



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO-INTERAÇÃO)

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO
SECRETOMA E BIOFILME DE *Aspergillus fumigatus*.**

CLÁUDIA PATRÍCIA MENDES DE ARAÚJO

Manaus - AM

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO-INTERAÇÃO)

CLÁUDIA PATRÍCIA MENDES DE ARAÚJO*

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO
SECRETOMA E BIOFILME DE *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Dra. Priscila Ferreira de Aquino

Co-Orientadora: Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

*Bolsista: CAPES

Manaus - AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

A663a

Araújo, Cláudia Patrícia Mendes de

Avaliação da formação de biofilme e análise das proteínas do secretoma e biofilme de *Aspergillus fumigatus*. / Cláudia Patrícia Mendes de Araújo. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

136 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Priscila Ferreira de Aquino.

Co-Orientadora: Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes.

1. Proteômica 2. *Aspergillus fumigatus* I. Título

CDU 616.992 (043.3)

CDD 616.969 22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos - CRB-11/ 287

CLÁUDIA PATRÍCIA MENDES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO
SECRETOMA E BIOFILME DE *Aspergillus fumigatus*.**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 02/08/2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Priscila Ferreira de Aquino - Orientador
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ



Prof^a. Dr^a. Nádya Cristina Falcão Bucker - Membro externo
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA



Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira - Membro externo
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, minha mãe, irmãos, tios e tias, amigas, marido e filho que com muito carinho, amor, apoio e paciência me acompanharam para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, por me guiar e permitir que eu concretizasse este sonho;
- Aos meus avós maternos, Maria de Nazaré e Manoel Rodrigues que não estão mais aqui, mas que estariam muito orgulhosos pela minha conquista;
- À minha família, por sempre me motivarem a continuar com meus sonhos, em especial minha mãe, Marlene Araújo, que foi o grande motivo de eu sempre querer estudar e aprender, e ao meu pai Edmilson;
- Aos meus irmãos Marlison e Milena, minhas tias Rosicley e Maria Resonilce pelo apoio e motivação;
- À minha amiga Glenda Silva, por ter me apoiado e cuidado do meu filho como se fosse uma mãe. Assim como a Izamar e a Devane;
- Ao meu marido James Lee Crainey por ter me apoiado durante todo este processo, que acreditou na minha capacidade mesmo quando eu achei que não conseguiria. Ao nosso filho, Manoel Crainey, que nasceu no decorrer deste período e deu mais sentido a tudo isso;
- À minha equipe de laboratório Kemily Nunes, Luana Leão, Juliana Leal, Sofia Cavalcante, Jéssica Kelly e Genésio Pontes. Mas principalmente à Kemily, pois se não fosse por ela eu não teria conseguido;
- Ao setor de informática da FIOCRUZ-ILMD, que durante todo o período de análise de dados estavam fazendo de tudo para que eu pudesse utilizar os programas. Em especial, ao Lucas por todo o suporte;
- Ao Antônio Balieiro, estatístico do ILMD, por ter tido paciência comigo e ter me ajudado na análise estatística dos meus dados;
- À Djane Baía da Silva por ter me ajudado na análise da microscopia eletrônica de varredura;
- À minha co-orientadora Ormezinda Fernandes por todo o suporte;
- À minha orientadora Priscila Aquino por todo o conhecimento repassado a mim de forma paciente e atenciosa, e por toda compreensão no decorrer deste período;
- Aos professores doutores do PPGBIO-INTERAÇÃO e do PPGVIDA pelo conhecimento passado no decorrer de cada disciplina;
- Ao Instituto Leônidas e Maria Deane, ao Programa de Pós-Graduação Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro (PPG-BIOINTERAÇÃO) e ao Instituto Oswaldo Cruz;

- Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Ferramentas para a Saúde-RPT-FIOCRUZ pelo uso da instalação de microscopia RPT07C, do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná; e ainda à Dra. Bruna Hilzendeger Marcon, que analisou minhas lâminas;
- À Plataforma de proteômica do Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ/RJ (RPT02A-Espectrometria de Massa – RJ), em especial ao Dr. André Ferreira;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos, que me auxiliou durante o meu período do mestrado.

OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Sabe-se que as doenças fúngicas acometem vários indivíduos em todo o mundo, porém, a quantidade de pessoas afetadas por essas doenças não é muito bem avaliada devido à falta de dados de vigilância que possam ser utilizados. A aspergilose é uma micose oportunista ocasionada por fungos do gênero *Aspergillus*, apresenta uma variedade de manifestações clínicas, o que dificulta o seu diagnóstico e possui a espécie *Aspergillus fumigatus* como o principal agente etiológico. Sabe-se que durante o processo de infecção este fungo secreta uma variedade de proteínas para o seu desenvolvimento bem como tem a capacidade de formação de biofilme. De forma geral, este consiste em uma comunidade microbiana envolta por uma matriz extracelular autopoduzida, a qual funciona como mecanismo de proteção contra ambientes hostis e agentes antifúngicos. Neste sentido, a proteômica é um conjunto de abordagens que pode auxiliar na elucidação de proteínas que estejam envolvidas no processo de infecção causada por esse fungo, bem como aquelas presentes no biofilme. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil proteico do secretoma e da formação de biofilme por *Aspergillus fumigatus*. Para este estudo, foram utilizadas três cepas de *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16913, ATCC 46640 e ATCC LB-01-AP), as quais foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente quanto a produção de biofilme. Nestes ensaios foram utilizados os meios: caldo CZ, SAB, RPMI 1640, BHI e meio mínimo, em diferentes tempos, a 28°C e 37°C. Posteriormente, foi feita a análise por microscopia eletrônica de varredura e o perfil proteico do secretoma e do biofilme foi verificado a partir de um gel de eletroforese unidimensional e pela proteômica *shotgun*. Os resultados da análise qualitativa para a produção de biofilme mostraram positividade para todas as cepas de *Aspergillus fumigatus*. Dos cinco meios testados, três foram positivos para a produção do biofilme (CZ, SAB e RPMI 1640) e os demais foram negativos, pois o fungo cresceu demais ou não apresentou aderência na superfície da placa. Na avaliação quantitativa, foi determinada que a melhor condição para produção de biofilme era no meio CZ, a 28°C, no tempo de 36 horas; porém, para análise microscópica e proteômica foram avaliadas as duas temperaturas a fim de verificar se esta influenciava na estrutura e composição proteica do biofilme e secretoma. Na análise por microscopia eletrônica de varredura foi observado que havia diferença no biofilme de acordo com a temperatura, uma vez que a 28°C o biofilme apresentou estruturas arredondadas e compactas, além de uma maior quantidade de conídios em estágio germinativo; já a 37°C foi observada uma maior quantidade de matriz extracelular presente por todo o comprimento da hifa fúngica. Quanto a análise proteômica, foram identificadas uma variedade de proteínas associadas à patogenicidade de *Aspergillus fumigatus*, que desempenham papéis importantes no seu processo de crescimento, mas que também atuam como alérgenos (*e.g.* ribonuclease mitogilina, enolase e Hsp90). Adicionalmente, grande parte destes alérgenos identificados no estudo estavam presentes apenas no biofilme do microrganismo. Com isso, verificou-se que há uma diversidade de proteínas no biofilme e secretoma de *Aspergillus fumigatus* que podem atuar na sua alergenicidade e processo de infecção, as quais também desempenham um importante papel no mecanismo de defesa deste microrganismo durante seu crescimento.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, biofilme, proteômica, alérgenos.

