,2%) e secos externamente com gaze estéril. A veia umbilical de cada cordão foi canulada em uma das extremidades, através de cânula acoplada a uma seringa e lavada com tampão cordão. Para a extração das células endoteliais, a extremidade não canulada de cada cordão foi vedada e, através da seringa, foi injetada uma solução de colagenase IV 0,1% (Sigma). A extremidade canulada também foi vedada e os cordões incubados durante 5 min à 37°C. A seguir, o conteúdo interno da veia umbilical despejado em um tubo de ensaio contendo meio 199 (M199; Sigma). As células endoteliais de cada tubo foram sedimentadas por centrifugação 290 x g, durante 10 min a 25°C. O precipitado foi ressuspendido em meio 199 com HEPES (Sigma), suplementado com antibióticos (penicilina G 10.000 U/ml e estreptomicina 10 mg/ml; Gibco), glutamina 2 mM (Gibco) e soro fetal bovino (SFB) 10% e soro adulto bovino (SAB) 10% (ambos Cultilab), sendo esta suspensão celular transferida para uma garrafa de cultura de 25 cm² (Nunc), cuja superfície foi previamente recoberta com gelatina 2% (Sigma). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com CO₂ 5%, até a obtenção de monocamadas confluentes (culturas primárias).

Para obtenção das subculturas, as culturas primárias em confluência foram tripsinizadas, utilizando-se tripsina 0,025% em EDTA 0,2% (Gibco) em PBS 50 mM, pH 7. A reação de tripsinização foi paralisada com meio 199 suplementado com SFB 10% e SAB 10%. Em seguida, esta suspensão celular foi cultivada em garrafas de 75 cm² (Nunc) para obtenção de massa celular para extração de proteínas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro (CEP SMSDC-RJ), número de protocolo 196/09 (Anexo B - Parecer do Comitê de ética 1; Anexo C - Parecer do Comitê de ética 2).

Foram utilizados cordões de doadoras saudáveis, coletados poucas horas após o parto. As culturas primárias foram realizadas com *pool* de, em média, 3 doadoras.

5.2 Padronização da extração de proteínas totais de HUVECs

As monocamadas de HUVECs confluentes cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² foram lavadas duas vezes com solução salina de HANK'S (Cultilab). Para a padronização da obtenção do extrato proteico total de HUVEC foi utilizado o tampão de lise celular (Uréia 8 M, Tris-HCl 1 M, CHAPS 4%, pH 8,5) com inibidores de protease (PMSF 100 µM, Leupeptina 40 µM e pepstatina 1 µM) através de três estratégias:

(a) Na terceira lavagem, as células endoteliais foram retiradas com o auxílio de um *cell scraper* e sedimentadas por centrifugação a 290 x g durante 10 min a 25°C. O sobrenadante foi descartado e as células endoteliais ressuspensas em 300 µL de tampão de lise celular e mantidas durante 30 min a 4°C, sob agitação suave. Os debris celulares foram sedimentados por centrifugação 18000 x g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante (extrato celular) foi recuperado.

(b) As células endoteliais lavadas foram incubadas com 2 mL de tampão de lise e agitadas manualmente a cada 15 min, durante 1 h a 4°C, o extrato foi incubado em um banho de ultrassom durante 10 ciclos de 10 s intercalados com banho de gelo. Os debris celulares foram sedimentados por centrifugação 18000 x g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante (extrato celular) foi recuperado.

(c) As células endoteliais lavadas foram incubadas com 2 mL de tampão de lise e agitadas manualmente a cada 15 min, durante 1 h, em temperatura ambiente. O extrato foi incubado em banho de ultrassom e os debris celulares sedimentados conforme descrito na extração (b).

Os extratos obtidos foram precipitados pelo método de TCA/acetona. Os extratos proteicos de HUVECs foram ressuspensos em Tris-HCl 30 mM, uréia 7 M, tiouréia 2 M e CHAPS 4% pH 8,8 e a proteína quantificada pelo método de Bradford (kit da Bio-Rad). Todos os extratos foram conservados em ultrafreezer a -80°C. Nesta etapa, cada amostra biológica correspondeu a um *pool* de extratos derivados de 10 garrafas de 75 cm²; cada garrafa correspondeu a um cordão de um doador.

5.3 Mapa de referência de HUVECs SDS-PAGE/nano-LC-MS/MS

5.3.1 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Quinhentos microgramas do extrato de HUVECs foram submetidos à eletroforese unidimensional em géis preparativos sob condições desnaturantes, segundo o método de Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em um sistema Protean II cell (Bio-Rad) utilizando um gel de poliacrilamida 10%, utilizando uma corrente constante de 40 mA/gel. O gel foi corado com *Coomassie* coloidal, método compatível para posterior identificação das proteínas por MS/MS.

5.3.2 Digestão tríptica e extração dos peptídeos trípticos

O gel contendo os extratos de HUVECs, previamente separados por SDS-PAGE, foi cortado manualmente por quadrante, para um total de 17 quadrantes (figura 11). Os mesmos foram transferidos para microtubos e lavados duas vezes com água ultrapura (Milli-Q Synthesis System) durante 10 min para a descoloração do gel. Posteriormente, foram desidratados com 100% acetonitrilo (ACN), durante 5 min três vezes. Em seguida, foram secos em *speedvac* por 15 a 20 minutos. Após o processo de descoloração e desidratação, os fragmentos de gel foram cobertos com uma solução de 10 mM de DTT (ditiotretol) em 25 mM de bicarbonato de amônio (AmBic), por 30 min a 56°C, para redução das proteínas. Após um breve período em temperatura ambiente, foi realizada uma etapa rápida de desidratação com ACN 100%. Posteriormente, os géis foram incubados com uma solução iodoacetamida (IAA) 50 mM em AmBic 25 mM, e, em seguida, os géis foram novamente desidratados com ACN 100% por 5 minutos. Após retirada da solução, foi adicionada uma solução AmBic 25 mM e após tira-la, foi adicionado igual volume de ACN 100%, seguindo-se incubação por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e os fragmentos de gel foram secos em uma centrífuga *speedvac* por 15 a 20 minutos.

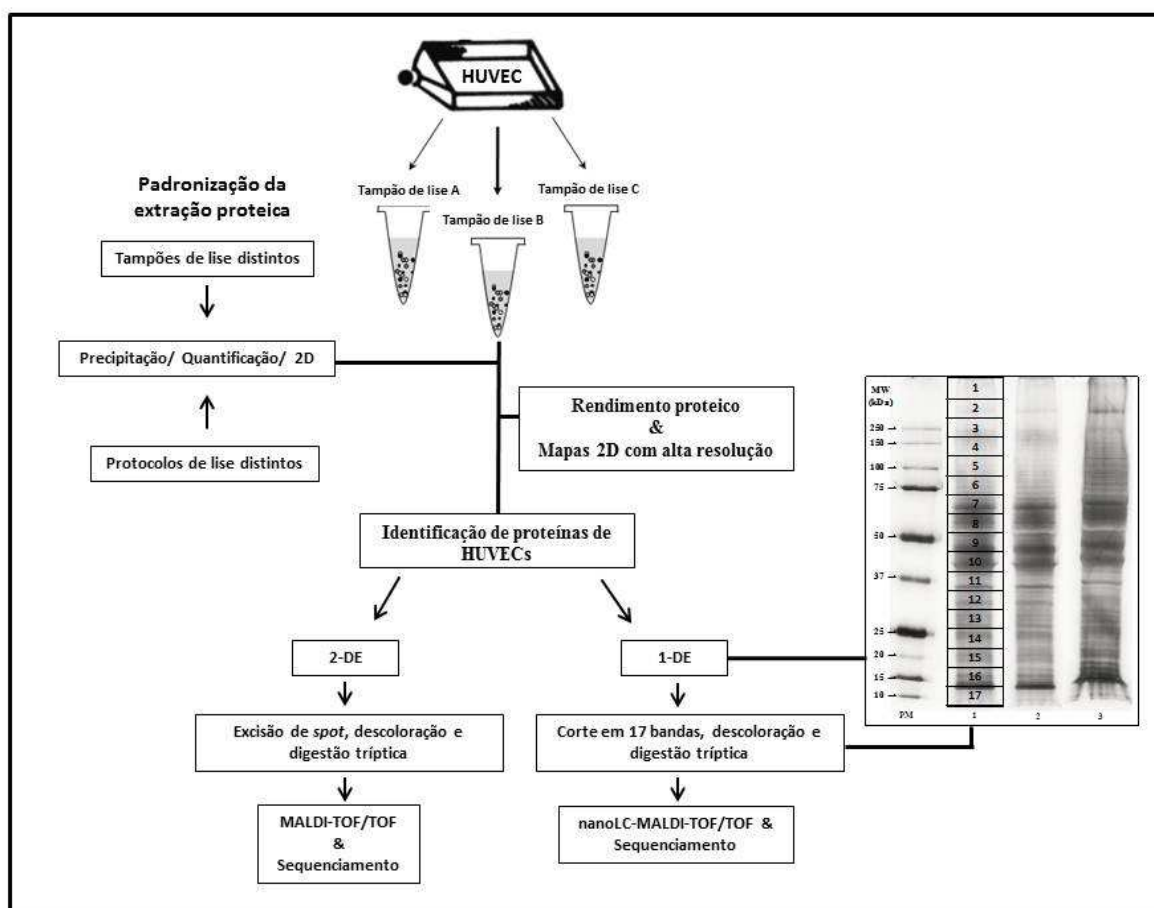


Figura 11. Diagrama da obtenção do mapa proteômico de HUVEC.

Posteriormente, os géis foram incubados com uma solução de tripsina (Promega) a 12,5 ng/μL em AmBic 25 mM, pH 8,5, durante 45 min em banho de gelo (para a penetração da mesma nos géis), sendo retirado o sobrenadante (excesso de enzima) e adicionada uma solução AmBic 25 mM. Seguiu-se incubação *overnight* a 37°C (digestão *in gel*). Após a digestão das proteínas *in-gel*, os tubos foram agitados em um *vortex* e centrifugados (*spin*). Os sobrenadantes contendo os peptídeos trípticos foram retirados e transferidos para novos microtubos. Para a extração dos peptídeos trípticos foi adicionada uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,5%/ ACN 50%, as amostras foram sonicadas durante 10 min e os sobrenadantes transferidos para os tubos correspondentes com os peptídeos oriundos da digestão antes da extração. Este procedimento foi repetido três vezes. Foram realizadas três extrações adicionais com ACN 100% e os sobrenadantes reunidos aos das extrações anteriores, sendo o volume reduzido na centrífuga *speedvac*.

5.3.3- Separação e análise dos peptídeos no Nano-LC-MALDI-TOF/TOF

A separação e análise dos peptídeos foi realizada em colaboração com a Dr^a. Concha Gil da Universidad Complutense de Madrid. Os peptídeos trípticos foram separados por nano-cromatografia líquida utilizando um sistema cromatográfico com injetor automático *Famos* (LC Packings), válvula automática *Switchos*, bomba *UltiMate*, com um detector UV (LC Packings). Os peptídeos foram aplicados diretamente na placa de *MALDI* (Applied Biosystems) e analisados em um *MALDI-TOF/TOF 4800* (Applied Biosystems).

A separação dos peptídeos foi realizada a um fluxo de 300 nL/min⁻¹ em uma coluna analítica de fase reversa C18 (15 cm x 75 μm id, empacotada com C18 PepMap100, 3 μm, 100 Å (LC Packings). O tempo total de toda corrida cromatográfica foi de 82 minutos. O eluído foi continuamente aplicado em uma placa de *MALDI* (Applied Biosystems) a cada 12 s, utilizando um coletor de micro-frações *Probot* (LC Packings), e as massas dos peptídeos trípticos foram obtidas usando um analisador do tipo *MALDI-TOF/TOF 4800 Analyser* (Applied Biosystems) em modo automático.

Foi realizada uma primeira análise de massas, em modo refletor positivo, para detectar os peptídeos precursores para fragmentação. A partir desta primeira análise, foram selecionados até 8 peptídeos por poço com sinal/ruído > 50.

Os resultados de identificação foram feitos através do *software Protein Pilot* (Applied Biosystems), utilizando o algoritmo *Paragon*, para um FDR (False Discovery Rate) de 95%.

5.3.4. Bioinformática (*in silico*)

O servidor proteômico *Expert Protein Analysis System (ExPASy)* do *Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)* foi utilizado para analisar as sequências peptídicas. O número de acesso proteico foi retirado deste servidor. Complementar a este número de acesso, foi utilizado o nome da *ORF (open reading frame) Homo sapiens*, retirado do servidor *Universal Protein Resource (UniProt)*, utilizando o banco de dados *UniProt Knowledgebase/Swiss-Prot*.

A partir dos códigos de acesso das proteínas identificadas, as mesmas foram analisadas no site *Genecodis 2.0* (Saez *et al.*, 2007; Cadenas *et al.*, 2009) que consiste de uma ferramenta que integra diferentes fontes de informações biológicas para procurar por recursos biológicos (anotações) que frequentemente ocorrem em um conjunto de genes, agrupando-os por significância estatística. A partir deste *software*, as proteínas foram agrupadas de acordo com os processos biológicos em que estão envolvidas, funções moleculares e compartimentos celulares onde se encontram. Todas as proteínas identificadas foram analisadas no *Osprey 1.2.0* (Tyers Lab), que consiste de um *software* para a visualização de complexas redes de interação entre genes e constrói representações gráficas a partir das informações anotadas dos genes e dados de interações mantidos no *BioGRID*. Análises complementares foram feitas em proteínas agrupadas por processos biológicos de interesse para nosso estudo de interação.

5.4 Mapa da interação de HUVECs com *A. fumigatus*

5.4.1 Cultivo de *A. fumigatus*

Para a obtenção dos conídios, foram cultivadas colônias de micélio da cepa AF293 (cedida pelo Dr. Scott Filler, UC, Estados Unidos) e da cepa *Δugm1* (cedida pelo Dr. Jean-Paul Latgé, Instituto Pasteur, França) de *A. fumigatus* em meio Sabouraud Agar (Difco) a 37°C durante sete dias. A superfície destas colônias foi raspada com o auxílio de um *cell scraper* na presença de PBS 50 mM acrescido de 0,01% Tween 80, pH 7. Esta suspensão de conídios foi filtrada a vácuo em um sistema reutilizável de filtro acoplado a um frasco estéril de 500 mL (Nalgene) com uma membrana de *nylon* do tipo Nitex 03-28/17 (Sefar). Os conídios separados foram sedimentados por centrifugação a 4000 x g a 4°C por 5 minutos. A seguir, foram lavados duas vezes em PBS 50 mM, pH 7,4 para retirar o detergente e ressuspensos em 1 mL do mesmo tampão, sendo então contados em câmara de Neubauer. Para a obtenção das células de tubos germinativos 10^7 conídios/mL das cepas de *A. fumigatus* foram inoculados em Sabouraud (Difco) em placas de Petri cobertas com gelatina bovina 0,2% (Sigma) e incubados a 37°C durante 6 horas. As células foram monitoradas por microscopia óptica. O meio Sabouraud (Difco) foi aspirado e as células de tubos germinativos aderidas à placa de Petri foram lavadas duas vezes com PBS 50 mM, pH 7,4 e incubadas com timerosal 0,02% durante 2 horas. O timerosal 0,02% foi aspirado, e as células de tubos germinativos obtidos através da raspagem com o auxílio de um *cell scraper* e acondicionadas em microtubos (Eppendorf). Os tubos germinativos foram lavados três vezes em PBS 50 mM, pH 7,4 e ressuspensos em meio 199 (M199; Sigma) sendo então contados em câmara de Neubauer.

5.4.2 Ensaio de interação de HUVECs com *A. fumigatus*

As monocamadas de HUVECs confluentes cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² foram infectadas com 10^7 células de tubos germinativos de *A. fumigatus* das cepas AF293 e *Δugm1*. Após a infecção, as HUVECs foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5,0% CO₂ durante 16 horas e depois submetidas ao protocolo de extração proteica **a**, descrito no item 3.2 para obtenção do extrato proteico total. Um grupo de monocamadas de HUVECs infectadas foi submetido a extração proteica total logo após a infecção para servir como controle (controle 0h). Monocamadas de HUVECs não infectadas foram mantidas nas mesmas condições para servir como controle negativo (Controle HUVEC). Ao todo foram realizados quatro ensaios

independentes (amostras biológicas) de infecção com 2 a 3 garrafas de cultura de 75 cm² para cada; o mesmo para controle 0 h.

Os extratos proteicos de HUVECs foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 30 mM, uréia 7 M, tiouréia 2 M e CHAPS 4% pH 8,5 e a proteína quantificada pelo método de Bradford (kit da Bio-Rad). Os extratos foram armazenados a - 80°C.

5.4.3 2D-DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)

Neste estudo foram realizadas três análises das proteínas diferencialmente expressas (DIGE): (1) Análise comparativa das proteínas diferencialmente expressas nos extratos controle HUVEC e extratos controle 0h de interação. Neste ensaio as réplicas biológicas foram agrupadas e marcadas de duas a duas (tabela 5); (2) Análise das proteínas diferencialmente expressas entre os extratos de HUVEC desafiadas com *A. fumigatus* (cepa AF293) durante 0h e durante 16 h. Neste ensaio as réplicas biológicas foram marcadas separadamente totalizando 4 réplicas biológicas de cada condição experimental (tabela 6); e (3) Análise das proteínas diferencialmente expressas entres os extratos de HUVEC desafiadas com *A. fumigatus* (cepa Δ ugm1), durante 0h e durante 16 h. Neste ensaio as réplicas biológicas foram marcadas separadamente totalizando 3 réplicas biológicas de cada condição experimental (tabela 7). Nos resultados referentes aos ensaios de DIGE 2 e 3 o controle 0h está denominado *extrato controle*. Todos os extratos proteicos utilizados neste estudo foram marcados (marcação mínima) com fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5 (GE Healthcare) seguindo o procedimento experimental descrito no manual do fabricante. Ao todo 50 µg de cada extrato foram marcados com cada CyDye (Cy3 e Cy5) e um *pool* contendo 50 µg de todas as réplicas biológicas de cada condição experimental, com quantidades iguais das mesmas foi marcado com Cy2.

Tabela 5. Desenho experimental do ensaio de DIGE dos extratos controle de HUVEC

	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 1	Controle HUVEC 1 e 2	Controle 0h $\Delta ugm1$ 1 e 2	Pool*
Gel 2	Controle 0h $\Delta ugm1$ 3 e 4	Controle 0h AF293 1 e 2	Pool*
Gel 3	Controle 0h AF293 3 e 4	Controle HUVEC 3 e 4	Pool*

*pool contendo quantidades iguais de proteínas das quatro réplicas biológicas das três amostras biológicas deste experimento totalizando 50 μ g.

Tabela 6. Desenho experimental do ensaio de DIGE da interação de HUVEC com *A. fumigatus* cepa AF293.

	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 1	Controle 0h AF293 1	Interação AF293 1	Pool*
Gel 2	Interação AF293 2	Controle 0h AF293 2	Pool*
Gel 3	Controle 0h AF293 3	Interação AF293 3	Pool*
Gel 4	Interação AF293 4	Controle 0h AF293 4	Pool*

*pool contendo quantidades iguais de proteínas das quatro réplicas biológicas das duas amostras biológicas deste experimento totalizando 50 μ g.

Tabela 7. Desenho experimental do ensaio de DIGE da interação de HUVEC com *A. fumigatus* cepa $\Delta ugm1$.

	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 1	Controle 0h $\Delta ugm1$ 1	Interação $\Delta ugm1$ 1	Pool*
Gel 2	Interação $\Delta ugm1$ 2	Controle 0h $\Delta ugm1$ 2	Pool*
Gel 3	Controle 0h $\Delta ugm1$ 3	Interação $\Delta ugm1$ 3	Pool*

*pool contendo quantidades iguais de proteínas das três réplicas biológicas das duas amostras biológicas deste experimento totalizando 50 μ g.

Os 50 μ g de proteínas marcadas com Cy3 e Cy5, correspondentes a cada amostra biológica a ser comparada e os 50 μ g do pool marcado com Cy2, foram reunidos em um único microtubo totalizando 150 μ g de proteínas que foram focalizadas utilizando IPG strips (*Immobilized pH Gradients, GE Health*) com faixa de pH 3-11, não linear, e comprimento de 18 cm em um sistema IPGphor (Amersham) após a adição de *DeStreak* 1,2% (GE Healthcare) e IPG buffer 3-11 1%. Foi utilizada a seguinte programação de focalização a 20°C: 30 V/ 12 horas, 200 V/ 1 hora, 500 V/ 1 hora, 1000 V/ 1 hora, 1000-10000 V/ 2 horas e 10000 V até

ser atingido um máximo de 100000 Vhs. As *strips* de cada ensaio de DIGE foram focalizadas simultaneamente. Em seguida as amostras foram reduzidas durante 15 min com ditiotreitol 1,5% e alquiladas durante 20 min com iodoacetamida 2,5% ambas etapas em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v)). Em paralelo, foram feitos géis preparativos onde foram adicionados 150 µg de um *pool* de todas as amostras totalizando 300 µg.

As fitas contendo as proteínas fracionadas por focalização foram colocadas sobre géis homogêneos de poliacrilamida 12% (1 mm de espessura) e fixadas com agarose. A eletroforese foi realizada em um sistema *DALTsix* (GE Healthcare) com placas de vidro de baixa fluorescência a 3 mA por gel durante a noite. Após as análises das imagens, os géis preparativos foram corados por *Coomassie* coloidal.

