



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

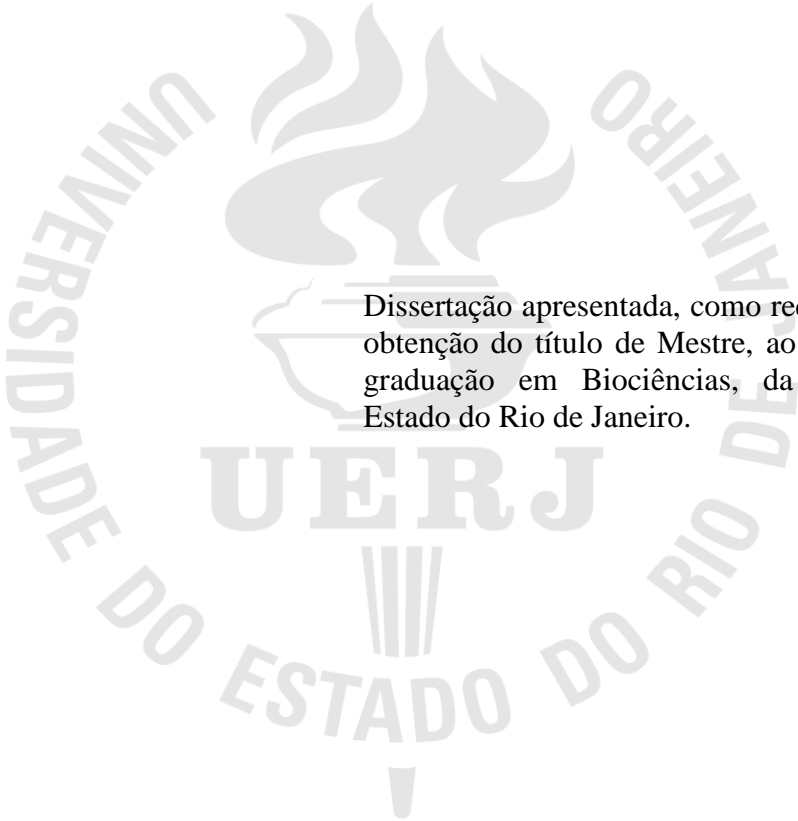
Gabriela Westerlund Peixoto Neves

**Perfil de secreção de citocinas e de ativação de células endoteliais após
interação com cepas selvagens e mutantes de *Aspergillus fumigatus***

Rio de Janeiro
2012

Gabriela Westerlund Peixoto Neves

Perfil de secreção de citocinas e de ativação de células endoteliais após interação com cepas selvagens e mutantes de *Aspergillus fumigatus*



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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

N513 Neves, Gabriela Westerlund Peixoto.
 Perfil de secreção de citocinas e de ativação de células endoteliais após
 interação com cepas selvagens e mutantes de *Aspergillus fumigatus* / Gabriela
 Westerlund Peixoto Neves. – 2012.
 95 f.

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

 1. *Aspergillus fumigatus* – Teses. 2. Endotélio vascular - Teses. 3.
 Células endoteliais - Teses. 4. Mutação (Biologia) – Teses. 5. Citocinas –
 Biosíntese – Teses. 6. 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 582.28

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

Assinatura

Data

Gabriela Westerlund Peixoto Neves

Perfil de secreção de citocinas e de ativação de células endoteliais após interação com cepas selvagens e mutantes de *Aspergillus fumigatus*

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

Aprovada em 10 de fevereiro de 2012

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

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Leonardo Nimrichter
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2012

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Leila Lopes Bezerra, pela paciência e dedicação em ensinar e orientar, pelas idéias e conselhos científicos, e por tornar todo esse trabalho possível.

Ao Dr. Gustavo Goldman, ao Dr. Jean-Paul Latgé e ao Dr. Nir Osherov por fornecer as cepas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Raphael Hirata, pela revisão final deste trabalho.

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

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

À Dra. Paula Kubitschek-Barreira e às doutorandas Nathália Curty e Rafaela Alvez pela ajuda e orientação na elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos 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 João Pedro, pela paciência, compreensão, respeito, amor e companheirismo.

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

RESUMO

NEVES, Gabriela Westerlund Peixoto. Perfil de secreção de citocinas e de ativação de **células endoteliais após interação com cepas selvagens e mutantes de *Aspergillus fumigatus***. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Apesar do desenvolvimento de novas drogas antifúngicas e da sua utilização como terapia profilática visando à prevenção de infecções fúngicas invasivas, estas ainda constituem-se num problema emergente, com elevadas taxas de mortalidade. Neste contexto, destaca-se a aspergilose invasiva, uma infecção fúngica oportunista que acomete pacientes com neutropenia profunda e prolongada, principalmente os pacientes com leucemia aguda ou submetidos a transplante de medula óssea. *Aspergillus fumigatus*, um fungo filamentososo, é o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, sendo um patógeno angioinvasivo. As hifas deste fungo são capazes de causar injúria e ativação endotelial, induzindo o endotélio a um fenótipo pró-trombótico, que por sua vez, é mediado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, em especial, o TNF- α . O presente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de cepas mutantes de *A. fumigatus* em ativar células endoteliais, avaliando o perfil de secreção de citocinas em meio condicionado e a expressão de fator tecidual. Resumidamente, monocamadas confluentes de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana foram incubadas com conídios e tubos germinativos de cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes ($\Delta ugm1$, $\Delta calA$, $\Delta crzA$, $\Delta prtT$) de *A. fumigatus*. A taxa de adesão e endocitose destas cepas às monocamadas de HUVEC foi avaliada a partir de um ensaio quantitativo de imunofluorescência diferencial. O perfil cinético de secreção de citocinas foi determinado em meio condicionado das HUVECs, por ensaio de multiplex para IL-6, IL-8 e TNF- α . A ativação endotelial, por sua vez, foi determinada pela expressão de fator tecidual por RT-PCR em tempo real. Os resultados obtidos demonstraram que a mutante para o gene *ugm1*, responsável por codificar a enzima UDP-galactopiranosose mutase, que converte resíduos de galactopiranosose a galactofuranose, apresentou um fenótipo hiperaderente às células endoteliais e um estímulo 10 vezes maior à secreção de TNF- α e 2,5 vezes maior a secreção de IL-6, quando comparada a ativação observada para as cepas selvagens. A galactofuranose é um componente importante de glicoconjugados da parede celular de *A. fumigatus*. Dessa forma, a ausência desse monossacarídeo na célula fúngica leva a um mecanismo compensatório caracterizado por um aumento na expressão de moléculas de galactosaminogalactana na parede celular. De maneira contrária, mutantes para os genes *calA* e *crzA*, apresentaram um fenótipo hipoaderente às HUVECs e uma perda na capacidade de induzir a secreção de citocinas e ativar o endotélio. Essas mutantes apresentam deleções que interferem na via de cálcio/calcineurina, responsável por regular a morfogênese e virulência de *A. fumigatus*, além de apresentarem alterações no conteúdo de beta-1-3 glucana. Já a cepa $\Delta prtT$, mutante para o fator de transcrição prtT que regula a secreção de múltiplas proteases, apresentou um fenótipo de adesão, estímulo e ativação endotelial semelhante ao observado para as cepas selvagens. A comparação entre a capacidade de conídios e tubos germinativos em ativar células endoteliais, corroborou achados anteriores da literatura que reportam que só hifas são capazes de ativar células endoteliais, independentemente da sua viabilidade. Os dados deste estudo permitiram concluir que dentre os componentes de superfície celular de *A. fumigatus*, os polímeros de galactose, em especial a galactosaminogalactana, parecem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelos mecanismos de interação e ativação endotelial.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatu*. $\Delta ugm1$. HUVEC. Citocinas. Fator tecidual

ABSTRACT

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 (HUVEC) which in turn switch to a pro-thrombotic phenotype. HUVEC activation is known to be mediated by TNF- α once cell-cell contact occurs. The aim of this study was to investigate the endothelial activation ability of several mutants of *A. fumigatus*. Briefly, HUVECs were infected with germ tubes and conidia of *A. fumigatus* wild type (WT) Af293 and Ku80 and mutant (Δ *ugm1*, Δ *calA*, Δ *crzA*, Δ *prtT*) strains and a differential quantitative fluorescence assay performed to determine adhesion and internalization rates. Thus, a kinetic study of secreted pro-inflammatory cytokines and chemokines in HUVEC conditioned medium was achieved by a multiplex immuneassay. The cytokine production was assayed at three time points (4, 8 and 16 hours) using dead germ tubes, and at one time point (16 hours) using dead conidia, for an E:T ratio of 2:1. Additionally, to investigate endothelial activated phenotype, the expression of tissue factor was performed by a real time RT-PCR assay. The *ugm1* mutant, which lacks the *ugm1* gene encoding UDP-galactopyranose mutase, an enzyme responsible for the conversion of galactopyranose in galactofuranose, showed a hiperadherent phenotype and an increased capability to cause endothelial cell stimulation and activation. This mutant stimulated at least a 10-fold and 2.5-fold increase of TNF- α and IL-6 secretion, respectively and 2-fold increase of tissue factor expression by host cells, as compared to WT strains. Galactofuranose is an uncommon 5-membered ring form of galactose and a very important component of glycostructures of the *A. fumigatus* cell wall. The lack of this monosaccharide in the fungal cell wall leads to a compensatory mechanism characterized by an increment in the galactosaminogalactan expression. In contrast, the *calA* and *crzA* mutants, with upstream and downstream dysfunction in the calcium/calcineurin pathway, with alteration in the cell wall β -1,3-glucan content, showed a decrease capacity to adhere to HUVECs and did not induce both the secretion of pro-inflammatory cytokine and activation on endothelial cells. Furthermore, the mutant Δ *prtT*, which lacks the transcriptional factor (*prtT*) that regulates the secretion of multiple proteases, showed the same adhesion and endothelial cell activation phenotype as observed for WT strains. As indicated in previous investigations, our data showed that conidia of *A. fumigatus* weren't able to cause the same endothelial cell cytokine stimulation observed for germ tubes, and that endothelial cell activation is independent on fungal cell viability. Finally, it's possible to conclude that the polymers of galactose in the cell wall of *A. fumigatus*, especially the galactosaminogalactan molecule, seem to be responsible for the endothelial cell interaction mechanisms and activation.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Δ *ugm1*, HUVEC, cytokines, tissue factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo de vida de <i>Aspergillus fumigatus</i>	19
Figura 2-	Estrutura do conidióforo de <i>Aspergillus spp.</i>	19
Figura 3-	Morfogênese em fungos filamentosos baseado em modelo do <i>Aspergillus nidulans</i>	21
Figura 4-	Relação entre a resposta imune do hospedeiro e o tipo de doença causada por <i>A. fumigatus</i> e Curva de resposta do hospedeiro ao dano causado pelo patógeno.....	23
Figura 5-	O resultado da infecção pulmonar por <i>A. fumigatus</i> vai depender do estado imune do hospedeiro.....	30
Figura 6-	Modelo de interação entre <i>Aspergillus fumigatus</i> , célula epitelial pulmonar e a célula endotelial vascular durante angioinvasão e disseminação.....	31
Figura 7-	Esquema da via extrínseca da coagulação ativada pelo fator tecidual (CD142).....	34
Figura 8-	Hifas de <i>A. fumigatus</i> invadem a superfície luminal e abluminal do endotélio por distintos mecanismos.....	35
Figura 9-	Modelo de interação de <i>A. fumigatus</i> aos constituintes do hospedeiro.....	38
Figura 10-	Representação da organização do core de polissacarídeos da porção álcali-insolúvel da parede celular de <i>A. fumigatus</i>	39
Figura 11-	Parede celular de <i>A. fumigatus</i>	41
Figura 12-	Monocamadas confluentes de HUVECs e tubos germinativos da cepa selvagem de <i>A. fumigatus</i>	53
Figura 13-	Representação do ensaio de imunofluorescência diferencial a partir da interação de HUVECs com TGs da cepa Af293.....	59
Figura 14-	Interação de conídios das cepas selvagens e mutantes de <i>A. fumigatus</i> com células endoteliais humanas.....	60
Figura 15-	Interação de tubos germinativos das cepas selvagem e mutantes de <i>A. fumigatus</i> com células endoteliais humanas.....	61
Figura 16-	Cinética da secreção de citocinas pró-inflamatórias no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas selvagens e mutantes de <i>A. fumigatus</i>	64

Figura 17-	Cinética da secreção da quimiocina pró-inflamatórias IL-8 no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas selvagens e mutantes de <i>A. fumigatus</i>	65
Figura 18-	Secreção de citocinas pró-inflamatórias no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com conídios e TG das cepas selvagens e mutantes de <i>A. fumigatus</i>	67
Figura 19-	Secreção da quimiocina pró-inflamatória IL-8 no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com conídios e TG das cepas selvagens e mutantes de <i>A. fumigatus</i>	68
Figura 20-	RT-PCR em tempo real mostrando a expressão de fator tecidual por HUVECs infectadas com cepas selvagens e mutantes de <i>A. fumigatus</i> relativo à expressão observada por HUVECs não infectadas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Incidência e mortalidade de grupo de pacientes de risco para aspergilose invasiva.....	27
Tabela 2-	Interação de PRRs solúveis e de membrana com PAMPs presente na parede celular de fungos.....	44
Tabela 3-	Cepas mutantes utilizadas no estudo da interação de <i>A. fumigatus</i> com HUVECs.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – ATP-binding cassette
- ABPA – Aspergilose broncopulmonar alérgica
- ADP – Adenosina difosfato
- AI – Aspergilose invasiva
- BSA – Albumina de soro bovino
- cDNA – DNA complementar
- CLR – Lectina tipo C
- CR3 – Receptor celular para C3
- CRD – Domínio de reconhecimento de carboidrato
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DP – Desvio Padrão
- DTT – Ditionotritol
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA – Ensaio imuno-absorvente ligado à enzima
- EP – Erro padrão
- F3 – Fator de coagulação 3
- GAG – Galactosaminogalactana
- GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- G-CSF – *Granulocyte colony-stimulating factor*
- GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GPI – Glicosilfosfatidil inositol
- HEPA – Filtro de ar particulado de alta eficiência
- HUVEC – Célula endotelial de veia umbilical humana
- IFI – Infecção fúngica invasiva
- IFN- γ – Interferon gamma
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-1a – Interleucina 1a
- IL-1b – Interleucina 1b
- IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
KC – Quimiocina derivada de queratinócitos
kDa – Quilodalton
Langerin– Lectina tipo C expressa em células de Langerhans
LPS – Lipopolissacarídeo
M – Membrana da célula endotelial
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1
MEC – Matriz extracelular
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MIP-1 – Proteína inflamatória de macrófago 2
MIP-2 – Proteína inflamatória de macrófago 1
MP – Membrana plasmática
NADP – Nicotinamida adenina Dinucleotídeo fosfato
NADPH– Nicotinamida adenina Dinucleotídeo fosfato reduzida
NFêB – Fator nuclear capa beta
PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio
PAMP – Padrão molecular associado ao patógeno
PBS – Tampão fosfato/salina
PBS –T- Tampão fosfato/salina com Tween
PC – Parede celular
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDGF – fator de crescimento plaquetário
PDGF – Fator de crescimento plaquetário
PRR – Receptor de reconhecimento padrão
RNA – Ácido Ribonucléico
Scavenger - Receptor presente em células dendríticas
SIDA – Síndrome da imunodeficiência humana
TFPI – inibidor da via do fator tecidual

TG - Tubo germinativo
TGF- β - Fator de crescimento tecidual beta
Th1 - Linfócitos T helper 1
Th2 - Linfócitos T helper do tipo 2
TLR - Receptor do tipo toll
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg - Linfócito regulatório
VCAM-1 - Molécula de adesão para a célula vascular
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular
VS - Vesículas secretoras
YD - Extrato de levedura e dextrose
YPD - Extrato de levedura, peptona e dextrose
 $\Delta calA$ - Cepa mutante para o gene *CALA*
 $\Delta crzA$ - Cepa mutante para o gene *CRZA*
 $\Delta prtT$ - Cepa mutante para o gene *PRTT*
 $\Delta ugm1$ - Cepa mutante para o gene *UGMI*
 $\Delta medA$ - Cepa mutante para o gene *MEDA*
 $\Delta dvrA$ - Cepa mutante para o gene *DVRA*
 $\Delta gliP$ - Cepa mutante para o gene *GLIP*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1	Gênero <i>Aspergillus</i>	16
1.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>: características gerais e ciclo de vida	18
1.3	Virulência e Patogênese de <i>A. fumigatus</i>	21
1.4	Aspectos gerais e clínicos da aspergilose	25
1.5	Fisiopatologia da aspergilose invasiva	29
1.6	Aspectos moleculares da interação fungo hospedeiro	32
1.6.1	<u>Ativação, estímulo e injúria endotelial por <i>A. fumigatus</i></u>	32
1.6.2	<u>Superfície Celular de <i>A. fumigatus</i></u>	38
1.6.3	<u>A presença de PAMPS da superfície celular de <i>A. fumigatus</i> e seu reconhecimento pelo hospedeiro</u>	42
1.7	A utilização de mutantes no estudo da interação de <i>A. fumigatus</i> com células do hospedeiro	45
2 -	OBJETIVOS	50
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	METODOLOGIA	51
3.1	Microrganismos utilizados	51
3.2 -	Condições de cultivo dos microrganismos	52
3.2.1	<u>Obtenção de conídios de <i>Aspergillus fumigatus</i></u>	52
3.2.2	<u>Obtenção de tubos germinativos de <i>Aspergillus fumigatus</i></u>	52
3.3	Cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano	54
3.4	Ensaio de internalização e adesão de <i>A. fumigatus</i> às monocamadas endoteliais	54
3.5	Dosagem de IL-6, IL8 e TNFalfa em meio condicionado de culturas de HUVEC após interação com <i>Aspergillus fumigatus</i>	56
3.6	Análise da ativação endotelial por RT-PCR em tempo real	56
3.7	Estatística	57

4	RESULTADOS	58
4.1	Interação, adesão e endocitose de conídios e tubos germinativos de <i>A. fumigatus</i> por com células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC)	58
4.2	Cinética da secreção de citocinas pró-inflamatórias e da IL-8 no meio condicionado de HUVEC após interação com tubos germinativos de diferentes cepas de <i>A. fumigatus</i>	62
4.3	Comparação do perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias e da IL-8 no meio condicionado de HUVEC após interação com conídios e tubos germinativos de <i>A. fumigatus</i>	66
4.4	Análise da ativação endotelial por RT-PCR em tempo real	69
5 -	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE - Tabelas suplementares	93

INTRODUÇÃO

Apesar do desenvolvimento de novas drogas antifúngicas e da sua utilização como terapia profilática visando à prevenção de infecções fúngicas invasivas, estas ainda constituem-se num problema emergente, com elevadas taxas de mortalidade. Neste contexto, destaca-se a aspergilose invasiva, uma infecção fúngica oportunista que acomete pacientes com neutropenia profunda e prolongada, principalmente os pacientes com leucemia aguda ou submetidos a transplante de medula óssea. *Aspergillus fumigatus*, um fungo filamentosos, é o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, sendo um patógeno angioinvasivo. As hifas deste fungo são capazes de causar injúria e ativação endotelial, induzindo o endotélio a um fenótipo pró-trombótico, que por sua vez, é mediado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, em especial, o TNF- α . O presente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de cepas mutantes de *A. fumigatus* em ativar células endoteliais, avaliando o perfil de secreção de citocinas em meio condicionado e a expressão de fator tecidual.

A taxa de adesão e endocitose destas cepas às monocamadas de HUVEC foi avaliada a partir de um ensaio quantitativo de imunofluorescência diferencial. O perfil cinético de secreção de citocinas foi determinado em meio condicionado das HUVECs, por ensaio de multiplex para IL-6, IL-8 e TNF- α . A ativação endotelial, por sua vez, foi determinada pela expressão de fator tecidual por RT-PCR em tempo real.

A mutante para o gene *ugm1*, responsável por codificar a enzima UDP-galactopiranosase mutase, que converte resíduos de galactopiranosose a galactofuranose. A galactofuranose é um componente importante de glicoconjugados da parede celular de *A. fumigatus*. A ausência desse monossacarídeo na célula fúngica leva a um mecanismo compensatório caracterizado por um aumento na expressão de moléculas de galactosaminogalactana na parede celular. De maneira contrária, mutantes para os genes *calA* e *crzA*, apresentam deleções que interferem na via de cálcio/calcineurina, responsável por regular a morfogênese e virulência de *A. fumigatus*, além de apresentarem alterações no conteúdo de beta-1-3 glucana. A cepa Δ *prtT*, por sua vez apresenta uma deleção para o fator de transcrição prtT, que regula a secreção de múltiplas proteases.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pertence à Família Trichocomaceae, Ordem Eurotiales, Classe Ascomycota do Reino Fungi. O primeiro a nomear o gênero foi Pier Antonio Micheli em seu trabalho intitulado *The Nova Geneva Plantarum* em 1729. Micheli percebeu que o formato dos conidióforos, estruturas de reprodução assexuada dos fungos deste gênero, assemelhava-se a um aspersório, instrumento utilizado para aspergir água benta em celebrações religiosas. Desta forma, ele não só descreveu e ilustrou o fungo em seu trabalho, como também nomeou o gênero de *Aspergillus*¹ (Micheli 1729 *apud* Denning 1998). Estes podem apresentar reprodução sexuada (fase teleomorfa) ou assexuada (fase anamorfa), porém, para algumas espécies está descrita somente a fase anamorfa. Por esta razão, fungos deste gênero eram descritos como fungos imperfeitos, pertencentes ao Filo Deuteromycota, grupo este já obsoleto e não mais considerado na classificação atual (O’Gorman *et al.*, 2007).

Estes micro-organismos são facilmente cultivados em laboratório e as espécies patogênicas são termotolerantes, apresentando crescimento ótimo a 36 °C. As espécies podem ser identificadas por suas características macroscópicas (coloração da cultura e etc.) e pela morfologia dos conídios e conidióforos. Quando crescido em meios de cultivo sólidos, a colônia de *Aspergillus* inicialmente apresenta-se despigmentada, porém, na medida em que a colônia cresce e os conidióforos amadurecem, ela passa a apresentar uma coloração que pode variar entre tons de verde, laranja, marrom ou preto, dependendo da espécie (Larone, 2002).

Fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um grande destaque nas áreas de biotecnologia e medicina. Suas aplicações na biotecnologia são diversas, principalmente na indústria alimentícia, onde eles são imprescindíveis em processos de fermentação de alimentos e bebidas. Espécies como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarisii*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus flavus* estão envolvidos na fermentação de grãos de soja para produção de molho shoyo, e na fermentação de arroz para produção de saquê (Alexopoulos *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 2006). Já o *Aspergillus niger* está envolvido na produção de ácidos orgânicos, sendo considerado a principal fonte de produção mundial do ácido cítrico, substância largamente

¹ Palavra de origem latina, *aspergillum*, que significa aspersório (Carlile *et al.*, 2007).

utilizada na indústria alimentícia para conservação, e para conferir sabor a alimentos e sucos (Carlile *et al.*, 2007). Ainda no setor alimentício, *A. niger* e *A. oryzae* se destacam na produção de enzimas extracelulares com aplicações industriais, como é o caso da glicoamilase, utilizada na fabricação de pães e cerveja; e da pectinase, utilizada na eliminação de grumos em sucos de fruta industrializados (Carlsen & Nielsen, 2001; Carlile *et al.*, 2007). Por fim, na indústria farmacêutica, *A. terreus* é um importante produtor de estatinas², que representa um lucro de aproximadamente quinze bilhões de dólares ao ano nos Estados Unidos (Maggon, 2005).

Esses micro-organismos também são responsáveis pela produção das micotoxinas, metabólitos secundários extremamente tóxicos aos humanos e a outros animais. As principais micotoxinas produzidas são: aflatoxina, ochratoxina A e patulina.

A aflatoxina é produzida principalmente por *A. flavus* e a mais comum é a Aflatoxina B1. Essa toxina é altamente cancerígena, sendo capaz de induzir câncer de fígado a uma concentração de apenas 1 µg/kg de massa corpórea (Cotty *et al.*, 1994). Como esse fungo é xerofílico, geralmente contamina produtos agrícolas secos, como nozes, amendoins e temperos em geral (Lacey, 1994). Por ser tão ubíqua e extremamente tóxica, a aflatoxina se destaca dentre as micotoxinas como a de maior relevância, e a que confere maior risco a seres humanos e animais quando considerada a contaminação de alimentos (Webster & Weber, 2007).

A ochratoxina A é produzida principalmente por *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*, espécies que contaminam grãos em geral, principalmente os de café. Essa toxina pode ser mantida por longos períodos de tempo no corpo humano (meia-vida de 35 dias). É altamente nefrotóxica, podendo causar uma doença renal humana chamada “Nefropatia endêmica de Balkan” (Webster & Weber, 2007).

A patulina por sua vez é uma micotoxina produzida principalmente por *Aspergillus clavatus* e pode contaminar a cevada utilizada na produção de cerveja e na alimentação do gado. Essa toxina é cancerígena, além de ser um inibidor enzimático por reagir com grupos sulfidril de proteínas (Webster & Weber, 2007).

Além disso, algumas espécies deste gênero apresentam impacto para a saúde humana, causando uma série de doenças denominadas aspergiloses. As aspergiloses podem ser divididas basicamente em três categorias: aspergilose bronco-pulmonar alérgica, aspergiloma ou bola fúngica e aspergilose invasiva (Stevens, 2008). A aspergilose invasiva é a forma mais grave dentre as aspergiloses por ser uma infecção fúngica invasiva (IFI), tendo como principal agente etiológico *Aspergillus fumigatus*, sendo o estudo desta patologia o foco da presente dissertação.

² Fármaco utilizado para controle dos níveis de colesterol plasmáticos (Maggon, 2005).

Esta IFI apresenta uma taxa de mortalidade que varia de 30 a 90 % dos pacientes, mesmo sob tratamento (Denning, 1998; Singh & Paterson 2005; Stevens, 2008). Dentre as espécies conhecidas por causar aspergilose, destacam-se em ordem decrescente de importância: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Aspergillus niger*, *A. terreus* e *Aspergillus nidulans*. No entanto, cabe destacar que *A. fumigatus* é o responsável por cerca de 90 % das infecções causadas por *Aspergilli* (Latgé, 1999; Brakhage & Langfelder, 2002).