ABSTRACT

It is known that fungal diseases affect many individuals around the world, but the exact number of people affected by these diseases is not very well evaluated due to the lack of surveillance data that can be used. Aspergillosis is an opportunistic mycosis caused by fungi from the genus *Aspergillus*, with *Aspergillus fumigatus* being the main etiological agent. The disease has a variety of clinical presentations, which makes its diagnosis difficult. It is known that during the process of infection this fungus secretes a variety of proteins for its development and that it can form biofilms. The biofilms it creates consist of a microbial community surrounded by a self-produced extracellular matrix, which acts as a protection mechanism against hostile environments and antifungal agents. Proteomics is an approach that can help in the elucidation of *Aspergillus fumigatus* proteins that are involved in the process of infection and those present in the biofilms it forms. The objective of this work was, thus, to characterize the protein profile of the *Aspergillus fumigatus* secretome and identify those involved in its biofilm formation. For this study, three strains of *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16913, ATCC 46640 and ATCC LB-01-AP) were qualitatively and quantitatively evaluated for biofilm production. In our tests the following media were used: CZ broth, SAB, RPMI 1640, BHI and minimum medium. These broths were used to culture the fungus for different culture periods and at different temperatures: 28 °C and 37 °C. Resulting biofilms were analysed using scanning electron microscopy and protein secretomes were evaluated using a one-dimensional electrophoresis gel and shotgun proteomics. The results of the qualitative analysis showed all strains of *Aspergillus fumigatus* capable of biofilm formation. Of the five media tested, three were positive for biofilm production (CZ, SAB and RPMI 1640). The others were negative because the fungus grew too much or showed no adhesion to the plaque surface. In the quantitative evaluation, it was determined that the best condition for biofilm production was achieved by culturing at 28 °C, in 36 hours in CZ medium. For microscopic and proteomic analysis, two temperatures were evaluated to verify whether temperature influenced the structure and protein composition of the biofilm. In the analysis by scanning electron microscopy it was observed biofilm varied according to the temperature. At 28 °C, the biofilm presented rounded and compact structures as well as an elevated amount of conidia in the germ stage. At 37 °C, an elevated amount of extracellular matrix was observed throughout the fungal hyphae. As for proteomic analysis, a variety of proteins associated with the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* have been identified. These identified proteins play important roles in the *Aspergillus fumigatus* growth process and act as allergens (e.g. ribonuclease mitogillin, enolase and Hsp90). Importantly, most of these allergens identified in the study were present only in the biofilm of the microorganism. In conclusion, it was found that there is a diversity of proteins in *Aspergillus fumigatus* biofilms and its secretome that may act on its allergenicity and infection process, playing an important role in the defence mechanism of this microorganism during its growth.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, proteomics, biofilm, allergens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema das rotas de invasão utilizadas por *Aspergillus spp.* para a invasão do epitélio pulmonar do hospedeiro. **A**, espaço aéreo alveolar; **BG**, β -glucano; **BM**, membrana basal; **Ep**, camada de epitélio respiratório; **En**, camada de endotélio vascular; **GT**, gliotoxina; **IFN γ** , interferon γ ; **IL**, interleucina; **L**, lisossomo; **TLR**, receptor do tipo Toll; **TNF**, fator de necrose tumoral; **VL**, lúmen vascular. Fonte: Ben-Ami & Kontoyiannis 2009..... 24
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do funcionamento de um espectrômetro de massas. 32
- Figura 3.** Macrocolônias das cepas de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640, *A. fumigatus* ATCC 16913 e *A. fumigatus* ATCC LB-01-AP com 72 horas de crescimento a 37°C em meio MEA..... 44
- Figura 4.** Placas de biofilme coradas com safranina à 28 °C e com 48 horas de crescimento, indicando que as amostras não formaram biofilme quando cultivadas nos meios BHI e meio mínimo. A) *A. fumigatus* ATCC 16913; B) *A. fumigatus* LB-01-AP; C) *A. fumigatus* ATCC 4660; D) placa positiva para a formação de biofilme no meio SAB. 45
- Figura 5.** Placas de biofilme coradas com safranina à 28°C e com 72 horas de crescimento, mostrando a formação de biofilme quando cultivadas nos meios CZ e SAB. A) *A. fumigatus* ATCC 16913; B) *A. fumigatus* LB-01-AP; C) *A. fumigatus* ATCC 46640; D) Controle negativo. 46
- Figura 6.** Placas de biofilme resultante do meio RPMI 1640 com 48 horas de crescimento, nas temperaturas de 28°C e 37°C; demonstrando positividade quando coradas com safranina. A) *A. fumigatus* ATCC 46640; B) *A. fumigatus* LB-01-AP; C) *A. fumigatus* ATCC 16913; D) Controle negativo em meio mínimo..... 47
- Figura 7.** Visualização de uma das placas de 96 poços usada na quantificação de biofilme, contendo solução de violeta cristal corando os biofilmes oriundos das cepas de *Aspergillus fumigatus* com 24 horas de crescimento à 37°C..... 48
- Figura 8.** Gráfico do intervalo de confiança para os valores esperados da absorbância, segundo as variáveis explicativas: tempo, cepa, meio e temperatura, nos meios de cultivos positivos para a formação de biofilme..... 50
- Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV): micrografias do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivado *in vitro* em meio CZ a 28°C durante 36 horas. As imagens A, B, C e D correspondem aos aumentos de 150x, 500x, 1500x e 3000x da estrutura do biofilme. A estrutura apontada com a seta vermelha corresponde a matriz extracelular do biofilme, a qual está revestindo as hifas e conídios de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640; a seta azul indica a

presença da matriz extracelular atuando como uma rede conectiva entre as hifas fúngicas; o círculo amarelo está indicando os canais formados na malha do biofilme; e o círculo verde pontilhado está indicando as regiões de contato entre as hifas fúngicas (anastomose). 51

Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): micrografias do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivado *in vitro* em meio CZ a 37 °C durante 36 horas. As imagens A, B, C e D correspondem aos aumentos de 150x, 500x, 1500x e 6500x da estrutura do biofilme. A seta vermelha mostra hifas fúngicas revestidas pela matriz extracelular; a seta azul indica a presença dessa matriz cobrindo os conídios fúngicos; a seta amarela indica essa matriz atuando como rede conectiva; o círculo amarelo indica os canais formados entre as hifas fúngicas; e o círculo verde pontilhado indica o contato direto entre as hifas..... 52

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640. Micrografias do biofilme de *Aspergillus fumigatus* cultivado a 28°C nos aumentos de 500x e 1500x (A e B) e cultivado a 37°C nos aumentos de 500x e 1500x (C e D). As setas amarelas indicam estruturas condensadas de biofilme; as setas vermelhas indicam os conídios de *Aspergillus fumigatus* em germinação; e as setas azuis indicam a presença da matriz extracelular ao longo de todo o comprimento das hifas e servindo de conexão entre elas. 53

Figura 12. Dados da concentração de proteínas do biofilme e secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C e 37°C, com o respectivo desvio padrão. Experimento realizado em triplicata biológica. 55

Figura 13. Eletroforese unidimensional demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras de biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C e 37°C; sendo que em cada amostra foi aplicado 30µg de proteína. A caixa amarela está indicando uma banda característica para as duas temperaturas; a caixa vermelha indica as bandas diferenciais presentes na temperatura de 37°C e a caixa verde indica uma banda diferencial presente na temperatura de 28°C..... 56

Figura 14. Eletroforese unidimensional das amostras de secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C e 37°C; sendo que em cada amostra foi aplicado 30µg de proteína. A caixa amarela indica a banda proteica característica das duas temperaturas e a vermelha indica as bandas diferenciais presentes em cada temperatura. 56

Figura 15. Perfil cromatográfico das amostras de biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivados a 28°C (A) e 37°C (B). 57

Figura 16. Perfil cromatográfico das amostras de secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivados a 28°C (A) e 37°C (B). 57

Figura 17. Perfil cromatográfico das amostras de biofilme (A) e secretoma (B) de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 cultivado a 28°C.....	58
Figura 18. Perfil cromatográfico das amostras de biofilme (A) e secretoma (B) de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 cultivado a 37°C.....	58
Figura 19. Análise da distribuição percentual das proteínas do biofilme de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640, de acordo com as diferentes funções. A) função molecular; B) processo biológico; C) componente celular.	63
Figura 20. Análise da distribuição percentual das proteínas do secretoma de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640, de acordo com as diferentes funções. A) função molecular; B) processo biológico; C, Componente celular.	64
Figura 21. Diagrama de Venn do biofilme de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 comparando as proteínas identificadas exclusivamente nas temperaturas de 28°C (azul) e 37°C (verde), e ainda as compartilhadas entre ambas as temperaturas (verde escuro).	65
Figura 22. Diagrama de Venn do secretoma de <i>A. fumigatus</i> ATCC 46640 comparando as proteínas identificadas exclusivamente nas temperaturas de 28°C (rosa) e 37°C (verde), e ainda as compartilhadas entre as duas temperaturas (azul).	66
Figura 23. Proteínas mais expressas no biofilme (verde) e no secretoma (rosa) de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 independentes da temperatura.....	68
Figura 24. Proteínas mais expressas no biofilme de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 nas temperaturas de 28 °C (verde) e 37 °C (rosa).....	69
Figura 25. Proteínas mais expressas no secretoma de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C (laranja) e 37°C (azul).....	69
Figura 26. Rede de interação entre os principais alérgenos de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 identificados neste estudo.	74
Figura 27. Rede de interação da proteína Catalase A com as proteínas quinase ativada por mitógeno hog1, glutathione redutase, tiorredoxina putativa e tiorredoxina redutase.	75
Figura 28. Rede de interação da proteína endoquitinase B1 com as proteínas endo-quitosanase, beta-hexosaminidase e aspergillopepsina -1 identificadas neste trabalho.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Coleção de cultura do tipo Americana (do inglês: <i>American Type Culture Collection</i>)
ABC	Transportadores de cassetes de ligação ao ATP
ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
AGC	Controle de ganho automático (do inglês: <i>Automatic Gain Control</i>)
AI	Aspergilose invasiva
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AM	Macrófago alveolar
APC	Aspergilose pulmonar crônica
AQUA	Quantificação absoluta, (do inglês: <i>Absolute quantification</i>)
BG	Beta-glucano
BHI	Infusão cérebro-coração (do inglês: <i>Brain heart infusion</i>)
BM	Membrana basal (do inglês: <i>basement membrane</i>)
CCPA	Aspergilose pulmonar cavitária crônica (do inglês: <i>chronic cavitary pulmonary aspergillosi</i>)
CFEM	Comum na membrana extracelular de fungos (do inglês: <i>Common in Fungal Extracellular Membrane</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês: <i>collision-induced dissociation</i>)
CNPA	Aspergilose pulmonar necrotizante crônica (do inglês: <i>chronic necrotizing pulmonary aspergillosi</i>)
CZ	Czapeck
DDA	Aquisição dependente de dados (do inglês: <i>Data Dependent Acquisition</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNH	Dihidroxinaftaleno
DTT	Ditiotreitol
Em	Endotélio vascular
Ep	Epitélio respiratório
ESI	Ionização por Eletrospray (do inglês: <i>Electrospray Ionization</i>)
FDR	<i>False discovery rate</i>
FT-ICR	Ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>)
GC	Controle de ganho (do inglês: <i>Gain control</i>)
GLM	Modelo Linear Generalizado
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GT	Gliotoxina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hsp	Proteínas de Choque Térmico (do inglês: <i>heat shock protein</i>)
IAA	Iodoacetamida
IFNγ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E

IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
KDa	Kilodaltons
L	Lisossomo
LC-MS/MS	Cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial (do inglês: <i>Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry</i>)
LTQ	Linear Trap Quadrupolo
M	Molar
m/z	Razão massa/carga
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (do inglês: <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>)
MAT1-1	Gene de acasalamento <i>mating-type 1</i>
MAT1-2	Gene de acasalamento <i>mating-type 1- 2</i>
MEA	Ágar extrato de malte
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (do inglês: <i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MS2	Espectro de íons produtos
NSAF	Fator de abundância espectral normalizado (do inglês: <i>normalized spectral abundance fator</i>)
p/v	Razão peso/volume
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
ppm	Parte por milhão
PSAQ	<i>Protein standard absolute quantification</i>
PSM	Correspondências espectro-peptídeo (do inglês: <i>Peptide Spectrum Match</i>)
QconCAT	<i>Artificial quantification concatemer</i>
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Rotação por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SAB	Sabouraud
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEPro	<i>Search engine processor</i>
SILAC	Marcação de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células (do inglês, <i>Stable Isotope Labelling with Amino acids of Cells in culture</i>)
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TLR	Receptor do tipo Toll (do inglês: <i>toll-like receptors</i>)
TLR2	Receptor do tipo Toll-2 (do inglês: <i>toll-like 2 receptors</i>)

TLR4	Receptor do tipo Toll-4 (do inglês: <i>toll-like 4 receptors</i>)
TMT	<i>Tandem mass tags</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TOF	Tempo de voo (do inglês: <i>Time of Flight</i>)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico (do inglês: <i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane - Hydrochloric acid</i>)
tRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v/v	Razão volume/volume
VL	Lúmen vascular (do inglês: <i>Vascular lumen</i>)
XIC	Cromatogramas de íons extraídos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doenças fúngicas notificadas ao Ministério da Saúde no ano de 2011 e incidência baseada no número de admissões hospitalares	22
Tabela 2. Principais alérgenos de <i>Aspergillus fumigatus</i> identificados neste estudo.	73
Tabela 3. Lista de proteínas identificadas no biofilme de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 em ordem alfabética.....	107
Tabela 4. Lista de proteínas identificadas no secretoma de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640 em ordem alfabética.....	127
Tabela 5. Proteínas identificadas no biofilme que apresentaram <i>fold change</i> significativo .	136
Tabela 6. Proteínas identificadas no secretoma que apresentaram <i>fold change</i> significativo	136
Tabela 7. Proteínas identificadas no biofilme nas diferentes temperaturas com <i>fold change</i> significativo	137
Tabela 8. Proteínas identificadas no biofilme nas diferentes temperaturas com <i>fold change</i> significativo	138

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1. Carga de doenças fúngicas	21
2.2. Aspergilose	23
2.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> e seus fatores de virulência	26
2.4. Secreção de proteínas	28
2.5. Biofilme.....	29
2.6. Proteômica.....	30
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MÉTODOS.....	36
4.1. Condições de cultivo	36
4.2. Avaliação qualitativa da formação de biofilme	36
4.3. Avaliação quantitativa da produção do biofilme	37
4.4. Análise estatística.....	37
4.5. Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.6. Obtenção do secretoma e do biofilme para o estudo proteômico	38
4.7. Precipitação, extração e quantificação proteica.....	39
4.8. Eletroforese unidimensional e coloração com <i>Coomassie</i> R-250	39
4.9. Digestão proteolítica em solução	40
4.10. Dessalinização, concentração e quantificação dos peptídeos.....	40
4.11. Análise por LC-MS/MS	40
4.12. Análise dos dados	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Cultura fúngica.....	44
5.2. Avaliação qualitativa da formação de biofilme	44
5.3. Avaliação quantitativa da formação de biofilme	47
5.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	51
5.5. Estudo proteômico	54
5.5.1. Análise da extração de proteínas.....	54
5.5.2. Gel de eletroforese unidimensional	55
5.5.3. Análise proteômica.....	57

5.5.3.1.	Perfil Cromatográfico	57
5.5.3.2.	Identificação proteica.....	59
5.5.3.3.	Análise diferencial do biofilme e secretoma nas diferentes temperaturas ..	65
5.5.4.	Principais alérgenos de <i>Aspergillus fumigatus</i>	70
5.5.5.	Rede de interações.....	74
6.	CONCLUSÕES	78
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8.	APÊNDICE	102
8.1.	Composição dos meios de cultivo utilizados neste trabalho	102
8.2.	Placas de biofilme coradas com safranina.....	103
8.3.	Proteínas identificadas no biofilme e secretoma de <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46640.....	107
8.4.	Proteínas identificadas no biofilme e no secretoma com <i>fold change</i> significativo.	
	136	

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que as doenças fúngicas acometem um número considerável de indivíduos em todo o mundo. Porém, a quantidade de pessoas afetadas por essas doenças não é muito bem estimada devido à falta de dados de vigilância que possam ser utilizados. Dentre estas doenças que atingem a população está a Aspergilose, uma doença infecciosa ocasionada por diferentes espécies do gênero *Aspergillus* e possui o *Aspergillus fumigatus* como principal agente etiológico (Brown et al. 2012a, Borghi et al. 2016).

Aspergillus fumigatus é um fungo saprofítico bem adaptado que produz um grande número de esporos aerotransportados, os quais podem sobreviver a uma ampla gama de condições ambientais (Duarte-Escalante et al. 2009). Os conídios de *A. fumigatus* são inalados continuamente por seres humanos e eliminados eficientemente por mecanismos imunes inatos. Porém, nas últimas décadas, a população de indivíduos infectados por este patógeno fúngico está se expandindo, mesmo nos países desenvolvidos; devido ao aumento do número de transplantados, ao desenvolvimento de terapias imunossupressoras, ao vírus da imunodeficiência adquirida, doenças autoimunes e neoplásicas (Latgé 2003, Hohl & Feldmesser 2007, Duarte-Escalante et al. 2009).

Sabe-se atualmente que a infecção ocasionada por *A. fumigatus* não está associada somente ao imunocomprometimento do hospedeiro, mas também aos diversos mecanismos deste fungo em se adaptar a ambientes hostis para o seu crescimento. Alguns fatores de virulência deste microrganismo e sua patogênese já foram estudados, como por exemplo, a produção e presença de melanina em sua parede celular e os genes associados à termotolerância (e.g. o gene *thtA* e o gene *afpmt1*) (Tsai et al. 1998, Wagener et al. 2008, Abad et al. 2010).