5.4.4 Análise de imagens 2D-DIGE

As imagens dos spots foram obtidas através do escâner *Typhoon* (GE Healthcare), com uma resolução final de 100 µm, em comprimentos de excitação de 488 nm, 532 nm e 633 nm e de emissão 520 nm, 580 nm e 670 nm, respectivamente para os fluoróforos *Cy2*, *Cy3* e *Cy5*. A quantificação da expressão proteica foi realizada pelo *software* DeCyder 7.0. Primeiramente, foi realizada a análise intra-gel no módulo *DeCyder DIA* (*Difference In-Gel Analysis*), onde foram utilizados como filtro de exclusão uma área 100 e Volume de 50000. Posteriormente, foi realizada a análise inter-gel no módulo *DeCyder BVA* (*Biological Variance Analysis*). A validação dos spots diferencialmente expressos foi dada pelo teste *t-student* e foram filtrados os spots validados para um valor de $p \leq 0,05$.

5.4.5 Digestão trípica e identificação dos spots proteicos diferencialmente expressos

Os spots proteicos de interesse foram excisados com auxílio de uma ponteira e transferidos separadamente para microtubos, lavados com água ultrapura (*Milli-Q Synthesis System*) e descorados com bicarbonato de amônio 25 mM e ACN 50% até ficarem transparentes. Os mesmos foram desidratados com ACN 100% e secos por centrifugação a vácuo em um *Savant SpeedVac* (Thermo) durante 15-20 minutos. Foram adicionados 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 25 mM

contendo 12,5 ng/ μ l de tripsina modificada para sequenciamento (Promega), em cada spot. Os mesmos foram mantidos durante 1 hora em gelo para reidratação dos mesmos, e posteriormente, incubados a 37°C durante a noite para a digestão.

Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel em ACN 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% durante 1 hora, sob agitação, sendo transferido para outro tubo. Este procedimento foi repetido duas vezes e as amostras concentradas até o volume de 10 μ L por centrifugação a vácuo (Thermo). As amostras foram dessalinizadas com ponteiros C18 (Agilent) e 0,6 μ L da solução de peptídeos recuperados foram aplicados na placa de MALDI e, após a secagem, 0,7 μ L da matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluída em ACN 50% e TFA 0,1%) para posterior análise por espectrometria de massas.

As massas dos peptídeos trípticos foram obtidas em um analisador tipo *AB Sciex TOF/TOF 5800 System* (Applied Biosystems) em modo automático. A lista de picos gerados de todos os espectros MS/MS foi submetida a uma busca contra o banco de dados do *SwissProt* utilizando-se o software *ProteinPilot* (AB Sciex).

6 RESULTADOS

6.1 Capítulo 1 - Mapa proteômico de referência de HUVEC

6.1.1 Diferenças qualitativas e quantitativas dependentes do método de extração proteica

Witzmann e colaboradores (2002) demonstraram que o processo mecânico de obtenção de hepatócitos pode promover o rompimento precoce da membrana plasmática, ocasionando a perda de proteínas citoplasmáticas. Deste modo, a primeira etapa do nosso trabalho foi otimizar o protocolo de obtenção de extratos endoteliais para as etapas de conclusão do mapa proteômico de referência das HUVECs, em condições de não ativação. Para isso, testamos três protocolos diferentes de extração (ver metodologia). Nos três, as proteínas foram obtidas após a lise celular com o mesmo tampão de extração, no entanto, o modo e/ou as condições de incubação com este tampão foram diferentes. Foi possível verificar diferenças quantitativas (tabela 8) e qualitativas (figura 12), nos extratos de HUVECs obtidos com estes diferentes protocolos.

Tabela 8. Rendimento proteico nos extratos totais de HUVECs obtidos a partir de diferentes protocolos de extração:

Protocolo	Método de extração	Rendimento proteico
(a)	Lise mecânica, 4 °C	100 µg
(b)	Lise direta, 4 °C	200 µg
(c)	Lise direta, TA*	150 µg

* Temperatura ambiente

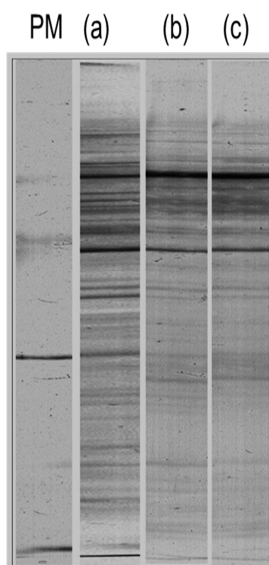


Figura 12. Perfil de bandeamento por *SDS-PAGE* 12% dos extratos proteicos de HUVECs obtidos com diferentes protocolos de extração: (a) com tampão de lise após a extração mecânica das HUVECs, (b) com tampão de lise sobre a cultura de HUVECs, a 4°C, e (c) p com tampão de lise sobre a cultura de HUVECs, na temperatura ambiente. Em cada poço foram aplicados 20 µg de proteína de cada extrato. (PM) padrão de peso molecular. Gel corado por *Coomassie* coloidal.

Na figura 12 é possível observar que apesar de haver maior rendimento proteico, o perfil de bandeamento proteico dos extratos (b) e (c) é distinto daquele observado quando foi utilizada extração mecânica (a). O método de extração (a) levou ao menor rendimento proteico, o que poderia ser um indício de uma perda qualitativa durante a extração. No entanto, observa-se um maior número de bandas no extrato (a), principalmente na região de baixo peso molecular. Este extrato foi o previamente utilizado nos experimentos de nanoLC-MS/MS.

Apesar destes achados, o gel unidimensional não apresenta a resolução necessária para verificar diferenças qualitativas entre os diferentes extratos analisados. Para melhorar a resolução e confirmar possíveis diferenças qualitativas as proteínas dos extratos obtidos pelos métodos (a) e (b) foram separadas por eletroforese bidimensional. Na figura 13 é possível observar que existem diferenças significativas entre os extratos obtidos pelos dois métodos.

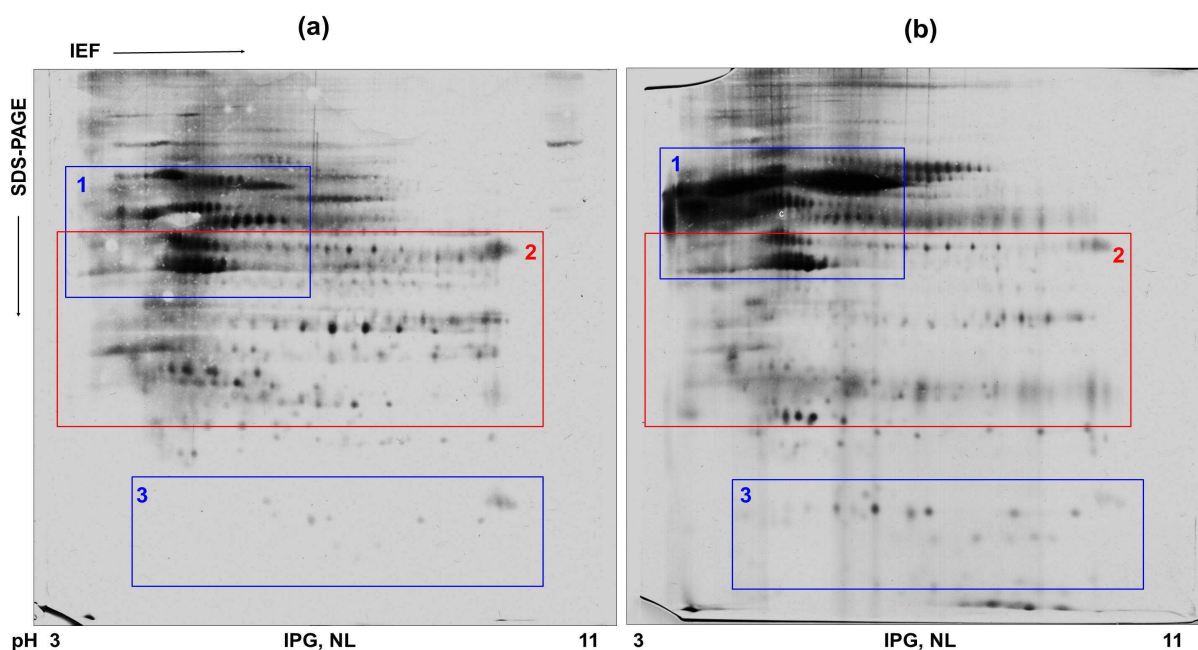


Figura 13. Mapas bidimensionais dos extratos proteicos de HUVEC. Os extratos proteicos obtidos pelo método de extração (a) e (b), ao todo 150 µg de cada, foram focalizados isoelectricamente em fitas NL 3-11 de 18 cm. Para segunda dimensão, foram utilizados géis de poliacrilamida homogêneos a 12 % e posteriormente revelados por prata amoniacal. Os quadrantes destacam as diferenças entre os extratos analisados.

6.1.2 Análise das proteínas identificadas de HUVECs pelo *Genecodis 2.0*

Nosso grupo, numa tentativa anterior de estabelecimento do mapa das HUVECs utilizando eletroforese bidimensional, identificando pouco mais de uma centena de proteínas entre mais de mil spots detectados. Para aprimorar estes dados, foram combinadas as técnicas de SDS-PAGE (1D) com nanoLC/MS/MS, estratégia com a qual foi possível identificar mais de mil proteínas de HUVECs. Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dr^a. Concha Gil da Universidad Complutense de Madrid, dentro do projeto de cooperação internacional. Foi possível identificar 665 proteínas ainda não descritas em HUVECs, seja em condições de ativação ou quiescência. Todos os dados, incluindo as listas de proteínas, as funções e os dados detalhados dos espectros foram disponibilizados no banco de dados *Proteopathogen* (proteopathogen.dacya.ucm.es - Anexo A).

A partir da listagem de proteínas identificadas, foi realizada uma extensa análise por bioinformática. Primeiramente, as 1010 proteínas foram analisadas, a

partir do código de acesso de cada uma, no site *Genecodis 2.0*. Este sistema *web* agrupa as proteínas com base nas informações dos bancos de dados do *Uniprot*, de acordo com o parâmetro de escolha. Neste caso, as proteínas foram agrupadas de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas (figura 14), suas localizações celulares (figura 15) e suas funções moleculares (figura 16).

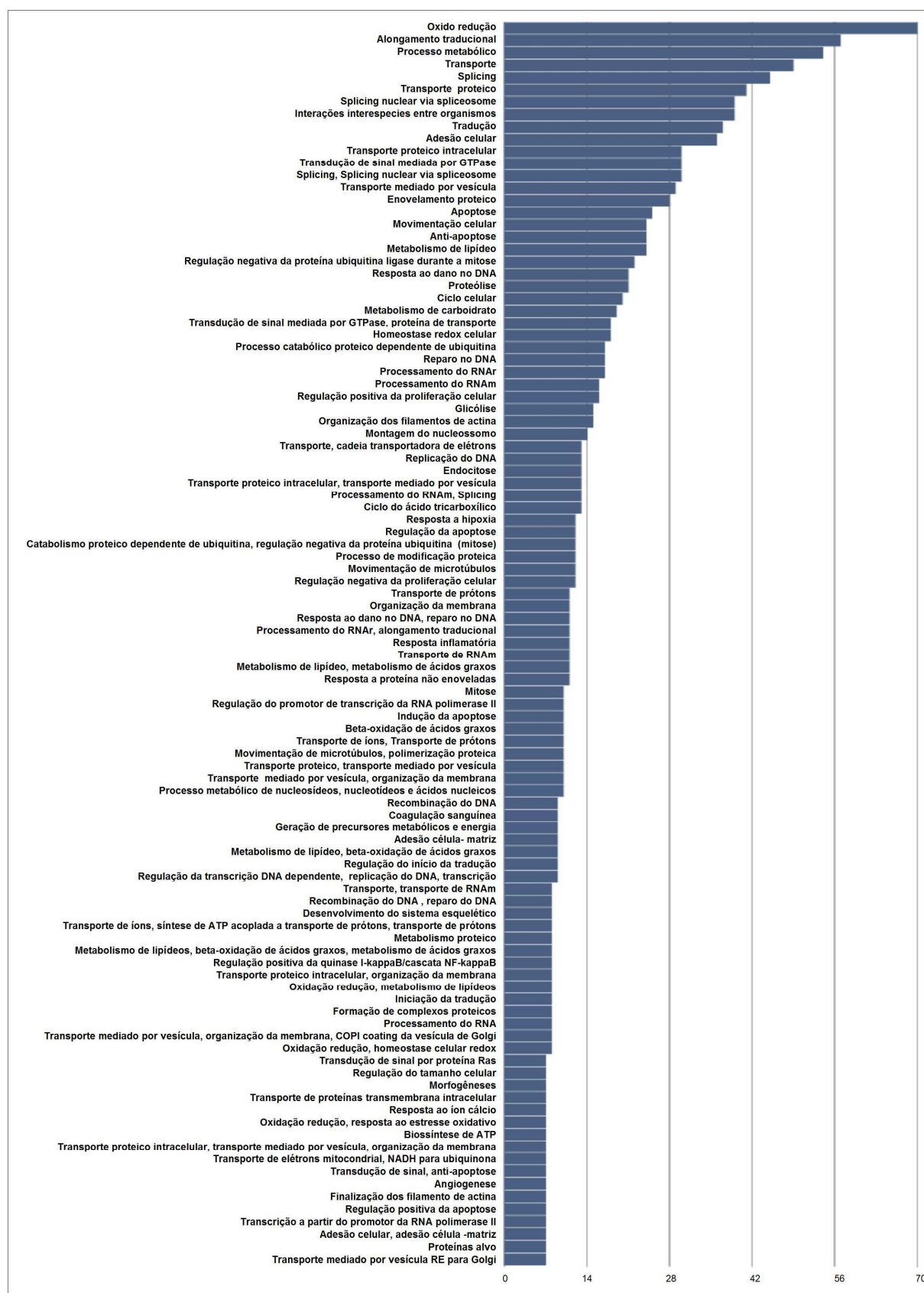


Figura 14. Distribuição das 1010 proteínas de HUVECs agrupadas de acordo com o processo biológico. Gráfico do *Genecodis 2.0*.

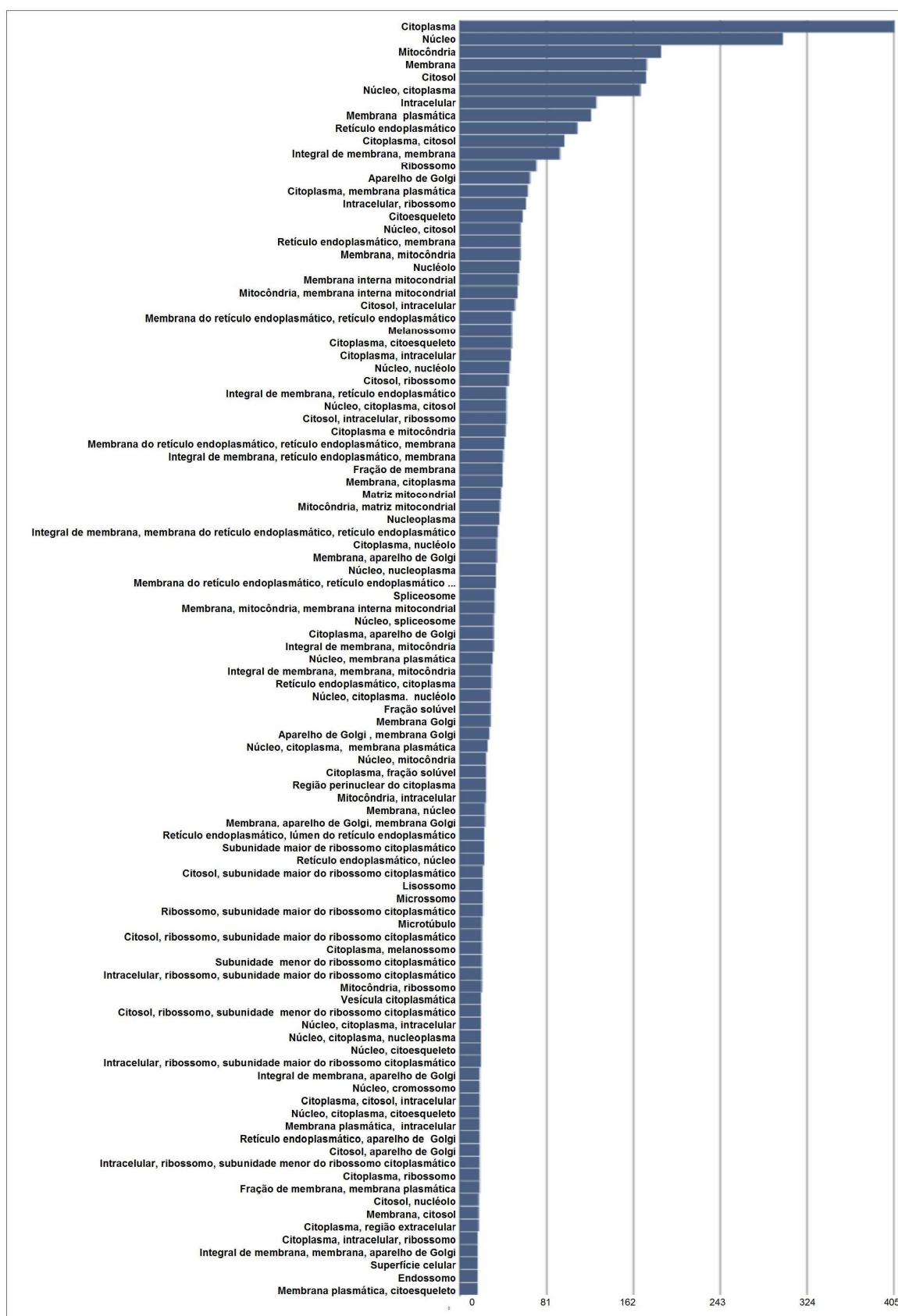


Figura 15. Distribuição das 1010 proteínas de HUVECs agrupadas de acordo com sua localização celular. Gráfico do *Genecodis 2.0*.

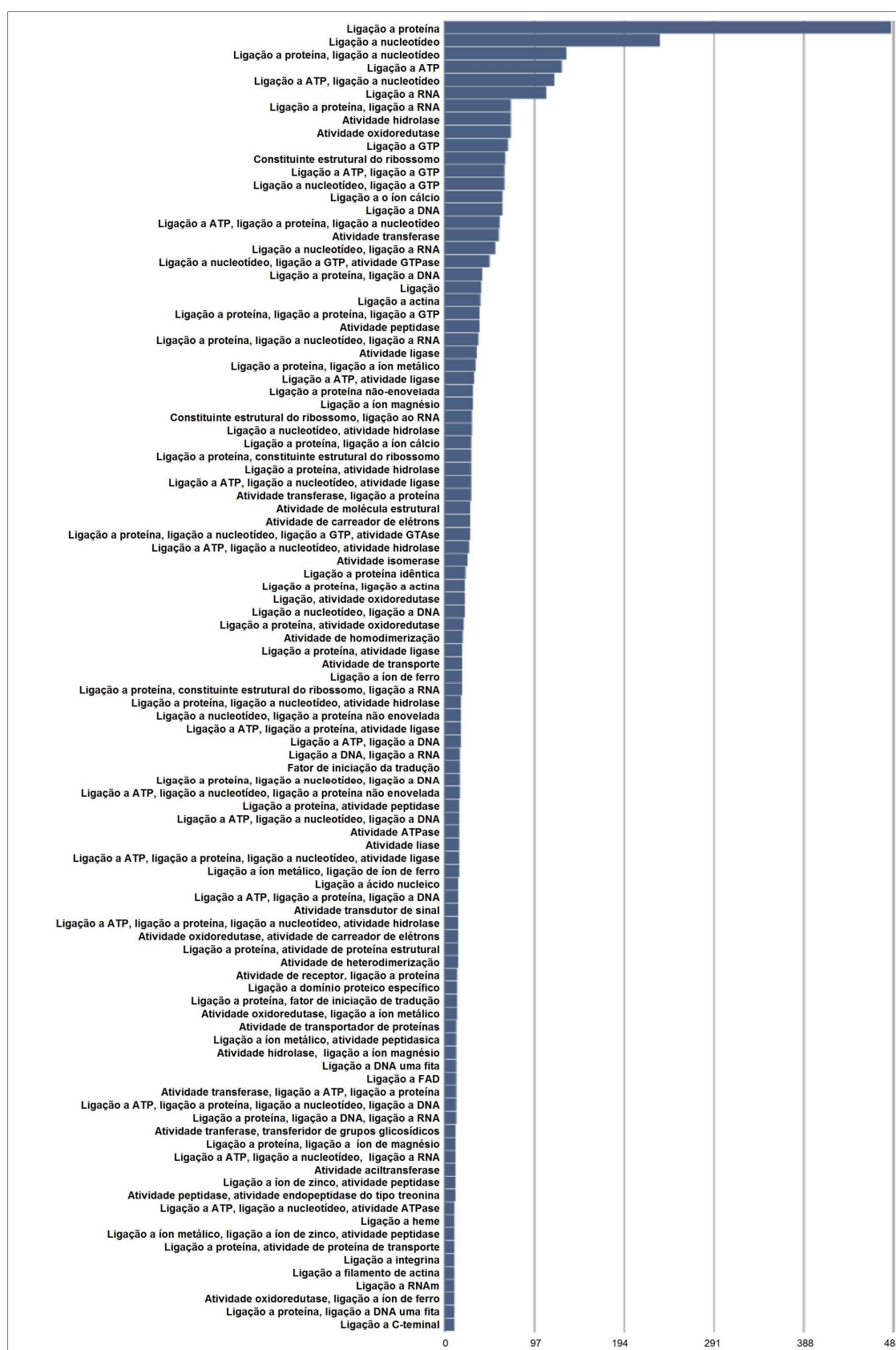


Figura 16. Distribuição das 1010 proteínas de HUVECs agrupadas de acordo com sua função molecular. Gráfico do *Genecodis 2.0*.