1.2 *Aspergillus fumigatus*: características gerais e ciclo de vida

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

Este fungo pode ser morfológicamente caracterizado pela ramificação dicotômica de suas hifas, cuja angulação é de 45° e pela morfologia do conidióforo. O micélio é formado por hifas hialinas e septadas, cujo diâmetro varia de 2,5 a 8 µm (Alexopoulos *et al.* 1996). *A. fumigatus* apresenta reprodução assexuada e sexuada descritas, porém quando encontrado em sua forma teleomorfa, este fungo passa a ser nomeado de *Neosartorya fumigata*. A forma teleomorfa *Neosartorya fumigata*, descrita recentemente por O’Gorman *et al.* (2008), é caracterizada pela formação de cleistotécio³, com produção de ascos⁴ e ascósporos. Entretanto, o ciclo de vida assexuado é o único bem conhecido e melhor descrito. Como ilustrado pela figura 1, este é caracterizado pela formação dos conidióforos, estruturas eréteis e longas, responsáveis pela produção dos esporos assexuados, denominados conídios. Os conidióforos de *A. fumigatus* são formados a partir de uma hifa somática diferenciada (hifa conidiogênica), que carrega uma célula bulbosa em seu ápice, chamada vesícula. A vesícula por sua vez dá origem às fiálides, estruturas que produzem os conídios por divisão mitótica. Este processo é

³ Corpo de frutificação ou ascocarpo (estrutura de reprodução sexuada).

⁴ Estrutura produtora de ascósporos presente no ascocarpo.

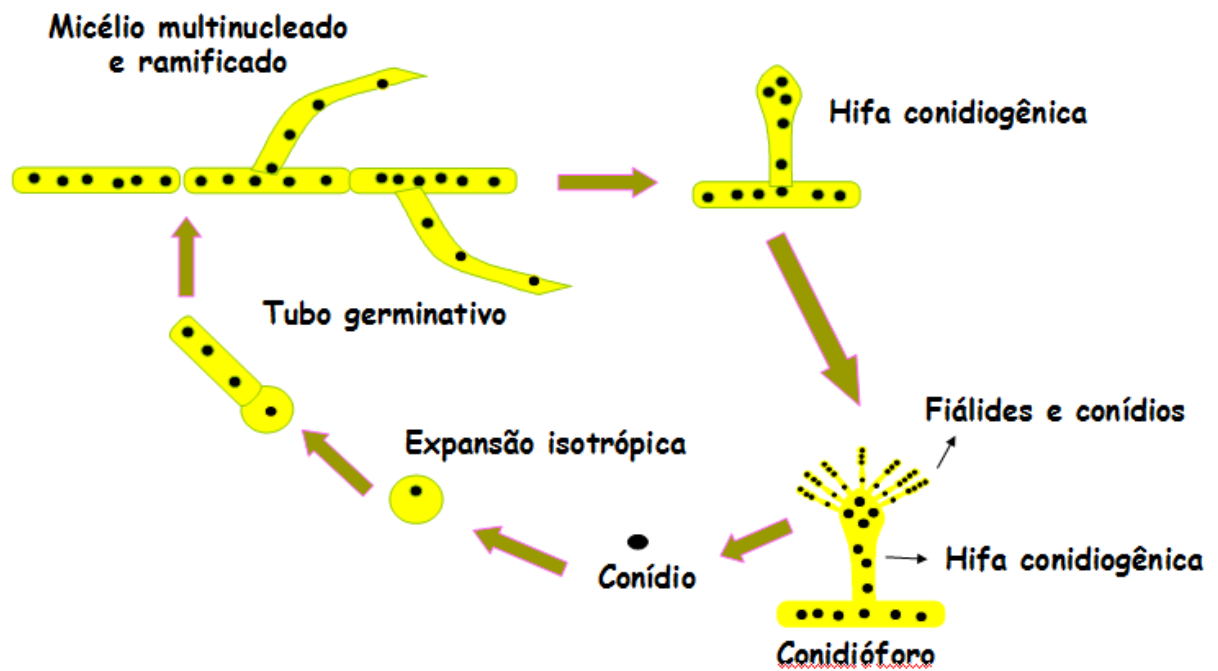


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus fumigatus*.

A espécie *A. fumigatus* produz conidióforos uniseriados, onde as fiálides partem diretamente da vesícula. Em outras espécies de *aspergilli* também pode ocorrer a formação de conidióforos bisseriados, onde as fiálides surgem a partir de uma camada de células chamada medula produzida a partir da vesícula (Alexopoulos *et al.*, 1996; Webster & Weber, 2007). Estas estruturas estão ilustradas na Figura 2.

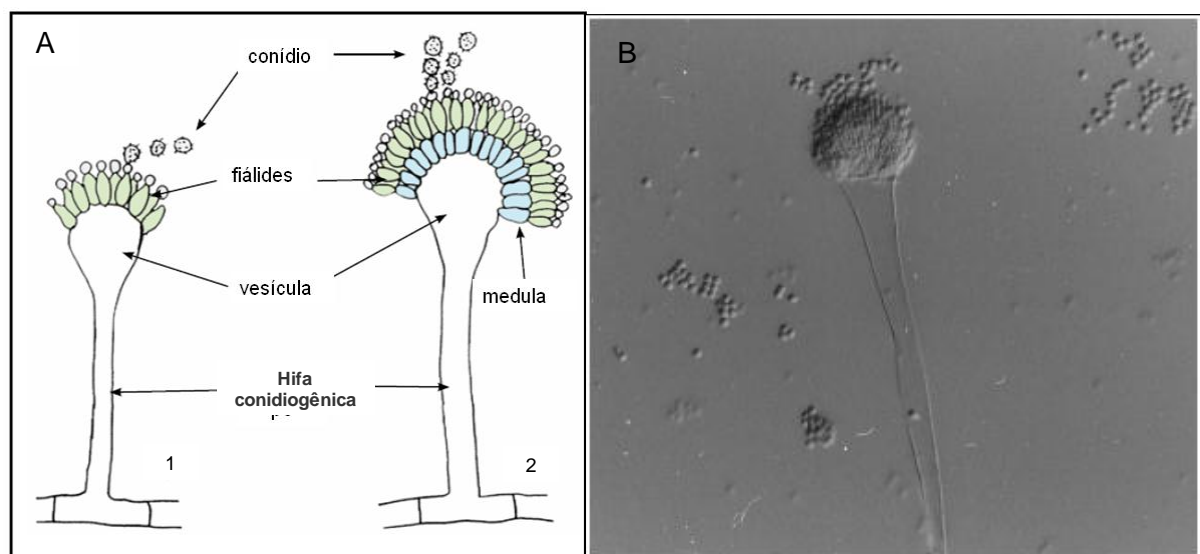


Figura 2. Estrutura do conidióforo de *Aspergillus spp.* (A) Esquema mostrando a conidiogênese uniseriada (1) e bisseriada (2) (Ellis *et al.*, 2007); (B) Microscopia ótica por

contraste interferencial de um conidióforo de *A. fumigatus* mostrando a fileira de conídios produzidos a partir das fiálides (Latgé, 1999).

A produção de conídios é uma etapa crítica para o ciclo de vida de *A. fumigatus*, pois além de ser o principal meio de dispersão do fungo no ambiente, os conídios servem também como estrutura de resistência em situações de escassez de água e nutrientes (Osherov, 2009). Essas células são cobertas por uma fina camada conhecida como *rodlet*, estrutura composta por hidrofobinas que formam uma rede organizada na superfície dos conídios. A presença dos *RO dlets* na superfície celular é uma característica exclusiva dos conídios, fornecendo a essas células propriedade hidrofóbica, que permite sua eficiente dispersão pelas correntes aéreas no ambiente (Aimanianda *et al.*, 2009; Osherov, 2009).

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

A germinação em *A. fumigatus*, assim como em outros fungos filamentosos, é basicamente caracterizada por um período inicial de expansão isotrópica dos conídios e da emersão de um tubo germinativo por crescimento apical. O processo de morfogênese durante a germinação é relativamente simples, e pode ser resumidas em cinco etapas, ilustradas na Figura 3: **(1) Quebra da dormência e início do crescimento isotrópico**, neste primeiro momento todo material e maquinaria necessária para produção de membrana plasmática e parede celular está disperso no córtex da célula; **(2) Estabelecimento de um eixo polar**, após a primeira divisão nuclear, a polaridade é estabelecida através da escolha de um ponto para a emersão do tubo germinativo; **(3) Manutenção da polaridade**, nesta etapa o material e a maquinaria para formação de membrana plasmática e parede celular migram para o ponto escolhido de germinação, e o tubo germinativo emerge; **(4) Crescimento apical do tubo germinativo**, a maquinaria de síntese de parede e membrana continua sendo direcionada para ponto de germinação; **(5) Surgimento dos septos e início da ramificação**, a tubo germinativo cresce até atingir um tamanho pré-determinado e a seguinte divisão mitótica direciona a formação do

primeiro septo na base do tubo germinativo (Harris, 1999; Momany & Taylor, 2000; Momany, 2002).

A cada divisão mitótica, outros septos são formados e novos pontos de crescimento polar são estabelecidos iniciando-se o processo de ramificação a partir da hifa principal que mantém seu crescimento polar e apical (Harris *et al.* 1994; Wolkow *et al.* 1996).

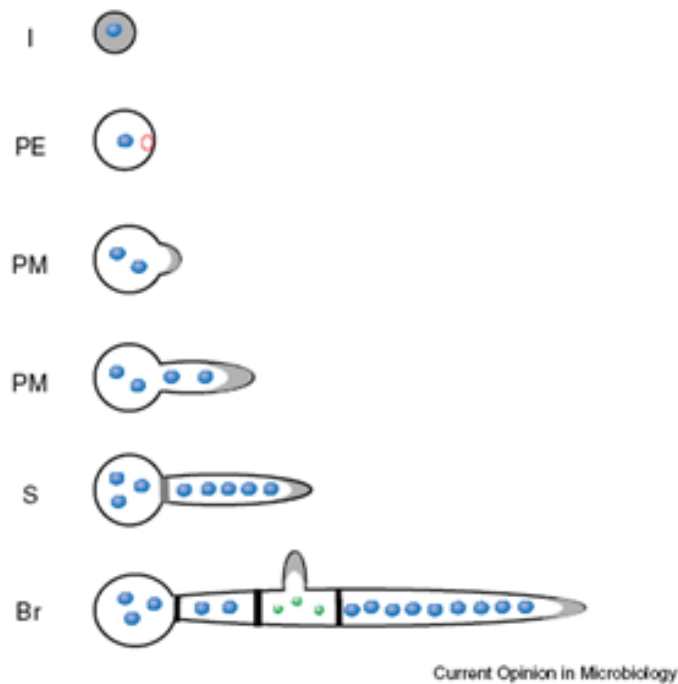


Figura 3: Morfogênese em fungos filamentosos baseado em modelo do *Aspergillus nidulans*. O sombreado em cinza mostra áreas em crescimento apical. I - expansão isotrópica; PE - estabelecimento da polaridade; PM - manutenção da polaridade; S - septação; Br - ramificação (do inglês *Branching*). A cor azul representa os núcleos na interfase e a cor verde os núcleos mitóticos (adaptado de Momany, 2002).

1.3 Virulência e Patogênese de *A. fumigatus*

A habilidade de resistir a danos oxidativos, de crescer em condições extremas, de apresentar versatilidade nutricional e termotolerância contribui não apenas para o sucesso de *A. fumigatus* como competidor ambiental, mas também para sua posição de destaque como patógeno oportunista (Tekaia & Latgé, 2005). Mas como um organismo saprófito e ambiental

foi capaz de se tornar um patógeno oportunista? – Fatores de virulência podem ser definidos como moléculas ou características do patógeno capazes de causar dano direto ou indireto ao hospedeiro (Casadevall, 2005). O dano direto pode ser ofensivo através da secreção de enzimas, produção de toxinas e etc.; ou defensivo através da produção de melanina, hidrofobinas, bombas de efluxo e termotolerância. O dano indireto é causado pela resposta imune do hospedeiro a determinantes antigênicos do patógeno. Porém, como ilustrado na figura 4, a capacidade que o *A. fumigatus* possui de causar doença não depende apenas do seu potencial de virulência, mas também e principalmente do estado imunológico do hospedeiro. Alguns autores denominam de *damage-response framework* essa relação entre fatores de virulência do patógeno e o estado imune do hospedeiro na patogênese e virulência de um micro-organismo (Casadeval & Pirofski, 2003).

Diferentes fatores de virulência podem estar envolvidos na patogênese do *A. fumigatus*. Dentre eles destacam-se a termotolerância, a versatilidade nutricional, os pigmentos protetores e antioxidantes, o sistema de efluxo de toxinas, bem como, as toxinas e proteases secretadas. A termotolerância permite ao fungo infectar mamíferos pela sua capacidade de multiplicação em temperaturas mais elevadas (37⁰C). Essa resistência parece estar relacionada a modificações na sequência de aminoácidos de algumas enzimas, o que permitiria a termoestabilização das mesmas ou à expressão de proteínas protetoras conhecidas como proteínas de choque térmico (Kauffman, 1990; Araujo & Rodrigues, 2004).

Moléculas tóxicas que eventualmente entram na célula fúngica podem ser expulsas por um sistema de efluxo composto pelas *ATP-binding cassette transporters* (transportadores ABC). No ambiente, o fungo utiliza esse sistema para eliminar componentes tóxicos secretados por plantas e outros organismos presentes no solo. No caso de um processo infeccioso, os transportadores ABC são fatores de virulência envolvidos na resistência de *A. fumigatus* a drogas e na detoxificação de componentes do sistema imune do hospedeiro (Osherov, 2007).

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

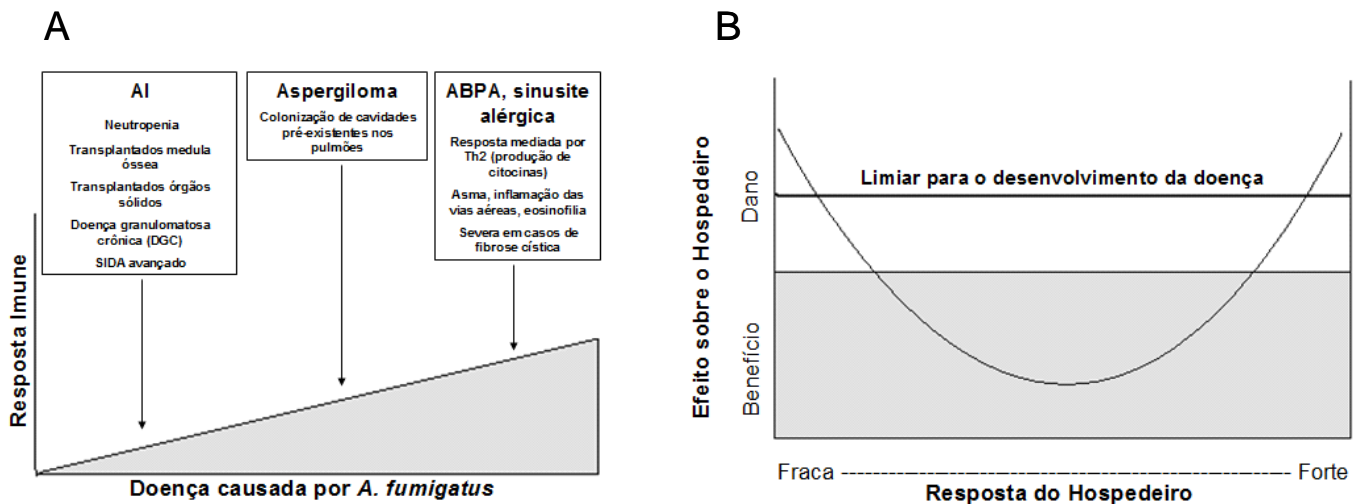


Figura 4: Gráfico mostrando relação entre a resposta imune do hospedeiro e o tipo de doença causada por *A. fumigatus* (A) (adaptado de Segal & Walsh, 2006) e Curva de resposta do hospedeiro ao dano causado pelo patógeno (*Damage-response framework*). O dano ao hospedeiro pode ser representado em função da resposta à infecção, que varia de acordo com o estado imunológico (B) (adaptado de Pirofki & Casadevall, 2007).

AI, aspergilose invasiva; SIDA, síndrome da imunodeficiência humana; ABPA, aspergilose bronco-pulmonar alérgica; Th2, linfócitos T *helper* do tipo 2.

Alguns autores afirmam que a virulência de *A. fumigatus* está relacionada à liberação de toxinas pelos conídios que, dentre outras funções, poderiam prevenir a fagocitose dos mesmos. De fato, já foi descrita a ação de uma toxina difusível e termoestável de 14 kDa sobre macrófagos competentes. Essa toxina ainda não foi identificada e atuaria inibindo o *burst* oxidativo dos macrófagos, bem como, à expressão de citocinas e à fagocitose (Mitchell, 1997; Bertout, 2002). Outra toxina associada aos conídios é a fumigaclavina, um metabólito alcalino inibidor da síntese de DNA e da ativação, proliferação e adesão de linfócitos T (Bertout, 2002).

Outras toxinas são liberadas pelas hifas de *A. fumigatus*, ressaltando-se a gliotoxina e as ribotoxinas. A gliotoxina é um metabólito secundário que dentre as toxinas é a melhor caracterizada e a que apresenta a maior toxicidade (Schulz *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 2004). Este metabólito apresenta diversas atividades biológicas, como citotoxicidade a macrófagos e inibição da NADPH oxidase em neutrófilos. Ela pode atuar também inibindo o funcionamento normal das células ciliadas ou causar danos ao epitélio pulmonar (Rementeria, 2005). As ribotoxinas, por sua vez, atuam inativando a ação dos ribossomos nas células do hospedeiro, e dentre elas destaca-se a Aspfl1, uma proteína de 18 kDa secretada pelo fungo. Sua

classificação como fator de virulência está relacionado ao seu possível papel na atividade citotóxica durante a aspergilose invasiva (Kao & Davies, 1999).

A etapa de invasão do epitélio pulmonar por hifas de *A. fumigatus* é a primeira etapa na patogênese da doença invasiva causada por este fungo. Dessa forma, *A. fumigatus* parece secretar enzimas com atividade elastinolítica e colagenolítica que atuam na invasão da barreira epitelial pulmonar, rico em colágeno e elastina (Monod *et al.*, 1995).

Além da hidrólise da barreira estrutural dos pulmões, ocasionada pela ação de serino proteases (Iadarola, 1998), proteases secretadas por *A. fumigatus* poderiam estar implicadas em outros processos durante a infecção, contribuindo para a virulência do fungo (Sharon *et al.*, 2009). Dentre as evidências que sugerem esse fato, destacam-se: (1) liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células epiteliais infectadas, induzida por proteases secretadas (Kauffman *et al.*, 2000); (2) mudanças no citoesqueleto de actina de células infectadas do epitélio pulmonar, dependentes de protease, levando ao desprendimento e morte dessas células (Kogan *et al.*, 2004); (3) secreção de proteases *in vivo* durante a infecção, evidenciada pela marcação por anticorpos anti-protease do micélio de *A. fumigatus* em tecido pulmonar de pacientes e de animais experimentais infectados (Monod *et al.*, 2002); (4) diminuição da virulência de cepas mutantes de *A. fumigatus*, deficientes na atividade elastinolítica (Kolattukudy *et al.*, 1993).

A adesão de micro-organismos às células e moléculas do hospedeiro é um evento determinante na patogênese da maior parte das doenças infecciosas. Neste sentido, cada vez mais a adesão a células epiteliais e endoteliais, bem como, os eventos decorrentes desta interação (processo inflamatório), têm sido estudadas em infecções fúngicas invasivas. A primeira proteína descrita como adesina em *A. fumigatus* foi a hidrofobina⁵ RodA, que estaria envolvida na adesão ao colágeno e à albumina (Aimanianda *et al.*, 2009). Porém, pouco é conhecido a respeito dos mecanismos de adesão deste fungo e acredita-se que os carboidratos da superfície celular do *A. fumigatus* sejam as principais moléculas envolvidas neste processo. Os primeiros indícios da participação de carboidratos nos processos de adesão de *A. fumigatus* surgiram com os estudos de Wasylnka & Moore (2000), quando foi observado que conídios deste fungo apresentam afinidade por domínios de ligação para glicosaminoglicanas presentes em moléculas de fibronectina. Além disso, este grupo também constatou que açúcares carregados negativamente eram capazes de inibir a ligação de conídios tanto à fibronectina quanto à lâmina basal de células epiteliais de pulmão.

⁵ Hidrofobinas também atuam mascarando β -1,3-glucana impedindo, conseqüentemente, seu reconhecimento pelo sistema imune (Aimanianda *et al.*, 2009).

Estudos recentes têm sugerido o envolvimento de dois polímeros de carboidratos, a galactosaminogalactana e a galactomanana, nos processos de adesão deste fungo ao hospedeiro. Ambos os polissacarídeos foram recentemente descritos como constituintes de uma hipotética matriz extracelular produzida por este fungo e associada à capacidade de formar biofilmes (Lousserte *et al.*, 2010). A interação de *A. fumigatus* a células do hospedeiro e o papel desta interação na fisiopatologia da aspergilose invasiva serão contemplados em maior destaque nos tópicos seguintes.

1.4 Aspectos gerais e clínicos da aspergilose

Aspergilose é definida como um grupo de doenças causadas por espécies do gênero *Aspergillus* destacando-se a aspergilose bronco-pulmonar alérgica (ABPA), o aspergiloma e a aspergilose invasiva. Como anteriormente citado, dentre as inúmeras espécies neste gênero, apenas algumas são conhecidas por causarem aspergilose no homem e em animais, destacando-se dentre elas o *A. fumigatus* como a principal espécie patogênica.

Conídios de *A. fumigatus* são ubíquos e centenas deles são inalados diariamente por seres humanos. Dessa forma, a principal porta de entrada para infecção por *A. fumigatus* é o trato respiratório (Stevens, 2008). O tipo de manifestação clínica, por sua vez, depende principalmente da localização da infecção no trato respiratório, e da invasão do micélio no organismo; fatores estes relacionados com o estado imunológico do hospedeiro (Liise-anne & Casadevall, 2007).

A aspergilose bronco-pulmonar alérgica é a doença alérgica mais grave causada por fungos do gênero *Apergillus* e acomete principalmente indivíduos atópicos (asmáticos) e indivíduos com fibrose cística. Essa doença apresenta uma evolução clínica muito semelhante ao de uma asma brônquica clássica, porém, com uma resposta imunológica específica mediada por células T (Murali *et al.*, 1997).

O aspergiloma ou bola fúngica é a doença caracterizada pela colonização de cavidades pré-existentes no pulmão de indivíduos que já sofreram de outras doenças pulmonares como, por exemplo, tuberculose e sarcoidose. O aspergiloma consiste de uma massa esférica de hifas embebida em uma matriz proteica, cuja periferia produz estruturas esporofíticas. Um sintoma clássico do aspergiloma é a hemoptise, resultante do rompimento de vasos sanguíneos

bronquiolares, região colonizada pelo fungo. Em alguns casos essa hemoptise pode ser massiva e até fatal (Dixon & Walsh, 1992).

A incidência de infecções fúngicas invasivas (IFI) tem aumentado muito nas últimas décadas devido à utilização cada vez mais freqüente de terapias imunossupressoras para o tratamento de câncer e para o controle da rejeição a transplantes. A aspergilose invasiva se destaca dentre as IFIs, sendo predominante em pacientes de Unidades Hematológicas (Denning, 1998; Alangaden, 2011).

Apesar de já terem sido descritos casos de aspergilose invasiva em pacientes imunocompetentes (Raja & Singh, 2006), os fatores de risco predominantes para o desenvolvimento desta IFI são: transplante de medula óssea e órgãos sólidos; terapia prolongada com corticosteróides; malignidades hematológicas; terapias citotóxicas (quimioterapia e radioterapia); SIDA avançada e doença granulomatosa crônica (Zimeili & Soubani, 2007). O imunocomprometimento mais relevante e determinante para o desenvolvimento de aspergilose invasiva é a neutropenia profunda e prolongada que atinge especialmente pacientes com leucemia mielóide aguda e pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea. Esse tipo de neutropenia é ocasionado pela terapia citotóxica com quimioterápicos associada à terapia imunossupressora (Segal & Walsh, 2006).

Existem dois períodos críticos para infecção invasiva por *A. fumigatus* em pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea. O primeiro período seria os estágios iniciais após o transplante, no qual o paciente recebe doses elevadas de corticosteróides que causam uma imunossupressão geral afetando a imunidade celular (Segal & Walsh, 2006). O segundo e principal período de risco pode ocorrer seis meses após o transplante, quando surge a possibilidade de desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro. Nessa situação o paciente retoma a terapia imunossupressora de maneira intensificada, sendo administrado além de corticosteróides,⁶ drogas como ciclosporina A e agentes anti-TNF- α (Zimeili & Soubani, 2007).

Outro grupo de risco que merece destaque é o de pacientes com granulomatose crônica. Esta doença é causada por uma mutação que inativa o complexo NADP oxidase em células polimorfonucleares. Esse complexo é responsável pela produção dos radicais livres liberados no *burst* oxidativo dos neutrófilos, mecanismo utilizado para a eliminação de hifas de *A. fumigatus*. Dessa forma, indivíduos com granulomatose crônica são muito suscetíveis a

⁶ Corticosteróides além de imunossupressores também estimulam o crescimento de *A. fumigatus* (Segal & Walsh, 2006).

manifestar aspergilose invasiva, sendo esta doença a principal causa de morte nesse grupo de pacientes (Cohen *et al.*, 1981; Almyroudis *et al.*, 2005).

Outros fatores também podem predispor a infecção invasiva por *A. fumigatus*, destacando-se: linfoma, transplante de órgãos sólidos (em especial, transplante de pulmão), diabetes, alcoolismo, estado neonatal, tuberculose, terapia imunossupressora para tratamento de doenças autoimunes, gravidez e processos cirúrgicos (Stevens, 2008).

A incidência de aspergilose invasiva dentre os pacientes de risco é muito alta, assim como a mortalidade que pode chegar a uma taxa de 90%, caso a doença atinja o sistema nervoso central. O quadro 1 abaixo reúne dados epidemiológicos e revelam a importância do estudo e controle desta doença (Denning, 1998; Latgé, 1999; Singh & Paterson, 2005; Maschmeyer *et al.*, 2007).

Tabela 1. 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.

Apesar do surgimento de drogas mais eficazes, o prognóstico dos pacientes com aspergilose invasiva continua baixo, e isso decorre principalmente da falta de um diagnóstico preciso e precoce, além da crescente multiresistência que o *A. fumigatus* apresenta aos antifúngicos (Baxter *et al.*, 2009). A aspergilose só pode ser provada a partir da cultura de isolados de amostras fisiológicas estéreis de pacientes, ou a partir de exames histológicos. Contudo, para realizar ambos os exames são necessários procedimentos invasivos, como isolamento do fungo de amostras sanguíneas e realização de biópsia pulmonar toracoscópica. Essas estratégias invasivas são arriscadas para pacientes com trombocitopenia, que é o caso dos pacientes transplantados e leucêmicos. Assim o diagnóstico para aspergilose torna-se apenas provável, sendo baseado em exames não invasivos (Segal & Walsh, 2006).