Além disso, este fungo secreta uma série de metabólitos primários e secundários durante seu crescimento/infecção no organismo do hospedeiro, e estudos recentes têm demonstrado sua capacidade para produção de biofilme (Bruns et al. 2010b, Sardi et al. 2014, Reichhardt et al. 2015, Borghi et al. 2016). Esta estrutura fornece proteção às células fúngicas, impedindo que o sistema imune consiga destruí-las, o que conseqüentemente lhe confere também resistência aos mecanismos antifúngicos.

Embora fatores como estes citados acima tenham sido identificados como contribuintes para a virulência deste fungo acredita-se que outras biomoléculas possam estar envolvidas neste processo. Nesse sentido a proteômica, através de abordagens como a proteômica *shotgun*, pode auxiliar na identificação e quantificação de proteínas presentes tanto no biofilme quanto no secretoma deste fungo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Carga de doenças fúngicas

As doenças fúngicas atingem várias pessoas a cada ano, porém como estas são subnotificadas, não é possível determinar com exatidão o número de indivíduos infectados (Vallabhaneni et al. 2016). Contudo, sabe-se que as pessoas acometidas podem variar de acordo com algumas características relacionadas às condições socioeconômicas, localização geográfica, hábitos culturais e situação de risco (Giacomazzi et al. 2016).

As infecções fúngicas superficiais são as que mais afetam a população. De acordo com Brown et al (2012), as de pele e unhas afetam aproximadamente 25% da população mundial e são causadas principalmente por dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp.; porém, as espécies podem variar de acordo com a região geográfica (Ameen 2010). Outros gêneros não-dermatófitos que também se configuram como agentes etiológicos destas infecções são: os fungos filamentosos *Fusarium* spp e *Aspergillus* spp, e as leveduras *Candida* spp e *Malassezia* spp (Chiacchio et al. 2014, Silva-Rocha et al. 2017). Vale ressaltar ainda que alguns fatores predisponentes estão associados ao surgimento de tais infecções, como: condições climáticas, migrações de pessoas, atividades esportivas, contato prolongado com água, estilo de vida, estado imunológico, terapia medicamentosa e idade dos pacientes (Silva-Rocha et al. 2017).

Já as infecções invasivas acontecem com menor frequência, porém os casos de mortalidade relacionados a essas infecções são alarmantes e tem aumentado devido as terapias imunossupressoras, transplante de órgãos sólidos, pessoas em tratamento de câncer e HIV/AIDS (Brown et al. 2012b). De acordo com Brown et al (2012a), mais de um milhão e meio de pessoas morrem vítimas de pelo menos uma das 10 principais infecções fúngicas invasivas (aspergilose, candidíase, criptococose, mucormicose, pneumocistose, blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose e peniciliose). Em um levantamento feito por Giacomazzi et al (2016) sobre a carga de doenças fúngicas no Brasil para o ano de 2011, verificou-se que apenas os casos de coccidioidomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose foram notificados para o Ministério da Saúde; já casos de aspergilose, candidose, pneumocistose, blastomicose e peniciliose não foram notificados ou encontrados no Brasil (Tabela 1). Vale ressaltar ainda que em mais de 90% dos casos das doenças fúngicas invasivas, o agente etiológico pertence a um desses quatro gêneros: *Cryptococcus*, *Candida*, *Pneumocystis* ou *Aspergillus* (Brown et al. 2012a).

Tabela 1. Doenças fúngicas notificadas ao Ministério da Saúde no ano de 2011 e incidência baseada no número de admissões hospitalares (n= 11.643.050). Fonte: Modificado de: Giacomazzi et al (2016).

Infecção fúngica	Total de casos	Incidência (/1000)
Coccidioidomicose	829	7.12
Histoplasmose	255	2.19
Paracoccidioidomicose	930	7.99

Dentre as infecções fúngicas invasivas há um importante destaque para a criptococose, o qual é causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* e mais raramente por *Cryptococcus gattii*. A maioria dos casos clínicos se apresentam como meningoencefalites com um número aproximado de 950 mil casos e 625 mil óbitos no mundo inteiro (Brown et al. 2012a, Armstrong-James et al. 2014, Vallabhaneni et al. 2016). No Amazonas, em um estudo realizado por Alves et al (2016), foi verificada a presença de propágulos de *C. neoformans/C. gattii* em uma variedade de amostras coletadas na área urbana da cidade de Manaus. Deste estudo, foi verificado que os tipos moleculares isolados correspondiam àqueles responsáveis pelas infecções nos indivíduos da cidade, revelando a presença de reservatórios ambientais destes em Manaus (Alves et al. 2016).

As espécies de *Candida* estão presentes na pele dos seres humanos e são consideradas os agentes mais comuns desse tipo de infecção. Apesar de existirem uma gama de espécies que possam acometer os pacientes, *Candida albicans* é a espécie mais comumente isolada (Brown et al. 2012a, Guinea 2014, Lovero et al. 2016). De acordo com Paramythiotou et al. (2014), a mortalidade para infecção invasiva causada apenas por esse gênero pode variar entre 30 a 60%, correspondendo à aproximadamente 400 mil casos por ano. Já *Pneumocystis jirovecii* é um patógeno fúngico de importância médica que causa pneumonia principalmente em indivíduos HIV/AIDS (Brown et al. 2012a, Roux et al. 2014, Vallabhaneni et al. 2016). É estimado que nestes indivíduos em terapia antirretroviral, ocorram 400 mil casos de infecções por ano, com uma taxa de mortalidade que pode variar de 13% a 80% (Brown et al. 2012a).

Além disso, a exposição constante dos pulmões às espécies de *Aspergillus* em indivíduos susceptíveis pode resultar em infecções. Nos casos de aspergilose pulmonar, estas podem se apresentar de forma invasiva ou como reações alérgicas, e estima-se que ocorram mais de 200.000 casos de aspergilose invasiva a cada ano, podendo chegar à uma taxa de mortalidade de 50%. Em contrapartida, as formas alérgicas podem chegar até 13 milhões de casos, resultando em cerca de 100 mil mortes por ano (Brown et al. 2012a). Em Manaus, em um estudo que visava verificar os casos de aspergilose em pacientes que tiveram tuberculose pulmonar e apresentavam baciloscopia negativa, observou-se que no decorrer de dois anos

(2012-2014), dos 400 pacientes atendidos 36 apresentaram aspergilose pulmonar (Oliveira et al., 2016).

Logo, verifica-se na literatura um número elevado de casos e mortes associadas às doenças fúngicas, bem como um custo elevado decorrente do tratamento destes pacientes quando apresentam comorbidades e as infecções (Wilson et al., 2002); necessitando assim de maiores estudos aplicados à micologia médica, em especial ao que se refere ao diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas doenças.