6.1.3 Predição *in silico* das interações proteína - proteína pelo Osprey 1.2.0

As proteínas de HUVECs identificadas foram analisadas no *Osprey 1.2.0* (Tyers Lab). Este programa cria representações gráficas a partir de dados de interações de proteínas depositadas no banco de dados para *Homo sapiens*, do *Biological General Repository for Interactions Datasets (BioGRID)*, após o *uploading* dos números de acesso (*Uniprot*) correspondentes às proteínas de interesse. No nosso caso, o *software* foi alimentado com o nosso banco de proteínas de HUVECs e a figura 17 ilustra as interações existentes entre as 1010 proteínas identificadas. Cada proteína está representada pelo respectivo número de acesso e a cor representa a função biológica na qual está envolvida.

Dada complexidade da análise e por se tratar de uma base de dados muito extensa, para uma análise funcional mais detalhada, selecionamos alguns grupos de proteínas, agrupados pelo *Genecodis 2.0* de acordo com o processo biológico, a partir de uma seleção empírica de vias principais que possam estar alteradas nos ensaios de interação fungo-endotélio. Ao todo, foram selecionados 12 grupos que, desconsiderando as proteínas que se repetem entre eles, contemplam um total de 291 proteínas (tabela 9). Estes grupos foram escolhidos, pois, continham proteínas endoteliais que poderiam estar diferencialmente expressas após a interação com o *A. fumigatus*, ou seja, proteínas de interesse durante a elaboração da segunda etapa deste trabalho.

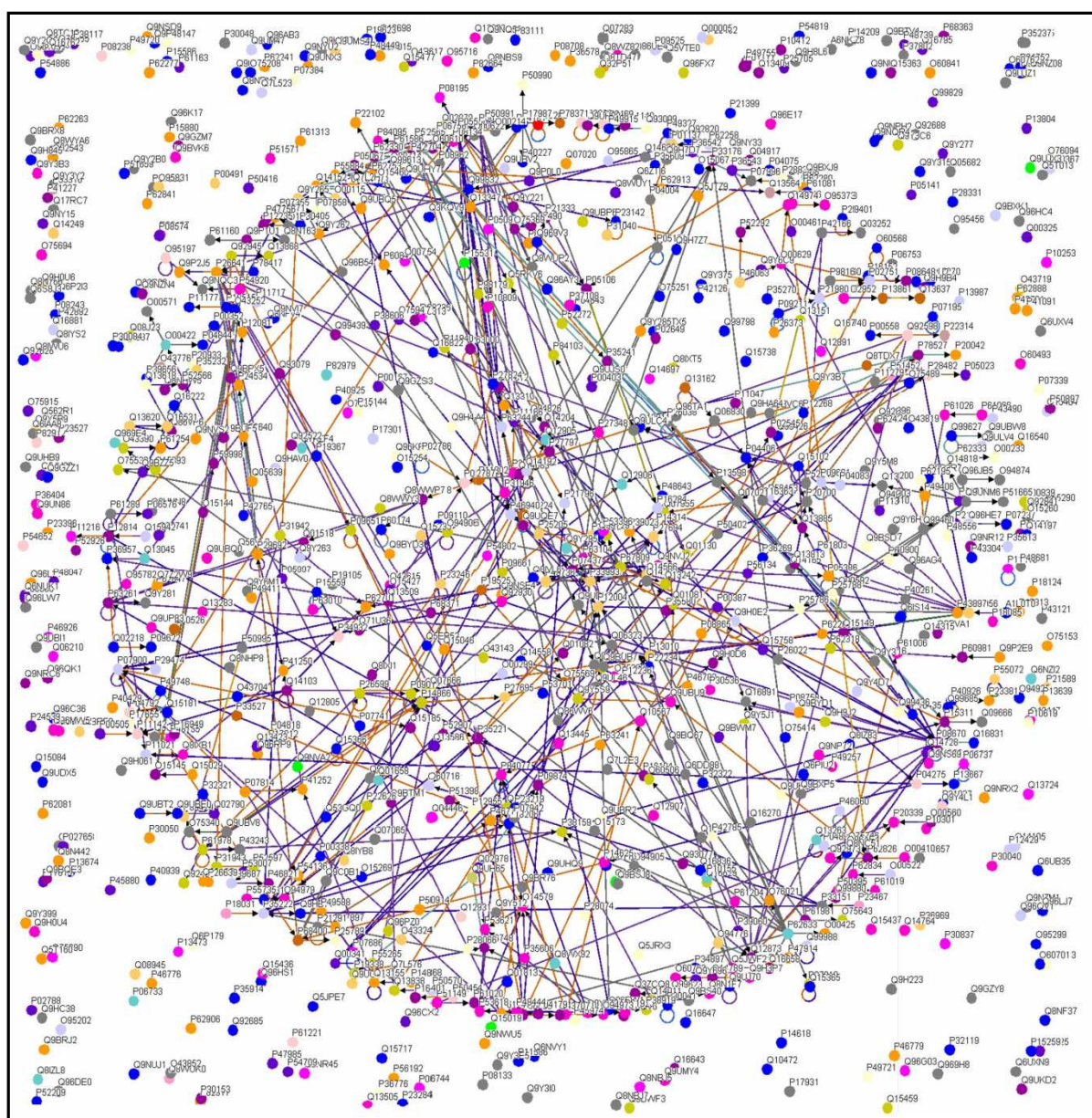


Figura 17. Predição *in silico* das interações proteína-proteína das 1010 proteínas identificadas no extrato total de HUVECs, utilizando-se o software *Osprey* 1.2.0. As proteínas identificadas estão representadas por seu respectivo número de acesso e esferas coloridas, sendo cada cor correspondente a uma função biológica (ver rodapé da figura).

Tabela 9. Grupos de proteínas por processos biológico selecionado, analisadas no *Osprey 1.2.0*.

Processo biológico	Número de acesso ^a	Número de proteínas
Interações interespecies	P06756, O95197, P28074, P28482 , Q14974, Q93009, Q7L523 , P23142, P52292, P42224 , Q16531, P05141, Q86V81, P05556 , Q7KZF4, Q92973, Q15046, P05106, P61586, Q15942, P62258, P08648 , P25788, P61221, P21796 , Q99436, P25789, Q9UBU9, P49720, P19525, P10809 , P62826, Q07021, P53618, P11142, P06748, P15144 , P12235, P08670, O14818, O00571, Q9Y624 , P61978, P62937, O95373, P09651, P02786 , O00410, O60506, P49721, P17301, P12236	52
Adesão celular	P98160, P63000 , P16615, P06756, P02751, P39060, P05556 , P33151, P05106, P22392, P35609, P61586, Q15942, P08648, P62330, O00622 , Q16270, P05067, P07996 , P11047, P18206, O60716, P17813 , P35221, Q13201 , Q14108, Q9Y624 , P08865, P07942, Q8WUP2, P04004, P14209, P43121, P04275 , Q9NY15, P17301 , Q9Y310, P35222 , Q9Y490	39
Homeostase sistema redox	celular/ P07237, P30101 , P09622, P27695, Q06830 , Q8IXB1, P13667, P30048 , Q9Y320, P30041 , Q16881, Q15084, Q8NBS9 , O43819, P32119 , Q9H7Z7, Q13162, O95831	18
Endocitose	O94973, P15531, Q10567 , P51149, Q9NP72, P05067 , Q9NZN4, P50570 , P20339, P02786, P01111 , O95782, O60493, P55290 , P61020, P51148, Q9H223	17
Resposta a hipoxia	P42892 , Q02809, P04179 , P17655, O00469, P01137 , Q9Y4L1, P07996 , P36776, P17813, P14625, O43707, P29474, P02786, P09601, P17301	16
Processos cardiovasculares e coagulação sanguínea	P05121, P02649 , P25705, P07996, P17813, P98160, P02751, P39060 , P07355, P35579, Q9NZ08, P23467, P06576, P15144 , P19338, Q9BXJ9, P09601 , P06744, Q9NQC3, P23219, P04179 , P05023, P00441, P29474 , Q6P179, P62847, Q06830, P08758 , P13987, Q13310, P05106 , Q9UNN8, P49257, Q13201, P04275, P17301, P35222 , Q9Y4D7, O00622, P01137	40
Regulação da migração celular	P01137, P05106 , Q16363, Q9NQC3	
Transdução de sinal	P55290, P61586 , P84095, P23528 , P52566, P52565 , Q13283, O00560, P28482 , P31946, P10301, P01111 , Q9UN86, Q9P0L0, P08134, P21980 , P29692, P21333, P09601	19
Apoptose	P30101, P35222, P39060 , Q14249, P10809, P00441 , P78527, O43324, P50570 , Q8N163, Q8WYA6, P62753, P30536, P63000, P42892, O95197, Q7L523 , Q9Y3E5, Q86WV6, Q9BZZ5, O75414 , Q8IX11, P61803 , P28331, O75340, P62258, P62330, P21796, P07996 , Q8IWU6, O00115, O60313, P06396 , Q00005, Q13155, Q14728, P12236, Q9NQC3 , Q9UDX5, P28482, P02649, P42224, P01137 , P62913, P23396, O75569, P30153, P21980, P05067 , O75489, P61247, Q07812 , Q6IS14	53
Anti-apoptose	P08758, P04179, P02649, Q9BZZ5 , Q05639, O75414, P61803 , P09525, P11021, P09211, P07996, P00441, P06748 , Q9UGV6, P23528, P14625, P32119, Q8NBS9, P29474 , P50453, P38646, P63104, P04083, P09601 , P04792, P52565, P15531 , P55072, P35232, P35609 , Q13564, P61289, P12814, P30405, O43707, Q07812 , P07858, P11717, P27797, Q9NQC3, P22392 , P08243, P13010, P10809, P30048 , P50897, Q8WWP	47
Resposta ao estresse oxidativo	P23219, P28074 , Q92626, P15559, P36969, O75874, P00441, P30048, P30041, P32119, P09601 , P67936	12
Organização da membrana e transporte	P63010, P61163, P48444, O95197 , P53621, O43617, O94979, Q00610, O60763, P84077, Q15437, Q15363, P62330 , P61923, O95741, P54920, P61204, Q15436, P18085, P53618 , O75396, P49257 , P49755, P35606, O14579, P06396 , Q9Y678, P61019, P09497, Q99829, Q10567 , P55735, P11142, Q8NBS9 , P61966, P50570	36

^aOs números de acesso em negrito correspondem as proteínas presentes em mais de um grupo.

Trezentos e cinquenta e três proteínas foram analisadas no *Osprey 1.2.0*, de acordo com o grupo funcional selecionado. Neste caso, foram verificadas as interações existentes entre as proteínas de cada grupo com outras proteínas funcionais existentes no banco de dados de *Homo sapiens*, *BioGRID*. Esta rede de interações proteína-proteína ajuda a entender com mais clareza a organização funcional do proteoma de HUVEC. Como este *software* permite o *download* (formato de texto) das informações presentes no banco de dados referentes às proteínas envolvidas nas interações por ele construídas, foram verificadas todas as interações existentes entre as proteínas identificadas de cada grupo com aquelas presentes no banco de dados (dado não mostrado). Dentre os grupos, foi escolhido o grupo 6 por incluir proteínas envolvidas na coagulação sanguínea; no perfil de vascularização; na angiogênese; na regulação da proliferação endotelial; na homeostase de eritrócitos; na regulação da pressão sanguínea e na regulação da migração celular endotelial, ou seja, processos importantes na biologia do endotélio.

A figura 18 permite a visualização das interações existentes entre as proteínas do banco de dados do *Osprey 1.2.0* com as proteínas identificadas do grupo funcional (tabela 9). As proteínas identificadas estão indicadas pelo seu número de acesso escrito em vermelho e negrito e/ou círculos maiores. As demais proteínas presentes na figura 18, indicadas por círculos pequenos e sua identificação *Uniprot/SwissProt* escrita em negro, foram adicionados pelo *software Osprey* (proteínas presentes no banco de dados *BioGRID*).

É possível observar na figura 18 algumas proteínas que são nós importantes incluindo a trombospondina (P07996), TGF beta -1 (P01137), endogлина (P117813), catenina alfa-1 (P35221), reticulon-4 (Q9NQC3), fibronectina (P02351) e fator de ribosilação de ADP 6 (P6230), dentre outras. Na figura 18, as proteínas foram agrupadas em quadrantes que correspondem a função endotelial que as mesmas desempenham.

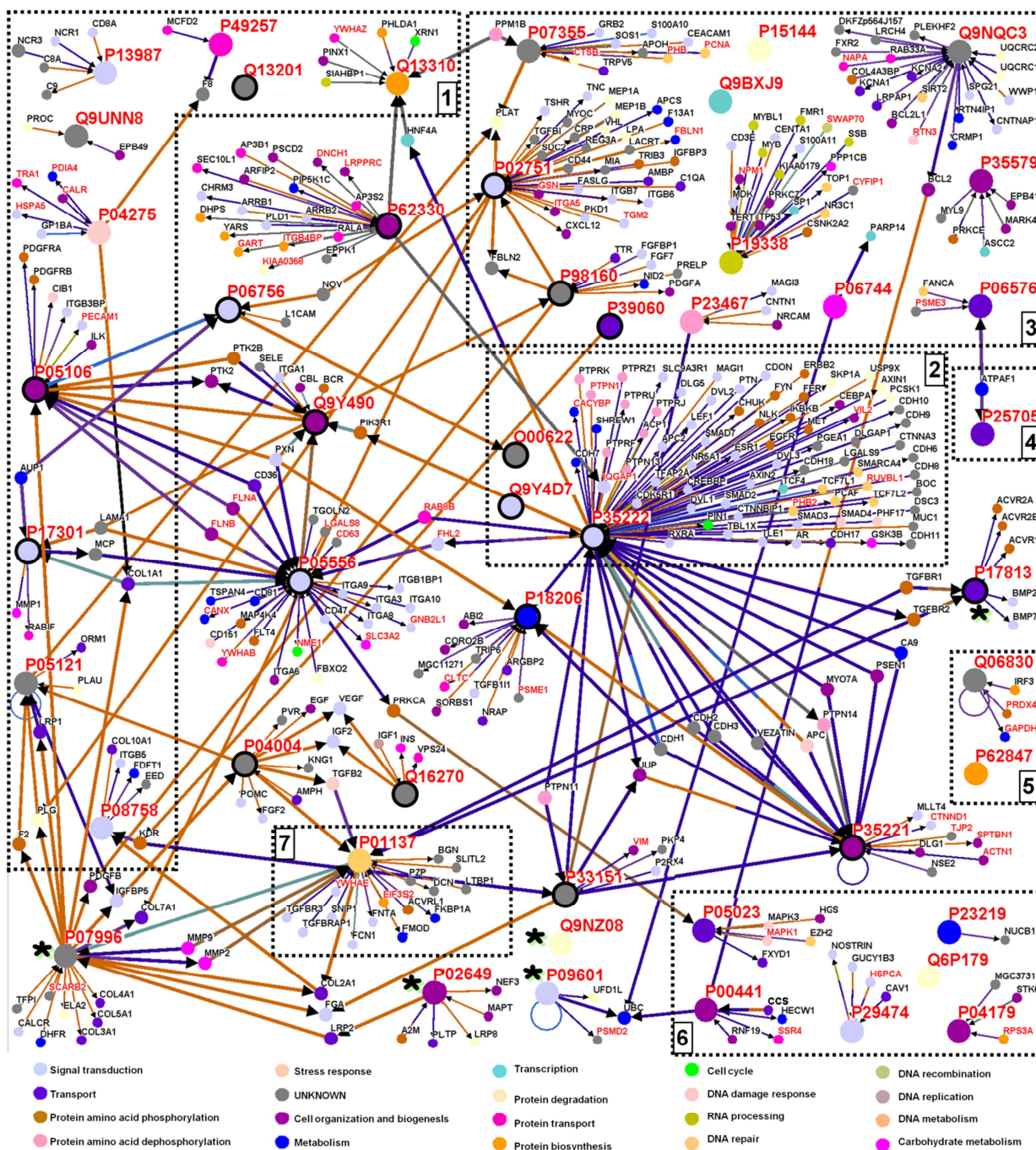


Figura 18. Interatoma de proteínas do grupo funcional 6 (indicadas pelos círculos e número de acesso do banco de dados do *Uniprot*) usando o software *Osprey 1.2.0*. Cada quadrante agrupa proteínas de acordo com a sua função no endotélio: (1) coagulação sanguínea; (2) perfil de vascularização; (3) angiogênese; (4) regulação da proliferação celular endotelial; (5) homeostase de eritrócitos; (6) regulação da pressão sanguínea; e (7) regulação da migração celular dos vasos sanguíneos. Os asteriscos negros destacam as proteínas envolvidas em mais de uma função endotelial (tabela 9). Os círculos com bordas negras indicam proteínas envolvidas na adesão. Todas as proteínas identificadas neste trabalho estão destacadas em negrito com a fonte em cor vermelha.

6.2 Capítulo 2- Estudo proteômico de HUVECs após interação com *A. fumigatus*

6.2.1 Análise do extrato controle de HUVECs

Para a realização do estudo proteômico da interação das HUVECs com *A. fumigatus* (cepas AF293 e $\Delta ugm1$), as monocamadas endoteliais confluentes foram infectadas com tubos germinativos durante 16 horas e, em seguida, submetidas ao protocolo de extração proteica. Nestes ensaios foram utilizados organismos inviáveis para evitar possíveis contaminantes secretados pelo fungo e o crescimento das hifas o que impossibilitaria a extração proteica das HUVECs. Para verificar se a presença do fungo poderia acrescentar contaminantes do mesmo no mapa proteômico de HUVEC, após a interação, foi realizada uma análise comparativa dos extratos proteicos de HUVEC não infectadas (controle HUVEC) com extratos proteicos de HUVEC infectadas durante 0h (figura 19), utilizando a técnica de DIGE.

Esta técnica é de alta sensibilidade e permite o estudo quantitativo de diferentes amostras biológicas, marcadas cada uma com um corante fluorescente distinto (Cy2, Cy3 e Cy5) e separadas simultaneamente em um mesmo gel 2D, resolvendo algumas limitações da técnica bidimensional clássica como intervalo dinâmico limitado e alta variabilidade entre os géis e entre amostras biológicas.

Neste experimento, foram utilizadas 4 réplicas biológicas agrupadas de duas a duas, conforme o desenho experimental descrito na tabela 5 (ver metodologia). As diferentes amostras biológicas foram marcadas alternadamente, utilizando-se a técnica de *dye swap*, para evitar artefatos oriundos da eficiência de marcação de cada fluorocromo. As imagens dos géis, obtidas em um escâner, foram analisadas no software *DeCyder 7.0*.

Na figura 19 apresentamos as imagens de um gel representativo deste ensaio. Em azul observam-se as proteínas marcadas com Cy2, correspondentes ao *pool* das diferentes amostras biológicas; em verde as proteínas do extrato controle HUVEC, marcadas com Cy3 e em vermelho as proteínas do extrato controle 0h $\Delta ugm1$ marcadas com Cy5. Após análise no módulo DIA do *DeCyder* foram detectados em média 4833 *spots*, com uma similaridade média entre as amostras biológicas controle HUVEC e controle 0h interação de 97,4%. Considerando, que o módulo DIA do *DeCyder*, com os limites de detecção escolhidos, detecta artefatos

oriundos do gel, pode-se afirmar que os extratos controle HUVEC e controle 0h, independente da cepa utilizada, apresentam um alto grau de similaridade.

Desta forma, foram utilizados os extratos controle 0h AF293 e extratos controle 0h $\Delta ugm1$ para a análise das proteínas diferencialmente expressas na HUVEC após 16h de interação com cada uma destas cepas, respectivamente. Por convenção, nos próximos resultados os extratos controle 0h estão denominados como *extratos controle* para evitar equívocos com os extratos proteicos após a interação durante 16h.