Hoje, as técnicas utilizadas na rotina para o diagnóstico de aspergilose são a tomografia computacional e o ELISA para galactomanana, em conjunto com a observação dos sintomas clínicos que o paciente apresenta (febre e nível de neutropenia) (Chamilos & Kontoyiannis, 2006). Na clínica nenhum desses métodos de diagnóstico leva a um resultado preciso e confiável se utilizado isoladamente. A tomografia computacional do pulmão é utilizada para a verificação da presença do “sinal do halo”, sinal característico de organismos angioinvasivos e altamente sugestivo de aspergilose invasiva (Kuhlman *et al.*, 1987). O ELISA por sua vez pode ser utilizado para detecção de antígenos circulantes do fungo, como a galactomanana e a 1,3- β -D-glucana, ambas presentes na parede celular do fungo sendo liberadas no sangue e detectadas no soro de pacientes. No entanto a 1,3- β -D-glucana também é encontrada em *Candida sp.* e *Fusarium sp.*, enquanto a galactomanana é predominantemente encontrada em *Aspergillus* (Segal & Walsh, 2006). Por esta razão, para diagnóstico da aspergilose o teste mais utilizado é o *Platelia aspergillus* (BioRad), um ELISA sanduíche para detecção da galactomanana (Verweij & Mennink-Kersten, 2006). Contudo, a sensibilidade e especificidade deste teste podem ser afetadas por medicamentos e fatores do hospedeiro, ocorrendo usualmente falsos negativos ou falsos positivos (Wheat, 2003). Já foi descrito também a utilização do PCR a partir de amostras de soro ou lavado broncoalveolar de pacientes para o diagnóstico de aspergilose, contudo as condições e as sondas específicas para realização do teste variam muito de acordo com o laboratório onde este é realizado (Segal & Walsh, 2006; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007).

Visto o desafio na obtenção de um diagnóstico precoce e preciso para a aspergilose, a profilaxia utilizando agentes antifúngicos continua sendo uma estratégia relevante na prevenção desta doença em pacientes de risco. Outra estratégia profilática relevante é a manutenção de um ar de boa qualidade, ou seja, livre de conídios de *Aspergillus*, através da utilização de filtro HEPA nas unidades hospitalares. Entretanto, essas medidas profiláticas apresentam eficiência parcial, levando apenas a taxas menores de incidência. Em relação ao tratamento da aspergilose invasiva, os antifúngicos mais utilizados são os poliênicos, como a anfotericina B, que atuam na membrana plasmática; e os azólicos, como o voriconazol, que inibem a síntese do ergosterol. Entretanto, a taxa de mortalidade por aspergilose invasiva continua elevada, o que é reflexo da baixa eficácia da terapia antifúngica (Stevens, 2008; Qiao *et al.* 2008).

Os aspectos clínicos apresentados revelam de forma sucinta os desafios que se impõem para o efetivo controle desta infecção oportunista emergente, que acomete um grupo

crecente de pacientes. Por ser a forma clínica mais relevante e o foco deste trabalho, a fisiopatologia da aspergilose invasiva será tratada em maior detalhe a seguir.

1.5 Fisiopatologia da aspergilose invasiva

Em indivíduos hígidos, a inalação dos conídios de *A. fumigatus* é geralmente inofensiva. Os conídios atingem os terminais das vias aéreas e são facilmente combatidos por células do sistema imune inato do hospedeiro, como os macrófagos alveolares residentes do pulmão e neutrófilos recrutados na inflamação (Philippe *et al.*, 2003; Lessing *et al.*, 2007).

Para combater conídios e hifas de *A. fumigatus*, macrófagos e neutrófilos atuam fagocitando conídios, e liberando espécies reativas de oxigênio para combater hifas e conídios do fungo (Figura 5A). Quando essas hifas já estão muito grandes para serem engolfadas, os neutrófilos são capazes de liberar filamentos de DNA, que formam redes capazes de envolver as hifas na tentativa de inibir o crescimento das mesmas (Bruns *et al.*, 2010).

O envolvimento de células dendríticas na infecção por *A. fumigatus* está relacionada a ativação de uma resposta imune adaptativa ao fungo, influenciando na resolução da infecção. Resumidamente, a fagocitose de conídios levará a uma ativação de linfócitos Th1, o que contribui para a proteção do hospedeiro. Entretanto, a interação de células dendríticas com hifas do fungo resultará na ativação de linfócitos Th2 e Treg, com concomitante secreção de citocinas antiinflamatórias (TGF- β e IL-10), gerando uma resposta desfavorável ao hospedeiro (Bozza *et al.*, 2002).

Entretanto, como ilustrado na figura 5B, em pacientes com neutropenia profunda e prolongada, os mecanismos do sistema imune inato são incapazes de eliminar os conídios. Dessa forma, esses conídios aderem às células epiteliais dos pulmões e são endocitados pelas mesmas. Já foi demonstrado que conídios e hifas de *A. fumigatus* são capazes de induzir a formação de pseudópodes por pneumócitos tipo II, e ao serem endocitados concentram-se nos lisossomos e endossomos dessas células epiteliais e germinam dentro das mesmas (Paris *et al.*, 1997; Wasylka & Moore, 2003). Durante esse processo, os conídios vivos estimulam a expressão de TNF- α pelos pneumócitos, o que leva à inibição da apoptose nessas células epiteliais (Berkova, 2006). Essa habilidade do fungo em utilizar células viáveis do hospedeiro como refúgio ou esconderijo pode, portanto, contribuir para sua virulência.

As hifas originadas desses conídios, por sua vez, escapam das células epiteliais dos pulmões, e por apresentarem um tropismo pelos vasos sanguíneos, aderem e invadem a

superfície abluminal do endotélio. Ao atingir a luz dos vasos sanguíneos, fragmentos de hifas são disseminados pela corrente sanguínea, atingindo diferentes pontos da face luminal do endotélio. Nesse momento as hifas aderem e atravessam o endotélio vascular, alcançando novos tecidos. Esses eventos estão ilustrados na figura 6 e são responsáveis pela disseminação hematogênica do fungo, processo que caracteriza a infecção sistêmica e leva a injúria, dano celular, e eventos protrombóticos no endotélio (Lopes-Bezerra & Filler, 2004; Filler & Sheppard, 2006; Kamai *et al.*, 2006). Por fim, a morte de pacientes com aspergilose invasiva decorre do infarto tecidual e falência dos órgãos vitais.

Já foi estudado também o envolvimento de plaquetas na fisiopatologia da aspergilose invasiva. Estudos da interação de hifas e conídios de *A. fumigatus* com plaquetas mostraram que as hifas desse fungo são capazes de induzir a ativação plaquetária, que pode estar envolvida de maneira sinérgica à ativação da trombina. Entretanto, o padrão de dano tecidual decorrente da aspergilose invasiva depende do tipo de imunocomprometimento que o paciente apresenta.

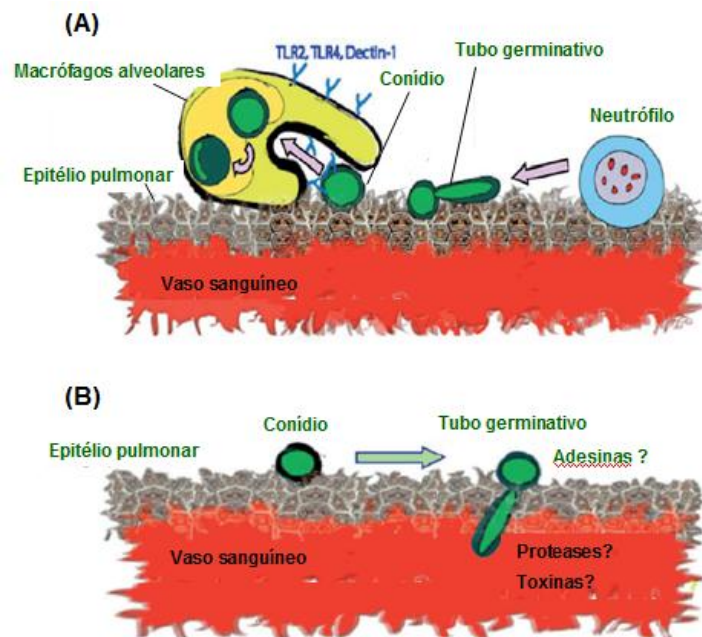


Figura 5. O resultado da infecção pulmonar por *A. fumigatus* vai depender do estado imune do hospedeiro. (A) Em indivíduos imunocompetentes os conídios e tubos germinativos são facilmente destruídos pelos macrófagos alveolares e neutrófilos. (B) Em indivíduos neutropênicos, os conídios germinam livremente, invadindo o epitélio pulmonar e o tecido vascular adjacente (adaptado de Osherov, 2007).

O dano tecidual observado em indivíduos neutropênicos decorre da angioinvasão, enquanto que em indivíduos não neutropênicos o dano decorre de um processo inflamatório

associado à necrose tecidual. Neste sentido, as plaquetas do hospedeiro não parecem estar envolvidas aos eventos angioinvasivos e protrombóticos causados pelas hifas desse fungo, visto que indivíduos neutropênicos também apresentam trombocitopenia. Dessa forma, o envolvimento de plaquetas na aspergilose se resume ao processo inflamatório e necrótico observado nos pacientes não neutropênicos, que não apresentam sinais de angioinvasão (Rodland *et al.*, 2010).

Outros fungos também são capazes de causar infecções invasivas, com disseminação hematogênica e invasão de células não fagocíticas do hospedeiro que pode ocorrer de diferentes formas dependendo do tipo de fungo invasivo. *Candida albicans*, por exemplo, utiliza dois mecanismos para invadir células epiteliais de mucosa, causando doenças como candidíase vulvovaginal e esofaríngea. Um deles ocorre através da secreção de aspartil proteinases, que digerem a superfície epitelial, promovendo sua entrada nas células (Stringaro *et al.*, 1997). O outro mecanismo é a indução da sua endocitose pelas células epiteliais (formação de pseudópodes) através da interação de proteínas presentes na superfície da hifa deste patógeno com um ou mais receptores epiteliais (Filler & Shepard, 2006). Em pacientes susceptíveis, esse fungo pode atingir o sistema vascular, causando uma infecção disseminada e invasiva. Sabe-se que a proteína Als3 presente na superfície das hifas de *C. albicans* é capaz de se ligar a N-caderina na superfície de células endoteliais humanas. Essa ligação induz o rearranjo dos microfilamentos das células endoteliais, que por sua vez iniciam o processo de endocitose (apud. Filler & Sheppard, 2006).

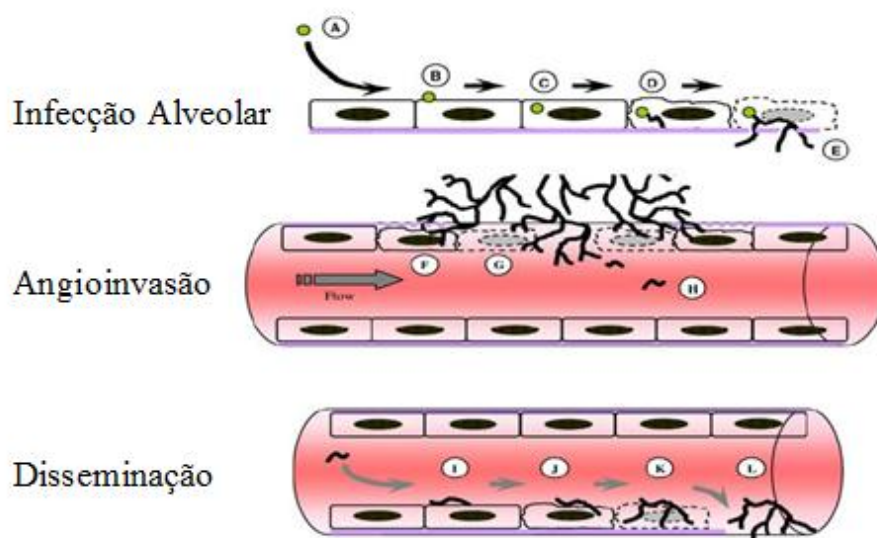


Figura 6: Modelo de interação entre *Aspergillus fumigatus*, célula epitelial pulmonar e a célula endotelial vascular durante angioinvasão e disseminação. (A) Inalação; (B) Adesão

epitelial; (C) Endocitose; (D) Germinação; (E) Escape; (F) Penetração no endotélio abluminal; (G) Indução à dano celular; (H) Disseminação hematogênica; (I) Adesão ao endotélio luminal; (J) Invasão; (K) Dano celular; (L) Invasão extravascular. (adaptado de Filler & Sheppard, 2006).

Leveduras de *Cryptococcus neoformans*, por sua vez, possuem uma cápsula de glucuronoxilomanana, que além de driblar fagócitos do sistema imune inato, auxilia na adesão dessas células ao epitélio pulmonar e ao endotélio cerebral. Esse fungo utiliza mecanismos transcelulares para ultrapassar a barreira hemato-encefálica do hospedeiro, causando meningite. Aparentemente tanto os pneumócitos tipo II, quanto as células endoteliais do cérebro, possuem um receptor específico para a glucuronoxilomanana, contudo a identidade desses receptores ainda não foi descoberta. Essa ligação polissacarídeo-receptor medeia a endocitose desse fungo pelos pneumócitos e células endoteliais (Chen *et al.* 2003; Chang *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006). Outros fungos patogênicos causadores de infecções sistêmicas e que sabe-se interagem com células não fagocíticas são: o *Paracoccidioides brasiliensis*, que induz sua endocitose pelos pneumócitos tipo II, induzindo a apoptose dessas células (Mendes-Giannini *et al.*, 2004) e *Histoplasma capsulatum* que é endocitado por células epiteliais traqueais, sendo capaz de sobreviver no interior dessas células (Eissenberg *et al.*, 1991).

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

1.6 Aspectos moleculares da interação fungo-hospedeiro

1.6.1 Ativação, estímulo e injúria endotelial por *A. fumigatus*

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

além da regulação de respostas imune e inflamatória (Sumpio et al., 2002). Esse tecido interage e estimula, de maneira parácrina e endócrina, outros tipos celulares como células do tecido muscular e elementos sanguíneos, como plaquetas e glóbulos brancos. Para a manutenção de suas propriedades, é muito importante que a integridade estrutural e funcional deste tecido seja mantida (Sumpio *et al.*, 2002).

Sob condições basais, o endotélio mantém a homeostase regulando eventos como trombose, trombólise, adesão plaquetária, tônus vascular e fluxo sanguíneo. Essa regulação ocorre através da liberação de substâncias vasoativas, como óxido nítrico e prostaciclina, que inibem a adesão plaquetária e causam vasodilatação. Esses mediadores, por sua vez, são liberados em resposta a variados estímulos químicos (Ex.: trombina, bradicinina, ADP) e físicos (Ex.: forças hemodinâmicas). Quando estimulado, o endotélio varia de um fenótipo basal, para um estado ativado, caracterizado por um perfil pró-trombótico, proliferativo e vasoconstritor (Sumpio, *et al.*, 1993).

Essa ativação endotelial pode ser causada por uma série de doenças infecciosas e vasculares, que estimulam processos inflamatórios e protrombóticos, contribuindo significativamente na patogênese dessas doenças (Dejana *et al.*, 2008). O choque séptico é um excelente exemplo desse processo, onde ocorre uma interação entre eventos protrombóticos e inflamatórios, estimulados pela ativação endotelial. Quando moléculas de LPS são liberadas no sistema vascular por bactérias gram-negativas, elas são capazes de estimular a expressão de fator tecidual na superfície das células endoteliais, bem como estimular a produção de PAI-1⁷. Conforme ilustrado na figura 7, a expressão de fator tecidual ocorre na superfície endotelial, dentre outros tipos celulares, o que leva à ativação da via extrínseca da coagulação, que pode ser ligada à via intrínseca pela ativação dos fatores VIII e IX (Kidokoro *et al.*, 1996; Libby & Simon, 2001).

Esses estímulos protrombóticos estão diretamente envolvidos com o processo inflamatório gerado, através da ação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ⁸, IL-6, IL-1 β , IL-2, IFN- γ , VEGF, MCP-1 e PDGF, que contribuem para a expressão de fator tecidual nas células endoteliais (Libby & Simon, 2001). Além disso, receptores endoteliais para moléculas anticoagulantes, como a trombosmodulina e o receptor endotelial da proteína C,

⁷ Inibidor do ativador de plasminogênio. O plasminogênio é uma importante molécula envolvida nos eventos fibrinolíticos (Libby & Simon, 2001).

⁸ O TNF- α também está envolvido na inibição da fibrinólise (Van der Poll *et al.*, 1990).

apresentam sua expressão inibida pela endotoxina no choque séptico e por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (apud. Lopes-Bezerra & Filler, 2003).

No entanto, não apenas a sepse interfere na homeostase endotelial, mas também outras doenças infecciosas podem causar esse desequilíbrio. A malária, a leptospirose e a aspergilose invasiva são exemplos dessas doenças, onde a interação do micro-organismo - *Plasmodium falciparum*, *Leptospira sp.* e *A. fumigatus*, respectivamente - com o endotélio vascular desencadeia eventos protrombóticos e inflamatórios semelhantes aos desenvolvidos no choque séptico (Ivo *et al.*, 2008; Wagenaar *et al.*, 2007, Kamai *et al.*, 2006, Lopes-Bezerra *et al.*, 2004).

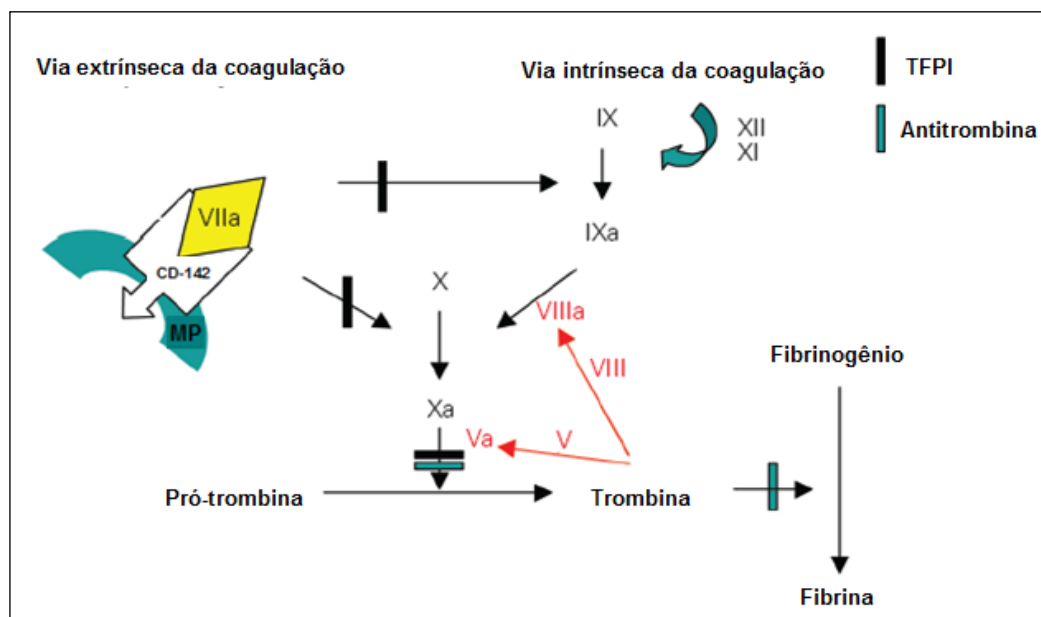


Figura 7. Esquema da via extrínseca da coagulação ativada pelo fator tecidual (CD142). Esse mecanismo é reportado como a via principal de coagulação *in vivo*. O domínio extracelular do CD142 sliga-se ao fator VII, formando um complexo ativado. Esse complexo converte o fator X a fator Xa, que tanto na via extrínseca, quanto na via intrínseca, leva à formação de trombina. A trombina, por sua vez, induz sua própria produção, através de um mecanismo de *feed-back* positivo estimulado pela ativação dos fatores V e VIII, e induz a formação de fibrina. Dentre os mecanismos inibitórios estão incluídos a ação da antitrombina e do inibidor da via do fator tecidual (TFPI). MP: membrana plasmática. (Adaptado de Lopes-Bezerra & Filler, 2003).

Como ilustrado na figura 8, as hifas de *A. fumigatus* aderem às células endoteliais, invadindo o endotélio de duas maneiras. A primeira ocorre no parênquima pulmonar, onde a hifa invade a superfície abluminal do endotélio, em direção ao lúmen dos vasos sanguíneos pulmonares, resultando no rompimento da monocamada endotelial. O segundo tipo de invasão ocorre em indivíduos gravemente neutropênicos, como consequência da disseminação

hematogênica da hifa. Neste momento a hifa interage e penetra a camada luminal do endotélio, escapando dos vasos em direção aos órgãos.

Os mecanismos de adesão e invasão utilizados pelo patógeno podem, portanto, induzir a trombose vascular, que parece ser mediado pela expressão de fator tecidual na superfície endotelial. Dessa forma, a angiomasia pode ser considerada um ponto chave da fisiopatologia da aspergilose invasiva (Lopes-Bezerra & Filler, 2004; Filler & Shepard, 2006; Kamai *et al.*, 2006).

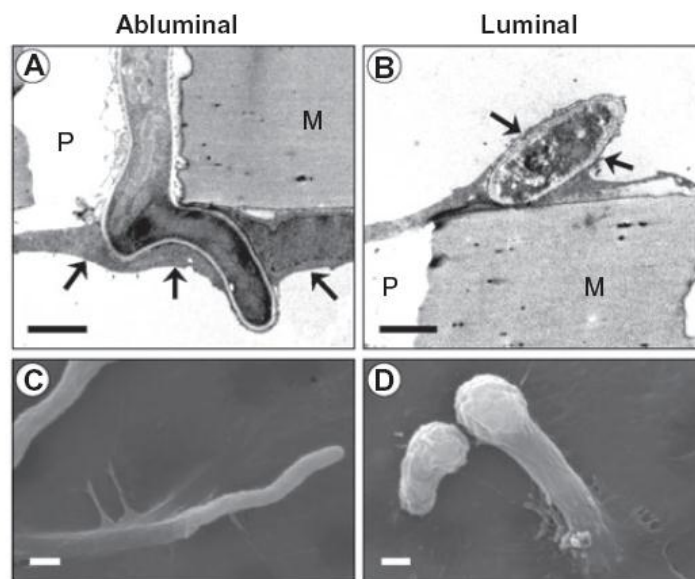


Figura 8. Hifas de *A. fumigatus* invadem a superfície luminal e abluminal do endotélio por distintos mecanismos. Imagem a partir de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura mostra a invasão abluminal (A e C) e luminal (B e D) do endotélio. Setas em (A) indicam que as células endoteliais estão sendo invadidas por hifas de *A. fumigatus*. Setas em (B) indicam pseudópodes endoteliais ao redor da hifa. M, membrana da célula endotelial. P, poro do inserto utilizado para cultura endotelial (Adaptado de Kamai *et al.*, 2009).

Sabe-se que as células endoteliais são polarizadas, ou seja, a expressão de proteínas de superfície celular varia de acordo com a região luminal ou abluminal do endotélio. A fração abluminal, por exemplo, é rica em transportadores de glicose, enquanto que a fração luminal apresenta uma maior expressão de proteínas de adesão plaquetária (Friis *et al.*, 2006; Gaudreault *et al.*, 2006). Além da expressão de moléculas de superfície, a resposta do endotélio vascular a estímulos externos também é polarizada, como a resposta endotelial ao TNF- α , que varia caso o estímulo ocorra na superfície luminal ou abluminal (Mark & Miller, 1999). Dessa forma, a resposta endotelial estimulada pela interação de *A. fumigatus* com o

endotélio vascular também parece ser polarizada, variando de acordo com a localização da infecção no endotélio (superfície abluminal ou luminal) (Kamai *et al.*, 2009).

Os estudos de referência da interação *Aspergillus*-endotélio, utilizam como modelo *in vitro* a interação deste fungo com células endoteliais isoladas de cordão umbilical humano (HUVECs). O primeiro trabalho a mostrar a endocitose de conídios de *A. fumigatus* por HUVECs foi realizado por Paris *et al.*, (1997). Entretanto, neste trabalho não foi descrito um modelo para o estudo da interação de HUVECs com as hifas de *A. fumigatus*, sendo este descrito posteriormente e pela primeira vez por Lopes-Bezerra e Filler (2004). Neste estudo, foram analisados eventos como endocitose, injúria e ativação endotelial, utilizando-se dois estados morfológicos do fungo, conídio e tubo germinativo. Nos ensaios de endocitose, foi demonstrado que os conídios de *A. fumigatus* são endocitados pelas HUVECs cerca de duas vezes mais que tubos germinativos. Ademais, a adição de citocalasina D, inibidor de microfilamentos, inibiu a endocitose desse micro-organismo, sendo demonstrado o rearranjo dos microfilamentos de actina das células endoteliais na endocitose dos dois morfotipos de *A. fumigatus*. Em relação à injúria endotelial, Lopes-Bezerra & Filler (2004) demonstraram que tanto conídios quanto tubos germinativos induziam a injúria endotelial, sendo menor na interação com as células germinativas. Entretanto, em relação aos conídios essa injúria era dependente da viabilidade do fungo e aumentava cineticamente de acordo com o tempo de germinação, enquanto que para tubos germinativos o nível de injúria causada por organismos mortos ou vivos era semelhante. Além disso, ensaios de interação utilizando *membrane inserts* que impediam o contato direto hifa-HUVEC demonstraram que a injúria endotelial era dependente do contato fungo-endotélio.

Como explicado anteriormente, um dos marcadores de ativação endotelial é o fator tecidual, responsável pela ativação da via extrínscica da coagulação. Nos ensaios de ativação endotelial, através da análise da expressão de fator tecidual, foi observado que apenas os tubos germinativos, vivos ou mortos, eram capazes de causar um aumento significativo na expressão de fator tecidual na superfície endotelial (Lopes-Bezerra & Filler, 2004). Chiang e colaboradores (2008) mostraram que além da ativação endotelial, somente as hifas de *A. fumigatus* eram capazes de estimular a expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície luminal de HUVECs, como E-selectina e VCAM-1. Esse estímulo foi causado tanto por hifas vivas quanto por hifas mortas (inativadas com timerosal). Além disso, esse grupo também demonstrou que hifas, mas não conídios de *A. fumigatus*, são capazes de causar estímulo pró-inflamatório sobre as HUVEC, caracterizado pela secreção de IL-8 e TNF- α .