2.2. Aspergilose

A aspergilose é uma micose oportunista ocasionada por fungos do gênero *Aspergillus*. Embora o *Aspergillus fumigatus* seja o principal agente etiológico, outras espécies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. versicolor* e *A. nidulans* também podem ser associadas a essa doença (Lalgé 1999, Barnes & Marr 2006). As manifestações clínicas variam de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, variando desde reação alérgica exacerbada à infecção invasiva disseminada (Kosmidis & Denning 2015). Adicionalmente, dentre os indivíduos afetados pela aspergilose estão aqueles que passaram por transplante de células hematopoiéticas e/ou órgãos sólidos, terapia imunossupressora, HIV/AIDS, pacientes neutropênicos, asmáticos, com fibrose cística, doença pulmonar crônica e que apresentam cavidades pulmonares pré-existentes (Agarwal et al. 2013, Godet et al. 2014, Knutsen 2017).

O processo infeccioso por *Aspergillus fumigatus* se dá através da inalação de seus conídios dispersos no ar. Em indivíduos saudáveis, estes são eliminados de maneira eficiente através de células do sistema imune inato, que identificam a presença destes nos alvéolos pulmonares e são fagocitados. Assim, após a produção de citocinas e quimiocinas por células imunes inatas, os linfócitos TCD4-*helper naive* começam a se diferenciar para atuar na eliminação dos conídios de *A. fumigatus* (Dewi et al. 2017). Contudo, em pacientes imunocomprometidos, esse processo não é totalmente eficaz e os conídios acabam germinando, o que desencadeia o início da infecção e pode ocorrer a colonização dos pulmões com grandes chances de disseminação para locais extrapulmonares (Brakhage et al. 2010, Oliveira & Caramalho 2014, Dewi et al. 2017).

Na figura 1, tem-se uma visualização desse processo de interação entre os conídios de espécies de *Aspergillus* com a superfície epitelial do hospedeiro (Ben-Ami & Kontoyiannis 2009, Heinekamp et al. 2015). Nesta, são mostradas duas rotas que *Aspergillus spp.* utilizam para o seu processo de invasão: a primeira acontece através do desnudamento das células epiteliais danificadas, o qual permite que os conídios se liguem a matriz extracelular epitelial e

iniciem a invasão; a segunda via é mais comum, onde os conídios induzem a sua absorção através das células epiteliais impedindo sua fagocitose por células efetoras imunes. Dentro dessas células, estes iniciam o processo de inchaço conidial e a formação do tubo germinativo para a produção das hifas, as quais penetrarão as camadas epiteliais e endoteliais do lúmen vascular (Ben-Ami & Kontoyiannis 2009).

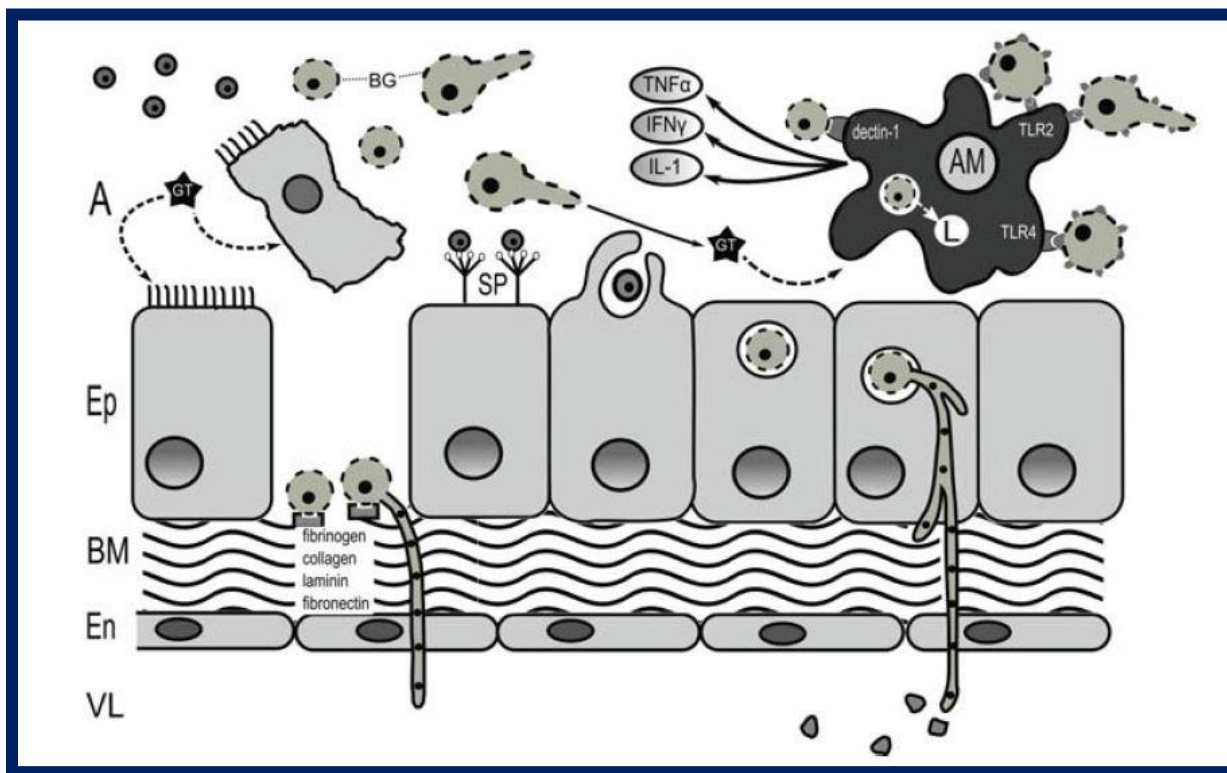


Figura 1. Esquema das rotas de invasão utilizadas por *Aspergillus spp.* para a invasão do epitélio pulmonar do hospedeiro. **A**, espaço aéreo alveolar; **BG**, β-glucano; **BM**, membrana basal; **Ep**, camada de epitélio respiratório; **En**, camada de endotélio vascular; **GT**, gliotoxina; **IFN γ** , interferon γ ; **IL**, interleucina; **L**, lisossomo; **TLR**, receptor do tipo Toll; **TNF**, fator de necrose tumoral; **VL**, lúmen vascular. Fonte: Ben-Ami & Kontoyiannis 2009.