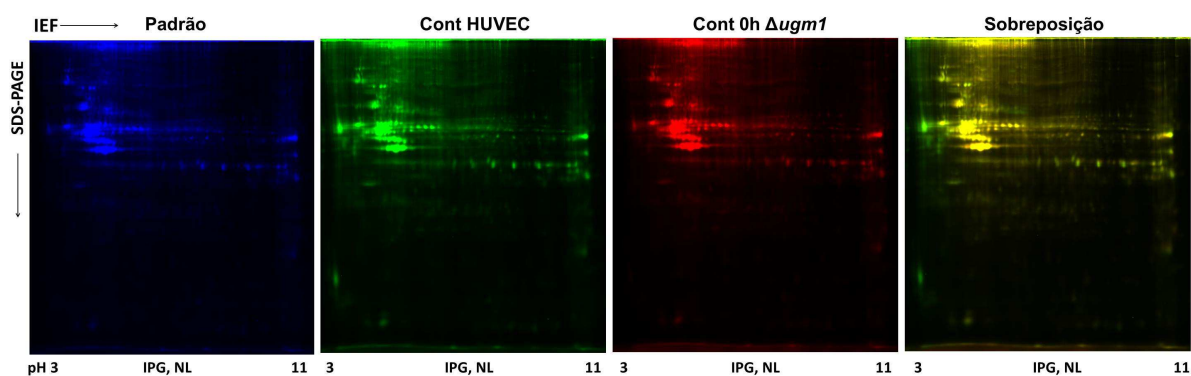


Figura 19. 2-D DIGE dos extratos HUVEC controle e controle 0h $\Delta ugm1$. Neste experimento 50 μg do extrato de HUVEC controle foi marcado com Cy3 (verde) e 50 μg do extrato proteico controle 0h $\Delta ugm1$ com Cy5 (vermelho). A sobreposição foi realizada com as imagens de Cy3 e Cy5. O padrão interno do experimento, que corresponde a um *pool* (50 μg) de todos os extratos utilizados na análise foi marcado com Cy2 (azul).

6.2.2 Proteínas diferencialmente expressas em HUVECs após a interação com cepa selvagem de *A. fumigatus*

A análise proteômica dos extratos de HUVEC infectadas com cepa selvagem de *A. fumigatus*, AF293, foi realizada utilizando a técnica de DIGE seguindo o desenho experimental indicado na tabela 6 (ver metodologia). Na figura 20 apresentamos um gel representativo deste ensaio. É possível observar o extrato interação AF293 em verde (Cy3); o extrato controle em vermelho (Cy5) e o padrão interno contendo os extratos proteicos de todas as replicas biológicas utilizadas na análise, em azul (Cy2). Através do módulo DIA do *DeCyder*, foram detectados em média 1723 *spots*. Foi realizada uma análise preliminar no módulo BVA do *software*

DeCyder considerando os quatro géis deste bloco de experimento. Este software permite a verificação da similaridade entre os géis e exclusão do(s) gel(s) menos reprodutível(s). Deste modo, foram avaliados os *spots* diferencialmente expressos considerando os três géis mais reprodutivos, dos quatro realizados. Esta análise revelou 69 *spots* proteicos diferencialmente expressos, com $p \leq 0,05$, dentre as quais 20 possuem uma abundância diferencial de 1,5 vezes. Dentre os *spots* com $p \leq 0,05$, 10 possuem $p \leq 0,01$ e apenas 1 uma abundância diferencial de 1,5 vezes.

6.2.3 Proteínas diferencialmente expressas em HUVECs após a interação com cepa mutante ($\Delta ugm1$) de *A. fumigatus*

A análise proteômica dos extratos de HUVEC infectadas com cepa mutante de *A. fumigatus*, $\Delta ugm1$, seguiu o desenho apresentado na tabela 7 (ver metodologia).

Na figura 21 apresentamos um gel representativo do ensaio de interação de HUVECs com a cepa $\Delta ugm1$ do *A. fumigatus*. Observa-se o extrato proteico de HUVEC após a interação com a cepa $\Delta ugm1$ em verde (Cy3); o extrato controle em vermelho (Cy5) e o padrão interno contendo todos os extratos proteicos utilizados na análise, em azul (Cy2). Através do módulo DIA do *DeCyder* foram detectados em média 1801 *spots*. A análise no módulo BVA revelou 21 *spots* proteicos diferencialmente expressos, com $p \leq 0,05$, dentre as quais 1 possui uma abundância diferencial de 1,5 vezes. Dentre os *spots* com $p \leq 0,05$, 1 possui $p \leq 0,01$.

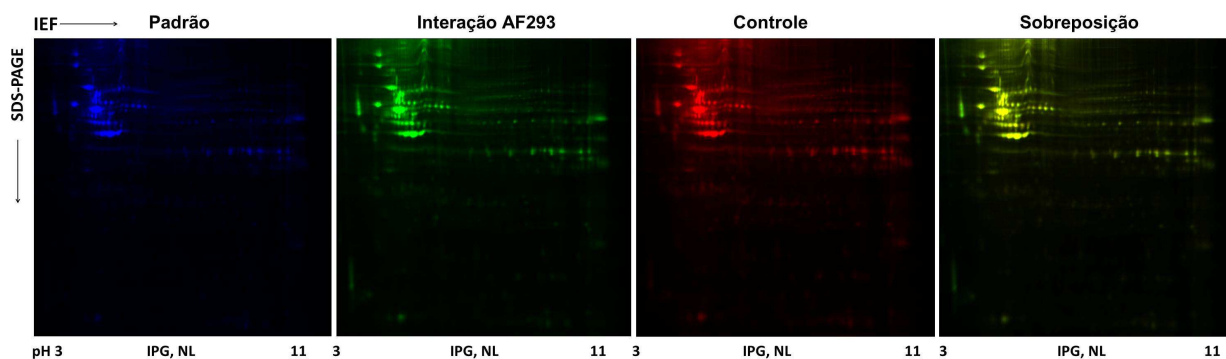


Figura 20. 2-D DIGE dos extratos controle e interação AF293. Neste experimento, 50 μg do extrato proteico de HUVEC após a interação com *A. fumigatus* AF293 foi marcado com Cy3 (verde) e 50 μg do extrato controle com Cy5 (vermelho). A sobreposição foi realizada com as imagens de Cy3 e Cy5. O padrão interno do experimento que corresponde a um *pool* (50 μg) de todos os extratos utilizados na análise, foi marcado com Cy2 (azul).

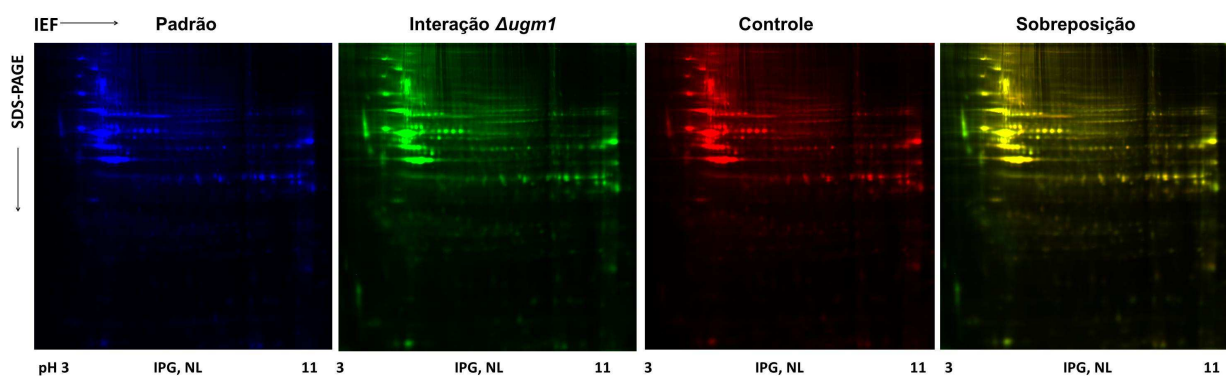


Figura 21. 2-D DIGE dos extratos controle e interação Δugm1 . Neste experimento, 50 μg do extrato de HUVEC Interação Δugm1 foi marcado com Cy3 (verde) e 50 μg do extrato controle com Cy5 (vermelho). A sobreposição foi realizada com as imagens de Cy3 e Cy5. O padrão interno do experimento que corresponde a um *pool* (50 μg) de todos os extratos utilizados na análise, foi marcado com Cy2 (azul).

6.2.4 Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos mapas 2-DE DIGE

Após a análise dos géis de DIGE referentes aos experimentos de interação de HUVECs com *A. fumigatus* de ambas as cepas (AF293 e Δugm1), consideramos como diferencialmente expressos os *spots* validados, com $p \leq 0,05$. Além disso, foram considerados diferencialmente expressos *spots* com abundância diferencial menor que 1,5 vezes. Foi necessário considerar variações pequenas de expressão,

pois, por se tratar de um extrato total, proteínas de baixa abundância poderiam estar mascaradas por proteínas de alta abundância. A identificação dos *spots* diferencialmente expressos detectados e validados foi realizada após excisão, digestão trípica seguida da análise dos peptídeos trípticos por espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS). A excisão foi realizada após a coloração dos géis preparativos com *Coomassie* coloidal, conseqüentemente, foram identificados apenas os *spots* mais abundantes, pois, esta coloração é muito menos sensível que a detecção por fluorescência.

Na tabela 10 estão listadas as proteínas diferencialmente expressas identificadas, assim como a abundância diferencial e o valor de p dado pelo *software DeCyder*. Também, estão indicados os dados de espectrometria de massas e o bloco de experimento/ análise na qual o *spot* foi considerado como diferencialmente expresso. Na figura 22 apresentamos a sobreposição de imagens do gel representativo dos extratos de HUVEC após a interação com tubos germinativos da cepa AF293 e, em destaque, os *spots* diferencialmente expressos identificados.

Nas figuras 22 e 23, observa-se em tamanho maior a sobreposição dos géis de DIGE da interação de HUVECs com *A. fumigatus* cepa AF293 e cepa Δ *ugm1*, respectivamente. Nestas figuras, está destacado o *spot* correspondente a galectina-1 que está 1,15 vezes mais expressa nas HUVECs após a interação *A. fumigatus* cepa AF293 e 1,47 vezes mais expressa nas HUVECs após a interação com a cepa Δ *ugm1*.

Tabela 10. Proteínas diferencialmente expressas em HUVECs após interação com tubos germinativos de *A. fumigatus*.

Nome	Nº de Acesso	pl e peso molecular teóricos	Nº de peptídeos*	Cobertura	Taxa de expressão (Contr/Int)	valor de p
Galectina-1	P09382	5,30 / 14,716	1	8,9	+ 1,15 ^a /+1,47 ^b	0,027 ^a / 0,019 ^b
Proteína 5 contendo domínio tioredoxina	Q8NBS9	5,37 / 47,629	5	16,7	-1,15 ^a	0,048 ^a
Fator de alongação 1-alfa 1	Q5VTE0	9,15 / 50,185	2	7,6	+1,21 ^b	0,043 ^b
Anexina A2	P07355	7,56 / 38,604	5	20,7	+1,08 ^a	0,028 ^a
Serpina H1	P50454	8,81 / 46,441	1	6,0	2,15 ^a	0,021 ^a

^aResultado da análise do *spot* diferencialmente expresso no módulo BVA do mapa de interação AF293.

^bResultado da análise do *spot* diferencialmente expresso no módulo BVA do mapa de interação Δ *ugm1*.

*Peptídeos com 95% de confiança.

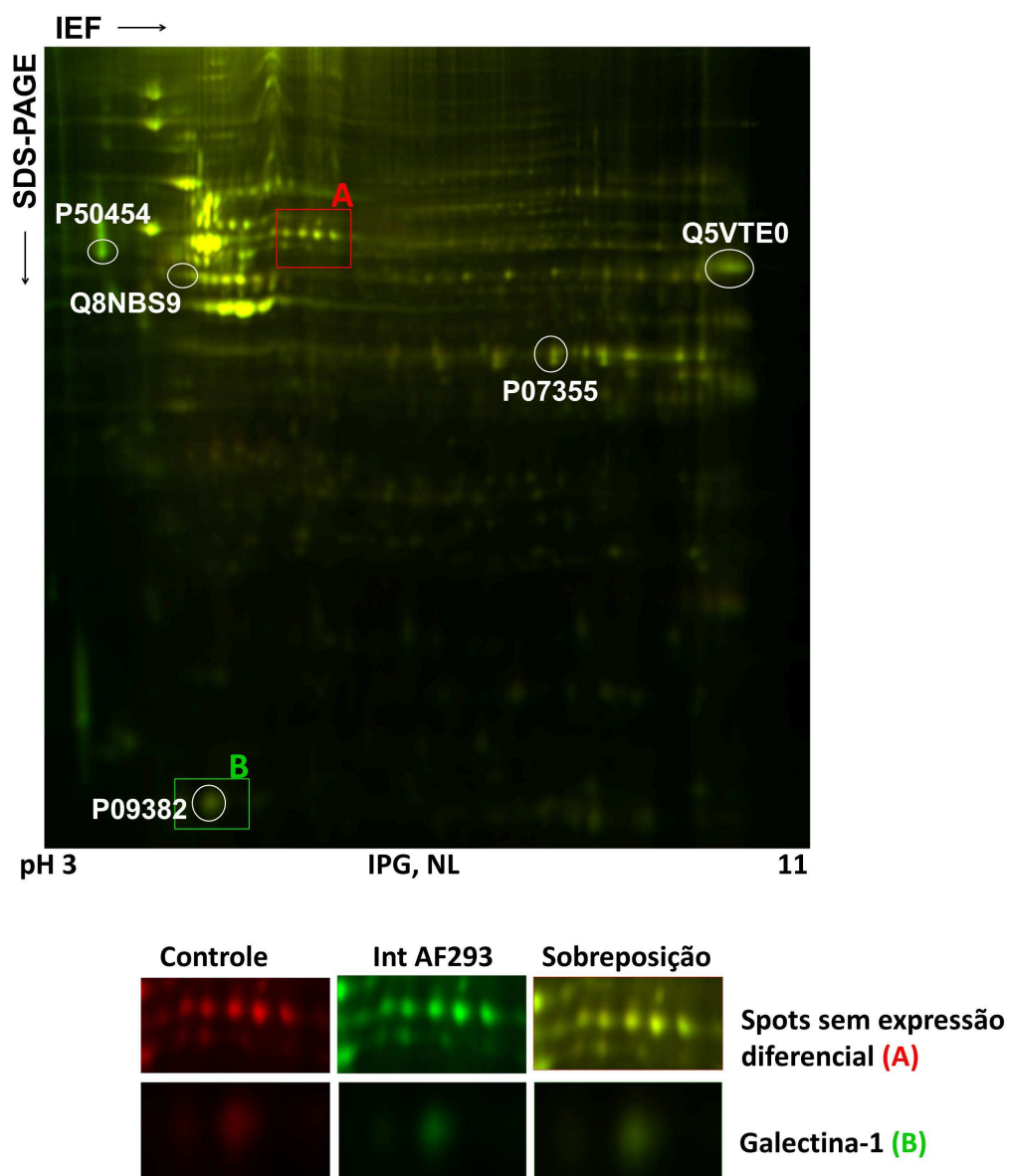


Figura 22. 2-D DIGE comparando o extrato controle com o extrato de HUVEC após a interação com a cepa selvagem (AF293). A imagem maior corresponde à sobreposição das imagens do gel representativo. Neste, a amostra controle foi marcada com Cy5 (vermelho) e o extrato de HUVEC após a interação com a cepa AF293 foi marcado com Cy3 (verde). Os *spots* amarelos indicam as proteínas detectadas nos dois extratos. (A) destaque para uma região do gel com *spots* não diferencialmente expressos. (B) Destaque para o *spot* correspondente à galectina-1, mais expressa nas HUVECs após interação com *A. fumigatus*.

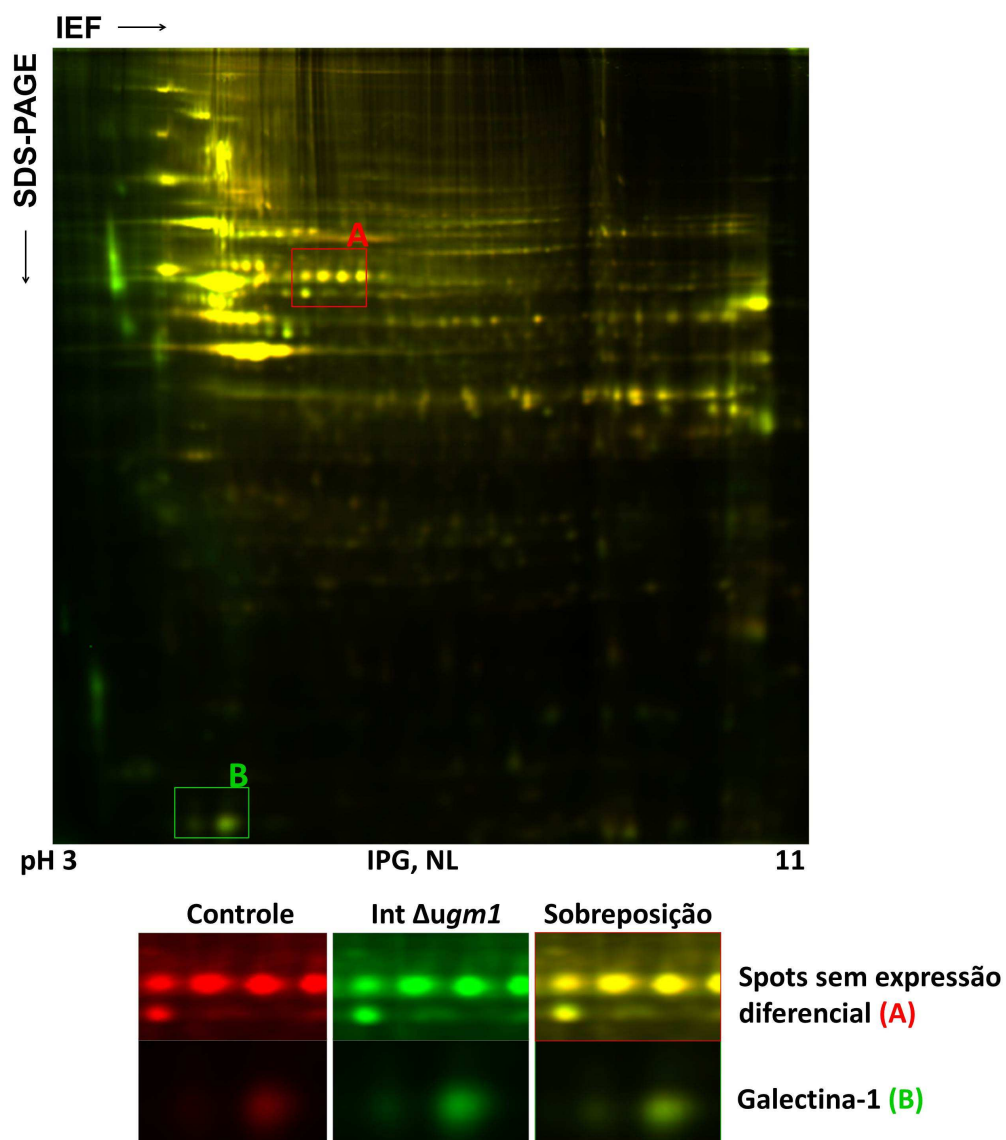


Figura 23. 2-D DIGE comparando o extrato controle com o extrato de HUVEC após a interação com a cepa $\Delta ug m 1$. A imagem maior corresponde à sobreposição das imagens do gel representativo. Neste, a amostra controle foi marcada com Cy5 (vermelho) e o extrato de HUVEC após a interação com a cepa $\Delta ug m 1$ foi marcado com Cy3 (verde). Os spots amarelos indicam as proteínas detectadas nos dois extratos. (A) destaque para uma região do gel com spots não diferencialmente expressos. (B) Destaque para o spot correspondente à galectina-1, mais expressa nas HUVECs após a interação com *A. fumigatus*.

Na figura 24, observa-se os gráficos 3D ilustrando a abundância relativa da galectina-1, mostrando a diferença de abundância relativa entre os extratos controle e interação tanto para a cepa AF293 quanto $\Delta ugm1$. Há fortes indícios de que *A. fumigatus* estimula a expressão de galectina-1 em HUVECs, pois, a mesma foi validada em 5 géis dos 7 avaliados no *DeCyder*. Na figura 25 observa-se o gráfico 3D ilustrando a abundância relativa da anexina A2.

Os dados proteômicos de expressão tanto da galectina-1 quanto da anexina A2 precisam ser validados. Para isso estão em andamento ensaios de *RT-PCR* para avaliar a expressão destas duas proteínas antes e após a interação. Os resultados preliminares corroboram que ambas as proteínas estão mais expressas após a interação com *A. fumigatus*, em especial, com a cepa mutante (dado não mostrado).