Ademais, também foi demonstrado neste trabalho que o estímulo da expressão de E-selectina por HUVECs, após interação com hifas de *A. fumigatus*, era dependente de contato célula-célula e independente da endocitose da hifa. Ensaios realizados com mutantes para metabólitos secundários produzidos por este fungo, como a gliotoxina, demonstraram que essas mutantes induziram o mesmo estímulo endotelial que a selvagem, indicando que esse processo independe de fatores secretados. Ensaios *in vivo*, realizados ainda por este grupo, corroboraram as observações *in vitro*. Foi visto que pulmões de camundongos neutropênicos com aspergilose invasiva apresentavam um aumento na expressão de E-selectina e a citocina KC⁹, concomitante a sinais de invasão abluminal e luminal do endotélio pulmonar. É provável que a expressão de TNF- α , IL-8 e E-selectina contribuam para a ativação e recrutamento de fagócitos ao local da infecção.

Posteriormente, Kamai *et al.*, (2009) verificaram que tanto a invasão luminal quanto a invasão abluminal do endotélio estimulavam a expressão de E-selectina, IL-8 e TNF- α pelas células endoteliais, porém na interação abluminal esse estímulo foi mais evidente. Ademais, foi verificado que a expressão de E-selectina e IL-8 eram dependentes da secreção de TNF- α . A fim de verificar a ativação endotelial, este grupo mediu a expressão de fator tecidual tanto no modelo de infecção luminal, quanto no modelo de infecção abluminal do endotélio. Em ambos os modelos houve aumento da expressão de fator tecidual pelas células endoteliais. Em concordância com os estudos anteriores, esse grupo também mostrou que o estímulo à expressão de E-selectina, IL-8, TNF- α e fator tecidual eram dependentes de contato hifa-célula endotelial, e independente de fatores secretados pelo patógeno.

Portanto, pode-se afirmar que a resposta endotelial à infecção por *A. fumigatus* é polarizada e que tanto à invasão luminal quanto abluminal do endotélio pela hifa levam a ativação endotelial, que é mediado por TNF- α . Essa citocina leva a um estímulo autócrino e/ou parácrino, induzindo a expressão de moléculas de adesão leucocitária, de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esse fenótipo pró-trombótico do endotélio após a interação com hifas de *A. fumigatus* pode caracterizar um mecanismo de defesa do hospedeiro, que tenta dessa forma prevenir a disseminação hematogênica do fungo (Lopes-Bezerra & Filler, 2004; Chiang *et al.*, 2008; Kamai *et al.*, 2009).

De maneira conclusiva, todos esses eventos como ativação, estímulo e injúria endotelial, parecem ser dependentes do contato direto hifa-endotélio e independentes da viabilidade do fungo, não estando envolvidos metabólitos secundários ou toxinas secretados

⁹ Em camundongos, a citocinas KC funciona similarmente à citocinas IL-8 em humanos (*apud* Chiang *et al.*, 2008).

pelo patógeno. No entanto, permanece a pergunta: Que moléculas presentes na superfície do patógeno participam desses eventos decorrentes da interação com o endotélio vascular? Quais os receptores endoteliais envolvidos neste mecanismo de ativação endotelial?

1.6.2 Superfície Celular de *A. fumigatus*

A parede celular dos fungos é uma estrutura que protege o micro-organismo da pressão osmótica e dos estresses no ambiente. Os carboidratos compreendem cerca de 90% da sua constituição, destacando-se quitina, glucanas, mananas e glicoconjugados. O nome químico dado a cada classe de polissacarídeo sugere uma estrutura semelhante entre eles, entretanto cada carboidrato é um polímero heterogêneo, cuja composição varia entre as espécies. A parede celular de *A. fumigatus* é uma estrutura dinâmica e complexa, composta basicamente de glicanas, pigmentos e proteínas, sendo o ponto chave na interação deste patógeno com o hospedeiro, como ilustra a Figura 9.

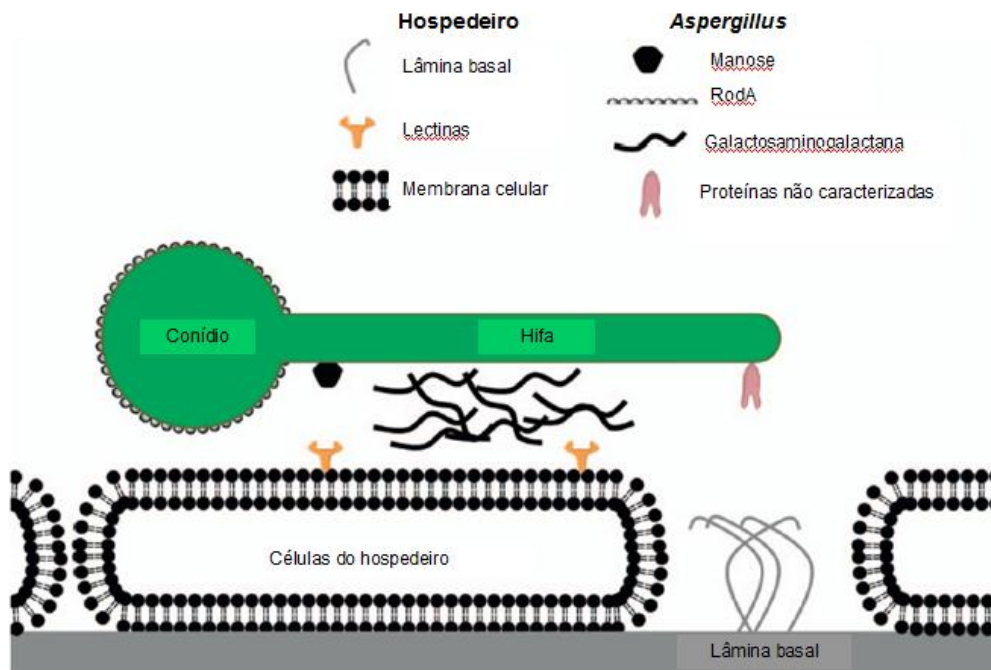


Figura 9. Modelo de interação de *A. fumigatus* aos constituintes do hospedeiro. Estão representadas moléculas conhecidas e suspeitas de estarem envolvidas na adesão desse micro-organismo a células e moléculas do hospedeiro. A lâmina basal inclui moléculas como colágeno, fibronectina e laminina (Adaptado de Sheppard, 2011).

Dentre os carboidratos que compõem a superfície celular do *A. fumigatus*, destacam-se: cadeias de β -glucanas, que são polímeros de glicose, destacando-se as β -1,3-glucanas com

ramificações de β -1,6 glucanas (β -1,3/1,6-glucanas); cadeias de α -1,3-glucanas; a galactomanana, composta por um esqueleto linear de α -manana (polímero de manose) ligado a cadeias curtas compostas por resíduos de galactofuranose β -1,5 ligados; e quitina, um polímero de N-acetilglucosamina β -1,4 ligados (Gatebois *et al.*, 2009).

Essa estrutura da parede celular pode ser dividida, de uma maneira esquemática e hipotética, em duas camadas: uma mais interna, fibrilar e álcali-insolúvel; e uma porção mais externa e amorfa, álcali-solúvel. A composição dessas camadas varia de acordo com a espécie, morfotipo ou estágio de crescimento da célula fúngica (Bowman & Free, 2006; Latgé 2010). Como representado na figura 10, em *A. fumigatus*, a estrutura fibrilar e álcali-insolúvel é caracterizada pela presença de um core central composto de quitina ligada através de ligações cruzadas do tipo β -1,4 a cadeias de β -1,3/1,6-glucana. As cadeias de β -1,3-glucana, por sua vez, podem estar ligadas a galactomanana através de ligações α -(1,6). Além disso, esse complexo glucana-quitina está também ligado covalentemente a β -1,3-1,4-glucana, um polissacarídeo de cadeia linear que compõe cerca de 10% da porção de β -glucana da parede. Esse core central, observado na porção fibrilar, é responsável por conferir rigidez à parede celular. Por fim, toda essa fração álcali-insolúvel está embebida pela fração amorfa e álcali-solúvel da parede, caracterizada pela presença de α -1,3-glucana, com 1% de ligações α -1,4; da galactosaminogalactana (GAG), um polímero com unidades de galactopiranosose ligadas à N-acetilglucosamina; e de glicoproteínas (Gatebois *et al.*, 2009; Latgé, 2010). A figura 11 ilustra de maneira completa a parede celular de conídios e hifas de *A. fumigatus*.

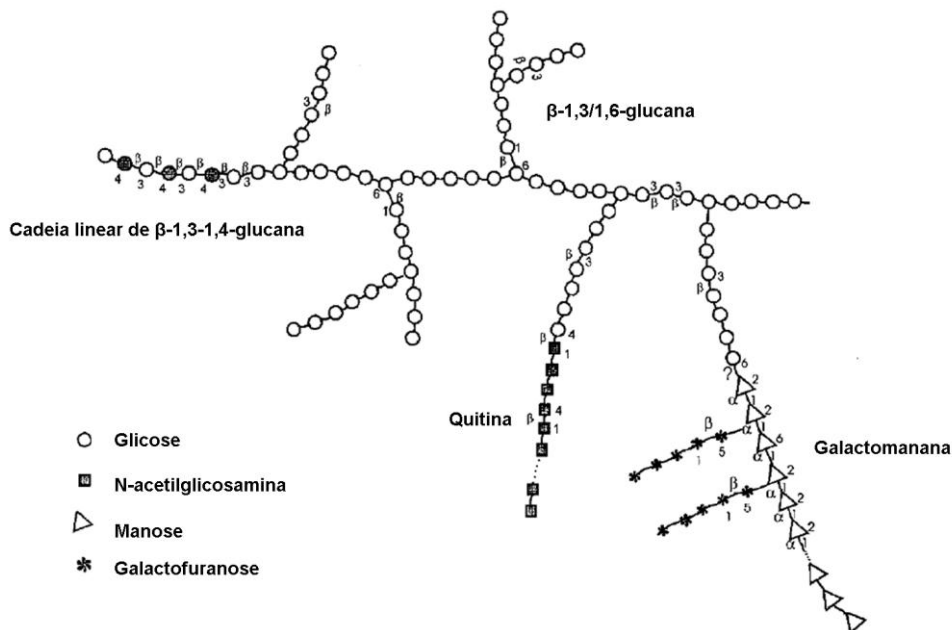


Figura 10. Representação da organização do core de polissacarídeos da porção álcali-insolúvel da parede celular de *A. fumigatus* (Adaptado de Fontaine *et al.*, 2000).

Além de compor a galactomanana, cadeias lineares de manana podem fazer parte da estrutura das glicoproteínas, como as galactomanoproteínas; e podem também estar ligadas covalentemente ao core de glucanas. No caso das galactomanoproteínas, cadeias curtas de manana compõem a porção glicana dessas glicoproteínas, através de ligações *N*- ou *O*-glicosídicas, e possuem resíduos de galatofuranose na porção terminal não redutora (Morelle *et al.*, 2005).

Além dos carboidratos, a parede celular de *A. fumigatus* também contém proteínas que compõem cerca de 2-3% da parede celular (Klis *et al.*, 2002). Essas proteínas podem estar em trânsito antes de serem secretadas para o meio extracelular, ou podem exercer suas funções biológicas nesta estrutura. Algumas delas, por exemplo, possuem funções de transglicosidase e fenoxidase, podendo alterar a estrutura da parede celular (Mouyna *et al.*, 2005; Eisenman *et al.*, 2007; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009). Entretanto, poucas proteínas estão covalentemente ligadas aos polissacarídeos. É o caso, por exemplo, das hidrofobinas na superfície celular dos conídios, que precisam permanecer ligadas covalentemente à parede celular para exercer suas atividades biológicas. Essas proteínas estão inicialmente ancoradas à membrana plasmática por âncoras de GPI, ligando-se em seguida, de maneira covalente às glucanas (Klis *et al.*, 2001).

A parede celular, como dito anteriormente, é uma estrutura dinâmica, que varia de acordo com estímulos do ambiente e com o ciclo celular do fungo. As diferenças estruturais mais significativas observadas na superfície de *A. fumigatus* ocorrem durante a morfogênese deste fungo (Figura 10). Conídios de *A. fumigatus* são cobertos por hidrofobinas e melanina, ao passo que durante sua expansão isotrópica e germinação, as células passam a expressar α -1,3-glucana, galactomanana, galactosaminogalactana e proteínas N-glicosiladas, como por ex., galactomanoproteínas.

Dependendo das condições ambientais, *A. fumigatus* pode formar uma espécie de matriz extracelular (MEC), que manteria as hifas aglomeradas, similar a um biofilme. Essa matriz é rica em polissacarídeos e apresenta uma composição muito semelhante à porção álcali-solúvel da parede celular. Sua composição varia de acordo com o ambiente onde o fungo se encontra, apresentando uma constituição diferente caso a hifa seja isolada a partir de colônias em placas de meio ágar em laboratório (Beauvais *et al.*, 2007) ou se encontre em isolados de aspergiloma e de tecido pulmonar de camundongos com aspergilose invasiva (Loussert *et al.*, 2010).

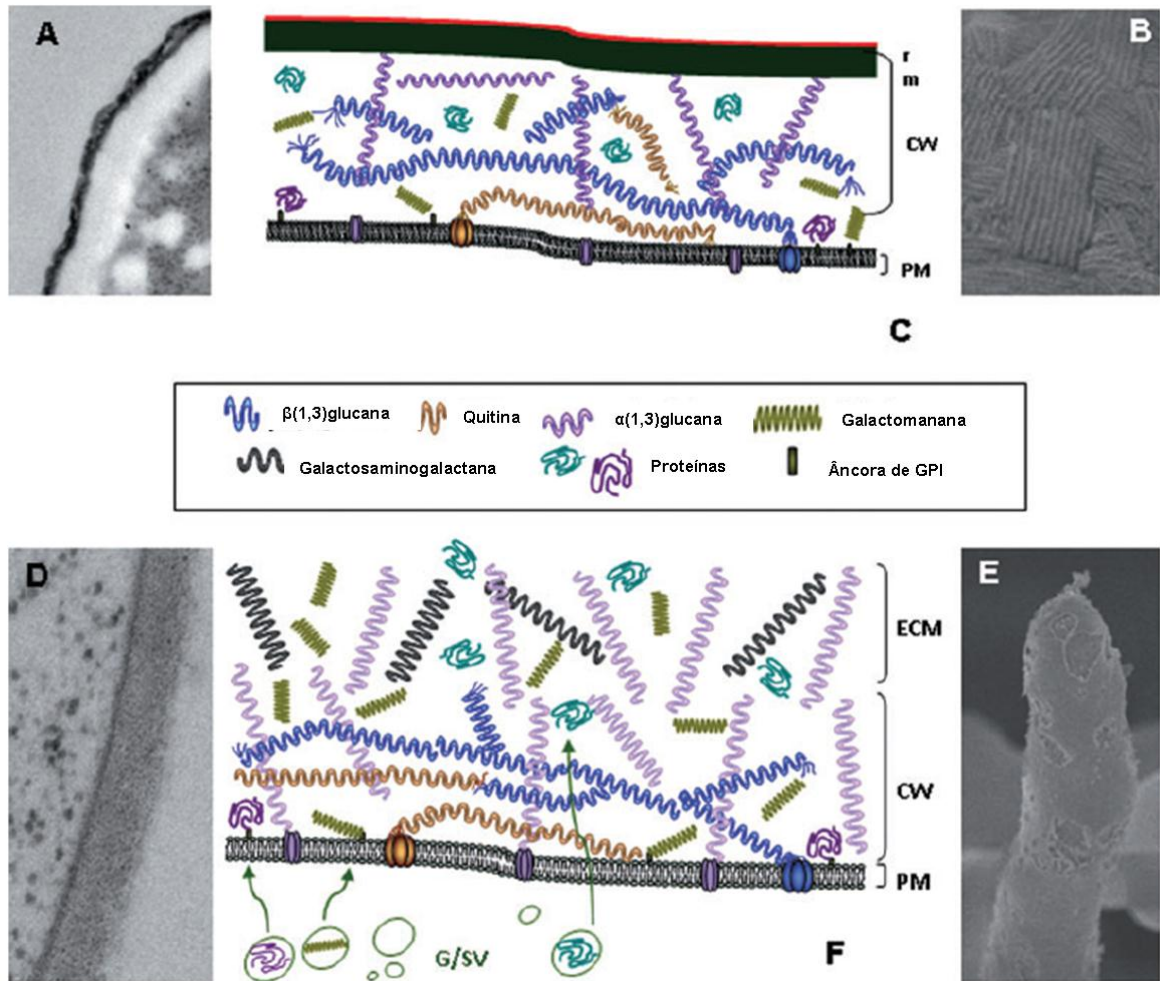


Figura 11. Parede celular de *A. fumigatus*. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de uma secção da parede celular do conídio mostrando a melanina, que é elétron densa, na face mais externa desta estrutura; (B) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando *rodlets* na superfície do conídio; (C) Esquema mostrando a suposta organização de polímeros na parede celular do conídio. Neste esquema, a camada amorfa composta de α -(1,3)-glucana liga a melanina à superfície celular do conídio; (D) MET mostrando a parede celular do micélio cultivado em meio líquido; (E) MEV mostrando o aparecimento de uma matriz extracelular (MEC) envolvendo a hifa cultivada em meio sólido (ausente em culturas de hifas em meio líquido); (F) Esquema da suposta organização dos polímeros da parede celular do micélio. Neste esquema, proteínas ancoradas à âncoras de GPI e alguns polissacarídeos como mananas são sintetizados intracelularmente e transportados para a parede celular pelo via Golgi/Vesículas secretoras. M = melanina; PC = parede celular; MP = membrana plasmática; G = golgi; VS = vesículas secretoras. (Adaptado de Latgé, 2010)

Análises *in vitro* da MEC de hifas de *A. fumigatus* crescidas em meio ágar confirmaram que ela seria composta principalmente por galactomanana, GAG, α -1,3-glucana, melanina, antígenos protéicos e monossacarídeos. Os monossacarídeos e os antígenos protéicos compõem a menor porção da MEC, e dentre os antígenos destacam-se as enzimas catalase, dipeptidil peptidase V e a ribotoxina Asp1 (Beauvais *et al.*, 2007). A análise *in*

*vivo*¹⁰, por sua vez, indicou uma constituição um pouco diferente da MEC, sendo encontradas apenas moléculas de galactomanana, GAG, α -1,3-glucana e melanina. Neste caso a GAG foi caracterizada como o principal componente da MEC. Além disso, a α -1,3-glucana e melanina só foram encontradas na MEC de hifas isoladas a partir de aspergiloma. Em hifas presentes no tecido pulmonar de camundongos com aspergilose invasiva, a α -1,3-glucana estava presente apenas nas camadas mais internas da parede celular. Isso sugere que a α -1,3-glucana exerça uma importante função na aglomeração de hifas, como é o caso do crescimento do fungo em meio ágar *in vitro*, ou no aspergiloma *in vivo*. No caso da aspergilose invasiva, uma infecção sistêmica e descentralizada, as hifas não formam um agregado, o que permite que seus fragmentos sejam disseminados pela corrente sanguínea.

Além disso, as proteínas antigênicas descritas nas análises *in vitro* também não foram encontradas nas análises *in vivo* (Loussert *et al.*, 2010). Em concordância, essas proteínas antigênicas (dipeptidil peptidase V, a enzima catalase e a ribotoxina Asp1) já foram obtidas em soro de pacientes com aspergilose invasiva e aspergiloma, fato que corrobora a hipótese de que essas proteínas sejam secretadas pelas hifas durante um processo infeccioso (Sarfati *et al.*, 2006). Estas proteínas foram recentemente identificadas por nosso grupo no secretoma deste fungo (Hagag *et al.*, 2012, manuscrito aceito para publicação).

1.6.3 A presença de PAMPS da superfície celular de *A. fumigatus* e seu reconhecimento pelo hospedeiro

Os fungos são em sua maioria seres ubíquos, e os humanos estão expostos a uma variedade de espécies potencialmente patogênicas como *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, dentre outros. Esses micro-organismos podem colonizar diferentes nichos no organismo humano, formando interações patogênicas ou comensais. O sistema imune, por sua vez, reconhece ambos os tipos de interação, e essa relação fungo-hospedeiro sofre uma regulação fina, dependente de sinais pró e anti-inflamatórios. No caso de fungos oportunistas, qualquer desequilíbrio nesse sistema pode transformar uma relação comensal em uma relação patogênica com graves conseqüências (Romani, 2011).

¹⁰ Análises *in vitro* da MEC de hifas de *A. fumigatus* foram realizadas a partir de isolados de pacientes com aspergiloma (pulmão e seios paranasais) e de tecido pulmonar de camundongos com aspergilose invasiva (Loussert *et al.*, 2010).

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

A parede celular fúngica é composta por carboidratos que estão ausentes em mamíferos, e que constituem a principal fonte de PAMPs neste grupo. Já foram descritos no hospedeiro PRRs para β -glucanas, especialmente β -1,3-glucana e β -1,6-glucana; e mananas, porém os epítomos específicos desses polissacarídeos ainda não foram bem definidos. Receptores para outros importantes componentes da parede celular dos fungos, como quitina, α -1,3-glucana e polímeros de galactose, ainda não foram identificados (Latgé, 2010).

Os principais PRRs envolvidos no reconhecimento de fungos patogênicos são, como ilustra a Tabela 2: (a) os *C-type lectin receptors* (CLRs), que atuam na ativação da resposta imune inata e adaptativa, e incluem a dectina-1, dectina-2, DC-SIGN, receptor de manose e langerin (Brown, 2011) e os TLRs, que estão envolvidos no reconhecimento de zimozan, mannanas e DNA fúngico (Van de Veerdonk *et al.*, 2008). Os receptores de carboidratos apresentam domínios de reconhecimento (CRD) compostos por resíduos de aminoácidos altamente conservados, que permitem ligações estáveis formadas por pontes dissulfeto. Esses CRDs podem ser únicos ou múltiplos e alguns deles, como as colectinas, são multivalentes, ligando-se a mananas com diferentes resíduos terminais (Latgé, 2010).

Tabela 2. Interação de PRRs solúveis e de membrana com PAMPs presente na parede celular de fungos.

Polissacarídeos da parede celular	Ligantes solúveis	Receptores de membrana
Polímeros de manose ^a , α -1,3-glucanas	Ig	?
β -1,3-glucana	Ig Fragmentos de C3	Dectina-1 + TLR2 Langerin CR3 (CD11b/CD18) Receptor Scavenger
O-manana ^b	?	TLR4
N-manana ^b	Ig Colectinas	DC-SIGN Dectina 2
β -1,2-manana ^b	Ig	Galectina 3 + TLR2
β -1,6-glucana	Fragmentos C3	CR3

a. Heteropolímero de manana com resíduos de ácido glucurônico, xilose e galactose.

b. Estrutura com resíduos de manose somente.

C3, proteína do sistema complemento. CR3, receptor celular para C3. Langerin, lectina tipo C expressa em células de Langerhans. Receptor Scavenger, expresso em macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. DC-SIGN, receptor presente em células dendríticas. TLR, receptor do tipo toll. Dectina 2, lectina tipo C expressa em células do sistema imune inato e adaptativo. Galectina-3, Lectina específica para resíduos de galactose expressa em células epiteliais e fagocíticas (macrófagos). (Latgé 2010)

No caso específico de *A. fumigatus*, os carboidratos já descritos como candidatos a PAMPs são β -glucanas, quitina, galactomanana e α -glucana. Entretanto, o único PAMP bem caracterizado na superfície de *A. fumigatus* até o presente momento é a β -1,3-glucana, sendo a dectina-1 o principal receptor envolvido no reconhecimento desta molécula. Esse receptor pode atuar sinergicamente com o TLR2, induzindo a translocação do NF κ B que por sua vez promove a transcrição de genes pró-inflamatórios, com conseqüente produção de citocinas e quimiocinas (Gatner *et al.*, 2003). Tanto os TLRs quanto os CLRs, quando ativados, desencadeiam cascatas de sinalização que vão levar às vias canônicas ou não canônicas do NF κ B (Romani, 2011).

A expressão de carboidratos na superfície de *A. fumigatus* varia de acordo com o estado germinativo do fungo, o que modula a resposta imune do hospedeiro. Conídios de *A. fumigatus* em processo de germinação, por exemplo, expressam em sua superfície as β -1,3-glucanas, que por sua vez serão reconhecidas pela dectina-1 presente na superfície de macrófagos alveolares. Porém, no caso de conídios dormentes, esses carboidratos estão “mascarados” pela presença das hidrofobinas, especialmente a RodA. Dessa forma a fagocitose de conídios dormentes não é tão eficiente quanto à de conídios em processo de germinação (Luther *et al.*, 2007).

Além disso, a ativação fagócitos também pode ocorrer via TLR2 e TLR4, levando a geração de uma série de citocinas pró-inflamatórias como: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MIP-2, MIP-1, G-CSF e GM-CSF (Gersuk *et al.*, 2006). Porém, o envolvimento dos TLR nesse processo inflamatório ainda não está bem esclarecido. Foi descrito recentemente um possível mecanismo de escape de *A. fumigatus* mediado por TLR. Foi visto que conídios e hifas de *A. fumigatus* são capazes de inibir a resposta pró-inflamatória em macrófagos, através da supressão da expressão dos TLR2 e TLR 4 (Chai *et al.*, 2009). Essa supressão seria mediada pela inibição da secreção de IL-6 e TNF- α pelos macrófagos, e as moléculas da superfície celular do fungo, responsáveis por esses eventos, seriam a α -glucana, β -glucana e galactomanana. Através desse mecanismo o equilíbrio Th1/Th2 seria afetado, assim como os eventos antimicrobianos mediados por Th1, o que confere uma vantagem ao patógeno (Chai *et al.*, 2010).

1.7 A utilização de mutantes no estudo da interação de *A. fumigatus* com células do hospedeiro.

A utilização de mutantes no estudo da interação patógeno - hospedeiro pode ser uma valiosa ferramenta para a descoberta de moléculas e vias do patógeno envolvidas nos processos de adesão e dano a constituintes celulares do hospedeiro. Na aspergilose pulmonar invasiva, o *A. fumigatus* interage com dois principais tipos celulares do hospedeiro: as células epiteliais do pulmão e as células endoteliais. Por essa razão, alguns dos modelos de interação de *A. fumigatus* com células do hospedeiro se concentram na utilização desses dois tipos celulares. Neste tópico serão abordados alguns dos estudos de interação de mutantes de *A. fumigatus* com células epiteliais e endoteliais, descrevendo os possíveis genes envolvidos

nesse processo (Romano *et al.*, 2006; Chiang *et al.*, 2008; Gravelat *et al.*, 2009; Loussert *et al.*, 2010; Ejzykowicz *et al.*, 2010; Sharon *et al.*, 2011).