O tratamento ou terapia é específica para o tipo de manifestação dessa doença, todavia de maneira geral são utilizados os seguintes medicamentos: cetoconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, anfotericina B, entre outros. A dosagem e o tempo aplicado dependem do estado clínico e resposta do paciente, e verifica-se que as opções existentes devem levar em consideração também as possíveis reações de toxicidade e resistência antifúngica (Godet et al. 2014, Schweer et al. 2014, Greenberger et al. 2014, Kosmidis & Denning 2015, Denning et al. 2016, Tracy et al. 2016).

O diagnóstico é baseado em diversos exames que variam de achados clínicos, radiológicos e imunológicos. Alguns exemplos destes são: a presença de infiltrados pulmonares, reatividade cutânea, valores de IgG e IgE para *A. fumigatus*, achados

broncoscópicas, micológicas, histológicas, biópsia do tecido e tomografia computadorizada (Cadena et al. 2016). É importante lembrar que apenas um destes exames não é sensível e nem específico o suficiente para fechar o diagnóstico. Por isso, eles são realizados de forma combinada para que haja maior exatidão no resultado (Segal & Walsh 2006, Agarwal et al. 2013, 2014, 2015, Dhooria & Agarwal 2014, Godet et al. 2014, Knutsen 2015, 2017, Maturu & Agarwal 2015, Kosmidis & Denning 2015, Denning et al. 2016, Tracy et al. 2016, Cadena et al. 2016).

Além disso, a aspergilose se apresenta de três formas principais: aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilose pulmonar crônica (APC) e aspergilose invasiva. A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é uma doença pulmonar atribuída a reações de hipersensibilidade às espécies do gênero *Aspergillus*. Os indivíduos mais afetados são aqueles que apresentam quadros de asma e portadores de fibrose cística, nos quais se estima que a prevalência seja de 1-9% em indivíduos com asma e de 7-9% em indivíduos com fibrose cística (Knutsen 2017). De forma geral, esta é caracterizada por exacerbações de asma, onde há comprometimento da função pulmonar, infiltrados pulmonares, eosinofilia pulmonar e no sangue periférico, níveis elevados de IgE total e de anticorpos IgE e IgG específicos para *A. fumigatus*, tosse, falta de ar, febre, anorexia, mal-estar; e ainda pode evoluir para danos pulmonares permanentes através do desenvolvimento de bronquiectasias se não for tratada de forma correta (Greenberger et al. 2014, Knutsen 2015, 2017, Kosmidis & Denning 2015).

A aspergilose pulmonar crônica (APC) afeta indivíduos com doenças pulmonares estruturais pré-existent e apresenta uma classificação distinta que é baseada nos seus achados clínicos, radiológicos e fisiopatológicos (Godet et al. 2014). Pode ser classificada como: aspergiloma simples, aspergilose pulmonar cavitária crônica e aspergilose pulmonar necrotizante crônica. De acordo com Szalewski et al. (2018), estas infecções são bastante graves e estima-se que 3 milhões de pessoas sofram de APC em todo o mundo, onde 1,74 milhões já tenham apresentado um histórico de doença pulmonar anterior (Latgé 1999; Pfaller et al. 2006; Denning et al. 2016).

Para o aspergiloma simples, não há progressão do tamanho da cavidade ao longo dos meses e os pacientes geralmente são assintomáticos (Denning et al. 2016). Na aspergilose pulmonar cavitária crônica (CCPA) pode ocorrer a formação e expansão de novas cavidades ou expansão daquelas já existentes que podem ou não conter bolas fúngicas, e não ocorre a invasão do tecido ou angioinvasão. Em adição, na aspergilose pulmonar necrotizante crônica (CNPA) ocorre a expansão das cavidades e invasão do tecido (Godet et al. 2014, Schweer et al. 2014). Nestes casos, o tratamento cirúrgico deve ser considerado apenas para pacientes que apresentem

uma boa função pulmonar e quando os benefícios forem maiores do que os riscos, sendo indicado geralmente para indivíduos com aspergiloma simples (Godet et al. 2014, Schweer et al. 2014, Denning et al. 2016).

Já a aspergilose invasiva é a manifestação mais grave dessa doença e atinge principalmente pacientes imunocomprometidos, em especial os hemato-oncológicos e os receptores de órgãos sólidos (Schmiedel & Zimmerli 2016). Uma de suas características mais comuns é a angioinvasão, a qual pode levar à trombose vascular, infarto de tecidos e necrose coagulativa (Segal & Walsh 2006).

2.3. *Aspergillus fumigatus* e seus fatores de virulência

O gênero *Aspergillus* foi descoberto em 1729 e recebeu este nome devido sua similaridade ao instrumento de dispersar água benta nos cultos cristãos, aspergillum (Gibbons & Rokas 2013, Sugui et al. 2014). Em 1856, Rudolf Virchow reconheceu espécies deste gênero como agentes causadores de doenças em animais e humanos, e em 1863 Fresenius apontou *A. fumigatus* como a espécie patogênica mais importante do gênero (Sugui et al. 2014).

Como dito anteriormente, essa espécie é o principal agente etiológico da aspergilose, correspondendo à 90% dos isolados e sua concentração de conídios no ambiente quando comparado com outras espécies de *Aspergillus*, corresponde a apenas 1% (Alshareef & Robson 2014). Este microrganismo demonstra algumas propriedades que o auxiliam nessa patogenicidade e se adapte/sobreviva dentro do organismo do hospedeiro, tais como: tamanho de seus esporos, reprodução assexuada, termotolerância e a parede celular (Abad et al. 2010, Alshareef & Robson 2014).

Esta espécie produz conídios que variam de 2 a 3 µm de tamanho, o que comparado com os conídios de outros fungos, são considerados pequenos. Após a inalação, estes escapam dos mecanismos de defesa da cavidade nasal e do trato respiratório superior, resultando em uma certa facilidade para entrarem nos alvéolos pulmonares e iniciarem o processo de invasão do tecido e dos vasos sanguíneos (Oliveira & Caramalho 2014). Esta angioinvasão leva à trombose, causando a morte de células teciduais que servirão como fonte de alimento para o crescimento fúngico. Adicionalmente, a necrose tecidual limita que as células do sistema imune e agentes antifúngicos consigam chegar ao local da infecção, agravando assim o estado de saúde do hospedeiro (Kamai et al. 2006, Oliveira & Caramalho 2014).