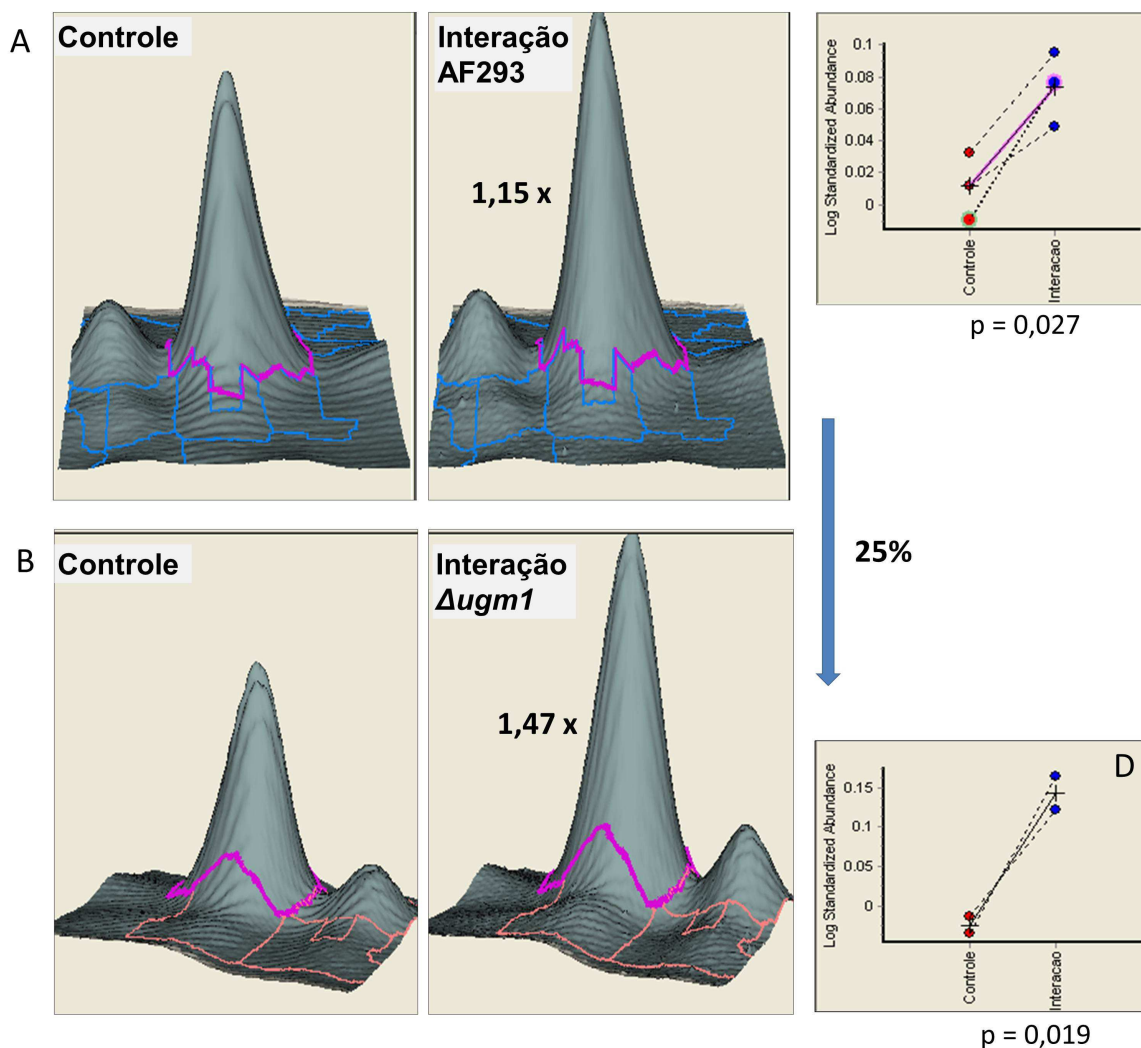


Figure 24. Gráficos 3D da quantificação relativa da expressão de galectina-1 em HUVEC após a interação com *A. fumigatus*. Os gráficos foram extraídos do software DeCyder. (A) A abundância relativa do *spot* correspondente a galectina-1 no extrato controle e no extrato HUVEC após a interação com tubos germinativos da cepa AF293; (B) A abundância relativa do *spot* correspondente a galectina-1 no extrato controle e no extrato HUVEC após a interação com tubos germinativos da cepa $\Delta ugm1$; (C) Gráfico da abundância relativa da galectina-1 nos três géis onde sua expressão foi validada no ensaio de interação com a cepa AF293; (D) Gráfico da abundância relativa da galectina-1 nos dois géis onde sua expressão foi validada no ensaio de interação com a cepa $\Delta ugm1$.

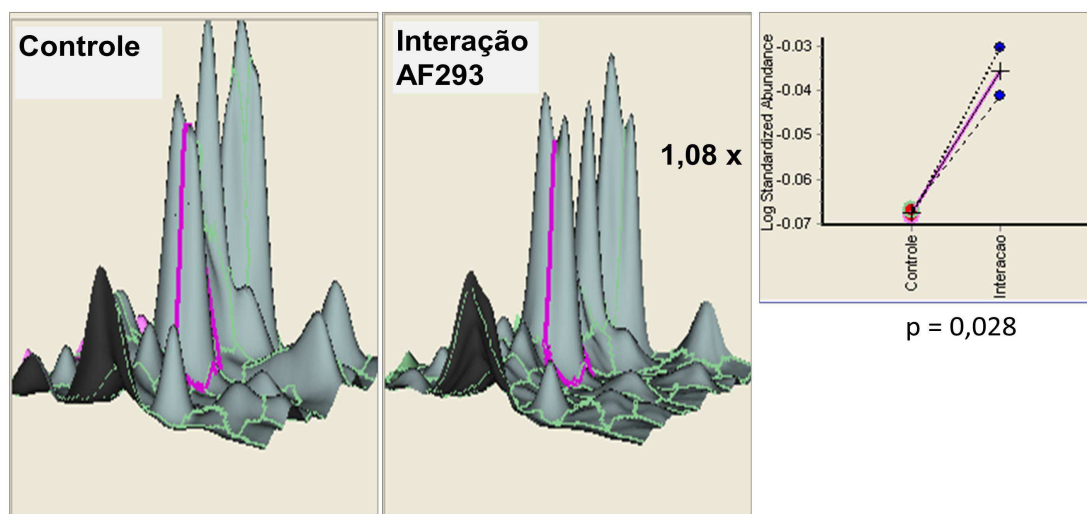


Figure 25. Gráfico 3D da quantificação relativa da expressão da anexina A2 em HUVEC após a interação com *A. fumigatus*. Os gráficos foram extraídos do *software DeCyder*. A abundância relativa do *spot* correspondente a anexina A2 no extrato de HUVEC controle no extrato após a interação com tubos germinativos da cepa AF293.

6.2.5 Predição *in silico* das interações proteína-proteína

As possíveis interações existentes entre a galectina-1 e a anexina A2 foram avaliadas através do software *Osprey 1.2.0.* Foram avaliadas *in silico* as interações que cada uma delas realizam com outras proteínas, através do banco de dados *BioGRID* (figura 26). É possível verificar que a galectina-1 não interage diretamente com a anexina A2, mas, indiretamente através da proteína HRas. Além disso, a galectina-1 interage diretamente com a galectina-3, outra lectina que reconhece resíduos de galactose. Estas e/ou outras interações importantes do ponto de vista da interação fungo-hospedeiro estão discutidas adiante.

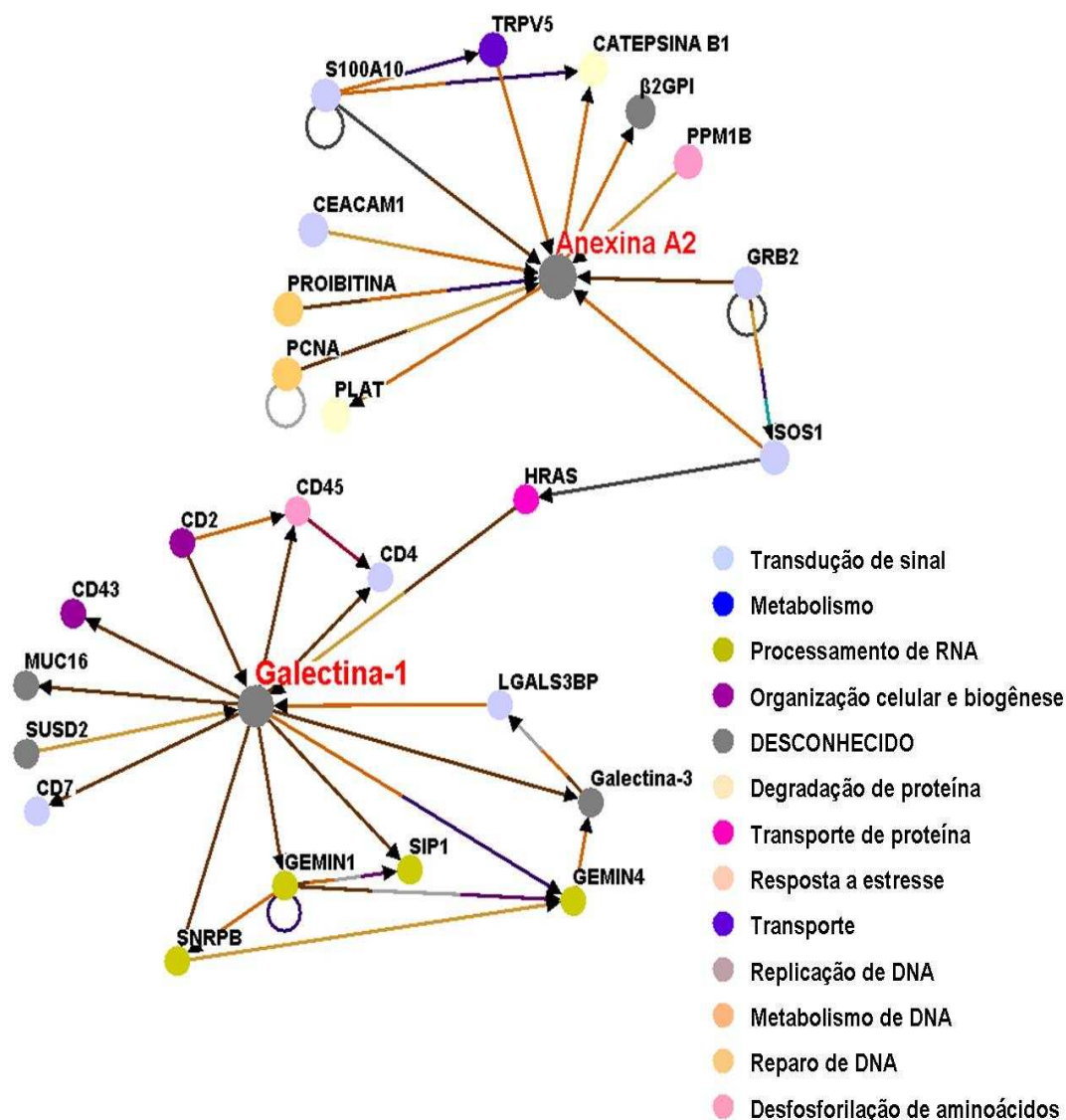


Figura 26. Predição *in silico* das interações proteína-proteína existentes entre a galectina-1 e a anexina A2. Esta análise retirada do software *Osprey 1.2.0*. As funções moleculares estão indicadas por diferentes cores.

7 DISCUSSÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas aumentou nas últimas décadas e acomete principalmente pacientes de Unidades Hematológicas, como pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou com leucemia aguda. Dentre estas infecções, destaca-se a aspergilose pulmonar invasiva, cujo principal agente etiológico é o *A. fumigatus*. Sabe-se que a fisiopatologia da doença está diretamente associada ao caráter angioinvasivo apresentado pelas hifas deste fungo. Ao invadirem o endotélio, estas hifas levam a um quadro grave de trombose, associado ou não a hemorragias, e de infarto tecidual, levando à falência de órgãos vitais (Lopes-Bezerra & Filler 2004, Kamai *et al.*, 2009).

Diferentes estudos demonstraram que é o contato das hifas do *A. fumigatus* com o endotélio que induz o fenótipo pró-trombótico, através do aumento da expressão de fator tecidual. Além disso, o contato do fungo com estas células leva ao aumento de secreção de citocinas, quimiocinas e de moléculas de adesão leucocitária, como IL-8, E-selectina e VCAM-1, desencadeando os processos inflamatórios decorrentes desta interação (Chiang *et al.*, 2008; Kamai *et al.*, 2009). No entanto, os receptores endoteliais que medeiam esta ativação, bem como as moléculas da superfície do fungo reconhecidas por estes receptores, são desconhecidos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas endoteliais diferencialmente expressas após a interação de HUVECs com hifas (*germlings*) de *A. fumigatus*, visando elucidar as vias de sinalização e os consequentes eventos celulares envolvidos na interação. Para isso, foi utilizado o modelo de infecção de HUVEC com *A. fumigatus* estabelecido por Lopes-Bezerra & Filler (2004). Neste estudo, as células endoteliais foram desafiadas com duas cepas de *A. fumigatus*, uma cepa selvagem AF293 e a cepa mutante $\Delta ugm1$.

Para a realização deste estudo, utilizamos a técnica de DIGE, que permite a análise simultânea de diferentes amostras biológicas visando identificar proteínas diferencialmente expressas. Os extratos proteicos totais de HUVECs, antes e após a interação, foram marcados com fluorocromos distintos, e separados em um mesmo gel, eliminando, assim, variações experimentais decorrentes da utilização de 2DE-PAGE independentes. No entanto, esta técnica apresenta limitações decorrentes do uso de géis bidimensionais, dentre elas, o fato de não permitir a

identificação de proteínas de baixa abundância. Ao longo deste trabalho, tentamos implementar a técnica de *iTRAQ* para este estudo (doutorado sanduíche de 4 meses na UCM/Espanha – Capes/DGU), mas os resultados revelaram que haviam inúmeros ajustes técnicos que se fazem necessários e estão nas metas futuras.

Apesar da limitação empírica do DIGE para proteínas de baixa abundância, foi possível identificar cinco proteínas diferencialmente expressas pelas HUVECs após a interação com tubos germinativos de *A. fumigatus*, cepa AF293 e/ou cepa *Δugm1*. Dentre as cinco proteínas, a galectina-1 teve seu *spot* proteico validado estatisticamente como diferencialmente expresso após a interação com as duas cepas de *A. fumigatus*. Outra proteína validada como diferencialmente expressa foi a anexina A2, no entanto, o *spot* proteico referente à anexina A2 foi validado apenas após a interação com AF293. Além disso, a diferença de abundância relativa desta proteína após a interação foi baixa. Na literatura, tanto a galectina-1 quanto a anexina A2 foram relacionadas à interação patógeno-hospedeiro e esta participação será discutida adiante.

As anexinas são uma família de proteínas ligantes de fosfolípidos reguladas por Ca^{2+} , caracterizadas pela arquitetura única de seu sítio de ligação ao Ca^{2+} (Gerke *et al.*, 2005). Estas estruturas conferem às anexinas a capacidade de interagir com fosfolípidos aniônicos da membrana, permitindo sua participação em uma infinidade de eventos ligados à membrana, como exocitose, endocitose e regulação do fluxo de íons através da membrana (Dassah *et al.*, 2009).

No citoplasma a anexina A2 encontra-se na forma monomérica enquanto que na membrana esta proteína se encontra na forma de heterotetrâmero. Este é constituído de duas cópias A2 e duas cópias de proteína S100A10/p11. Este heterotetrâmero é expresso na superfície de células endoteliais e promove a atividade fibrinolítica através de sua ligação com o plasminogênio e com o fator de ativação de plasminogênio, levando à aceleração na formação de plasmina (Dassah *et al.*, 2009).

A anexina na forma de heterotetrâmero (A2t) também está relacionada à ativação de células endoteliais desencadeada por anticorpos β 2-glicoproteína I (β 2GPI) (Zhang *et al.*, 2005). β 2GPI é uma glicoproteína plasmática que foi descrita como um importante auto-antígeno na síndrome do anticorpo antifosfolípido. Uma das principais consequências desta síndrome é a trombose, possivelmente relacionada à inibição de vias fibrinolíticas (Zhang *et al.*, 2005, Meroni *et al.*, 2011).

A ativação de células endoteliais, mediada por anti- β 2GPI leva à cascata de sinalização endotelial, similar à cascata ativada por LPS, cujo receptor celular é do tipo *Toll* (TLR-4). Isto resulta na ativação da via de NF- κ B. O TLR-4 poderia atuar na via como proteína “adaptadora” e a sinalização iniciaria com a ligação de β 2GPI com fosfolípídios da membrana ou anexina A2. Embora a anexina A2 não possua nenhuma porção citoplasmática para transduzir sinalização, o complexo A2t- β 2GPI pode interagir com TLR-4 pela sua homologia com estruturas microbianas que são ligantes naturais de TLR-4. Uma vez que o complexo está formado pelo anti- β 2GPI circulante, a polimerização do TLR-4 desencadeia a sinalização, levando à translocação de NF- κ B (Meroni *et al.*, 2011).

Diferentes estudos têm relacionado a anexina A2, presente na superfície tanto de células epiteliais quanto de células endoteliais, com infecções virais e bacterianas. Na superfície de células endoteliais é capaz de se ligar a HCMV (Wright *et al.*, 1994), aumentando sua ligação aos fosfolípídeos de membrana (Raynor *et al.*, 1999). Foi descrita como receptor para vírus que formam sincícios em células epiteliais respiratórias (Malhotra *et al.*, 2003) e como ligante para o vírus HIV-1 (Ryzhova *et al.*, 2006) além de atuar na ligação e invasão do HIV-1 em macrófagos (Ma *et al.*, 2004).

Na superfície de células epiteliais a anexina A2 pode funcionar como receptor para patógenos bacterianos, como *P. aeruginosa*, participando, mesmo que parcialmente, da internalização desta bactéria (Kirschnek *et al.*, 2005). Esta proteína também atua como receptor para *H. pylori*, e sua expressão é aumentada em até 2,5 vezes quando as células epiteliais gástricas são infectadas com este patógeno (Das *et al.*, 2005). Além disso, a anexina A2 está envolvida na agregação de F-actina durante o curso da infecção por *Escherichia coli* (Miyahara *et al.*, 2009; Zobiack *et al.*, 2002).

Outras anexinas também foram reportadas como essenciais para a patogênese de alguns vírus, como, por exemplo, a anexina A5, que se liga especificamente a um antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV), sendo importante para a suscetibilidade das células ao vírus (Gong *et al.*, 1999; Hertogs *et al.*, 1993). Além disso, foi visto que *Streptococcus* grupo B é capaz de induzir a fosforilação, a partir da tirosina, da anexina A5 (Santos *et al.*, 2009).

Harrist e colaboradores (2009) verificaram que a anexina A2 possui um papel na montagem e liberação do vírus HIV-1. Estes autores caracterizam um sítio

intracelular de interação com a anexina A2 com uma protease denominada p55^{Gag} que aumenta a replicação de partículas virais em células 293T. Esta interação ocorre em *rafts* da membrana plasmática contendo gangliosídeo M1 e sua eficiência depende da presença de PtdIns(4,5)P₂, um fosfolípido de membrana que facilita a ligação de p55^{Gag} à membrana.

Patchell e colaboradores (2007) identificaram mudanças na glicosilação da superfície celular durante o reparo de tecidos lesionados, utilizando a lectina CPA (*Chickpea agglutinin*) em monocamadas de 1HAEo. Neste estudo a anexina A2 foi identificada como uma proteína associada ao ligante de CPA e sua presença aumenta coordenadamente com o reparo, acumulando-se na extremidade do tecido lesionado. Além disso, a translocação da anexina A2 é dependente de N-glicosilação, sendo um evento celular mediador de reparo.

Em resumo, a anexina A2 é discutida como receptor ou mediador na interação de diferentes patógenos com células hospedeiras, indicando sua participação como PRR. Em concordância com isto, está o fato desta proteína disparar, mesmo que indiretamente, uma resposta similar à cascata ativada por LPS. Sabe-se que esta endotoxina ativa células endoteliais e induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias e que as células endoteliais também são capazes de expressar PRRs em sua superfície. Por exemplo, moléculas de LPS são capazes de estimular a expressão de TLR2 e TLR4 em HUVEC e esse estímulo é mediado por citocinas, como IL-6 e TNF- α , eventos que podem estar envolvidos nos processos trombolíticos desencadeados no choque séptico (Faure *et al.*, 2001; Hijiya *et al.*, 2003). Coincidentemente, a resposta de HUVECs ao LPS é semelhante à ativação endotelial por *A. fumigatus*, e a hipótese de que a anexina A2 está diretamente relacionada nesta ativação precisa ser comprovada por experimentos complementares.

A anexina A2 também parece apresentar, indireta ou diretamente, a capacidade de se ligar a lipídeos e carboidratos. Esta ligação, mesmo que indireta, pode representar um mecanismo pelo qual esta proteína atua como receptor para patógenos. Neste trabalho, tivemos indícios da participação da anexina A2 na interação de *A. fumigatus* com células endoteliais. No entanto, são necessários estudos adicionais para entender o seu papel exato nesta interação.

Outra proteína diferencialmente expressa após a interação de *A. fumigatus* com células endoteliais foi a galectina-1. Esta proteína pertence a uma família de

lectinas que compartilham a afinidade de ligação por carboidratos contendo β -galactosídeos (Vasta, 2009). Thijssen *et al.*, 2008 verificaram, em ensaios *in vitro*, que HUVECs quiescentes expressam diferentes galectinas, sendo as galectinas -1, -3, -8 e -9 as mais proeminentes. Além disso, a expressão da galectina-1 é semelhante em culturas de células endoteliais de diferentes origens e estável em tecidos normais, diferente das galectinas -3, -8 e -9 que possuem uma expressão variável, dependente do tecido e do ambiente onde a célula endotelial se encontra.

Baum e colaboradores (1995) verificaram que a ativação de células endoteliais *in vitro* por MM-LDL aumenta a expressão de galectina-1 ligada à membrana. As condições de cultivo, como a presença de soro em altas concentrações, também podem induzir a expressão de galectina-1. A adição de 20% de soro humano aumenta a expressão de galectina-1 em até 5 vezes, sendo esta a única galectina a responder à presença de soro. Além disso, este grupo verificou que a galectina-1 está até 30% mais expressa extracelularmente nas células endoteliais e que é translocada para este compartimento durante a ativação (Thijssen, *et al.*, 2008).