Mecanismos moleculares de *A. fumigatus* envolvidos no controle da adesão e dano celular causados ao hospedeiro ainda não foram bem elucidados. Em outros fungos patogênicos, como em *C. albicans*, alguns genes envolvidos na regulação desses processos já foram bem descritos. Dentre eles destacam-se o gene *ECM33*, uma proteína GPI - ancorada cuja função na levedura de *C. albicans* é controlar a habilidade do fungo em invadir e causar danos às células epiteliais; e o gene *BCRI*, que é um fator de transcrição responsável pelo controle da expressão de genes envolvidos na produção de biofilme e no controle da adesão desta levedura aos constituintes do hospedeiro (Nobile & Mitchell, 2005; Martinez-Lopez *et al.*, 2006; Orciulo *et al.*, 2007).

A descoberta de genes homólogos ao *BCRI* e ao *ECM33* em *A. fumigatus* levou a produção de mutantes que foram utilizadas em estudos de interação com células endoteliais e epiteliais do hospedeiro, e no estudo do envolvimento desses genes na virulência do fungo. Ejzykowicz *et al.* (2010) mostraram que o gene homólogo ao *BCRI* em *A. fumigatus* exerce uma regulação negativa quanto ao dano e ao estímulo inflamatório causado às células endoteliais e epiteliais. Isso foi verificado através de ensaios *in vitro* onde a mutante para este gene causou um maior estímulo à expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e TNF- α) por essas células, bem como um maior dano celular. Por esta razão esse grupo nomeou este gene de *DVRI* (*damage and virulence regulator*). Em relação ao estudo do controle da virulência por esse genes em modelos *in vivo*, tanto a mutante para o gene *DRVA*, quanto a mutante para o homólogo do gene *ECM33*, apresentaram um perfil hipervirulento em modelo murino para aspergilose invasiva (Romano *et al.*, 2006; Ejzykowicz *et al.*, 2010).

Outro gene já estudado na interação de *A. fumigatus* a células endoteliais e epiteliais do hospedeiro foi o gene *MEDA*. Esse gene já foi descrito como responsável pelo controle da transcrição de várias proteínas envolvidas na conidiogênese em *A. nidulans* (Busby *et al.*, 1996). A fim de estudar o envolvimento de *medA* no desenvolvimento e na virulência de *A. fumigatus*, Gravelat *et al.* (2009) produziram uma cepa mutante para este gene ($\Delta medA$). Neste trabalho, a cepa $\Delta medA$ apresentou deficiência na formação de conidióforo e biofilme; hipovirulência em modelos animais de aspergilose invasiva; além de menor adesão e uma menor capacidade de causar danos a células endoteliais e epiteliais do pulmão. Análises de carboidratos de superfície e do transcriptoma dessa mutante, indicaram que o gene *MEDA* controla a síntese da galactosaminogalactana (componente da hipotética MEC de hifas de *A.*

fumigatus). Esse controle ocorre através da regulação de um cluster no DNA que contém genes que atuam na biossíntese de carboidratos. Dentre esses genes está a UDP-glicose epimerase, cujo rompimento resultou em uma mutante com total deficiência na síntese de GAG, e bloqueio na adesão a superfícies inertes e a células epiteliais de pulmão (Gravelat *et al.*, 2011).

Outro gene que também atua na síntese de carboidratos, interferindo indiretamente na síntese de galactosaminogalactana é o *UGMI*. Este gene codifica a enzima UDP-galactopiranosose mutase, responsável pela conversão de resíduos de galactopiranosose a galactofuranose. Resíduos de galactofuranose são componentes essenciais de moléculas da parede celular do fungo como a galactomanana e glicoproteínas, além de compor moléculas de membrana celular como a lipofosfogalactomanana e esfingolipídios (Lamarre *et al.*, 2009). Contrariamente, a GAG é um polímero formado por resíduos de galactopiranosose (Loussert *et al.*, 2010). Portanto, Lamarre *et al.* (2009), criaram uma mutante para o gene *UGMI* ($\Delta ugmi$), cuja caracterização química da superfície celular indicou ausência de moléculas compostas por resíduos de galactofuranose e uma maior proporção de moléculas de GAG, compostas por resíduos de galactopiranosose (Lamarre *et al.*, 2009; Loussert *et al.* 2010).

Estudos *in vitro* realizados por Lamarre *et al.* (2009) mostraram que, coincidentemente ao aumento da expressão da galactosaminogalactana na superfície celular, esta mutante apresentou um fenótipo mais aderente a superfícies inertes e a células epiteliais de pulmão. Logo, os dados obtidos com a mutante $\Delta ugmi$ corroboram os observados para a mutante $\Delta medA$, indicando um forte envolvimento da galactosaminogalactana nos processos de adesão deste fungo a células do hospedeiro.

Contudo, a utilização de mutantes na interação de *A. fumigatus* não se resume apenas a eventos como adesão e dano celular. Mutantes para proteases e toxinas secretadas por *A. fumigatus* também já foram utilizadas para a avaliação do envolvimento de fatores secretados na virulência deste patógeno oportunista. A fim de verificar os efeitos causados por proteases secretadas por *A. fumigatus* sobre células epiteliais pulmonares, Sharon *et al.* (2011) incubaram essas células com filtrados de cultura de uma cepa mutante e uma selvagem de *A. fumigatus*. A cepa mutante utilizada neste estudo apresenta o gene *PRTT* deletado. Este gene codifica para um fator de transcrição responsável pela regulação de diversas proteases secretadas por esse fungo (Sharon *et al.*, 2009; Bergmann *et al.*, 2009). Esse grupo demonstrou que células epiteliais do pulmão quando expostas a filtrados de cultura da cepa selvagem de *A. fumigatus*, apresentam a via da MAPK ativada, enquanto que filtrados de

cultura da mutante $\Delta prtT$ não é capaz de causar o mesmo efeito nessas células. Essa via quando ativada, é responsável pelo controle de eventos no hospedeiro como: dano ao citoesqueleto de actina, redução da atividade metabólica e morte celular por necrose (Sharon *et al.*, 2011).

Outro estudo dos efeitos de fatores secretados por esse patógeno em células do hospedeiro foi realizado com uma cepa mutante para o gene responsável pela produção da gliotoxina ($\Delta gliP$). Ensaio de ativação endotelial mostram que hifas da cepa $\Delta gliP$, incubadas com HUVECs, estimularam a expressão de E-selectina nessas células de maneira semelhante ao estímulo causado por hifas da cepa selvagem (Chiang *et al.*, 2008).

Os trabalhos citados contribuíram de maneira significativa para a elucidação de alguns mecanismos moleculares utilizados pelo patógeno para aderir e causar danos ao hospedeiro. Contudo, ainda permanece o desafio de identificar receptores específicos nas células endoteliais e epiteliais para moléculas deste patógeno, bem como o desafio de elucidar as vias de sinalização no hospedeiro responsáveis pelo controle da resposta celular à infecção por *A. fumigatus*.

Neste sentido, no trabalho aqui apresentado, cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes ($\Delta crzA$, $\Delta calA$, $\Delta prtT$, $\Delta ugml$) foram utilizadas para o estudo dos processos celulares envolvidos na interação de *A. fumigatus* com células endoteliais.

As cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$ são mutantes para genes envolvidos nas vias de sinalização dependentes de cálcio em *A. fumigatus*. A mutante $\Delta calA$ possui o gene *CALA* deletado. Esse gene codifica para a subunidade catalítica da calcineurina, proteína envolvida na regulação da sinalização intracelular mediada por cálcio. Esse mutante apresenta defeitos no crescimento apical e na ramificação das hifas, quando cultivada em meio mínimo; e na arquitetura dos conídios (da Silva Ferreira *et al.*, 2006; Steinbach *et al.*, 2006). A cepa $\Delta crzA$, por sua vez, é uma mutante para o gene *CRZA*, um fator de transcrição que controla a expressão de genes dependentes de cálcio e calcineurina. Essa cepa mutante apresenta diminuição da produção e na arquitetura dos conídios e alteração nos níveis de expressão de transportadores de cálcio (Soriani *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2008). Em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, esse fator de transcrição é chamado de Crz1p e é controlado pela calcineurina. Em resposta ao aumento de cálcio intracelular, a calcineurina desfosforila o fator Crz1p presente no citoplasma, levando à sua translocação para o núcleo (Soriani *et al.*, 2008). Ambas as cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$ apresentaram fenótipo hipovirulento em modelo murino de aspergilose invasiva (Steinbach *et al.*, 2006; Soriani *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2008). Por fim, o fator de transcrição *crzA* pode

se tornar um alvo para drogas no tratamento da aspergilose invasiva, já que não existe um homólogo para este gene em mamíferos (Cramer *et al*, 2008). As cepas $\Delta prtT$ e $\Delta ugml$, por sua vez, já foram descritas nos parágrafos anteriores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a capacidade de cepas mutantes de *A. fumigatus* em ativar células endoteliais, avaliando o perfil de secreção de citocinas em meio condicionado e a expressão de fator tecidual. As cepas utilizadas neste estudo foram: Af293, Ku80 Δ *ugm1*; Δ *priT*, Δ *calA* e Δ *crzA*

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de internalização e adesão de conídios e tubos germinativos das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus* pelas células endoteliais (HUVECs);
- Comparar o padrão de secreção de citocinas e quimiocina pró-inflamatórias no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com conídios e tubos germinativos das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*;
- Avaliar a ativação endotelial nas monocamadas desafiadas com tubos germinativos de cada cepa mutante, através da análise quantitativa por RT-PCR em tempo real do fator tecidual (CD-142).

3 METODOLOGIA

3.1 Micro-organismos utilizados

Foram utilizadas duas cepas selvagens, Af293 e Ku80, gentilmente cedidas pelo Dr. Scott Filler da California University e Dr. Jean-Paul Latgé do *Institut Pasteur*, respectivamente. A cepa selvagem Af293 foi utilizada como referência em todos os ensaios, por se tratar da cepa utilizada no modelo de estudo da interação deste micro-organismo com células endoteliais humanas (Lopes-Bezerra *et al*, 2004). A selvagem Ku80 refere-se à cepa de referência da mutante $\Delta ugm1$. As cepas mutantes $\Delta crzA$ e $\Delta calA$ foram cedidas pelo Dr. Gustavo Goldman da USP-RP, a cepa $\Delta prtT$ cedida pelo Dr. Nir Osherov da *Tel-Aviv University* e a cepa $\Delta ugm1$ foi também cedida Dr. Jean-Paul Latgé do *Institut Pasteur*. Os genes deletados de cada cepa mutante estão representados na tabela 3.

Tabela 3: Cepas mutantes utilizadas no estudo da interação de *A. fumigatus* com HUVECs

Cepas mutantes	Gene deletado	Função biológica
$\Delta ugm1$	<i>UGM1</i>	Transcrição da enzima UDP-galactopiranosose mutase
$\Delta calA$	<i>CALA</i>	Transcrição da subunidade catalítica da calcineurina
$\Delta crzA$	<i>CRZA</i>	Codifica para o fator de transcrição <i>crzA</i>
$\Delta prtT$	<i>PRTT</i>	Codifica para o fator de transcrição <i>prtT</i>

3.2 Condições de cultivo dos micro-organismos:

3.2.1 Obtenção de conídios de *Aspergillus fumigatus*

As cepas selvagens e mutantes de *Aspergillus fumigatus* utilizadas neste estudo foram cultivadas em placas de Petri, em meio sólido YPD (Difco) ou Sabouraud (Difco). Para algumas mutantes o meio YPD foi suplementado com elementos traços (Tabela S3, Apêndice). Após 7 dias de crescimento em meio sólido a 37°C, os conídios foram extraídos das culturas de micélio, sob agitação suave, com solução de NaCl 0,15 M tamponada com fosfato 50 mM pH 7,4, com Tween 80 0,01% (v/v) (PBS-T – Tabela S1, Apêndice), e isolados por centrifugação a 4000 g por 5 minutos, a 4°C. Os conídios foram então lavados duas vezes com PBS pH 7,4 (Tabela S1, Apêndice). Os conídios assim isolados foram então contados em câmara de Neubauer. Para os ensaios de interação com conídios mortos das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, os conídios foram incubados com timerosal (Quimibrás) 0,02% (v/v) em solução salina tamponada, por pelo menos 12 horas a 4°C, sendo posteriormente lavados duas vezes com solução salina HANK'S, e contados na câmara de Neubauer. Os conídios viáveis ou inviáveis (tratados com timerosal) foram suspensos em meio 199 completo (tabela S2, Apêndice) para os ensaios de interação com células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVECs).

3.2.2 Obtenção de tubos germinativos de *Aspergillus fumigatus*

Para obtenção dos tubos germinativos (TG) das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, os conídios obtidos, como descrito acima, foram suspensos em meio Sabouraud líquido ou YD (Tabela S2, apêndice), para uma concentração final de 10^6 conídios/mL. Para algumas mutantes o meio YD foi suplementado com elementos traços. Um volume de 15 mL desta suspensão de conídios foi incubada em placas de Petri de 150 mm previamente tratadas com gelatina 0,2 % (p/v) por 6 horas, a 37 °C, sendo a diferenciação monitorada em microscópio invertido (Figura 12). Todas as cepas apresentaram o mesmo perfil de germinação. O meio foi aspirado com pipeta Pasteur estéril e as células (tubos germinativos) aderidas à placa de Petri, foram lavadas com PBS. Para os ensaios de interação com tubos

germinativos inviáveis (TG morto) estas células foram incubadas com timerosal 0,02% (v/v) em salina tamponada por pelo menos 12 horas, a 4°C. Nos ensaios com tubos germinativos viáveis, as células foram deixadas por 12 horas à 4°C na presença de PBS glicose 0,2 % pH 7,4. Após esse período de incubação, as células foram retiradas da placa de Petri com auxílio de um *cell scraper*, e lavadas duas vezes com solução salina de HANK'S. Os tubos germinativos viáveis e inviáveis (tratados com timerosal) foram contados na câmara de Neubauer, e suspensos Meio 199 completo para os ensaios de interação com monocamadas confluentes de HUVECs (Figura 12A).

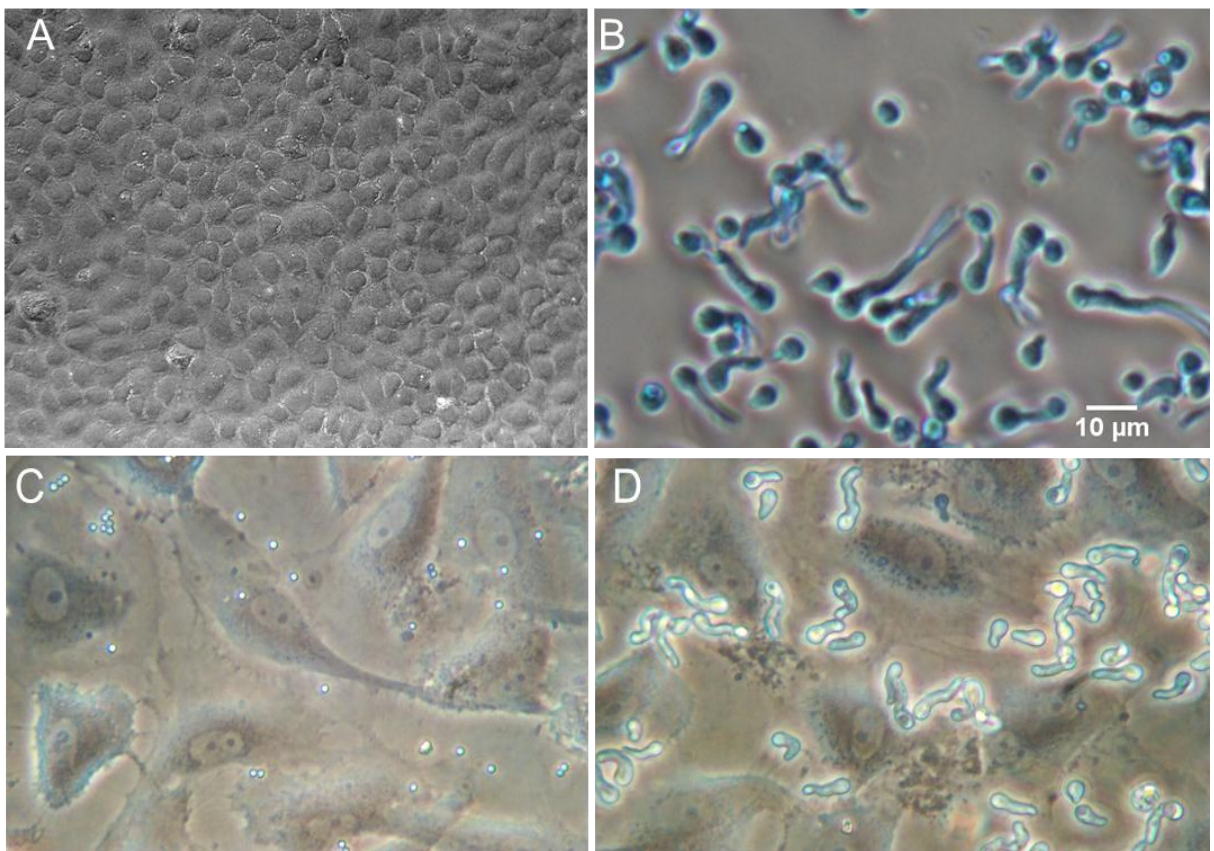


Figura 12. (A) Monocamadas confluentes de HUVECs. Aumento de 200x; (B) Tubos germinativos da cepa selvagem de *A. fumigatus* obtidos a partir de conídios incubados por 6 horas em meio Sabouraud líquido. Corados com lactofenol azul de algodão. Aumento de 400x. Microscopia de contraste de fase da interação de conídios (C) e tubos germinativos (D) da cepa selvagem de *A. fumigatus* com monocamadas confluentes de HUVEC. Aumento de 400x. (Lopes-Bezerra, comunicação pessoal).

3.3 Cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano

As células endoteliais da veia umbilical humana foram isoladas seguindo-se o método descrito por Jaffe *et al.* (1973), modificado por Lopes-Bezerra & Filler (2004). Brevemente, os cordões umbilicais eram coletados semanalmente na Maternidade Carmela Dutra (aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro, número de protocolo 196/09) e após a coleta, uma cânula acoplada a uma seringa era introduzida na veia umbilical de cada cordão umbilical. Feito isso, a veia era lavada com tampão cordão (Tabela S1, Apêndice), e as células endoteliais eram isoladas a partir da incubação a 37°C por 5 minutos em solução de colagenase IV 0,1% (p/v) (Sigma). As células endoteliais extraídas foram então suspensas em meio 199 puro (Tabela S2, apêndice) e sedimentadas por centrifugação a 290 x g, durante 10 min a 25°C. Por fim, o precipitado foi suspenso em meio 199 completo, e transferido para uma garrafa de cultura celular de 25 cm² (Nunc), cuja superfície foi previamente recoberta com gelatina 0,2% (Sigma). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% CO₂, até a obtenção de monocamadas confluentes (culturas primárias) (Figura 12).

Para obtenção das subculturas de primeira (P1) e segunda passagem (P2), as culturas primárias em confluência foram tripsinizadas, utilizando-se 0,025% de tripsina e 0,2% EDTA (Gibco) em PBS. A reação de tripsinização foi paralisada com meio 199 completo. Desta forma as células endoteliais utilizadas nos experimentos de interação mantinham sua integridade fenotípica (Bachetti & Morbidelli, 2000). Todas as interações com células endoteliais foram realizadas na presença de meio 199 completo a 37°C, e em atmosfera de 5% de CO₂.

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

Para os ensaios de adesão e internalização, células endoteliais (P1) foram cultivadas sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro previamente tratadas com fibronectina 0,001% (v/v) em solução salina de HANK'S (Cultilab), em placas de cultura de 24 poços (Corning). Atingida a confluência, as monocamadas de células endoteliais foram infectadas com conídios ou tubos germinativos (Figura 12) viáveis das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 45 minutos, conforme descrito por Lopes-Bezerra & Filler (2004).

Após a interação das monocamadas de células endoteliais com as cepas listadas de *A. fumigatus*, o meio de cultura foi aspirado e as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 3% (p/v), sendo posteriormente lavadas uma vez com PBS pH 7,4 e incubadas com tampão de bloqueio (Tabela S1, Apêndice) por 12 horas a 4°C. O bloqueio das células foi seguido de incubação com soro policlonal de coelho anti-*Aspergillus fumigatus* (gentilmente cedido pelo Dr. Jean-Philippe Bouchara, Université D'Angers, France), na diluição de 1:100 em PBS-BSA (Tabela S1, Apêndice), por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as monocamadas foram lavadas três vezes com PBS-BSA e depois incubadas com anti-IgG de coelho conjugada a Alexa Flúor 568 (Molecular Probes) na concentração de 1µg/mL em PBS-BSA, por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Essa etapa foi realizada para marcar os micro-organismos não internalizados com fluorescência vermelha. Posteriormente, as células endoteliais foram lavadas com PBS-BSA e permeabilizadas por 6 minutos com solução de Triton X-100 0,1% (v/v) em PBS pH 7,4. Após nova etapa de lavagem com PBS pH 7,4, as lamínulas foram incubadas com solução de Uvitex 1% (p/v) em PBS pH 7,4 por 30 minutos, no escuro. Dessa forma, tanto os organismos internalizados quanto os não internalizados foram marcados com fluorescência azul.

Após a marcação com os fluorocromos, as lamínulas foram então montadas sobre lâminas, com solução de *Slow Fade* (Molecular Probes). Os organismos aderidos e internalizados às células endoteliais foram visualizados em microscópio de fluorescência (Olympus IX71/IX51). Foi quantificado o número total de organismos interagidos com as monocamadas confluentes de HUVEC, marcados com UVITEX; e o número de organismos aderidos marcados pelo Alexa Flúor 568. Desta forma, o número de organismos endocitados pelas células endoteliais foi determinado pela subtração do número de organismos aderidos às células (fluorescência vermelha) pelo número total de micro-organismos interagidos (fluorescência azul). Os valores encontrados foram expressos por número de organismos por campo. Os parâmetros adotados para a contagem dos organismos foram: mínimo de 10 campos e um total mínimo de 100 micro-organismos. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em duplicata ou triplicata.

3.5 Dosagem de IL-6, IL8 e TNFalfa em meio condicionado de culturas de HUVEC após interação com *Aspergillus fumigatus*

Com o objetivo de traçar uma cinética do perfil de secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais infectadas com tubos germinativos das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, foi realizada a dosagem das citocinas IL-6 e TNF-alfa, e da quimiocina IL-8 no meio condicionado. Foi feita uma curva cinética de secreção destas moléculas nos tempos de interação de 4, 8 e 16 horas. Células endoteliais (P1) foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) previamente tratadas com fibronectina 0,001% (p/v) diluída em solução salina de HANK'S (Cultilab). Atingida a confluência, as monocamadas endoteliais foram infectadas com tubos germinativos das cepas selvagens e mutantes numa proporção fungo:célula endotelial de 2:1. Após a interação, o meio condicionado Foi retirado com auxílio de pipeta, sendo centrifugado a 1000 g por 15 minutos a 4⁰C, para retirada de possíveis fragmentos celulares ou de células em suspensão. Posteriormente foram dosados IL-6, IL-8 e TNF- α nos sobrenadantes por um ELISA Multiplex (Millipore). O aparelho utilizado para a leitura das placas de multiplex foi o Luminex 200 (BioRad).

Para avaliar comparativamente a expressão de citocinas em monocamadas infectadas com tubos germinativos e conídios, foram realizados ensaios no tempo de interação de 16 horas, porém desafiando-se monocamadas confluentes de HUVEC com conídios e tubos germinativos inviáveis (mortos), nas mesmas condições experimentais anteriores.

Experimentos de interação com células do morfotipo tubo germinativo foram realizados 2 vezes, com duplicatas experimentais. Os experimentos de interação com conídios foi realizada uma vez, com triplicatas experimentais. Os controles negativos referem-se ao meio condicionado das culturas de HUVEC não infectadas.

3.6 Análise da ativação endotelial por RT-PCR em tempo real

Com o objetivo de verificar e quantificar a ativação endotelial, monocamadas endoteliais foram infectadas com tubos germinativos das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, e foi avaliada a expressão gênica do fator tecidual (CD142) através da técnica de RT-PCR em tempo real. Nestes ensaios, culturas confluentes de HUVEC foram obtidas em placas de 6 poços (Corning) previamente tratadas com gelatina 0,2% (p/v). As monocamadas foram desafiadas

com tubos germinativos mortos, tanto das cepas selvagens quanto das cepas mutantes de *A. fumigatus*. Após 16 horas de interação, o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas uma vez com meio 199 puro, pré-aquecido a 37 °C. Em seguida, as células foram tripsinizadas, como anteriormente descrito, para obtenção das mesmas em suspensão, para posterior extração de RNA.

Na extração do RNA foi utilizado o *RNeasy mini kit* (QIAGEN) e a extração foi realizada segundo as instruções do fabricante. Para verificação da integridade do RNA extraído, uma alíquota foi fracionada em gel de agarose 1 % (p/v), o gel foi então corado com brometo de etídio e o padrão de bandamento do RNA foi observado em transiluminador com luz ultravioleta. A presença de duas bandas de RNA ribossomal 28S e 18S foi utilizada como critério para confirmação da integridade do RNA. Após a verificação da integridade, 10 µg de RNA foram tratadas com solução de *RNase-free DNase* (Tabela S1, Apêndice), e a reação ocorreu a 37°C por 60 minutos, sendo parada com incubação a 70°C por 30 min. Por fim, as amostras foram quantificadas em *NanoDrop 2000 spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o *ABI 7500 fast real-time PCR System* (Applied Biosystems) e o kit *Taq-Man Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As condições para o PCR em tempo real foram: passo inicial a 50°C por dois minutos; trinta minutos a 60°C para a reação da transcriptase reversa; 95°C por 5 minutos; e 40 ciclos, com 1 ciclo de vinte segundos a 94°C e um ciclo de um minuto a 60°C. Os cálculos foram realizados segundo Semighini *et al.* (2002). As sondas *Lux* (Invitrogen) utilizadas no ensaio estão discriminadas na Tabela S4, no Apêndice. Esses experimentos foram realizados 2 vezes, com duplicatas experimentais.

3.7 Estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Interação, adesão e endocitose de conídios e tubos germinativos de *A. fumigatus* por com células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC)

Conídios e tubos germinativos inviáveis (tratados com timerosal) das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus* foram interagidos com monocamadas confluentes de HUVEC, por 45 minutos, à 37°C e 5 % de CO₂. O número de organismos endocitados e aderidos foi determinado por imunofluorescência diferencial. O número de organismos aderidos foi obtido pela subtração do número total de organismos interagidos (marcação com UVITEX) pelo número de organismos aderidos mas não endocitados (marcados pelo conjugado com ALEXA 568), como representado pela imagem de microscopia confocal (Figura 13). Foi então determinado o número de organismos associados à monocamada endotelial, o número de organismos aderidos e o número de organismos endocitados pelas HUVECs após 45 minutos interação.

Como ilustrado na Figura 13, os conídios da cepa $\Delta ugml$ apresentaram uma maior adesão às células endoteliais em relação às duas cepas selvagens, Af293 e Ku80. Estas, por sua vez, apresentaram resultados similares entre si e ao modelo anteriormente descrito (Lopes-Bezerra & Filler, 2004). Diferenças significativas em relação às cepas selvagens também foram observadas quanto ao número total de organismos interagidos e quanto ao número de organismos endocitados das cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$ (Figura 14).

Quanto à interação de tubos germinativos das cepas selvagem e mutantes de *A. fumigatus* com monocamadas confluentes de HUVEC, a figura 15 mostra que, comparativamente à cepa selvagem Af293, os tubos germinativos da cepa $\Delta ugml$ apresentam uma maior taxa de adesão às células endoteliais. Diferenças na taxa de adesão de tubos germinativos às HUVECs também foram observadas em relação à cepa $\Delta crzA$, no entanto, neste caso, houve uma diminuição significativa da interação. Os tubos germinativos desta cepa apresentaram não só uma menor taxa de adesão às células endoteliais, como também uma taxa de endocitose significativamente menor em relação aos tubos germinativos da cepa Af293. Neste ensaio somente a cepa selvagem Af293 (cepa de referência) foi utilizada como controle, uma vez que os dados com as duas cepas selvagens são similares no modelo *in vitro*.

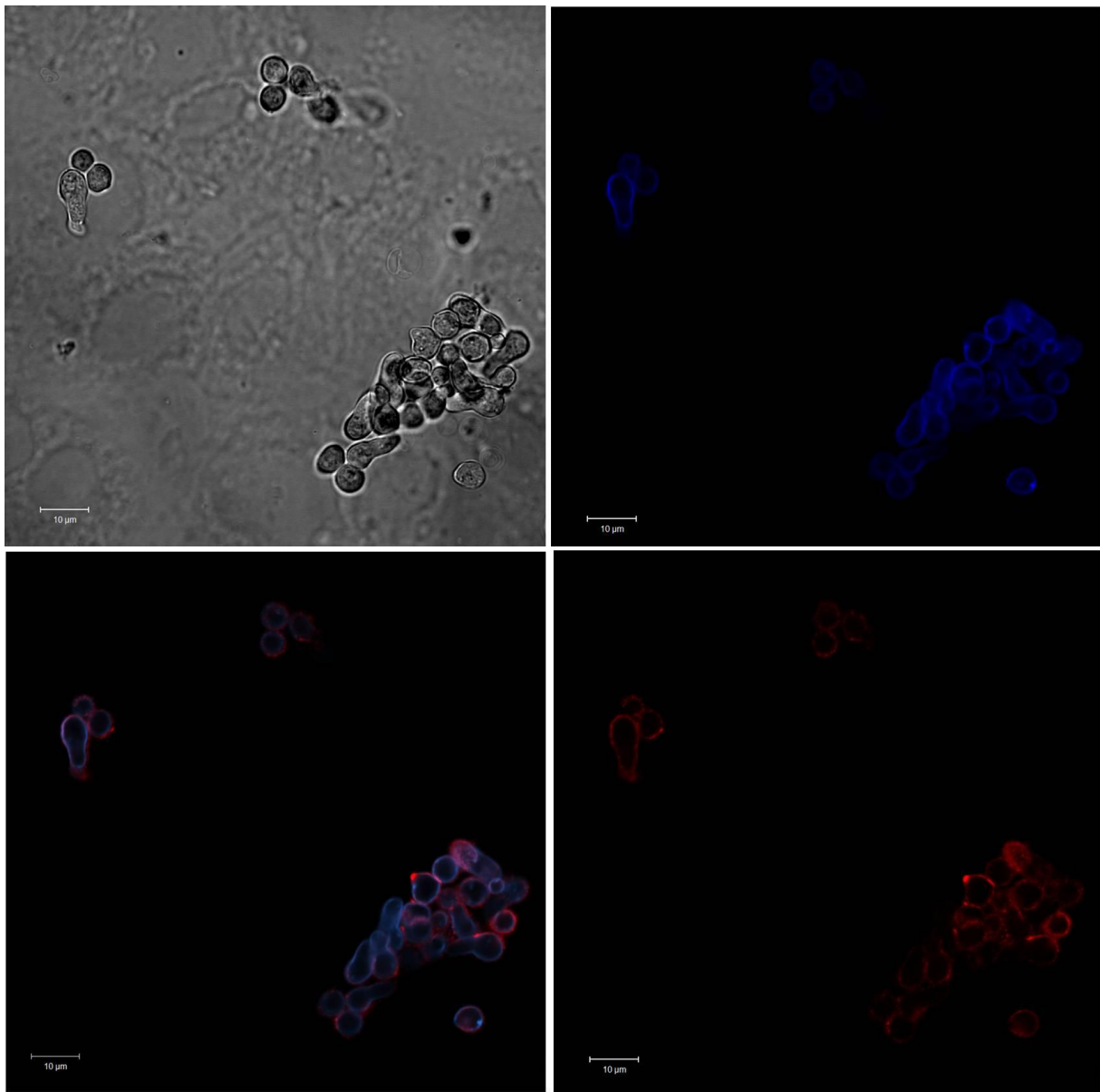


Figura 13. Representação do ensaio de imunofluorescência diferencial a partir da interação de HUVECs com TGs da cepa Af293. Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas por 45 minutos com tubos germinativos da cepa selvagem Af293 de *A. fumigatus*. O número total de organismos foi determinado pela contagem dos TGs corados em azul (Uvitex) e o número de organismos aderidos foi determinado pela contagem dos TGs corados em vermelho (Alexa flúor 568). Aumento de 630 x. Barra de 10 µm.

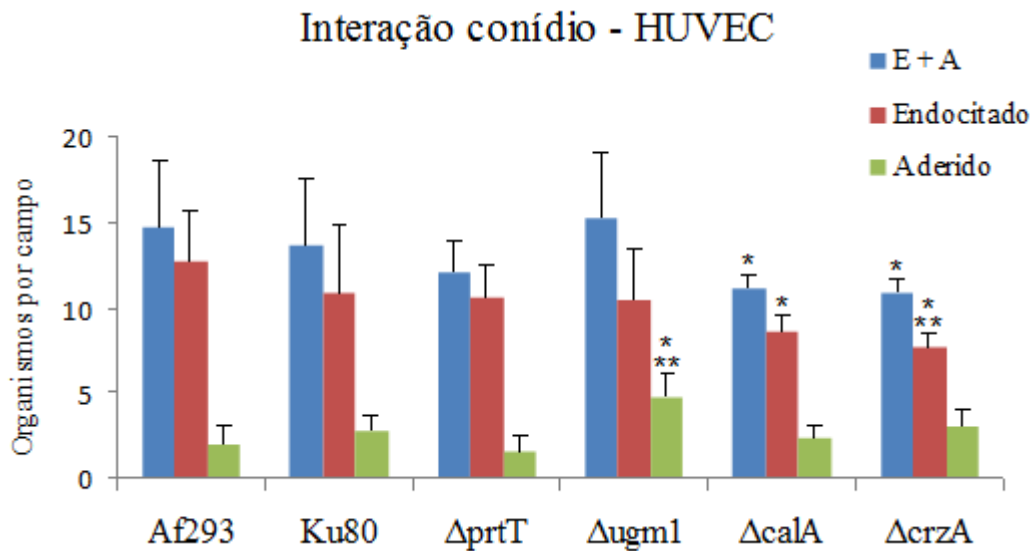


Figura 14. Interação de conídios das cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes ($\Delta ugm1$, $\Delta prtT$, $\Delta calA$ e $\Delta crzA$) de *A. fumigatus* com células endoteliais humanas. Os conídios foram incubados com monocamadas confluentes de HUVECs por 45 minutos, sendo o número total de organismos (Endocitado + Aderido), bem como, o número de organismos aderidos ou endocitados determinado por ensaio de imunofluorescência diferencial. Os resultados expressos correspondem a média \pm o DP de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ em relação à cepa Af293 e ** $P < 0,05$ em relação a cepa Ku80.

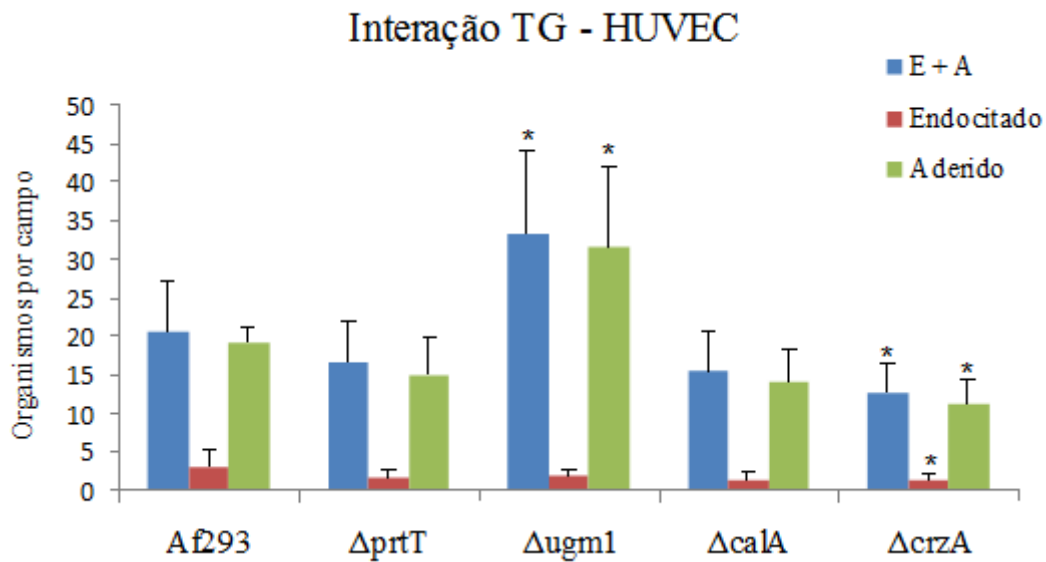


Figura 15. Interação de tubos germinativos (TG) das cepas selvagem (Af293) e mutantes ($\Delta ugm1$, $\Delta prtT$, $\Delta calA$ e $\Delta crzA$) de *A. fumigatus* com células endoteliais humanas. Os TGs foram incubados com monocamadas confluentes de HUVECs por 45 minutos, sendo o número total de organismos (Endocitado + Aderido), bem como, o número de organismos aderidos ou endocitados determinado por ensaio de imunofluorescência diferencial. Os resultados expressos no gráfico correspondem a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ em relação à cepa selvagem.

4.2 Cinética da secreção de citocinas pró-inflamatórias e da IL-8 no meio condicionado de HUVEC após interação com tubos germinativos de diferentes cepas de *A. fumigatus*

A fim de realizar uma cinética do perfil de secreção da quimiocina IL-8 e das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α por células endoteliais desafiadas com tubos germinativos das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus*, os meios condicionados foram coletados após 4, 8 e 16 horas de interação. As interações foram realizadas nas mesmas condições experimentais que o ensaio anterior, para uma relação E:T de 2:1. As citocinas IL-6 e TNF- α e a quimiocina IL-8 foram dosadas através de um ensaio multiplex. Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de culturas de HUVEC não interagidas.

Conforme representado pela figura 16, após 4 e 8 horas de interação, as cepas selvagens foram capazes de estimular um aumento significativo na secreção de IL-6 pelas células endoteliais, em relação ao controle. Em compensação, após 16 horas de interação essa diferença embora ainda evidente, não foi estatisticamente significante (Figura 16A). Em relação às cepas mutantes, a cepa $\Delta ugm1$ foi aquela que mais estimulou significativamente a secreção de IL-6 e TNF- α pelas células endoteliais (Figura 16). Os níveis das citocinas e desta quimiocina nos sobrenadantes das culturas HUVEC com tubos germinativos desta mutante foram significativamente maiores que os níveis dosados no controle não interagido, para todos os tempos de interação. Além disso, após 16 horas de interação com HUVECs, o estímulo causado pela $\Delta ugm1$ na secreção de IL-6 foi significativamente maior ao estímulo causado pelas cepas selvagens, que sabidamente ativam a célula endotelial. Em relação ao TNF- α , essa diferença foi observada nos tempos de 8 e 16 horas de interação (Figura 16B). No entanto, o resultado para a cepa $\Delta ugm1$ em relação aos níveis de IL-8 foi similar às cepas selvagens (Figura 17).

Com relação as demais cepas mutantes, cabe destacar que a cepa $\Delta prtT$ estimulou um aumento significativo nos níveis de IL-6 secretados pelas HUVECs após 4 horas de interação, quando comparada ao controle não interagido. Porém, este aumento não foi evidente nos tempos de 8 e 16 horas. O perfil cinético da secreção de IL-6 observado para esta mutante no meio condicionado das células endoteliais, foi bastante similar ao observado com as duas cepas selvagens. Quanto ao estímulo dos tubos germinativos dessa cepa na secreção de IL-8 e TNF- α pelas HUVECs, foram observadas diferenças significativas em relação ao controle para todos os tempos de interação realizados. Porém, mais uma vez o perfil foi muito similar ao observado nos ensaios com as cepas selvagens. Desta forma, não foram observadas

diferenças significativas em relação à cinética de secreção de IL-6, IL-8 e TNF- α no meio condicionado das células endoteliais interagidas com tubos germinativos da cepa $\Delta priT$, e das cepas selvagens.

A interação de monocamadas confluentes de HUVEC com tubos germinativos das cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$ mostrou que estas mutantes não foram capazes de estimular de maneira significativa a secreção de IL-6, IL-8 e TNF- α pelas células endoteliais quando comparado ao perfil de secreção destas induzido pelas cepas selvagens (Figura 16, A e B e Figura 17). Dentre estas duas mutantes, só foi observado um aumento significativo nos níveis de IL-8 e TNF- α para a cepa $\Delta calA$, em relação ao controle não interagido, após 8 e 16 horas de interação respectivamente. No geral, podemos afirmar que o perfil de secreção de IL-6, IL-8 e TNF- α pelas células endoteliais após interação com essas duas mutantes, $\Delta calA$ e $\Delta crzA$, foi semelhante ao perfil apresentado pelo controle não interagido.

Cabe destacar, que ao contrário do estímulo observado no meio condicionado das células endoteliais induzido pela hifa, no caso de $\Delta calA$ e $\Delta crzA$, os níveis observados para IL-8 após 16 horas e para TNF- α após 4 ou 8 horas de interação dos tubos germinativos com as HUVECs foram significativamente menores aos controles com as cepas selvagens (Figuras 16B e 17).

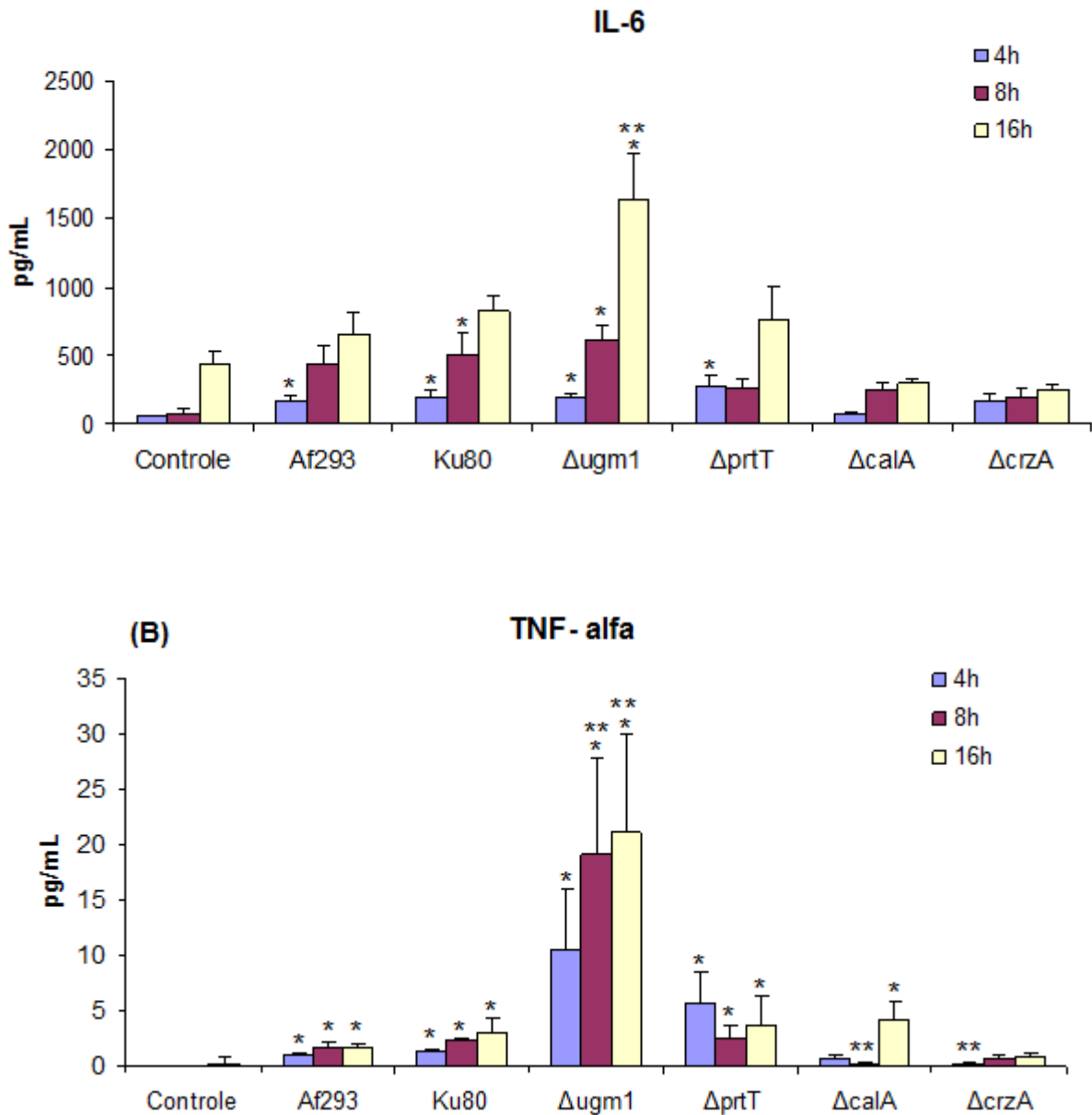


Figura 16. Cinética da secreção de citocinas pró-inflamatórias no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes (Δ ugm1, Δ prtT, Δ calA e Δ crzA) de *A. fumigatus*. Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com TGs dessas cepas e o meio condicionado foi coletado após 4, 8 e 16 horas de interação. Os níveis de IL-6 (A) e TNF- α (B) foram determinados através de um ensaio multiplex. Os resultados obtidos são a média \pm EP de dois experimentos independentes em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao controle não interagido e ** $P < 0,05$ comparado às cepas selvagens (Af293 e Ku80).

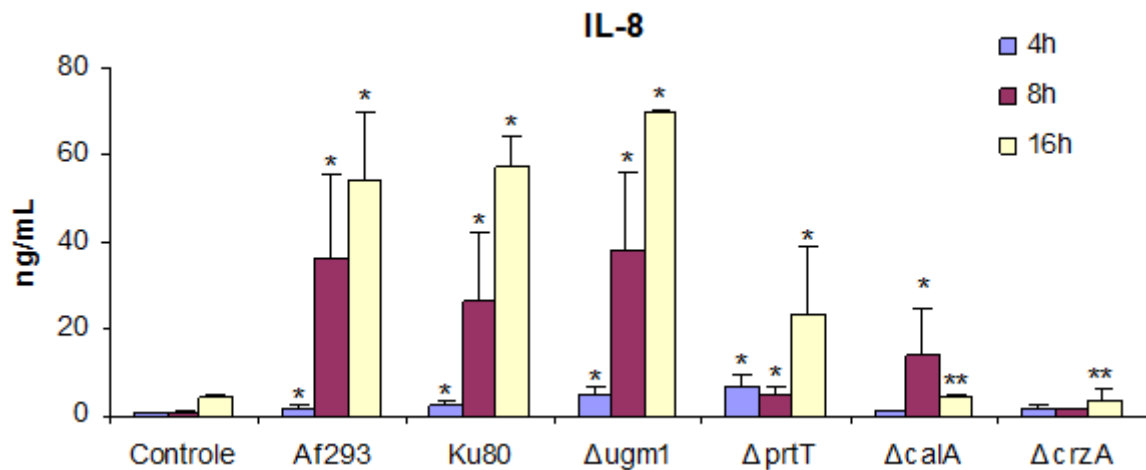


Figura 17. Cinética da secreção da quimiocina pró-inflamatórias IL-8 no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com TG das cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes ($\Delta ugm1$, $\Delta prtT$, $\Delta calA$ e $\Delta crzA$) de *A. fumigatus*. Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com TGs dessas cepas e o meio condicionado foi coletado após 4, 8 e 16 horas de interação. Os níveis de IL-8 foram determinados através de um ensaio multiplex. Os resultados obtidos são a média \pm EP de dois experimentos independentes em duplicata. * $P < 0,05$ comparado ao controle não interagido e ** $P < 0,05$ comparado às cepas selvagens (Af293 and Ku80).

4.3 Comparação do perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias e da IL-8 no meio condicionado de HUVEC após interação com conídios e tubos germinativos de *A. fumigatus*

Com o objetivo de avaliar comparativamente a secreção das citocinas IL-6 e TNF- α , e a quimiocina IL-8 no meio condicionado, após interação de HUVECS com conídios de *A. fumigatus* das diferentes cepas estudadas, o sobrenadante de cultura de HUVEC foi coletado após 16 horas de interação. Os resultados foram comparados ao perfil de secreção destas moléculas em culturas desafiadas com tubos germinativos, após 16 horas de interação.

Como observado na Figura 18 e 19, os conídios das cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus* não foram capazes de estimular a secreção de TNF- α e IL-8, em comparação ao estímulo induzido pela interação das células endoteliais com tubos germinativos.

No entanto, os conídios de todas as cepas foram capazes de estimular a secreção de IL-6 da mesma forma que os tubos germinativos, sendo observado para algumas mutantes como as cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$, uma indução maior pelos conídios em relação aos níveis determinados para o ensaio de interação com tubos germinativos (Figura 18A).

Nossos resultados demonstram que, aparentemente nos tempos estudados, os conídios das diferentes cepas de *A. fumigatus* não causam estímulo suficiente para aumentar a secreção de IL-6, IL-8 e TNF- α pelas células endoteliais, uma vez que apresentando meio condicionado níveis semelhantes ao controle de HUVECs não interagidas, com destaque para as cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$.

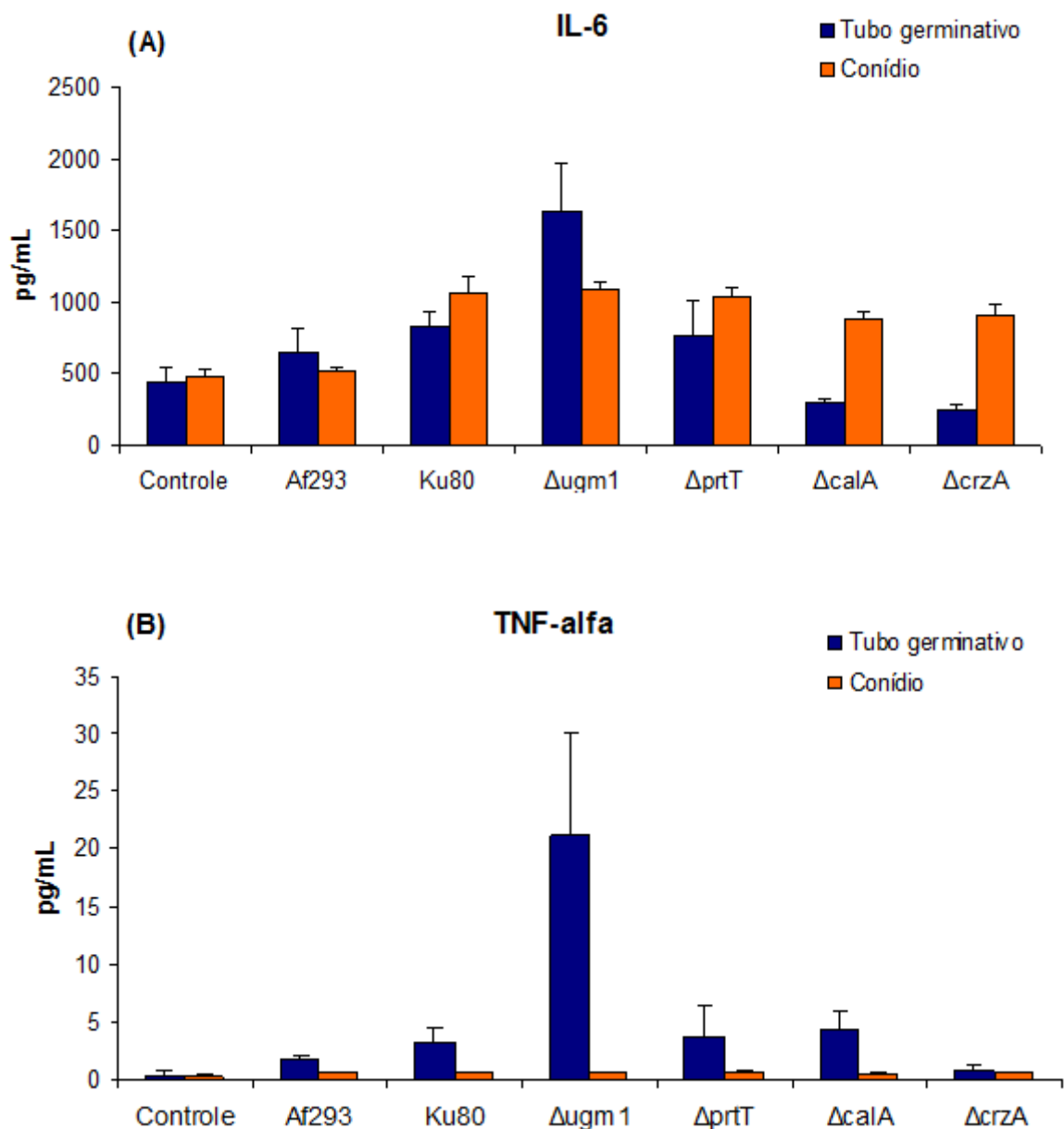


Figura 18. Secreção de citocinas pró-inflamatórias no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com conídios e TG das cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes (Δ ugm1, Δ prtT, Δ calA e Δ crzA) de *A. fumigatus*. Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com conídios e TG dessas cepas por 16 horas e o meio condicionado foi coletado para dosagem de IL-6 (A), TNF- α (B) através de um ensaio multiplex. Os resultados obtidos são a média \pm EP de 1 experimento em triplicata realizado com conídios e dois experimentos independentes em duplicata realizados com TG.