Estudos com diferentes vírus, bactérias e fungos têm demonstrado a participação da galectina-1 como PRR (Vasta, 2009). Este reconhecimento pode iniciar as respostas imunes e pode tanto eliminar o micro-organismo quanto agir a favor do mesmo (Sato *et al.*, 2009). Ouellet e colaboradores (2005) e Mercier e colaboradores (2008) demonstraram que a galectina-1 promove a adesão de HIV-1 a células hospedeiras, como macrófagos e células T CD4⁺, desencadeando a infecção. Esta infecção de células hospedeiras por HIV-1 mediada pela galectina-1 é inibida com a adição de açúcares contendo resíduos de β -galactosídios, sugerindo a dependência deste tipo de ligação durante a infecção (Ouellet *et al.*, 2005; Mercier *et al.*, 2008). No entanto, estudos com vírus Nipah demonstraram que a galectina-1 inibe a formação do sincício, evento chave da infecção por este vírus que é característico da fisiopatologia da doença (Levroney *et al.*, 2005). Garner e colaboradores (2010), em estudos com este mesmo vírus, inibiram a expressão de galectina-1 e verificaram o aumento da formação do sincício em até duas vezes e meia. Além disso, através da análise do glicoproteoma da superfície do vírus, os autores verificaram que a galectina-1 reconhece complexos contendo lactosaminas (Gal-GlcNAc).

A galectina-3 também já foi descrita como PRR, principalmente durante infecções bacterianas, e pode se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de diferentes bactérias, como *H. pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*. Além disso, a galectina-3 se liga a *P. aeruginosa* através de LPS e a análise bioquímica desta interação revelou que o domínio não lectínico da galectina-3 se liga ao domínio lipídico do LPS, enquanto o domínio lectínico se liga ao polissacarídeo contendo β -galactosídeo. Além disso, em estudos com camundongos deficientes para galectina-3, a migração de neutrófilos para alvéolos infectados com *P. aeruginosa* é reduzida (Sato *et al.*, 2009).

Na superfície do protozoário *Leishmania major* e alguns helmintos existem poligalactosídeos reconhecidos por galectina -3, -8 e -9, mas não galectina-1 (Sato *et al.*, 2009). A galectina-3 também se liga à superfície do *Trypanosoma cruzi*, promovendo sua adesão às células de músculo liso das artérias (Kleshchenko *et al.*, 2004). No entanto, a galectina-1 se liga à superfície de outros protozoários parasitas, como, por exemplo, a lipofosfoglicanos (LPGs) na superfície de *Trichomonas vaginalis*, estabilizando sua ligação ao epitélio cervical (Okumura *et al.*, 2008).

Outras PRRs do tipo lectina foram descritas. Em fungos, foi descrita a participação do reconhecimento de resíduos de β -glucanas pela dectina-1, presente na superfície de macrófagos que é capaz de disparar a resposta anti-fúngica. Estes resíduos permanecem escondidos pelos fungos e são expostos durante a germinação (Taylor *et al.*, 2007). Em *C. albicans*, a dectina-1 atua como PRR, ligando-se à resíduos de β -glucana (Gow *et al.*, 2007). No entanto, sabe-se que a galectina-3 também se liga a resíduos de β -1,2 manosídeos na superfície deste fungo, modulando a resposta imune através de um *cross-talking* com TLR2, mas não parece estar envolvida na fagocitose deste fungo (Fradin *et al.*, 2000; Jouault *et al.*, 2006).

Esta participação das galectinas -1 e -3 como PRRs pode estar relacionada ao fato de que a afinidade de cada galectina varia dependendo das substituições existentes no *core* dos β -galactosídeos. Esta diferença de afinidade está diretamente relacionada à diferença no domínio CRD de cada galectina. Por exemplo, a modificação de α -N-acetilgalactosamina de resíduos de galactose diminui a afinidade da galectina-1 por este resíduo, mas aumenta a afinidade da

galectina-3 (Hirabayashi *et al.*, 2002). No entanto, a modificação de resíduos de α -6 ácido siálico, e não de α -3 ácido siálico, reduz a afinidade tanto da galectina-1 quanto da galectina-3. A galectina-3 reconhece resíduos de lactosamina internos e externos, enquanto a galectina-1 se liga apenas a galactoses periféricas apresentadas por lactosamina (Sato *et al.*, 2009).

Sabe-se que a secreção de galectinas é um evento altamente regulado, que pode ser disparado tanto pelos danos teciduais causados pela invasão de patógenos quanto pela ação de células imunes profissionais, como macrófagos e linfócitos, estas proteínas podem agir como PRRs de acordo com o nível de patogenicidade do micro-organismo invasor (Sato *et al.*, 2009). Apesar dos dados que sugerem o papel de galectinas como PRRs, são necessários estudos *in vitro* e *in vivo* adicionais para validar e investigar a atividade tipo-PRR das galectinas na infecção pelo *A. fumigatus*.

Nossos resultados sugerem que os tubos germinativos da cepa Δ *ugm1* de *A. fumigatus* induzem uma maior expressão de galectina-1 em HUVECs do que os organismos da cepa AF293. No presente momento, estão em andamento experimentos para validar esta diferença de expressão e os resultados preliminares sugerem que a cepa mutante é capaz de induzir até duas vezes mais a expressão de galectina-1 (dado não mostrado). O gene *UGM1*, codifica a enzima UDP-galactopiranosose mutase, responsável pela conversão de polímeros de galactopiranosose (Galp) em galfuranose (Galf). Resíduos de Galf se ligam a uma cadeia principal de α -manana, formando o polissacarídeo mais abundante na superfície de *A. fumigatus*, a galactomanana (Latgé, 2010). Estudos bioquímicos mostram que a deleção do gene *UGM1* resulta na ausência de resíduos de galactofuranose, com consequente diminuição do conteúdo de galactomanana. Além disso, a deleção deste gene leva ao aumento no conteúdo de galactosaminogalactana na superfície de *A. fumigatus* (Lamarre *et al.*, 2009; Heesemann *et al.*, 2011). A galactosaminogalactana é um polímero constituído por resíduos de galactopiranosose ligados a resíduos de galactosamina, similarmente às cadeias de glicosaminoglicanos em mamíferos (Alberts *et al.*, 2004). Isto indica que os resíduos de galactopiranosose não convertidos em galactofuranose, provavelmente através de um mecanismo compensatório, estão sendo utilizados na formação de galactosaminogalactana, até mesmo para compensar a falta de galactomanana (Sheppard, 2011).

Estudos de outros grupos e do nosso laboratório demonstraram que a cepa *Δugm1* possui maior capacidade de aderir a superfícies inertes, células epiteliais e células endoteliais, quando comparada à cepa selvagem (Lamarre *et al.*, 2009; Neves, 2012). Além disso, em contato com HUVECs, estes organismos são capazes de estimular uma maior secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo TNF- α , que é 10 vezes mais expresso após a interação de HUVECs com a cepa *Δugm1* (Neves, 2012). Sabe-se que esta capacidade de *A. fumigatus* de ativar o endotélio é dependente de contato (Lopes-Bezerra & Filler, 2004), sugerindo que, na superfície de *A. fumigatus* da cepa *Δugm1*, estão expressas e/ou superexpressas moléculas responsáveis pela ativação endotelial. Isto é reforçado por estudos onde foi visto que o aumento na adesão da cepa *Δugm1* é revertido após o tratamento dos tubos germinativos com uma manosidase. A partir desse resultado, os autores sugeriram que, após a deleção do gene *UGM1*, resíduos de manana estariam mais expostos na superfície das mutantes, sendo responsáveis pela maior adesão observada para esta cepa. Similarmente, a deleção do gene *UGM1* em outras espécies de *Aspergillus*, como *A. nidulans*, também resultou em uma cepa com fenótipo hiperaderente (Paul *et al.*, 2011). Dessa forma, alguns grupos sugerem que os resíduos de galactofuranose, presentes na superfície celular de *Aspergillus spp* e portanto, ausentes em mutantes para o gene *UGM1*, sejam responsáveis por mascarar grupos polares durante a morfogênese do fungo, regulando assim sua capacidade adesiva (Lamarre *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2011).

Além de adesinas, as moléculas de superfície de *A. fumigatus* também podem ser responsáveis por modular o reconhecimento imune por células do hospedeiro. Dentre os possíveis PAMPs na superfície de *A. fumigatus*, estão as β -glucanas, quitina, galactomanana e α -glucana. Os principais PRRs descritos como envolvidos no reconhecimento deste fungo por células do sistema imune são os TLRs e as lectinas do tipo C. No entanto, o único PAMP bem caracterizado até o momento em *A. fumigatus* é a β -1,3-glucana, que é reconhecida por células do sistema imune inato através do receptor dectina-1 (Wang *et al.*, 2001). Ainda assim, o papel de algumas destas moléculas como PAMPs ainda é controverso. Um exemplo é a quitina, que apesar de ter seu envolvimento na ativação de células mielóides já descrito, é considerada por muitos autores como uma molécula é imunologicamente inerte (Chai *et al.*, 2011). A α -1,3-glucana, foi associada ao escape de *A. fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*,

por mascarar o reconhecimento de β -glucanas. Entretanto, essa molécula também já foi descrita como moduladora da resposta adaptativa anti-*A. fumigatus* mediada por células Th1 (Rappleye *et al.*, 2007). Já a ausência de galactomanana não altera a resposta pró-inflamatória dos fagócitos, indicando que este polímero pode não apresentar uma função de PAMP na superfície do patógeno (Heesemann *et al.*, 2011). Além disso, estudos do papel de frações polissacarídicas isoladas da parede celular de *A. fumigatus* na interação com macrófagos mostraram que α -glucana, β -glucana e galactomanana são capazes de causar uma regulação negativa na resposta mediada por TLR2 e TLR4 (Chai *et al.*, 2011).

Deste modo, sabe-se que a deleção do gene *UGM1* interfere no potencial adesivo dessa cepa, bem como na sua capacidade de ativar e estimular células do hospedeiro (Neves, 2012), o que parece estar relacionado a mudanças estruturais e a mecanismos compensatórios para a ausência de galactomanana e de resíduos de galactofuranose durante a morfogênese do fungo (Latgé, 2010). Como consequência, ocorre o aumento na proporção e exposição de moléculas de galactosaminogalactana, sugerindo um possível envolvimento destas moléculas nos processos de adesão, estímulo e ativação de células endoteliais (Neves, 2012). Nosso grupo está realizando experimentos para confirmar esta hipótese. Além disso, este aumento na proporção de galactosaminogalactana parece estimular uma maior expressão de galectina-1 e anexina A2, como aqui demonstrado utilizando-se uma abordagem proteômica. Para confirmar esta hipótese, serão realizados experimentos com galectina-1 recombinante em colaboração com o Dr. Jean-Paul Latgé (Instituto Pasteur, Paris) e de PCR em tempo real em colaboração com o Dr. Gustavo Goldman (USP-RP).

Através da técnica de DIGE, obtivemos indícios de quais proteínas e, conseqüentemente, vias de sinalização poderiam estar envolvidas na interação de *A. fumigatus* com HUVECs. No entanto, outras proteínas que não foram detectadas, devido às limitações técnicas do DIGE, e que também poderiam estar envolvidas na interação. Deste modo, dando continuidade a este trabalho, será realizada uma avaliação das proteínas diferencialmente expressas, utilizando a quantificação de expressão *label-free*, por espectrometria de massa, uma técnica que é mais sensível para detectar diferenças de expressão em proteínas de baixa abundância e que não apresenta as limitações do 2D-SDS-PAGE.

Os eventos inflamatórios e trombolíticos desencadeados a partir da interação de *A. fumigatus* com células endoteliais são dependentes do contato hifa-endotélio, e que, portanto, envolvem moléculas presentes na superfície de *A. fumigatus*, e não os fatores secretados por esse micro-organismo (Lopes-Bezerra & Filler 2004; Chiang *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2009). Contudo, até o presente, não se conhece quais moléculas de superfície deste patógeno são responsáveis pela adesão, estímulo e ativação endotelial, bem como, quais os receptores na célula hospedeira medeiam esses processos. Neste sentido, nosso trabalho sugere duas proteínas como possíveis receptores e/ou mediadores da ativação endotelial por *A. fumigatus*: galectina-1 e anexina A2. Adicionalmente, a maior expressão de galectina-1 após a interação com a cepa mutante para o gene *UGM1* contribui para a elucidação de possíveis polissacarídeos expressos pelas células germinativas que estariam diretamente envolvidos nesta interação.

8 CONCLUSÕES

- Foi estabelecido todo o *pipeline* para o estudo proteômico de HUVECs, incluindo-se as ferramentas de bioinformática para a predição *in silico* das interações proteína-proteína e funções biológicas das proteínas identificadas.
- Foi estabelecido modelo de interação HUVEC com *A. fumigatus* para estudo de proteínas diferencialmente expressas pelas células hospedeiras durante esta interação
- A proteína anexina 2 foi identificada por MALDI/TOF/MS e encontra-se diferencialmente expressa em HUVECs desafiadas com a cepa selvagem de *A. fumigatus*
- A proteína galectina-1 foi identificada por MALDI/TOF/MS e encontra-se diferencialmente expressa em HUVECs desafiadas com a cepa selvagem e a cepa mutante $\Delta ugm1$ de *A. fumigatus*.
- A expressão aumentada de galectina-1 foi quantitativamente mais significativa na interação de HUVECs com a mutante $\Delta ugm1$ de *A. fumigatus*.
- Nossos resultados sugerem que tanto anexina 2 quanto galectina-1 podem estar envolvidas, como PRRs, na interação de *A. fumigatus* com o endotélio vascular, no processo de angiogênese observado na aspergilose invasiva.

REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Garland Science. 2004, 4th edition.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory Mycology. John Wiley & Sons, Inc., 4th Edition, Cap. 11,p306-322. 1996.
- Backes P, Quinkert D, Reiss S, Binde M, Zayas M, Rescher U, Gerke V, Bartenschlager R, Lohman V. Role of Annexin A2 in the production of infectious Hepatitis C Virus particle. *Virology*. 2010, 84(11):577
- Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*. 2009, 11(12):919-27.
- Baum LG, Seilhamer JJ, Pang M, Levine WB, Beynon D, Berliner JA: Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. *Glycoconj J*. 1995, 12:63–68.
- Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood*. 2009, 114(26):5393-9.
- Bossche VH, Mackenzie DWR, Cauwenbergh G. *Aspergillus* and aspergillosis. Plenum Press, New York, N.Y. 1988.
- Cadenas NR, Saez CP, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research*. 2009.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006 16(11):137R-157R.
- Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin Immunol*. 2012, 142(2):107-16.
- Chai LY, Vonk AG, Kullberg BJ, Verweij PE, Verschueren I, van der Meer JW, Joosten LA, Latgé JP, Netea MG. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes Infect*. 2011, 13(2):151-9.
- Chauhan N, Latgé JP, Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol*. 2006, 4(6):435-44.
- Chiang LY, Sheppard DC, Gravelat FN, Patterson TF, Filler SG. *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect Immun*. 2008, 76(8):3429-38.

Chung CY, Erickson HP. Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol.* 1994, 126: 539-548.

Cummings RD & Liu F-T. Galectins Chapter 33. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009.

Das S, Sierra JC, Soman KV, Suarez G, Mohammad AA, Dang TA, Luxon BA, Reyes VE. Differential protein expression profiles of gastric epithelial cells following *Helicobacter pylori* infection using ProteinChips. *J Proteome Res.* 2005, 4: 920-930.

Dassah M, Deora AB, He K, Hajjar KA. The endothelial cell annexin A2 system and vascular. *Fibrinolysis Gen Physiol Biophys.* 2009, 28(SPEC): F20–F2.

Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem.* 2004, 279: 43411-43418.

Dias-Baruffi M, Stowell SR, Song SC, Arthur CM, Cho M, Rodrigues LC, Montes MA, Rossi MA, James JA, McEver RP, Cummings RD. Differential expression of immunomodulatory galectin1 in peripheral leukocytes and a dult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. *Glycobiology.* 2010, 20(5):507-20.

Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij P. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009, 15(7):625-33.

Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev AE., Equils O, Arditi M. NF- κ B activation expression in human endothelial cells: Role of Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4. *Journal of Immun.* 2001, 166:2018-2024.

Filler SG & Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *Plos Pathogens.* 2006, 2: 12 - e129.

Fontaine, T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, Vorgias CE, Diaquin M, Latgé JP. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem.* 2000, 41528.

Fradin C, Poulain D, Jouault T. beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun.* 2000, 68(8):4391-8.

Garner OB, Aguilar HC, Fulcher JA, Levroney EL, Harrison R, Wright L, Robinson LR, Aspericueta V, Panico M, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Lee B, Baum LG. Endothelial Galectin-1 binds to specific glycans on Nipah virus fusion protein and inhibits maturation, mobility, and function to block syncytia formation. *Plos Pathog.* 2010, 6(7): e1000993.

Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6:449-461.

Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 2002, 82:331-371.

Gong ZJ, De Meyer S, Van Pelt J, Hertogs K, Depla E, Soumillon A, Fevery J, Yap SH. Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 1999, 29:576-584.

Gow NA, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, Walker L, Jansen T, Jacobs L, Tsoni V, Brown GD, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg BJ. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis.* 2007, (10):1565-71.

Groll, AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a University Hospital. *J. Infect.* 1996, 33:23–32.

Hajjar KA, Guevara CA, Lev E, Dowling K, Chacko J. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol Chem.* 1996, 271:21652-21659.

Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med.* 1999, 9: 128-138.

Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ. Specific recognition of purified Cu, Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33:495-496.

Harrist AV, Ryzhova EV, Harvey T, Gonzalez-Scarano F. Anx2 interacts with HIV-1 Gag at phosphatidylinositol (4,5) biphosphate-containing lipid rafts and increases viral production in 293T cells. *Plos One.* 2009, 4: e5020.

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

Hertogs K, Leenders WP, Depla E, De Bruin WC, Meheus L, Raymackers J, Moshage H, Yap SH. Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology.* 1993, 197:549-557.

Hijiya N, Miyake K, Akashi S, Matsuura K, Higuchi Y, Yamamoto S. Possible involvement of Toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology.* 2003, 70:18-25.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 2002,19:1572(2-3):232-54.

Kleshchenko YY, Moody TN, Furtak VA, Ochieng J, Lima MF, Villalta F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infect Immun*. 2004, 72(11):6717-21.

Jaffe EA, Nacchman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells of derivate from umbilical cords veins. Identification on by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973, 52: 2745-2756.

Jouault T, El Abed-El Behi M, Martínez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamaillard M, Trottein F, Poulain D.J.

Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. 2006, 1;177(7):4679-87.

Kamai Y, Chiang LY, Lopes-Bezerra LM, Doedt T, Lossinsky AS, Sheppard DC, Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with vascular endothelial cells. *Med Mycol*. 2006, 44:S115-7.

Kamai Y, Lossinsky AS, Liu H, Sheppard DC, Filler SG. Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*. 2009, 11(1):170-82.

Kim JM, Lu L, Shao R, Chin J, Liu B. Isolation of mutations that bypass the requirement of the septation initiation network for septum formation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2006, 173: 685–696.

Kirschnek S, Adams C, Gulbins E. Annexin II is a novel receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005, 327: 900-906.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Lond*. 1970, 227:680-685.

Lamarre C, Beau R, Balloy V, Fontaine T, Wong Sak Hoi J, *et al*. Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiology*. 2009, 11:1612-1623.

Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 4th ed., Washington, DC: ASM Press. 2002.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999, 12:310-50.

Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol*. 2007, 66: 279-290.

Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*. 2010, 12(7):863-72.

Levroney EL, Aguilar HC, Fulcher JA, Kohatsu L, Pace KE, Pang M, Gurney KB, Baum LG, Lee B. Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1

inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *J Immunol.* 2005, 175: 413–420.

Liu F & Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010. ISSN 0077-8923.

Lopes-Bezerra LM & Filler SG. Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2003, 36:987-991.

Lopes-Bezerra LM & Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood.* 2004, 103: 2143-2149.

Lousserte C, Schmitt C, Prevost MC, Balloy V, Fadel E, Philippe B, Kauffmann-Lacroix C, Latgé JP, Beauvais A. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiology.* 2010, 12:405-410.

Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, Wild CT, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 2004, 200: 1337-1346.

Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurle M, Blair E, Bird M. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect.* 2003, 5: 123-133.

Mercier S, St-Pierre C, Pelletier I, Ouellet M, Tremblay MJ, Sato S. Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. *Virology.* 2008, 371: 121-129.

Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Endothelial cell activation by anti- β_2 GPI autoantibodies. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nature Reviews Rheumatology.* 2011, 7: 330-339.

Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003, 196(3):430-43.

Miyahara A, Nakanishi N, Ooka, T, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. *Cell. Microbiol.* 2009, 11, 337-350.

Momany M & Taylor I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology.* 2000, 12: 3279-84.

Neves GWP. Perfil de secreção de citocinas pelas células endoteliais após interação com *A.fumigatus*. 2012. 97f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biociências). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O`Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 2008, 10.1038-07528.

Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol.* 2008, 10: 2078–2090.

Osherov N. Conidial germination in *Aspergillus fumigatus*. Cap. 10. Washington, DC. ASM Press. 2009.

Ouellet M, Mercier S, Pelletier I, Bounou S, Roy J, Hirabayashi J, Sato S, Tremblay MJ. Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *J Immunol.* 2005 174: 4120–4126.

Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, Houcine O, Taramelli D, Lombardi L, Latgé JP. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect Immun.* 1997, 65(4):1510-4.