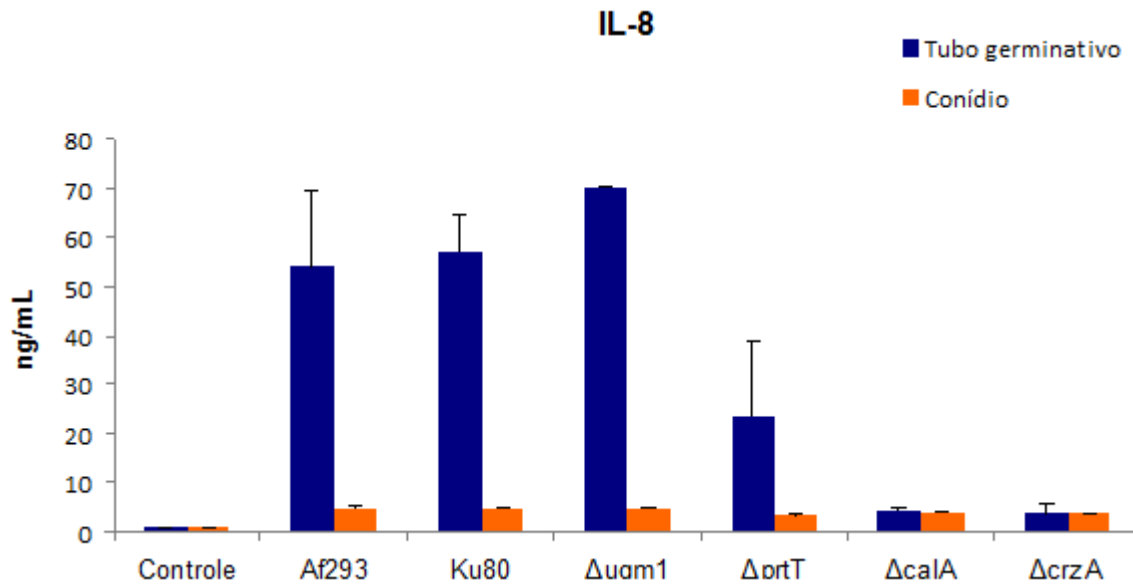


Figura 19. Secreção da quimiocina pró-inflamatória IL-8 no meio condicionado de culturas de HUVEC interagidas com conídios e TG das cepas selvagens (Af293 e Ku80) e mutantes ($\Delta ugm1$, $\Delta prtT$, $\Delta calA$ e $\Delta crzA$) de *A. fumigatus*. Monocamadas confluentes de HUVEC foram incubadas com conídios e TG dessas cepas por 16 horas e o meio condicionado foi coletado para dosagem de IL-8 através de um ensaio multiplex. Os resultados obtidos são a média \pm EP de 1 experimento em triplicata realizado com conídios e dois experimentos independentes em duplicata realizados com TG.

4.4 Análise da ativação endotelial por RT-PCR em tempo real

Para verificar se as diferenças no perfil de secreção de citocinas no meio condicionado correspondia a um fenótipo de ativação endotelial, perfil pró-trombótico, foi avaliada a expressão do fator tecidual por RT-PCR em tempo real. Para isso, monocamadas confluentes de HUVEC foram desafiadas com tubos germinativos de todas as cepas por 16 horas, e o RNA extraído foi utilizado para produção do cDNA com posterior quantificação por PCR em tempo real.

Sendo os dados quantitativos, a expressão do fator tecidual foi normalizada em relação à expressão do gene constitutivo GAPDH (controle interno). Os resultados apresentados correspondem à expressão gênica do fator tecidual relativa à expressão obtida a partir do controle de HUVEC não interagido. De acordo com a figura 20, a mutante $\Delta ugm1$ foi a cepa que induziu uma maior expressão de fator tecidual pelas células endoteliais. A expressão de fator tecidual pelas células endoteliais desafiadas com essa mutante foi praticamente o dobro da expressão induzida pelas duas cepas selvagens, Af293 e Ku80.

Como esperado, as cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$ estimularam uma expressão de fator tecidual equivalente ao controle de HUVEC não interagido, o que corrobora os dados anteriores relativos a secreção de citocinas. O nível de expressão de fator tecidual das células endoteliais desafiadas com essas duas mutantes foi aproximadamente a metade daquele observado nestas células hospedeiras após interação com as cepas selvagens.

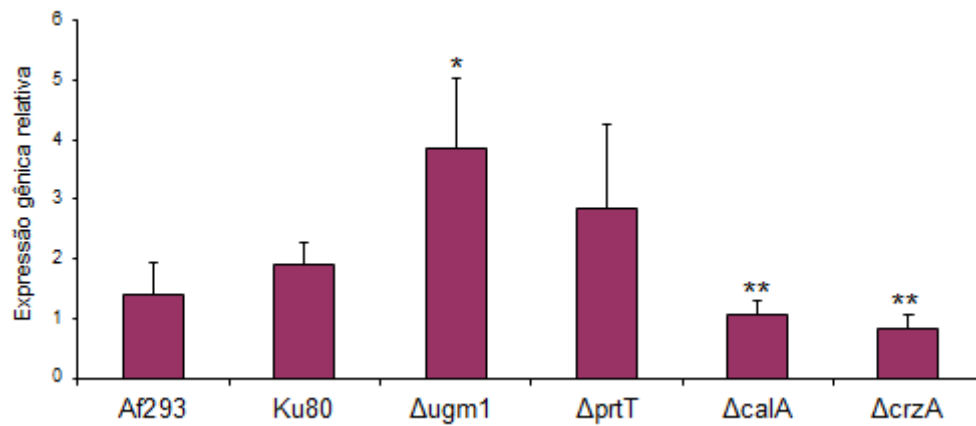


Figura 20. RT-PCR em tempo real mostrando a expressão de fator tecidual por HUVECs infectadas com cepas selvagens e mutantes de *A. fumigatus* relativo à expressão observada por HUVECs não infectadas. Monocamadas de HUVECs foram incubadas com tubos germinativos das cepas listadas de *A. fumigatus* por 16 horas e a expressão de fator tecidual foi quantificado por RT-PCR em tempo real. Dados foram normalizados com a expressão constitutiva de GAPDH. Resultados são a média \pm DP de dois experimentos independentes em duplicata. * $P < 0,05$ comparado às cepas selvagens e ** $P < 0,05$ comparado à cepa selvagem Ku80.

5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas invasivas sofreu um crescimento gradativo, principalmente devido ao aumento no número de pacientes submetidos a terapias imunossupressoras. Apesar do desenvolvimento de drogas antifúngicas mais eficazes e menos tóxicas, e da utilização dessas drogas como terapia profilática, as infecções fúngicas invasivas ainda são responsáveis pelos elevados índices de mortalidade entre pacientes de Unidades Hematológicas, dentre outros (Alangaden, 2011). Dentre as IFIs, destaca-se a aspergilose invasiva, uma doença sistêmica que acomete principalmente pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou com leucemia aguda (Denning, 1998; Rhodes, 2006; Stevens 2008). Uma das mais relevantes características do agente etiológico da aspergilose invasiva, o fungo filamentosso *A. fumigatus*, é o seu caráter angioinvasivo. Isto leva a um quadro grave de trombose associado ou não a hemorragias, e de infarto tecidual, levando a falência de órgãos vitais (Lopes-Bezerra & Filler 2004, Kamai *et al.*, 2009). O estudo da relação deste patógeno com o endotélio vascular, revela que as hifas deste fungo, por contato com células endoteliais são capazes de ativar estas células e induzir um fenótipo pró-trombótico (Kamai *et al.*, 2006)

Os eventos protrombóticos desencadeados a partir do contato de hifa-endotélio estão intimamente relacionados aos eventos inflamatórios desencadeados por essa interação. Foi demonstrado que as hifas deste fungo são capazes de estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais que regulam e estimulam a ativação endotelial. A principal citocina pró-inflamatória envolvida nestes processos é o TNF- α , que estimularia de maneira parácrina e/ou autócrina a expressão de fator tecidual (Chiang *et al.*, 2008; Kamai *et al.*, 2009). Porém não apenas a secreção de citocinas é estimulada por *A. fumigatus*, mas também a expressão de quimiocinas e de moléculas de adesão leucocitária, como IL-8, E-selectina e VCAM, respectivamente (Chiang *et al.*, 2008).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar e comparar os eventos celulares envolvidos na interação de cepas mutantes de *A. fumigatus* com células endoteliais (HUVEC), as mutantes escolhidas apresentavam algum fenótipo de virulência ou de alterações na interação com o hospedeiro, previamente descritos. Neste estudo foi utilizado o modelo de infecção luminal do endotélio vascular, como descrito por Lopes-Bezerra & Filler (2004). A utilização de cepas mutantes de *A. fumigatus* neste estudo serviu como estratégia metodológica para a busca de fatores ou moléculas do patógeno responsáveis por mediar

eventos de adesão, com a subsequente ativação endotelial. Cepas mutantes de *A. fumigatus*, para diferentes genes, já foram utilizadas em estudos anteriores de interação de *A. fumigatus* com células epiteliais e endoteliais, indicando o envolvimento de carboidratos da superfície celular deste fungo na adesão, ativação e no dano causado a células do hospedeiro (Sheppard, 2011). Visto que a maioria das mutantes utilizadas nesse trabalho possui diferenças estruturais na superfície celular, possíveis mecanismos compensatórios utilizados por esse fungo devem ser levados em consideração para a interpretação dos resultados apresentados.

A adesão do micro-organismo patogênico ao hospedeiro é um evento determinante na fisiopatologia de doenças infecciosas e, precede o processo de invasão e colonização observado nas infecções fúngicas invasivas. Dessa forma, a parede celular de fungos patogênicos sempre foi o alvo para os estudos de adesão. Apesar das tentativas iniciais de identificação de adesinas terem sido focadas nas proteínas de parede celular, estudos recentes têm demonstrado cada vez mais o papel dos carboidratos de superfície nesse processo (Sheppard, 2011). Em relação ao *A. fumigatus*, pouco é conhecido a cerca das possíveis proteínas adesivas expressas na superfície deste patógeno. A hidrofobina RodA, presente na superfície dos conídios, foi a primeira adesina descrita para este fungo (Aimanianda *et al.*, 2009). Em relação ao envolvimento de carboidratos de superfície de *A. fumigatus* em processos de adesão, já foi descrito o envolvimento de carboidratos de superfície como mananas e uma galactosaminogalactana (Gravelat *et al.*, 2009; Lamarre *et al.*, 2009). A galactosaminogalactana, em conjunto com a galactomanana e α -glucana, constituem uma matriz extracelular que seria produzida por *A. fumigatus* (Loussert *et al.*, 2010). Essa suposta MEC foi identificada primeiramente em extratos de parede celular e de filtrado de cultura o de *A. fumigatus* (Fontaine *et al.*, 2000), sendo posteriormente descrita em hifas em diferentes condições incluindo o tecido hospedeiro (Beauvais *et al.*, 2007; Loussert *et al.*, 2010).

Uma das mutantes utilizadas neste estudo apresenta o gene *UGMI* deletado ($\Delta ugmi$). Esse gene é o responsável pela transcrição da enzima UDP-galactopiranosose mutase, que converte resíduos de galactopiranosose a galactofuranose. Resíduos de galactofuranose constituem moléculas como a galactomanana, glicoproteínas e glicolipídios. A galactomanana é por tanto, um polímero contendo resíduos de galactofuranose ligados a uma cadeia principal de α -manana, e a recém descrita, galactosaminogalactana é um polímero constituído por resíduos de galactopiranosose ligados a resíduos de galactosamina, similarmente as cadeias de glicosaminoglicanos em mamíferos (Alberts *et al.*, 2004). Dessa forma, a análise bioquímica da superfície celular dessa mutante indicou ausência de resíduos de galactofuranose com

conseqüente diminuição do conteúdo de galactomanana e aumento no conteúdo de galactosaminogalactana (Lamarre *et al.*, 2010; Heesemann *et al.*, 2011). Os resultados aqui obtidos mostram que tanto conídios quanto tubos germinativos dessa mutante apresentam uma maior capacidade adesiva às células endoteliais quando comparadas ao comportamento de duas cepas selvagens, Af293 e Ku80. Em estudos anteriores, Lamarre *et al.* (2010), mostraram que essa mesma mutante apresentou um fenótipo hiperaderente a superfícies inertes e às células epiteliais de pulmão. Estes autores demonstraram que o aumento na adesão foi revertido após tratamento dos tubos germinativos da cepa $\Delta ugml$ com uma manosidase. A partir desse resultado, os autores sugeriram que após a deleção do gene *UGMI*, resíduos de manana estariam mais expostos na superfície das mutantes, sendo responsáveis pela maior adesão observada para esta cepa. Similarmente, a deleção do gene *UGMI* em outras espécies de *Aspergillus*, como em *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*, portanto, ausentes em mutantes para o gene *UGM*, sejam responsáveis por mascarar grupos polares durante a morfogênese do fungo, regulando assim sua capacidade adesiva (Lamarre *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011).

No presente trabalho, dentre todas as cepas utilizadas neste estudo, a cepa $\Delta ugml$ além de ter apresentado uma maior adesão às células endoteliais, foi capaz de induzir um maior estímulo à produção de citocinas que parece estar associada a uma maior ativação endotelial, esta avaliada pela expressão de fator tecidual. Após 16 horas de interação com HUVECs, tubos germinativos dessa cepa foram capazes de estimular níveis de IL-6, no meio condicionado das HUVECs, duas vezes superiores do que aqueles observados para as cepas selvagens; e em relação ao TNF- α os níveis chegaram a ser 10 vezes maiores quando comparado ao estímulo observado pelas cepas selvagens. Além disto, a análise da ativação endotelial revelou níveis de RNA mensageiro para o fator tecidual na HUVEC duas vezes maior que o estimulado pelas cepas selvagens.

Sabe-se que além do possível papel de adesinas, as moléculas de superfície de *A. fumigatus* são responsáveis por modular o reconhecimento imune por células do hospedeiro. Os principais candidatos a PAMPs em *A. fumigatus* são β -glucanas, quitina, galactomanana e α -glucana. Os receptores já descritos como envolvidos no reconhecimento deste fungo por células do sistema imune são os TLR 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).

Porém pouco é conhecido em relação ao papel dos outros constituintes da parede celular deste fungo na resposta imune do hospedeiro. Apesar de alguns estudos caracterizarem a quitina como uma molécula imunologicamente inerte (Chai *et al.*, 2010), já foi descrito seu envolvimento na ativação de células mielóides, mediado pelos TLR2 e TLR4. A α -1,3-glucana, por sua vez, já foi descrita como responsável pelo escape imunológico tanto em *A. fumigatus*, quanto em outros fungos como *H. capsulatum* e *P. 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). Quanto à galactomanana, ensaios recentes de interação da mutante Δ *ugm1* com macrófagos mostraram que a ausência desse polímero não altera a resposta pró-inflamatória por esses fagócitos. Isso indica que a galactomanana pode não apresentar uma função de PAMP na superfície deste patógeno (Heesemann *et al.*, 2011).

Além disso, estudos do papel de frações polissacarícas 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.*, 2010). Ademais, estudos anteriores já haviam demonstrado que a interação de conídios de *A. fumigatus* com macrófagos resultava em uma supressão da resposta mediada por TLR2 e 4, enquanto que a interação com hifas suprimia apenas a resposta mediada por TLR4 (Chai *et al.*, 2009). Essa imunorregulação negativa causada por constituintes da superfície do fungo, expressos tanto em conídios quanto na hifa, seria mediada pela inibição da secreção de IL-6 e TNF- α pelos macrófagos (Chai *et al.*, 2009; Chai *et al.*, 2010). A supressão da resposta pró-inflamatória via TLR por *A. fumigatus* pode ser um mecanismo de evasão eficiente, através do qual o micro-organismo consegue driblar a tentativa do sistema imune em conter a germinação dos conídios (Chai *et al.*, 2010).

Não apenas macrófagos neutrófilos e células dendríticas participam do reconhecimento de PAMPs, mas também as células endoteliais são capazes de expressar PRRs em sua superfície. Sabe-se que moléculas de LPS são capazes de estimular a expressão de TLR2 e TLR4 em HUVECs, e que esse estímulo é mediado por citocinas como IL-6 e TNF- α ; e que estes eventos podem estar envolvidos nos processos protrombóticos desencadeados no choque séptico (Faure *et al.*, 2001; Hijiya *et al.*, 2003).

Como já explicado, a mutante *Δugm1* não apenas apresenta um aumento na proporção de moléculas de GAG, como também possui uma acentuada diminuição de moléculas de galactomanana na superfície celular. Conforme explicado anteriormente, moléculas de galactomanana inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos. Coincidentemente, a mutante *Δugm1*, foi a cepa que causou um maior estímulo às células endoteliais quanto a secreção de IL-6 e TNF- α . Sabe-se que, assim como o IL-8 e o TNF- α , a citocina IL-6 tem um papel importante na regulação da inflamação e da coagulação sanguínea. Essa citocina é uma das responsáveis por estimular a expressão de fator tecidual pelo endotélio vascular, além de ser responsável pela diferenciação de linfócitos B, ativação e produção de proteínas de fase aguda pelos linfócitos T, e estímulo à proliferação de células musculares (Esmon, 2005).

Em concordância com os resultados aqui apresentados, estudos paralelos com outras mutantes sugerem indiretamente o envolvimento da galactosaminogalactana na interação de *A. fumigatus* tanto com células endoteliais quanto epiteliais. O gene *MEDA* em *A. fumigatus* foi descrito como responsável pelo controle da biossíntese de carboidratos através da regulação da transcrição da UDP-glicose epimerase. Em ensaios *in vitro* com a mutante para este gene (*ΔmedA*), ela apresentou um fenótipo hipoaderente à fibronectina, ao plástico, a células epiteliais e endoteliais; além de ser hipovirulenta em modelo murino de aspergilose invasiva (Gravelat *et al.*, 2009). A posterior deleção do gene da UDP-glicose epimerase resultou em uma mutante deficiente na síntese de GAG. Essa mutante apresentou um fenótipo caracterizado pela inibição total da adesão de tubos germinativos e hifas a células epiteliais; e caracterizado pela redução na sua capacidade de causar injúria e estímulo a células epiteliais (Gravelat & Sheppard, 2011).

Entretanto, resultados controversos foram obtidos a partir de ensaios *in vivo* utilizando mutantes para o gene *UGM1*. Apesar do aumento da adesão e do aumento ao estímulo endotelial apresentado nesta dissertação, Lamarre *et al.* (2010) mostraram que cepa *Δugm1* apresenta virulência igual à selvagem em modelo murino de aspergilose invasiva. A cepa *Δugm1* utilizada por este grupo é a mesma mutante utilizada no presente trabalho. Contudo, Schmalhorst *et al.* (2008) produziram outra mutante para o gene *UGM1*, que apresentou uma diminuição da virulência em relação à cepa selvagem, em modelo murino de aspergilose invasiva. Concomitantemente às diferenças de resultado observadas no modelo animal, ensaios *in vitro* mostraram diferenças fenotípicas entre as mutantes geradas por estes dois autores. O fato das cepas mutantes apresentarem um *background* genético distinto pode ter

contribuído para essas diferenças. Além disso, a deleção do gene *UGM1* pode ter levado a outras mutações que interferiram na virulência das cepas (Lamarre *et al.*, 2010).

Em outros organismos procarióticos e eucarióticos, o bloqueio da síntese de galactofuranose possui conseqüências variadas dependendo do organismo. Para a *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, o gene *UGM* é essencial. Nesse organismo, os resíduos de galactofuranose compõem a arabinogalactana, molécula responsável pela ligação do componente estrutural da parede celular, o complexo de peptidoglicana, à camada externa de ácido micólico (Pan *et al.*, 2001). Já em *Escherichia coli* e em *Klebsiella pneumoniae*, a galactofuranose compõe apenas uma parte do LPS, não sendo considerada essencial nestes dois micro-organismos. Já em protozários como a *Leishmania major* e *T. cruzi*, mutantes para o gene *UGM* apresentaram hipovirulência e deficiência no crescimento, respectivamente (Kleczka *et al.*, 2007).

Finalmente, os resultados apresentados para a mutante $\Delta ugml$, em conjunto com os obtidos de outros estudos, sugerem que a deleção do gene *UGM1* interfere no potencial adesivo dessa cepa, bem como na sua capacidade de ativar e estimular células do hospedeiro. Esse fenótipo apresentado pela mutante $\Delta ugml$ parece estar relacionado a mudanças estruturais e a mecanismos compensatórios durante a morfogênese do fungo. A ausência de galactomana e de resíduos de galactofuranose nessa mutante, com conseqüente aumento na proporção e exposição de moléculas de galactosaminogalactana e da manana sugerem um possível envolvimento destas moléculas nos processos de adesão, estímulo e ativação de células endoteliais. Ademais, o fenótipo hipovirulento e hipoadesivo de mutantes cuja via de síntese de galactosaminogalactana foi bloqueada, corroboram para a hipótese do envolvimento desta molécula nestes processos. Esta hipótese está sendo confirmada em experimentos em andamento, que farão parte do projeto de doutoramento.

Com relação às outras mutantes utilizadas neste estudo, as cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$, estas apresentaram diferenças antagônicas a mutante $\Delta ugml$ e em relação às selvagens nos ensaios de adesão às células endoteliais. Ambas as mutantes tiveram uma menor taxa de endocitose e um número de conídios que interagiram com as monocamadas endoteliais, em relação às cepas selvagens. O mesmo foi observado para o morfotipo tubo germinativo. Entretanto somente para a cepa $\Delta crzA$ as diferenças em relação à adesão de tubos germinativos foram estatisticamente significativas. Coincidentemente à menor adesão, ambas as mutantes causaram um menor estímulo e menor ativação das células endoteliais. O estímulo à secreção de citocinas por essas cepas foi inclusive semelhante ao mensurado no controle não infectado.

Ademais, o estímulo dessas mutantes à expressão de fator tecidual pelas HUVEC foi aproximadamente metade do observado para as cepas selvagens.

As vias de sinalização mediadas por *calA* e *crzA* já foram descritas como importantes para morfogênese, virulência e resistência antifúngica não apenas para *A. fumigatus*, mas também para outros fungos patogênicos como *C. albicans* e *C. neoformans*. A cepa $\Delta calA$ apresenta uma deleção que afeta a subunidade catalítica da calcineurina, interrompendo os eventos *upstream* da via; enquanto que a cepa $\Delta crzA$ possui uma deleção para o fator de transcrição *crzA*, que depende da calcineurina para regular os genes que atuam nessa via (eventos *downstream*). Apesar das deleções serem distintas, já foi descrito que essas mutantes possuem um fenótipo parecido, como defeitos no crescimento polar da hifa, redução da filamentação e alterações na superfície dos conídios. Contudo, a literatura demonstra que as alterações morfológicas nas hifas da cepa $\Delta calA$ são mais acentuadas que os observados nas hifas da cepa $\Delta crzA$. Além disso, a microscopia eletrônica de varredura dos conídios de ambas as cepas mostraram diferenças estruturais na superfície dessas células em relação à selvagem parental. Os autores sugerem que essas diferenças possam ser uma consequência da diminuição da camada de hidrofobinas nesses conídios (da Silva Ferreira *et al.*, 2006; Steinbach *et al.*, 2006; Soriani *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2008). Como essas proteínas já foram descritas como adesinas em *A. fumigatus*, é possível que a ausência de hidrofobinas na superfície celular dos conídios de tais mutantes possam explicar a diminuição do número total de conídios interagidos com as células endoteliais em relação às selvagens. No entanto, esta é uma hipótese a ser comprovada.

Além disso, estudos anteriores mostraram que essas mutantes possuem maior sensibilidade a drogas antifúngicas, especialmente a equinocandinas; e uma menor virulência em modelo murino de aspergilose invasiva (da Silva Ferreira *et al.*, 2006; Steinbach *et al.*, 2006; Soriani *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2008). As equinocandinas compreendem uma classe de antifúngicos que atuam inibindo a síntese de β -1,3-glucanas. De fato, a análise química do conteúdo de β -1,3-glucanas na parede celular dessas mutantes indicou uma diminuição na quantidade desse polissacarídeo em relação à cepa selvagem. Além disso, o mecanismo compensatório a ação de equinocandinas em *A. fumigatus* é marcado pelo aumento da produção de quitina, e não foi observado nessas mutantes (Fortwendel, *et al.*, 2009). Dessa forma, as deleções dos genes *CALA* e *CRZA* em *A. fumigatus* pode acarretar em diferenças estruturais na superfície deste fungo, e é possível que essas diferenças sejam responsáveis

pela menor adesão, estímulo e ativação endotelial observada na interação das cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$ com células endoteliais, como demonstrado no nosso estudo.

Finalmente, os resultados da interação de tubos germinativos e conídios da cepa $\Delta prtT$ com monocamadas de HUVEC não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à interação dessas células com as cepas selvagens. No entanto, o gráfico relacionado à dosagem de IL-8 no meio condicionado após a interação mostrou que essa mutante não foi capaz de causar um estímulo tão elevado quanto o causado pelas cepas Af293 e Ku80. Essa cepa é mutante para o fator de transcrição *prtT*, responsável pelo controle da expressão de diversas proteases secretadas por *A. fumigatus* (Sharon *et al.*, 2009; Bergmann *et al.*, 2009). Vale lembrar que os organismos utilizados nos ensaios de estímulo e ativação endotelial estavam metabolicamente inativos por ação do thimerosal. Portanto, não foi possível avaliar se as diferenças entre essa mutante e as cepas selvagens quanto aos fatores secretados, estariam influenciando na resposta endotelial. Contudo, nos ensaios de adesão e endocitose, os organismos utilizados estavam vivos, e nestes ensaios tanto conídios quanto tubos germinativos da mutante $\Delta prtT$ apresentaram uma taxa de adesão e endocitose semelhante às taxas obtidas para as cepas selvagens.

Paralelamente aos dados apresentados acima, os resultados obtidos a partir da interação de conídios e tubos germinativos de *A. fumigatus* mostraram que as células endoteliais respondem de maneira diferente aos dois morfotipos do fungo (conídios e tubo germinativo), como seria esperado. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que conídios de *A. fumigatus*, ao contrário das hifas, não são capazes de estimular ou aumentar a secreção de TNF- α e IL-8 pelas células endoteliais, nem de modular a expressão de fator tecidual por essas células. Presume-se que mudanças moleculares na superfície do fungo durante sua morfogênese sejam as responsáveis por essa diferença na resposta endotelial (Lopes-Bezerra & Filler, 2004; Chiang *et al.*, 2008). Dentre as diferenças entre conídios e tubos germinativos, destacam-se a presença de hidrofobinas e melanina na superfície dos conídios, e a exposição α -1,3-glucanas, galactomanana, galactosaminogalactana e galactomanoproteínas na superfície das células durante a germinação (Latgé, 2010). No presente estudo, os resultados obtidos quanto ao estímulo causado por conídios e tubos germinativos às células endoteliais, corroboram os dados obtidos em estudos anteriores com a cepa selvagem Af293, quanto ao estímulo à secreção de IL8 e TNF- α . Entretanto, o estímulo de *A. fumigatus* à secreção de IL-6 ainda não havia sido avaliada em nenhum modelo de interação de *A. fumigatus* com células endoteliais. Nesse caso, ambos os morfotipos de todas as cepas, com exceção das mutantes

$\Delta calA$ e $\Delta crzA$, foram capazes de estimular a secreção de IL-6 pelas HUVECs. Porém, esse estímulo à secreção de IL-6 por conídios e tubos germinativos de *A. fumigatus* após 16 horas de interação com as células endoteliais não pareceu significativamente maior aos níveis secretados pelo controle não infectado (salvo para o estímulo causado pelos tubos germinativos da mutante $\Delta ugm1$). Surpreendentemente, em relação às cepas $\Delta calA$ e $\Delta crzA$, o estímulo causado por conídios, quanto a secreção de IL-6 por HUVECs, foi praticamente o dobro do estímulo causado por tubos germinativos dessas cepas. Provavelmente mudanças químicas na superfície celular, mencionadas nos parágrafos anteriores, durante a germinação dessas mutantes causaram essa diferença quanto ao estímulo da secreção de IL-6 pelas HUVECs.

Os eventos inflamatórios e protrombóticos desencadeados a partir da interação de *A. fumigatus* com células endoteliais, são processos conhecidos e bem descritos na literatura. Sabe-se que estes eventos são dependentes do contato hifa-endotélio, e que, portanto, são moléculas presentes na superfície de *A. fumigatus*, e não os fatores secretados por esse micro-organismo os controlam (Lopes-Bezerra & Filler 2004; Chiang *et al.*, 2008; Kamai *et al.*, 2009). Contudo, qual(is) moléculas de superfície deste patógeno são responsáveis pela adesão, estímulo e ativação endotelial, bem como, qual(ais) o(s) receptor(es) na célula hospedeira medeiam esses processos, constiuem-se em questões em aberto. Neste sentido, nosso trabalho com a mutante para o gene *UGM1* contribui para a elucidação de possíveis polissacarídeos expressos pelas células germinativas que estariam diretamente envolvidos na virulência e patogênese da aspergilose invasiva, em especial, no processo de alteração da homeostase.

6 CONCLUSÕES

- A cepa selvagem Ku80 apresentou um perfil de interação, e capacidade de induzir a ativação do endotélio, similar a cepa de referência Af293, em concordância com os dados da literatura.
- A mutante para o gene *UGM1* de *A. fumigatus* apresenta um fenótipo hiperaderente à monocamada endotelial e, coincidentemente, uma maior capacidade de induzir a secreção das citocinas IL-6, TNF-alfa e a expressão de fator tecidual pelas HUVECs.
- As mutantes para os genes *CALA* e *CRZA* de *A. fumigatus* apresentam um fenótipo hipoaderente à monocamada endotelial e, coincidentemente, uma perda da capacidade de induzir a secreção de IL-6, IL-8, TNF-alfa e a expressão de fator tecidual pelas HUVECs.
- O perfil de ativação das HUVECs induzido pelas cepas selvagens de *A. fumigatus* foi o mesmo observado para a mutante $\Delta prtT$. Estas cepas apresentaram taxas similares de adesão e endocitose à monocamada endotelial.
- Os conídios de todas as cepas de *A. fumigatus* (mutantes e selvagens) apresentaram uma taxa de endocitose mais elevada pelas HUVECs, comparado àquela observada para os tubos germinativos. No entanto, os conídios não apresentam capacidade de ativar significativamente as células endoteliais.
- Foi observado um aumento de secreção das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α induzida pelo morfotipo tubo germinativo das cepas selvagens Ku80 e Af293, e da cepa mutante $\Delta ugm1$ quando comparados aos níveis de secreção das HUVECs em quiescência (não ativadas).
- A deleção do gene *UGM1* interfere com a capacidade de hifas de *A. fumigatus* em ativar células endoteliais humanas, o mesmo não é observado pela deleção dos genes *CALA*, *CRZA* e *PRTT*, sugerindo o envolvimento da galactosaminogalactana na interação e ativação do endotélio.

REFERÊNCIAS

- Abe K, Gomi K, Hasegawa F, *et al.* Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopatho.* 2006;162:143–53.
- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, *et al.* Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nat.* 2009; 460:1117-1121.
- Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2001; 251:201-25.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4^a ed., Garland Science, 2004
- Alexopoulos C J, Mims C W, Blackwell M. *Introductory Mycology.* 4^a ed. *John Wiley & Sons.* NY, 1996.
- Almyroudis NG, Holland SM, Segal BH. Invasive aspergillosis in primary immunodeficiencies. *Med Mycol Suppl.* 2005, 43:247–259.
- Araújo R, Rodrigues AG. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol.* 2004, 42:4335-4337
- Bachetti TU & Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacological Research.* 2000, 42:9-19.
- Barbosa FM, Fonseca FL, Holandino C, Alviano CS, Nimrichter L, *et al.* Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect.* 2006, 8: 493–502.
- Baxter C, Webb K, Jones A, Denning D. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in clinical frame: a role for molecular diagnosis. Poster presentation. ISHAM, Tokyo 2009.
- Beauvais A, Loussert C, Prevost MC, Verstrepen K, Latgé, JP. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res.* 2009, 9: 411–419
- Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret, E, *et al.* An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol.* 2007, 9: 1588–1600.
- Bergmann A, Hartmann T, Cairns T, Bignell EM, Krappmann S. A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Infect Immun.* 2009, 77: 4041–4050.

- Berkova N, Lair-Fullerger S, Femenia F, Huet D, Wagner MC, et al. *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *Int Immunol*. 2009, 18: 139–150.
- Bertout S, Badoc C, Mallie M, Giannis J, Bastide J M. Spore diffusate isolated from some strains of *Aspergillus fumigatus* inhibits phagocytosis by murine alveolar macrophages. *FEMS Immunol & Med Microbiol*. 2006, 33:101-106.
- Bowman SM & Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 2006, 28:799–808.
- Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, et al. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol*. 2002, 168:1362-1371.
- Brakhage AA & Langfelder K. Menacing Mold: The Molecular Biology of *Aspergillus fumigatus* *Annual Rev of Microbiol*. 2002, (56): 433-455
- Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol*. 2011, 29, 1–21.
- Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaniananda V, Nietzsche N, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog*. 2010, 6:1000873.
- Busby, T.M., Miller, K.Y., and Miller, B.L. Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. *Genetics*. 1996, 143: 155–163.
- Campbell JH & Campbell GR. Development of Vascular System. *Ciba Found. Symp*. 100. Londres: Pitman, 1983.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. *The Fungi*. 2th ed. Elsevier Ltd, 2007.
- Carlsen M, Nielsen J. Influence of carbon source on alphaamylase production by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001, 57:346–9.
- Casadevall A. & Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2003, 1(1):17–24.
- _____. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*. 1999, 67:3703-13.
- Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet. Biol*. 2005, 42(2):98–106.

- Chai LY, Kullberg BJ, Vonk AG, Warris A, Cambi A, *et al.* Modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 responses by *Aspergillus fumigatus*. *Infect. and Immu.* 2009, 77:2184-2192
- Chai LYA, Vonk AG, Kullberg BJ, Verweij PE, *et al.* *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes and Infection* 2011, 13:151-159
- Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2006, 44:163-72
- Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, *et al.* Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood–brain barrier. *Infect. and Immu.* 2004, 72: 4985–4995.
- Charles TE. The interactions between inflammation and coagulation. Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology.* 2005, 131: 417–430
- Chen SH, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, *et al.* *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Med Microbiol.* 2003, 52: 961–970.
- 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. *Infection and Immunity.* 2008,76: 3429–3438.
- Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L, Buckley RH. Fungal infection in chronic granulomatous disease: the importance of the phagocyte in defense against fungi. *Am J Med.* 1981, 71:59–66
- Cotty PJ, Bayman P, Egel DS, Elias KS. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In *The Genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*, ed. KA Powell, A. Renwick & J.F, 1994.
- Cramer RA, Perfect B Z, Pinchai N, Park S, Perlin DS, *et al.* Calcineurin Target CrzA Regulates Conidial Germination, Hyphal Growth, and Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Eukariotic Cell.* 2008, 1085–1097.
- Dejana E, Siminoescu H, Wolburg H. Endothelial cell biology and pathology. *Cell tissue Res.* 2008, 335(1):1-3.
- Denning W D. State-of-the-Art Clinical Article. Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 1998, 26:781-805.
- Dixon DD & Walsh TJ. Human pathogenesis, p. 249–267. In J. W. Bennett and M. A. Klich (ed.), *Aspergillus, biology and industrial application.* Butterworth-Heinemann, Boston, 1992.
- Eisenman HC, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, *et al.* *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology.* 2007, 153: 3954–3962.

- Eissenberg LG, West JL, Woods JP, Goldman WE. Infection of P388D1 macrophages and respiratory epithelial cells by *Histoplasma capsulatum*: Selection of avirulent variants and their potential role in persistent histoplasmosis. *Infection and Immunity*. 1991, 59: 1639–1646.
- Ejzykowicz DE, Solis NV, Gravelat FN *et al.* Role of *Aspergillus fumigatus* DvrA in host cell interaction and virulence. *Eukaryotic Cell*. 2010, 9:1432-1440.
- 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 Immunology*. 2001, 166:2018-2024.
- Figueiredo CC, De Lima OC, De Carvalho L, Lopes-Bezerra LM, Morandi V. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbiol. Pathog.* 2004, 36: 177–188.
- Filler S G. & Sheppard D C. Fungal Invasion of Normally Non-Phagocytic Host Cells. *PLoS Pathog.* 2006, 2:1099-1105.
- Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M. Molecular Organization of the Alkali-insoluble Fraction of *Aspergillus fumigatus* Cell Wall. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275(36): 27594–27607.
- Fortwendel JR, Juvvadi PR, Pinchai N, Zachary Perfect B, Alspaugh JA *et al.* Differential Effects of Inhibiting Chitin and 1,3- β -D-Glucan Synthesis in Ras and Calcineurin Mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53(2):476.
- Francischetti IMB, Seydel KB, Robson QM. Blood Coagulation, Inflammation and Malaria. *Microcirculation*. 2008, 15(2): 81–107.
- Friis T, Hansen AB, Houen G, Engel AM. Influence of angiogenesis inhibitors on endothelial cell morphology *in vitro*. *Apmis*. 2006, 114: 211–224.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003, 197: 1107–1117.
- Gastebois A, Clavaud C, Amanianda V, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol.* 2009, 4(5):583-95.
- Gaudreault N, Scriven DR, Moore ED. Asymmetric subcellular distribution of glucose transporters in the endothelium of small contractile arteries. *Endothelium*. 2006, 13: 317–324.
- Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *Journal of Immunology* 2006, 176:3717-3724.

Gravelat FN & Sheppard DC . Abstract O3. Biofilms in Nasocomial Fungal Infections, 2011.

Gravelat FN, Ejzykowicz DE, Chiang LY, Chabot JC, Urb M, *et al.* *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. *Cellular Microbiol.* 2009, 1-16.

Greene R. The radiologic spectrum of pulmonary aspergillosis. Presented at Advances against Aspergillosis conference, San Francisco, CA, 2004.

Gross, O. *et al.* Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nat.* 2006, 442:651–656.

Harris SD, Morrell JL & Hamer JE. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genet.* 1994, 136:517-532.

Harris SD. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Microbiol.* 1999, 145:2747-2756.

Hebart H, Loffler J, Meisner C, *et al.* Early detection of *Aspergillus* infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis.* 2000, 181 (5): 1713-9

Heesemann L, Kotz A, Echtenacher B, *et al.* Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical microbiology*, 2011.

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.

Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, Morgan LA, Chen PL *et al.* *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display, *PLoS Pathog.* 2005, 1-30.

Iadarola P, Lungarella G, Martorana PA, Viglio S, Guglielminetti M, *et al.* Lung injury and degradation of extracellular matrix components by *Aspergillus fumigatus* serine proteinase. *Exp. Lung Res.* 1998 24 :233–251.

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

Julie AW & Margo MM. Adhesion of *Aspergillus* Species to Extracellular Matrix Proteins: Evidence for Involvement of Negatively Charged Carbohydrates on the Conidial Surface. *Infection and Immunity.* 2000, 68:3377–3384

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

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

- Kao R & Davies J. Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of natural genetically engineered ribonucleases. *Journal of Biology Chemistry*. 1999, 274:12576-12582.
- Kauffman H F, Tomee J F, van de Riet M A, Timmerman A J, Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 105:1185–1193.
- Kauffman SHE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol today*. 1990, 11: 129-136.
- Kidokoro A, Iba T, Fukunaga M, Yagi Y. Alterations in coagulation and fibrinolysis during sepsis. *Shock*. 1996, 5: 223-228.
- Kleczka B, Lamerz AC, van Zandbergen G, Wenzel A, Gerardy-Schahn R, et al. Targeted gene deletion of *Leishmania major* UDPgalactopyranose mutase leads to attenuated virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282: 10498–10505.
- Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2001, 39 (1): 1–8.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K. and Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2002. 26: 239–56.
- Kogan T V , Adoun J J , Mittelman L , Hirschberg K , Osherov N. Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. *J.Infect. Dis.* 2004, 189:1965–1973.
- Kolattukudy P E, Lee J D , Rogers L M , Zimmerman P , Ceselski S et al. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect Immun*. 1993, 61:2357–2368.
- Kuhlman JE, Fishman EK, Burch PA, Karp JE, Zerhouni EA, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: the contribution of CT to early diagnosis and aggressive management. *Chest*. 1987, 92:95–99.
- Lacey J. *Aspergilli* in feeds and seeds. In *The Genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*, ed. KA Powell, A. Renwick & J.F, 1994.
- 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.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 2003, 38:143-158
- Larone DH. *Medically important fungi*, 4th ed. ASM Press, 2002.
- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, (12): 310-350.
- _____. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*. 2010, 12: 863-872

Leitao EA, Bittencourt VC, Haido RM, Valente AP, Peter-Katalinic J, *et al.* Betagalactofuranose- containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology*. 2003, 13: 681–692.

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

Libby P & Simon DI. Inflammation and Thrombosis: The Clot Thickens. *Circulation*, 2001, 103:1718-1720

Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001, 32 (3): 358-66.

Liu, M. *et al.* The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J. Clin. Invest*. 2010, 120:1914–1924.

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

_____. Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. *Braz J Med Biol*. 2003, 36(8):987-991.

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

Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol*. 2007, 9:368-381.

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

Mark KS & Miller DW. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Science*. 1999, 64: 1941–1953.

Martinez-Lopez R, Park H, Myers C L *et al.* *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interaction with host cells. *Eukaryot Cell*. 2006, 5:140-147.

Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis and Management in Immunocompromised Patients. *Drugs*. 2007, 67(11): 1567-1601.

Mendes-Giannini MJ, Hanna SA, da Silva JL, Andreotti PF, Vincenzi LR, *et al.* Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infection*. 2004, 6: 882–891.

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

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

Mitchell CG, Slight J, Donaldson K. Diffusible component from the spore surface of the fungus *Aspergillus fumigatus* which inhibits the macrophage oxidative burst is distinct from gliotoxin and other hyphal toxins. *Thorax* 1997, 52:796-801.

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

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

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

Monod, M., A. Fatih, K. Jatou-Ogay, S. Paris, and J. P. Latge. The secreted proteases of pathogenic species of *Aspergillus* and their possible role in virulence. *Can. J. Bot.* 1995, 73:S1081–S1086.

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

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

Murali P S, V P Kurup, N K Bansal, J N Fink, P A Greenberger. IgE down regulation and cytokine induction by *Aspergillus* antigens in human allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Lab. Clin. Med.* 1997, 131:228–235.

Nobile CJ & Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by *C. albicans* transcription factor Br1p. *Current in. Biology*. 2005, 15:1150-1155.

Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS *et al.* Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biology* 2009, 7: e1000133.

O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2008, 457:471-475

Orciuolo E, Stanzani M, Canestran M, *et al.* Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implication for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *J. Leukoc. Biol.* 2007, 82:839-848.

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

_____. The virulence of *Aspergillus fumigatus*. In; K. Kavanagh (Ed.), *New insights in medical mycology*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, p.185-293, 2007.

Pan F, Jackson M, Ma Y, and McNeil M. Cell wall core galactofuran synthesis is essential for growth of mycobacteria. *Journal of Bacteriology* 2001, 183: 3991–3998.

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

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. *Eukaryotic Cell*. 2011, 10:646-653

Paul E. Verweij & Monique A. S. H. Mennink-Kersten. Issues with galactomannan testing *Medical Mycology*. 2006, 44:179-183

Pham AS, Tarrand JJ, May GS, Lee MS, Kontoyiannis DP, Han XY. Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR. *Am J Clin Pathol*. 2003, 119:38–44.

Philippe B, Ibrahim-Grnet O, Prevost M C *et al.* Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun*. 2003, 71: 3034-3042.

Pirofski L A. & Casadevall L A. The Damage-Response Framework of Microbial Pathogenesis and Infectious Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2008, 635:135-146.

Qiao J, Liu W, Li R. Antifungal Resistance Mechanisms of *Aspergillus*. *Japanese Journal of Medical Mycology*. 2008, 49:157-163.

Raad I, Hanna H, Huaranga A, Sumoza D, Hachem R, Albitar M. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of aspergillus in BAL. *Chest*. 2002, 121:1171–1176.

Raja N S, Singh N N. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. 2006, 39:73-77.

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

Reeves EP, Murphy T, Daly P, Kavanagh K Amphotericin B enhances the synthesis and release of the immunosuppressive agent gliotoxin from the pulmonary pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*. 2004, 53:719-725.

Rementería A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco B A, Bikandi J, *et al.* Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol*. 2005, 22:1-23.

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

Rippon J W. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. 3^a ed., *Philadelphia: WB Saunders Company*, 1998

Rødland EK, Ueland T, Pedersen TM, Halvorsen B, Mu''ller F, *et al.* Activation of Platelets by *Aspergillus fumigatus* and Potential Role of Platelets in the Immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infection and Immunity*. 2010, (78)1269–1275.

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

_____. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011, 11:275-278

Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, *et al.* Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 2006, 55: 279–291.

Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B , Rotter M L, Hirschl A M , Willinger B. Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. *J.Clin. Microbiol*. 2007, 45:906–914.

Schmaler-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O., *et al.* Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2009, 75: 493–503.

Schmalhorst PS, Krappmann S, Vervecken W, Rohde M, Muller M, Braus GH, *et al.* Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*. 2008, 7: 1268–1277.

Schulz T, Senkpiel K, Ohgke H. Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2004, 207:267-277.

Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, *et al.* Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood* . 2005, 106 (8): 2641-5

Segal BH, Walsh TJ. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* .2006, 173:707–717.

Semighini CP, Marins M, Goldman MH, Goldman GH. Quantitative Analysis of the Relative Transcript Levels of ABC Transporter *Atr* Genes in *Aspergillus nidulans* by Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(3):1351–1357.

Sharon H, Amar D, Levdansky E, Mircus G, Shadkchan Y. PrtT-Regulated Proteins Secreted by *Aspergillus fumigatus* Activate MAPK Signaling in Exposed A549 Lung Cells Leading to Necrotic Cell Death. *PLoS ONE* . 2011, 6 :3:17509.

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.

Hagag S, Kubitschek-Barreira P, Neves, GWP, Amar D, Nierman W, Shalit I, Shamir R, Lopes-Bezerra L, Oshero N. Transcriptional and Proteomic analysis of the *Aspergillus fumigatus* Δ prtT protease deficient mutant. PLOS ONE, 2012

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

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

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

Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, *et al.* FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. Cell. 2008, 135: 726–737.

Soriani FM, Malavazi I, da Silva Ferreira ME, Savoldi, M, Regina M, Kress VZ, *et al.* Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA Molecular Microbiology. 2008, 67(6):1274–1291.

Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL *et al.* The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathogen. 2005, 1-42.

Steinbach WJ , Cramer RA, Perfect BZ, Asfaw YG, Sauer TC, *et al.* Calcineurin Controls Growth, Morphology, and Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. Eukariotic Cell. 2006, 1091–1103.

Steinbach WS, Latge JP, Stevens DA. Advances against aspergillosis. Med Mycol. 2005, 43:S1.

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

Stringaro A, Crateri P, Pellegrini G, Arancia G, Cassone A, *et al.* Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall in vitro and in experimentally infected rat vagina. Mycopathologia. 1997, 137: 95–105.

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

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

Taubitz A , B Bauer, J Heesemann, F Ebel. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 2007, 62: 4380-4388.

Tekaia F, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* saprophyte or pathogen? Curr Opin in Microbiol. 2005, 8:384-392.

Van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea, MG. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 2008, 11:305–312.

Van der Graaf, CA, *et al.* Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur. Cytokine Netw.* 2006, 17:29–34.

Van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, *et al.* Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med.* 1990, 322:1622–1627.

Wagenaar JFP, Goris MGA, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu ATA. What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Tropical Medicine and International health.* 2007, (12) 1:111–122.

Wang J E, Warris A Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo T H, *et al.* Involvement of CD14 and Toll-like receptors in activation of human monocytes by hyphae, *Infection and Immunity.* 2001, 69:2402-2406

Wasylnka JA, Moore MM. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J Cell Sci.* 2003, 116: 1579–1587.

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

Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transpl Infect Dis.* 2003, 5:158–166.

Wolkow T D, Harris S D & Hamer J E. Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *J. Cell Sci.* 1996, 109:2179-2188.

Zmeil OS & Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Q J Med.* 2007, 100:317–334

APÊNDICE – Tabelas suplementares

Tabela S1. Soluções tampão

PBS	Tampão fosfato ----- 50 mM NaCl ----- 0,15 M pH 7,4
PBS-T	Tampão fosfato ----- 50 mM NaCl ----- 0,15 M Tween 80 ----- 0,01% (v/v) pH 7,4
PBS-BSA	Tampão fosfato ----- 50 mM NaCl ----- 0,15 M BSA ----- 1% (p/v) pH 7,4
Tampão cordão	NaCl ----- 125 mM KCl ----- 4 mM, Tampão fosfato ----- 0,65 mM Glicose ----- 0,2% (p/v)
Tampão de bloqueio	Tampão fosfato ----- 50 mM NaCl ----- 0,15 M Soro de cabra (Sigma) ----- 1% (v/v) pH 7,4
Solução <i>RNase-free DNase</i>	RNasin (40 U/ μ l; Promega) ----- 1 μ l RNase-free DNase (1 U/ μ l; Promega) ----- 10 μ l DTT (200 mM) ----- 5 μ l Tampão Tris-HCl 40 mM com 6 mM de MgCl ₂ pH 7,5 --- 100 μ l (qsp)

Tabela S2. Meios de cultura

Meio 199 puro	Meio 199 em pó, sem HEPES (Sigma) ----- 9,5 g NaHCO ₃ ----- 3,75 g Hepes ----- 3,75 g Água apirogênica ----- 1 L (qsp)
Meio 199 Completo	Meio 199 puro Penicilina G (Gibco) ----- 10.000 U/ml Estreptomicina (Gibco) ----- 10.000 µg/ml Glutamina (Gibco) ----- 2 mM Soro fetal bovino (Cultilab) ----- 10% (v/v) Soro adulto bovino (Cultilab) ----- 10% (v/v)
Meio YD (Yeast Dextrose)	Extrato de levedura (USB, Ohio, EUA) ----- 5 g Dextrose (Difco) ----- 20 g Água destilada ----- 1 L (qsp)
Meio YPD-ágar	Extrato de levedura ----- 10 g Peptona ----- 20 g Dextrose ----- 20 g Ágar ----- 15 g Água destilada ----- 1 L (qsp)
Meio Sabouraud líquido	Digestão péptica de tecido animal ----- 5 g Caseína ----- 5 g Dextrose ----- 40 g Água destilada ----- 1 L (qsp)
Meio Sabouraud-ágar	Digestão péptica de tecido animal ----- 5 g Caseína ----- 5 g Dextrose ----- 40 g Ágar ----- 15 g Água destilada ----- 1 L (qsp)

Tabela S3. Elementos traços utilizados nos meios YPD e YD para as cepas $\Delta calA$, $\Delta crzA$ e $\Delta prtT$

Cepas	Elementos traços
$\Delta calA$ e $\Delta crzA$ (Ferreira <i>et al.</i> , 2007)	ZnSO ₄ .7H ₂ O ----- 11 g H ₃ BO ₃ ----- 5,5 g MnCl ₂ .4H ₂ O ----- 2,5 g FeSO ₄ .7H ₂ O ----- 2,5 g CoCl ₂ .6H ₂ O ----- 0,8 g CuSO ₄ .5H ₂ O ----- 0,8g Água destilada ----- 500 mL (qsp)
$\Delta prtT$ (Sharon <i>et al.</i> , 2009)	H ₃ BO ₃ ----- 100 mg CuSO ₄ .5H ₂ O ----- 100 mg FeCl ₃ ----- 200 mg MnCl ₂ ----- 200 mg NaMoO ₄ .2H ₂ O ----- 200 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O ----- 2 mg Água destilada ----- 250 mL (qsp)

Tabela S4. Sequência das sondas Lux utilizadas e o número de acesso do gene correspondente.

Gene	Número de Acesso	Sondas Lux	Sequência
<i>GAPDH</i>	P04406	GAPDH_739FL/766RU GAPDH_739FL	AGCTTCCCGTTCAGCTCAGG cgccCATCCCTGCCTCTACTGG?G
<i>F3</i>	Q86SE7	Thro F3_1411FL/1442RU Thro F3_1411FL	CGCACCTGTAATCCCAGCTACTC cgagaACTGCACCCTCCGTCTCT?G

GAPDH – gene do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

F3 – gene do fator tecidual ou CD142 ou fator de coagulação 3.