Park SJ & Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev.* 2009, 22(4):535-51.

Patchell BJ, Wojcik KR, Yang T, White SR, Dorscheid DR. Glycosylation and annexin II cell surface translocation mediate airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007, 293:354–363.

Paul BC, El-Ganiny AM, Abbas M, Kaminskyj SG, Dahms TE. Quantifying the importance of galactofuranose in *Aspergillus nidulans* hyphal wall surface organization by atomic force microscopy. *Eukaryot Cell.* 2011,10(5):646-53.

Phan QT & Filler SG. Endothelial cell stimulation by *Candida albicans*. *Methods Mol Biol.* 2009, 470:313-26.

Pitt JI. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J. Med. Vet. Mycol.* 1994, S1:17–32.

Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007,(4):1366-70.

Raynor CM, Wright JF, Waisman DM, Pryzdial EL. Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry.* 1999, 38: 5089-5095.

Rhodes JC. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Medical Mycology.* 2006: 44. S77-S81.

Rippon JW. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes, 1st ed., Philadelphia: WB Saunders Company. *Medical Mycology.* 1974.

Ryzhova EV, Vos RM, Albright AV, Harrist AV, Harvey T, Gonzalez-Scarano F. Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein

involved in replication in monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 2006, 80: 2694-2704.

Saez CP, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biology.* 2007, 8(1):R3.

Santos GS, Loureiro y Penha CV, Matos-Guaraldi AL, Attias M, Lopes-Bezerra LM, Silva Filho FC, Nagao PE. Group B *Streptococcus* induces tyrosine phosphorylation of annexin V and glutathione S-transferase in human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine.* 2009, 24:393-399.

Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble β -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Glycoimmunology.* 2009, 230(1):172–187.

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

Sheppard DC. Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. *Current Opinion in Microbiology.* 2011, 14(4):375–9.

Stevens DA. Clinical aspergillosis for basic scientists. *Medical Micology.* 2009, 47. S1-S4.

Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007, 8(1):31-8.

Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of endothelium. Altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 2008, 172(2): 545–553.

Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol.* 2009, 7(6):424-38.

Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jørgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE, Aasen AO. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2402-6.

Wasylnka JA & Moore MM. Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun.* 2002, 70(6):3156-63.

Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycosis in the immunocompromised host. *Transpl. Infect. Diseases.* 2006, 8:128-139.

Witzmann, FA, Clack JW, Geiss K, Hussain S, Juhl MJ, Rice CM, Wang C. Proteomic evaluation of cell preparation methods in primary hepatocyte cell culture. *Electrophoresis*. 2002, 14; 2223–2232.

Wright JF, Kurosky A, Wasi S. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994, 198: 983-989.

Yang R, Daniel K. Hsu, Liu F-T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93:6737-6742.

Zhang J, McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood*. 2005, 105: 1964-1969.

Zmeili O, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*. 2007, 100(6):317-34.

Zobiack N, Rescher U, Laarmann S, Michgehl S, Schmidt MA, Gerke V. Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J. Cell. Sci*. 2002, 115: 91-98.

APÊNDICE A – Manuscrito em preparação - The overexpression of a cell wall galactosaminogalactan by the *ugm1* mutant of *Aspergillus fumigatus* activates human endothelial cells

The overexpression of a cell wall galactosaminogalactan by the *ugm1* mutant of *Aspergillus fumigatus* activates human endothelial cells

Gabriela W. Neves¹, Nathália Curty Andrade¹, Thierry Fontaine², Paula K. Barreira¹, Gustavo Goldman³, Jean-Paul Latgé² and Leila Lopes-Bezerra^{1*}

¹Laboratório de Micologia Celular e Proteômica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ² Unité des Aspergillus, Institut Pasteur, France; 3- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Besides the emergency of more active and less toxic antifungal agents and the conventional use of antifungal prophylaxis, invasive mold infections have still high mortality rates, especially, invasive aspergillosis (IA). This life-threatening disease is a predominant fungal opportunistic infection for patients with long-term neutropenia, mostly HSCT recipients. *Aspergillus fumigatus* is the most important species causing IA and is already known as an angioinvasive fungal pathogen. Upon filamentation this fungus can damage and activate human vein endothelial cells (HUVECs) which in turn, switch to a pro-thrombotic phenotype by the expression of tissue factor. HUVEC activation is known to be mediated by TNF- α once cell-cell contact occurs. To investigate the possible pathogen molecules involved in this interaction, conidia and germlings of several mutants of *A. fumigatus* were screened by their capacity to adhere to and be internalized by HUVECs in confluent monolayers. Briefly, HUVECs were infected with germ tubes and conidia of *A. fumigatus* strains and a differential quantitative fluorescence assay was achieved to determine adhesion and internalization rates. The *ugm1* mutant, which lacks the AfUGM1 gene encoding UDP-galactopyranose mutase, an enzyme responsible for the conversion of UDP-galactopyranose in UDP-galactofuranose, showed a significant increased in adhesion to HUVECs in comparison to two reference wild type (WT) strains. Galactofuranose is an uncommon 5-membered ring form of galactose and a very important component of glycan structures of the *A. fumigatus* cell wall. Thus, we further investigated if the increment in adherence observed for the *ugm1* mutant correlated with endothelial cell activation. To ascertain this goal a kinetic study of secreted pro-inflammatory cytokines and chemokines in HUVEC conditioned medium was performed by a multiplex assay. The cytokine production was assayed at three time points (4, 8 and 16 hours) using either live or dead germlings for an E:T ratio of 2:1. A significant increase in IL-6, IL-8 and TNF- α secretion by HUVECs upon interaction with the *ugm1* mutant was observed in comparison with a wild type strain. The deletion of *UGM1* gene was associated with an increase in the production of the cell wall galactosaminogalactan (GAG). A similar cytokine response was seen when the purified galactosaminogalactan secreted by

the fungus was added to the HUVEC cells. This result suggests that the effect of the *ugm1* mutant in the activation of the HUVEC cells is not due to the lack of galactofuran but to a compensatory reaction resulting in an increase in the GAG. The activation of HUVECs infected with the *ugm1* mutant was confirmed by the tissue factor expression determined by real time PCR. Finally, to further investigate HUVEC putative host receptors a differential proteomic analysis is being accomplished, indicating galectin 1 as a putative PRR.

* Correspondence author:

Dr. Leila M. Lopes Bezerra, PhD

Laboratório de Micologia Celular e Proteômica, IBRAG/UERJ

Rua São Francisco Xavier 524 PHLC sl 501D, Maracanã, Rio de Janeiro, Brasil

CEP 20550-013; phone number: +55 21 23340835; e.mail: leila@uerj.br

APÊNDICE B – Manuscrito em preparação - Discovery of putative drug targets in *Aspergillus fumigatus* morphotypes by a 2D-DIGE proteomic approach

Discovery of putative drug targets in *Aspergillus fumigatus* morphotypes by a 2D-DIGE proteomic approach

Kubitschek-Barreira PH¹, Andrade NA¹, Neves GWP¹, Gil C² and Lopes-Bezerra LM^{1*}

¹ Laboratório de Micologia Celular e Proteômica (LMCProt), Instituto de Biologia da Universidade do estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

² Universidad Complutense de Madrid, Spain

Aspergillus fumigatus is the main etiological agent of invasive aspergillosis, an opportunistic infection with high mortality rates. The disease affects mainly neutropenic patients of Hematological Units, especially patients with acute leukemia or bone marrow transplantation recipients. The difficulty on establishing early diagnosis as well as the poor spectrum of antifungal drugs remains a setback to the successful treatment of this disease. Novel approaches to early detection of subclinical infections could improve prognosis as well as new drug targets, not expressed by mammalian cells. The proteomics technology is a powerful tool to search new protein targets involved in the pathophysiology of fungal infections. The aim of this work was to study differentially expressed proteins of *A. fumigatus* during fungus morphogenesis, a process also observed during the invasive infection. To reach this goal a 2D-DIGE approach was applied to study surface proteins extracted by a mild treatment of intact cells with DTT for 2 hours at 4 °C. Two morphotypes of *A. fumigatus* (AF293) were studied: (a) germlings (GT_{6h}) and (b) mature hyphae (H_{72h}). The software DeCyder 7.0 was used to analyze the differentially expressed proteins among 296 proteins statistically validated for the 2D-DIGE maps. The GT_{6h} cells presented 42.6% overexpressed proteins in relation to the hyphae while the H_{72h} cells had 28% proteins overexpressed in relation to the germlings. Sixty-three of the differentially expressed proteins were identified by MALDI-ToF/MS. Among the identified proteins, at least two can be considered as good candidates as new drug targets, one is known to be involved in calcium regulation and the other one, which is exclusively expressed in hyphae, is involved in virulence and drug stress response in other fungi.

* Correspondence author:

Dr. Leila M. Lopes Bezerra, PhD

Laboratório de Micologia Celular e Proteômica, IBRAG/UERJ

Rua São Francisco Xavier 524 PHLC sl 501D, Maracanã, Rio de Janeiro, Brasil

CEP 20550-013; phone number: +55 21 23340835; e.mail: leila@uerj.br

APÊNDICE C – Manuscrito submetido - Large-scale identification of proteins expressed by non-stimulated human umbilical vein endothelial cells using gel and non-gel proteomics approaches

Large-scale identification of proteins expressed by non-stimulated human umbilical vein endothelial cells using gel and non-gel proteomics approaches

Dataset Brief

Nathalia C. de Andrade¹; Rosana C. Nascimento¹; Gabriela S. Santos²; Vital Vialás³; Verônica Morandi²; Prescilla E. Nagao²; Lucia Monteoliva³; Concha Gil³; Leila M Lopes-Bezerra¹

¹Laboratório de Micologia Celular e Proteômica and ² Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Departamento de Microbiologia II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid, Spain.

Corresponding author:

Dr. Leila M. Lopes Bezerra
Laboratório de Micologia Celular e Proteômica
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Rua São Francisco Xavier, 524 PHLC 501D – CEP 20550-013
Rio de Janeiro, Brazil
Tel: + 55 21 23340835
e.mail: leila@uerj.br

Running title: quiescent human endothelial cell proteome by nanoLC/MS/MS

Keywords: proteome, endothelial cells, HUVEC, Proteopathogen, nanoLC/MS/MS

Abstract

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) are an important model system for studying the biology of the endothelium, an important regulatory organ involved in the maintenance of cardiovascular homeostasis (quiescent state). The aim of the present work was the standardization of protocols and proteomic strategies to study the HUVEC proteome. To ascertain the nonactivated physiological condition of HUVECs in our model, cell surface markers were followed by flow cytometry. Using a combination of a 2-DE-MS/MS and a nanoLC-MS/MS strategy, it was possible to identify 973 newly described proteins in this quiescent homeostatic phenotype compared to other proteomic studies using this cell type. Proteins were grouped by relevant biological processes, mainly related to homeostasis, cell migration and angiogenesis, using GENECODIS and an extensive analysis of protein-protein interactions was performed with the Osprey software. These data elicited new information regarding proteins identified in this work involved in key cellular routes and/or interconnecting important biological processes for cardiovascular homeostasis. Furthermore, certain proteins such as latexin and FTO protein, are also described for the first time in this cell type. The entire dataset is available on a public proteomic database at proteopathogen.dacya.ucm.es.

Main text

The most important model for the study of endothelial functions is based on primary cultures of isolated endothelial cells from human umbilical cords, HUVECs [1]. This cell type can be activated by growth factors, microbial components, cytokines and other exogenous molecules using culture conditions that attempt to reproduce several physiological and pathological conditions faced by endothelium [2, 3]. Furthermore, their quiescent homeostatic phenotype can be modified by autocrine and/or paracrine stimulation [4]. To understand the biochemical and/or phenotypic modifications that occur in the endothelium upon activation using this *in vitro* model, is important the knowledge on quiescent endothelial cell phenotype, including mapping protein expression and ascertaining their cell biology. In this case, culture conditions are critical and must be restrained. Despite their importance for the study of angiogenesis, vasculogenesis and infectious diseases caused by angioinvasive pathogens, among other physiological and pathological conditions, very few studies have been conducted on the proteome of quiescent HUVECs [5, 6]. Although important, these published works describe less than a hundred proteins and few protein interactions in the homeostatic phenotype of HUVECs [5, 6].

Given the extensive interest aroused by the endothelial cells as a model system for the study of the biology of endothelium, the purpose of the present study was to elucidate proteins expressed by the endothelium focusing on the homeostatic state of this organ. To achieve this purpose, a combination of proteomic strategies was used together with extensive analysis of protein-protein interactions, mainly involved in cell adhesion, cardiovascular regulation (homeostasis), angiogenesis and blood coagulation.

HUVECs were obtained by treatment of umbilical veins with a 0.1% collagenase IV (Sigma) solution, as previously described by Jaffe et al. [1]. Primary cells were seeded onto 25 cm² cell culture flasks coated with porcine skin gelatin and grown in 199 medium (M199)/HEPES (Sigma) supplemented with antibiotics, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 µg/mL amphotericin-B, 2 mM glutamine and 20% FCS (Cultilab) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere until they reached confluence and subcultured by trypsinization to 75 cm² cell culture flasks. This study was approved by Ethical Committee of the Municipal Health Secretariat and Civil Defense of Rio de Janeiro (CEP SMSDC-RJ), protocol n° 196/09.

Endothelial cells were obtained and cultured under restricted conditions to ascertain their nonactivated state. To confirm the phenotype, specific markers of activated endothelium (ICAM-1 and TF) were verified by flow cytometry (see supplementary Experimental Procedures). It is known that the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is expressed on quiescent endothelium and upregulated by TNF- α , IL-1 or IFN- δ stimulation [7]. Moreover, tissue factor (or CD142) is a type I integral membrane protein expressed after endothelial cells

challenged by proinflammatory cytokines, bacterial lipopolysaccharide (LPS) and opportunistic fungi [8, 9]. For this reason these cells express low levels of these markers and respond to treatment with either LPS or TNF- α (Fig. 1, A to G). As expected, the surface molecule ICAM-1 was expressed on non-stimulated HUVECs (54.25% cells) (Fig. 1B), but when HUVECs were stimulated with LPS or TNF- α , the expression of ICAM-1 increased to 84.61% (Fig. 1D) and 92.57% (Fig. 1F), respectively. The expression of TF in non-stimulated endothelial cells was very low, only 1.77% (Fig. 1C); however, when HUVECs were stimulated with LPS or TNF- α , the levels increased to 28.61% (Fig. 1E) and 13.79% (Fig. 1G), respectively.

Two proteomic platforms, a gel based and a non-gel based approaches, were used to generate a representative map of proteins expressed on the non-activated HUVECs.

For protein extraction, confluent endothelial cells were washed three times with PBS, scrapped off the cell culture flasks and collected by centrifugation. Cells (10^7 cells/mL) were suspended in 300 μ L in one of the lysis buffers listed forward and incubated for 30 min at 4°C under agitation. Each biological sample (total HUVEC extract) corresponded to a pool of at least five umbilical cords being representative of individual variations between donors.

To optimize total protein extraction from HUVECs, three different lysis buffers were tested (Figure 1H) (buffer A (tris 25 mM, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, 1% Igepal, PMSF 100 μ M, leupeptin hemisulfate salt 40 μ M or; buffer B (urea 8 M, tris 30mM, CHAPS 4%, PMSF 100 μ M, leupeptin hemisulfate salt 40 μ M) or; buffer C (urea 6 M, thiourea 2M, tris 30 mM, CHAPS 4%, PMSF 100 μ M, leupeptin hemisulfate salt 40 μ M) and several parameters were evaluated: efficiency of protein extraction, protein yield, quality of the isoelectric focusing (using different hydration buffers) and 2-D resolution. Protein recovery was 1.16 mg/mL using a classic HUVEC lysis buffer containing the detergent Igepal (buffer A). This was considered satisfactory, but several artifacts were observed leading to unresolved 2-D maps. With the other lysis buffers tested, buffers B and C, protein recovery was 1.84mg/mL and 0.61 mg/mL, respectively (Figure 1H) and provided high quality 2-DE gels. Since the presence of thiourea in the lysis buffer did not improve 2-DE gel resolution (data not shown) and impaired protein recovery, lysis buffer B was used in the standardized protocol. Using this protocol, our group attempted to optimize protein extraction by comparing two disruption protocols [10], see supplementary Experimental Procedures for details. The protocol described here for HUVEC total protein extraction provided better results, since qualitative protein recovery improved compared with a gentle extraction without cell-scrapper (data not shown).

The cellular extracts were centrifuged at 12000 x *g* for 15 min, the supernatants collected and precipitated with cold trichloroacetic acid/acetone at -20°C for 1 h [11]. The proteins were resuspended in rehydration buffer (urea 6 M, thiourea 2 M, Tris 30 mM, 4% CHAPS, 1.2% DeStreak, 1% pharmalytes pH 3-11, bromophenol blue) for the 2-DE experiments or in Tris 10mM, urea 8 M, thiourea 2 M and 2% CHAPS for 1D gels. For methodological information regarding the 2-DE gels, see Experimental Procedures in the supplementary material.

In the 2-DE reference map (Supplementary Figure 1), 548 spots were revealed and 84 proteins corresponding to 131 spots were identified (Supplementary Table 1). Only a small percentage of proteins could be identified using the 2-DE-MS/MS strategy, as previously report [12]. For this reason, a 1-D nanoLC-MS/MS was performed.

For the 1D- nanoLC-MS/MS protein map a SDS-PAGE 10% gel was performed with 500 µg of HUVEC extracts. The gel was stained by colloidal CBB [13] and cut into 17 uniform slices. The proteins from each gel slice were digested by trypsin and the resulting peptides were separated by nanoLC and spotted directly onto a MALDI target and analyzed by MALDI-TOF/TOF following the bioinformatic analysis (see supplementary Experimental Procedures).

The 1-D nanoLC-MS/MS analysis led to the identification of 1010 proteins (Supplementary Table 2) of which 29 are based on a single peptide (spectra provided) representing 2.87% of the identifications. Additional information was included in the Supplementary material. With the addition of 14 proteins exclusively identified using the 2-DE platform, a total of 1024 HUVEC proteins from several subcellular localizations (i.e, integral membrane proteins) were identified. Compared to the current literature (Supplementary Table 3), a total of 973 new molecules in the proteome of quiescent HUVECs were identified and 665 proteins had not been previously described in published proteomic studies within this cell type, either under stimulation or in nonphysiological conditions. The total list of proteins, the subcellular localization and the biological process are also presented in Supplementary Table 3. All data analysis, including protein lists, Gene Ontology and KEGG pathways annotations and detailed identification information is available on the Proteopathogen database (<http://proteopathogen.dacya.ucm.es>).

The biological processes of the proteins were extracted from Gene Ontology (GO), using the automated GeneCodis 2.0. [14,15]. Then, 12 functional protein groups with matched biological processes showing high impact in several key endothelium functions were selected (Table 1), including proteins involved in blood clotting, angiogenesis, stress response, cell signaling and the cell cycle. The interactome analysis was performed

using BioGrid (Biological General Repository for Interactions Datasets) by Osprey 1.2.0 software that constructed the interaction networks against uploaded proteins [16]. In Figure 2, uploaded proteins which perform pivotal functions in the endothelium, such as those belonging to group 6 and some proteins of group 2 (Table 1), are indicated by red bold color and/or enlarged circles. The small circles, with their respective UniProt/SwissProt ID (in black characters), indicate proteins that interact with the identified HUVEC proteins according to the Osprey database. This figure revealed that several of the proteins identified are important route nodes, including: thrombospondin (P07996), TGF beta-1(P01137), endoglin (P117813), catenin alpha-1 (P35221), reticulon-4 (Q9NQC3), fibronectin (P02351) and ADP-ribosylation factor 6 (P6230). Moreover, observation verified that some of the proteins identified interconnect cellular routes, such as FLNA and FLNB. As shown, these proteins interact with membrane proteins integrin beta 3 (P05106) and integrin beta 1 (P05556), which promote different signal transduction pathways that regulates HUVEC cell attachment, spreading and migration on collagen and vitronectin [17]. It is also important to highlight the linkage proteins RAB8B (Ras- oncogene family) and FHL2 (four and a half LIM protein 2), with catenin beta-1 (P35222) and integrin beta 1 (P05556). These last two proteins are important nodes, as shown in Fig.2, and participate in signal transduction pathways, as well as cytoskeleton actin filament reorganization in HUVECs (see Supplementary Table 3).

Moreover, some of the proteins described are related to distinct endothelial functions, including: apolipoprotein (P02649) and thrombospondin-1(P07996), which are involved in the negative regulation of endothelial cell proliferation and the negative regulation of blood vessel endothelial cell migration; endoplasmic reticulum aminopeptidase 1(Q9NZ08), which is involved in angiogenesis and the regulation of blood pressure; heme oxygenase 1(P09601), which is involved in the regulation of blood pressure, erythrocyte homeostasis and angiogenesis and; and endoglin (P17813), which is involved in the patterning of blood vessels and negative regulation of endothelial cell proliferation.

In this work, our group identified new proteins not previously described in this cell and some of these proteins exhibit less evident relations with current knowledge of endothelial biology, opening unexplored avenues for future investigations in this field. One of these is latexin, a noncompetitive inhibitor of carboxypeptidase A (CPA) and carboxypeptidase B (CPB) [18], indicating that this inhibitor may regulate tissue-specific protein degradation and turnover. Moreover, the expression of this inhibitor is similar in a variety of human leukemia and lymphoma cell lines and in primary cells from patients with these diseases, indicating that it could be implicated in the regulation of tumor progression, perhaps as a suppressor [19]. Interestingly, in

this work, a product of the fat mass and obesity associated gene was also identified, the FTO protein, a homologue of the AlkB family of nucleic acid (DNA/RNA) demethylases [20]. It has been proposed that FTO protein may act as AlkB, by correcting unwanted methylation of single strand DNA and may assist in repairing damaged bases in RNA [21]. A cluster of polymorphic variants in the first intron of the FTO gene showed a highly significant positive correlation with the development of common forms of human obesity [22]. However, the structure-function relations of this enzyme with the regulation of food intake, lipolytic activity in adipose tissue and even with the expansion of body fat mass are still unknown. Indeed, emerging evidence indicates that modulators of adipose tissue angiogenesis can affect the expansion and metabolism of fat mass, a fact that elicited the proposal of obesity as an angiogenesis-dependent pathology, together with cancer, atherosclerosis and diabetes, among others [23].

In conclusion, the refinement of current knowledge regarding the proteome of a nonactivated HUVEC phenotype through an advanced proteomic technology could improve knowledge of its use not only in traditional models for studying inflammation, infection and cancer-associated conditions, but also to guide the choice of these cells as a model for the investigation of new physiopathological issues.

Acknowledgements

The authors would like to thank Maria Dolores Gutierrez-Blazque at the Proteomics Unit of the Complutense University of Madrid (UCM)-Parque Científico of Madrid, Spain, for her technical support with the MS/MS experiments. This Proteomics Unit is member of the ProteoRed-Spanish National Institute for Proteomics. For their helpful suggestions and technical support in HUVEC culture and 2D gel standardization, the authors would also like to Cecília Silva Santos (BsC) and Dr. Carla Verônica Loureiro y Penha. This work was supported by the CAPES-DGU International Cooperation Program (DGU074/2009 and CAPES192/09), by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (grants E-26/102.399/2009) and, by BIO 2009-07654 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CYCIT, Spain) and REIPI, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases, RD06/0008/1027, from the Instituto de Salud Carlos III. LMLB is a research fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and NCA is a post-graduation fellow of CAPES, Brazil.

Conflict of Interest: None.

REFERENCES

1. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973, *52*, 2745-2756.
2. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., *et al.*, Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998, *91*, 3527-3561.
3. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Crit. Care Med.* 2003, *31*, S221-S230.
4. Sumpio, B. E., Riley, J. T., Dardik, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, *34*, 1508-1512.
5. Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., *et al.*, Proteomic study of human umbilical vein endothelial cell in culture. *Proteomics* 2003, *3*, 714-723.
6. Sprenger, R. R., Speijer, D., Back, J. D., De Koster, C. G. *et al.*, Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004, *25*, 156-172.
7. Brooks, P. C. Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1996, *15*, 187-194.
8. Lopes-Bezerra, L. M., Filler, S. G. Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. *Braz. J. Med. Bio. Res.* 2003, *36*, 987-991.
9. Lopes-Bezerra, L. M., Filler, S. G. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood*, 2004, *103*, 2143-2149.
10. Witzmann, F.A.; Clack J.W.; Geiss, K.; Hussain, S.; Juhl, M.J.; Rice C.M. & Wang C. Proteomic evaluation of cell preparation methods in primary hepatocyte cell culture. *Electrophoresis* 2002; *14*; 2223–2232.
11. Yuan, S. Y. Protein kinase signalling in the modulation of microvascular permeability. *Vasc. Pharmacol.* 2002, *39*, 213-223.
12. Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., *et al.*, Proteomic study of human umbilical vein endothelial cell in culture. *Proteomics* 2003, *3*, 714-723.
13. Pitarch, A., Nombela, C., Gil, C. Proteomic profiling of serologic response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions. *Methods Mol. Biol.* 2009, *470*, 369-411.
14. Nogales- Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., *et al.*, GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research* 2009, *37*, W317-W322.

15. Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J. M., Pascual-Montano, A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007, 8, R3.
16. Breitkreutz, B. J., Starck, C., Tyers, M. Osprey: a network visualization system. *Genome Biol.* 2003, 4, R22.
17. Leavesley, D. I., Schwartz, M. A., Rosenfeld, M., Cheresh, D. A. Integrin beta 1 and beta 3 mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J. Cell Biol.* 1993, 121, 163-170.
18. García-Castellanos, R., Bonet-Figueroa, R., Pallarés, I., Ventura, S., *et al.*, Detailed molecular comparison between the inhibition mode of A/B-type carboxypeptidases in the zymogen state and by the endogenous inhibitor latexin. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62, 1996-2014.
19. Liang, Y., Van Zant, G. Aging stem cells, latexin and longevity. *Exp. Cell Res.* 2008, 314, 1962-1972.
20. Yi, C., Yang, C. G., He, C. A non-heme iron-mediated chemical demethylation in DNA and RNA. *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 519-529.
21. Jia, G., Yang, C. G., Yang, S., Jian, X., Yi *et al.*, Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.* 2008, 582, 3313-3319.
22. Loos, R. J., Bouchard, C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes. Rev.* 2008, 9, 246-250.
23. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, 6, 273-286.

ANEXO A -- Banco de dados *Proteopathogen*.

1. Página principal *Proteopathogen*

Os espectros obtidos após a análise dos peptídeos por espectrometria em um analisador do tipo MALDI-TOF/TOF foram depositados no banco e dados *Proteopathogen*. Neste caso, peptídeos obtidos durante a elaboração do mapa de referência de HUVEC. Os dados estão com acesso restrito, através de login e senha, até que o manuscrito seja publicado. O acesso ao banco de dado se dá através do link: <http://proteopathogen.dacya.ucm.es/>. A página principal está ilustrada na figura 1.

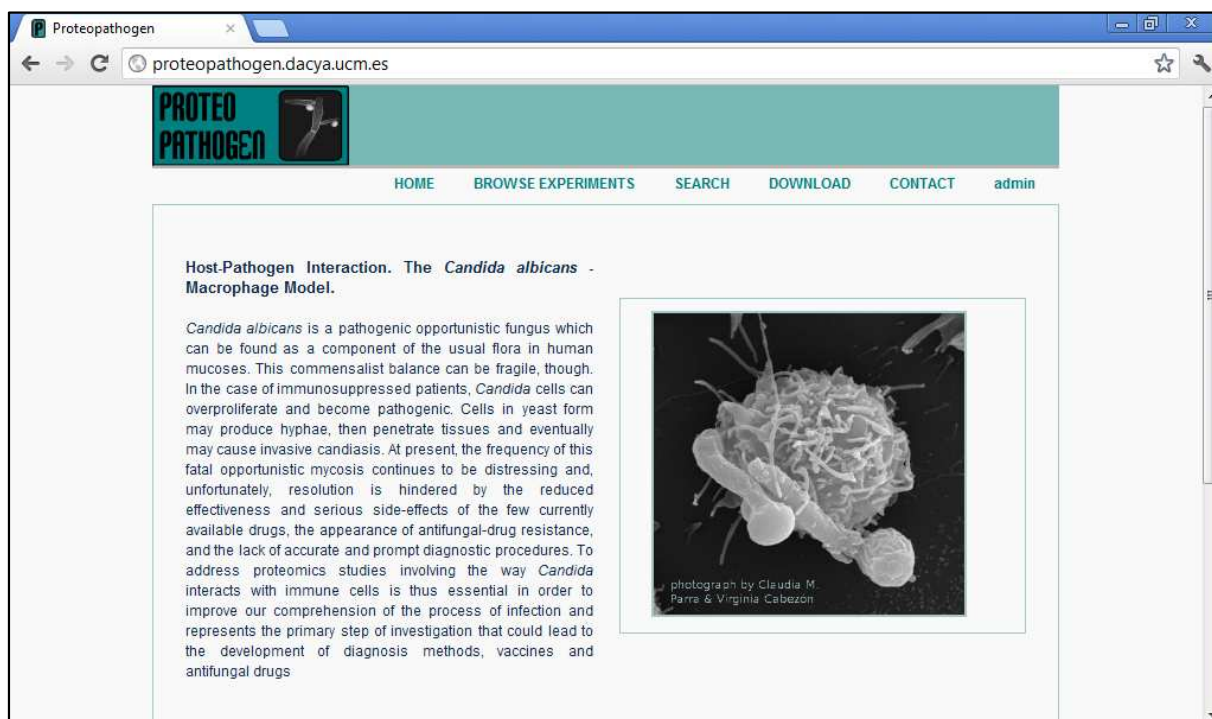


Figura 1. Página principal do banco de dados *Proteopathogen*.

2. Acesso ao experimento: Mapa de referência de HUVEC

Neste banco de dados é possível acessar o mapa de referência de HUVECs. Para isso, é necessário selecionar o experimento no atalho (*Browse Experiments*). Ao selecionar o experimento desejado, uma página contendo o título do trabalho e o nome do responsável pelos dados será aberta (figura 2).

Proteopathogen

proteopathogen.dacya.ucm.es/experiments

PROTEOPATHOGEN

HOME BROWSE EXPERIMENTS SEARCH DOWNLOAD CONTACT

logged in as Leila.Lopes — log out

Browse Experiments in Proteopathogen

General Approach / Study

Description	Author
Proteomic Map HUVEC cells (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	Rosana

[+] Related Experiments:

Experiment(s)

Description	Species	Proteins
1D nanoLC-MS/MS. (MALDI-TOF/TOF Mascot/ProteinPilot)	Human	1010
2DGE + MALDI-TOF/TOF	Human	14

Dpto. Microbiología II
Fac. de Farmacia - UCM

ArTeCS
Dpto. de Arquitectura de Computadores y Automática.

U n i d a d d e
P R O T E Ó M I C A
U C M

Figura 2. Página do banco de dados *Proteopathogen* após a escolha do experimento desejado.

3. Lista de 1010 proteínas identificadas

É possível acessar cada uma das proteínas identificadas clicando no número total de proteínas (1010). Com isso, é aberta uma página contendo a lista com a descrição de cada proteína identificada, a espécie, o número de acesso e o nome do gene. Além disso, cada uma contém o atalho para seus espectros de massa (*Mass Spec*) e alguns dados adicionais (“P” = *Proteopathogen*). Na figura 3 é possível observar a primeira página da listagem de 1010 proteínas de HUVECs identificadas.

Proteo pathogen	Mass Spec	Gene Name	Accession	Description	Species	Existence
P	MS	MYH9	P35579	Myosin-9; Myosin heavy chain 9; Myosin heavy chain, non-muscle IIa; Non-muscle myosin heavy chain IIa; NMMHC II-a; NMMHC-IIA; Cellular myosin heavy chain, type A; Non-muscle myosin heavy chain A; NMMHC-A;	Homo sapiens	Evidence at protein level seq
P	MS	FLNB	O75369	Filamin-B; FLN-B; Beta-filamin; Actin-binding-like protein; Thyroid autoantigen; Truncated actin-binding protein; Truncated ABP; ABP-280 homolog; ABP-278; Filamin 3; Filamin homolog 1; Fh1;	Homo sapiens	Evidence at protein level seq
P	MS	HSPG2	P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein; HSPG; Perlecan; PLC;	Homo sapiens	Evidence at protein level seq
P	MS	ACTG1	P63261	Actin, cytoplasmic 2; Gamma-actin; Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;	Homo sapiens	Evidence at protein level seq
P	MS	HSP90B1	P14625	Endoplasmic; Heat shock protein 90 kDa beta member 1; 94 kDa glucose-regulated protein; GRP94; gp96 homolog; Tumor rejection antigen 1;	Homo sapiens	Evidence at protein level seq
P	MS	PLEC1	Q15149	Plectin-1; PLTN; PCN; Hemidesmosomal protein 1; HD1;	Homo sapiens	Evidence at protein level seq

Figura 3. Primeira página da lista de 1010 proteínas de HUVECs identificadas.

4. Dados disponíveis de cada proteína

Utilizando como exemplo a anexina A2, uma das proteínas identificadas, é possível observar os dados disponíveis de cada proteína (figura 4). Dentre eles, estão disponíveis os dados referentes à identificação dos espectros de cada proteína como o *site* de busca utilizado, o banco de dados, e os parâmetros utilizados na busca (figura 4A). Além disso, estão disponíveis os parâmetros de identificação proteica como, por exemplo, a taxa de cobertura (figura 4B). Clicando na lista de peptídeos (figura 4C), é possível ter acesso à lista de todos os peptídeos sequenciados (figura 5).

Também é possível acessar informações depositadas no banco de dados *Gene Ontology* (figura 6) ou demais informações relevantes como estrutura terciária tridimensional, interações preditas no KEGG (não ilustrado) dentre outras.

Proteopathogen

proteopathogen.dacya.ucm.es/identifications/3209

HOME BROWSE EXPERIMENTS SEARCH DOWNLOAD CONTACT

logged in as Leila Lopes log out

Common search settings for proteins identified in this experiment:

1D nanoLC-MS/MS. (MALDI-TOF/TOF Mascot/ProteinPilot)

Search Database	Search Type	Search Analysis Software	Enzyme	Fixed Modifications	Variable Modifications	Peptide Mass Tolerance	Fragment Mass Tolerance	Number Queries
UniProt KB	MALDI-TOF/TOF	Protein Pilot / MASCOT	Trypsin	Carbamidomethyl(C)	Oxidation(M), Deamidation (N)	-	-	-

Protein Identification Parameters for P07355, ANXA2 :

Unused	Total	Coverage %	Coverage %(50)	Coverage %(95)	MW	pl
40.95	40.95	71.09	62.83	56.64	38.604	7.57

[+] Peptides List supporting identification for P07355 , ANXA2 :

Dpto. Microbiología II
Esc. de Farmacia - UCM

ArTeCS
Dpto. de Arquitectura de Computadores y Automática.

U N I V E R S I D A D D E
P R O T E O M I C A

Figura 4. Dados disponíveis da proteína anexina A2, exemplo do conteúdo disponível de cada uma das proteínas.

Proteopathogen

proteopathogen.dacya.ucm.es/identifications/3209

[+] Peptides List supporting identification for P07355 , ANXA2 :

Contrib	Conf	Sequence	Modification	Cleavages	dMass	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	Theor m/z	Theor z	Sc
2	99	AEDGSVIDYELIDQDAR			0	1907.87	1908.88	1907.87	1908.88	1	21
2	99	AYTNFDAER			0.01	1085.49	1086.5	1085.48	1086.49	1	13
2	99	AYTNFDAERDALNIETAIK		missed R-D@9	-0.04	2154.02	2155.03	2154.06	2155.07	1	21
2	99	DLYDAGVK			0.02	879.45	880.46	879.43	880.44	1	13
2	99	DLYDAGVKR		missed K-R@8	0.01	1035.55	1036.56	1035.53	1036.54	1	14
2	99	GLGTDEDSLIEIICSR	Carbamidomethyl(C)@14		-0.23	1776.63	1777.64	1776.86	1777.86	1	23
2	99	GVDEVTIVNLTNR			0.01	1541.85	1542.86	1541.84	1542.85	1	20
2	99	LMVALAKGR	Dethiomethyl(M)@2; Carbamyl(K)@7	missed K-G@7	0.01	952.59	953.6	952.58	953.59	1	11
2	99	LSLEGDHSTPPSAYGSVK			-0.03	1843.87	1844.88	1843.9	1844.9	1	17
2	99	QDIAFAYQR	Gln->pyro-Glu@N-term		-0.01	1093.51	1094.52	1093.52	1094.53	1	12
2	99	RAEDGSVIDYELIDQDAR		missed R-A@1	-0.04	2063.93	2064.94	2063.98	2064.98	1	20
2	99	SALSGHLETVLGLLK	Carbamidomethyl@N-term		0.02	1707.01	1708.02	1706.99	1708	1	18
2	99	SLYYIQQDTK			0	1420.69	1421.7	1420.69	1421.69	1	17
2	99	SNAQRQDIAFAYQR		missed R-Q@5	-0.02	1666.79	1667.8	1666.82	1667.82	1	13
2	99	SYSPYDMLESIR	Dethiomethyl(M)@7		-0.01	1411.65	1412.66	1411.66	1412.67	1	18

Figura 5. Lista de peptídeos de alta confiança sequenciados da anexina A2, exemplo da listagem de peptídeos disponível para cada uma das proteínas.

Proteomic Map HUVEC cells (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
1D nanoLC-MS/MS. (MALDI-TOF/TOF Mascot/ProteinPilot)

[-] Gene Ontology annotations

Ontology	Id	Description	Evidence [?]	Reference	Title
Biological Process	GO:0001501	skeletal system development	TAS	PubMed	Cloning and identification of annexin II as an autocrine/paracrine factor that increases osteoclast formation and bone resorption.
Biological Process	GO:0001525	angiogenesis	IEA	-	-
Biological Process	GO:0007589	body fluid secretion	IEA	-	-
Biological Process	GO:0030199	collagen fibril organization	IEA	-	-
Biological Process	GO:0042730	fibrinolysis	IEA	-	-
Molecular Function	GO:0004859	phospholipase inhibitor activity	TAS	PubMed	Two human 35 kd inhibitors of phospholipase A2 are related to substrates of pp60v-src and of the epidermal growth factor receptor/kinase.
Molecular Function	GO:0005509	calcium ion binding	IEA	-	-
Molecular Function	GO:0005544	calcium-dependent phospholipid binding	IEA	-	-
Molecular Function	GO:0005546	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding	IEA	-	-

Figura 6. Página do *Proteopathogen* de acesso ao banco de dados do *Gene Ontology*.

ANEXO B- Parecer comitê de ética 1



Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº 173A/2011

Rio de Janeiro, 20 de junho de 2011.

Sr(a) Pesquisador(a),

Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:

<p>Coordenadora: Salesia Felipe de Oliveira</p> <p>Vice-Coordenadores: Fabio Tuche Pedro Paulo Magalhães Chripim</p> <p>Membros: Andréa Estevam de Amorim Andréa Ferreira Haddad Carla Moura Cazelli Carlos Alberto Pereira de Oliveira José M. Salame Martine Gerbauld Nara da Rocha Saraiva Rodrigo de Carvalho Moreira Sônia Ruth V. de Miranda Chaves</p> <p>Secretária Executiva: Carla Costa Vianna Renata Guedes Ferreira</p>	<p style="text-align: center;">RENOVAÇÃO DE PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 196/09 CAAE nº: 0230.0.314.000-09</p> <p>TÍTULO: Infectoma de células endoteliais humanas na interação com cepa mutante e selvagem de <i>Aspergillus fumigatus</i>.</p> <p>PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Leila Maria Lopes Bezerra.</p> <p>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: Hospital Maternidade Carmela Dutra.</p> <p>DATA DA APRECIÇÃO: 08/03/2010.</p> <p>DATA DA PRIMEIRA RENOVÇÃO: 20/06/2011</p> <p>PARECER: APROVADO.</p>
--	--

Atentamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata (*item V.13, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

O CEP/SMSDC-RJ deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (*item V.4, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas a este CEP/SMSDC-RJ, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Acrescentamos que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (*item IV.1.f, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (*item IV.2.d, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).


 Salesia Felipe de Oliveira
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil
 Rua Afonso Cavalcanti, 455 sala 710 – Cidade Nova – Rio de Janeiro
 CEP: 20211-901 Tel.: 3971-1463
 E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br - Site: www.saude.rio.rj.gov.br/cep

FWA nº: 00010761
 IRB nº: 00005577

ANEXO C- Parecer comitê de ética 2



Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº 19A/2012

Rio de Janeiro, 05 de março de 2012.

Sr(a) Pesquisador(a),

Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:

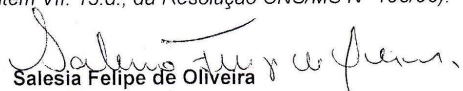
<p>Coordenadora: Salesia Felipe de Oliveira</p> <p>Vice-Coordenadores: Fabio Tuche Pedro Paulo Magalhães Chrispim</p> <p>Membros: Andréa Ferreira Haddad Carla Moura Cazelli Carlos Alberto Pereira de Oliveira José M. Salame Livia Beiral Forni Maria Alice Gunzburguer Costa Lima Martine Gerbauld Nara da Rocha Saraiva Sônia Ruth V. de Miranda Chaves Vitoria Regia Osorio Vellozo</p> <p>Secretária Executiva: Carla Costa Vianna Renata Guedes Ferreira</p>	<p>ALTERAÇÃO DE PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 196/09 CAAE nº: 0230.0.314.000-09</p> <p>TÍTULO: Infectoma de células endoteliais humanas na interação com cepa mutante e selvagem de <i>Aspergillus fumigatus</i>.</p> <p>PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Leila Maria Lopes Bezerra.</p> <p>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: Hospital Maternidade Fernando Magalhães.</p> <p>DATA DA APRECIÇÃO: 02/03/2012.</p> <p>PARECER: APROVADO.</p>
---	---

Atentamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata (*item V.13, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

O CEP/SMSDC-RJ deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (*item V.4, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas a este CEP/SMSDC-RJ, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Acrescentamos que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (*item IV.1.f, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (*item IV.2.d, da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).


 Salesia Felipe de Oliveira
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil
 Rua Afonso Cavalcanti, 455 sala 716 – Cidade Nova – Rio de Janeiro
 CEP: 20211-901 Tel.: 3971-1590
 E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br - Site: www.saude.rio.rj.gov.br/cep

FWA nº: 00010761
 IRB nº: 00005577