Com relação à forma de reprodução, algumas espécies de *Aspergillus* apresentam tanto uma forma sexuada como outra assexuada (Szalewski et al. 2018). *A. fumigatus* é uma dessas espécies, onde *Neosartorya fumigata* é sua forma sexuada, contudo para que haja a reprodução

é necessário a presença de tipos de cruzamento opostos (*MAT1 - 1* e *MAT1 - 2*), e outros fatores ambientais que favoreçam este tipo de reprodução (Sugui et al. 2014, Szalewski et al. 2018). Na forma assexuada, este microrganismo inicia seu processo de germinação quando encontra um ambiente favorável; assim, quando os conídios assexuados são inalados pelo indivíduo imunocomprometido, estes germinam e podem iniciar o processo de infecção (Abad et al. 2010, Sugui et al. 2014, Szalewski et al. 2018).

A termotolerância é outro fator importante associado à patogenicidade, pois permite que este se adapte a temperatura do ambiente em que se encontra. Segundo Abad et al. (2010), este microrganismo apresenta a capacidade de sobreviver a temperaturas mesófilas, podendo também suportar temperaturas até 70 °C. Na literatura, estudos já identificaram alguns genes (*thtA*, *afpmt1*, *kre2*, *afmnt1*, *cgrA* e *hsp1/asp f 12*) associados a essa característica (Kumar et al. 1993, Bhabhra et al. 2004, Zhou et al. 2007, Abad et al. 2010). Apesar de não estar completamente esclarecido o papel destes genes, foi observado que *thtA* (associado ao crescimento a 48 °C) e *afpmt1* (necessário para o crescimento a 48 °C) não influenciavam na virulência do fungo, mas que o silenciamento de *kre2*, *afmnt1* e *cgrA* (relacionados ao crescimento a 37 °C) tornou a cepa menos virulenta; e ainda, que *hsp1/asp f 12* tem um papel muito importante nos casos alérgicos de aspergilose, apresentando uma alta reatividade com anticorpos IgG e IgE em soros de pacientes com ABPA (Bhabhra et al. 2004, Wagener et al. 2008, Abad et al. 2010).

Além disso, a temperatura também pode influenciar na alergenicidade dos conídios de *A. fumigatus*, o que é interessante já que os nichos habitacionais deste microrganismo são variados e ele pode crescer em diversas temperaturas (Low et al. 2011). Nesse contexto, a temperatura estimula a produção de uma família de proteínas produzidas como mecanismo de proteção dessa espécie, as proteínas do choque térmico (HSPs) (Bui et al. 2016). As HSPs 90 e 70 estão associadas a mecanismos de resistência, uma vez que a superprodução de Hsp90 está associada a resistência à caspafungina e Hsp 70 corresponde a um alto nível de resistência ao itraconazol (Szalewski et al., 2018; Kumar et al. 1993, Abad et al. 2010, Low et al. 2011, Hagiwara et al. 2017).

A parede celular de *A. fumigatus* assim como de outros fungos patogênicos é essencial para a sua virulência, pois atua na interação do fungo com o hospedeiro. Esta é composta por glucanos (lineares e ramificados), quitina, galactomanano, melanina, entre outros. Tais componentes (*e.g.* melanina) podem funcionar como um mecanismo de defesa do fungo, evitando processos como a fagocitose e danos por espécies reativas de oxigênio (Askew 2008, Abad et al. 2010, Veerdonk et al. 2017). Em contrapartida, geralmente quando estes

componentes são identificados pelo sistema imunológico do hospedeiro desencadeiam uma série de estímulos e produção de citocinas que atuarão em resposta à presença do microrganismo (Abad et al. 2010).

2.4. Secreção de proteínas

Todo microrganismo durante seu crescimento secreta uma série de proteínas e metabólitos secundários úteis para a manutenção de um ambiente propício às suas necessidades metabólicas (Wartenberg et al. 2011). Neste contexto, as proteínas do secretoma correspondem aquelas secretadas, ancoradas na superfície celular ou no ambiente extracelular, bem como aquelas proteínas envolvidas na via secretora (Abdel-Azeem et al. 2016, McCotter et al. 2016).

Dentre as proteínas secretadas por *Aspergillus fumigatus* estão enzimas como proteases, peptidases e fosfolipases, assim como exoproteases, micotoxinas e outros produtos fúngicos que são capazes de comprometer o epitélio pulmonar e ativar o sistema imune (Kumar et al. 1993, Bruns et al. 2010, Vivek-Ananth et al. 2018). De acordo com Szalewski et al. (2018), as proteases fúngicas secretadas durante seu desenvolvimento no hospedeiro podem ser consideradas como um dos principais fatores responsáveis pelo processo de angiogênese (Szalewski et al. 2018). Porém, é importante frisar que o secretoma produzido por este fungo, assim como o de qualquer outro microrganismo, pode sofrer uma influência do meio ao qual está sendo submetido (McCotter et al. 2016). Logo, dependendo das condições de seu crescimento, a composição proteica será diferente (Kniemeyer 2011).

Em um estudo desenvolvido por Vivek-Ananth et al (2018), foi observado que 71% das proteínas do secretoma, sendo 52% relacionadas à membrana celular de *A. fumigatus*, não apresentavam homólogos para humanos. Estas proteínas estavam relacionadas principalmente à patogênese, em especial aos processos metabólicos, regulação da resposta imune do hospedeiro, bem como na resposta e síntese para micotoxina. De maneira que, estas podem servir como alvos para o desenho de futuros novos biomarcadores (Vivek-Ananth et al. 2018).

Em outro estudo, Kumar et al. (2011) verificou 24 proteínas, das quais a sua maioria eram enzimas que estavam envolvidas no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios. Destas, 15 apresentavam imunogenicidade e 3 (beta-1,3-endoglucanase, tioredoxina redutase e a oxigenase dependente de FAD) não apresentavam homologia com proteínas humanas, podendo ser interessantes também como marcadores de diagnóstico (Kumar et al. 2011).

2.5. Biofilme

Assim como a secreção de proteínas é utilizada para preparar um ambiente favorável para o crescimento fúngico (Wartenberg et al. 2011), a formação de biofilme também pode desempenhar uma importante função para o microrganismo uma vez que este fornece integridade estrutural e proteção (Flemming & Wingender 2010). O biofilme consiste em comunidades microbianas que estão inseridas dentro de uma matriz exopolimérica autoproduzida, a qual contribui na retenção de água e nutrientes que contribuirão para o crescimento do microrganismo (O'Toole 2003, Oliveira et al. 2010, Hobley et al. 2015). Estes vivendo nestas comunidades apresentam uma maior proteção contra ambientes hostis e à ação de agentes antimicrobianos quando comparados com seus homólogos que vivem de forma planctônica, pois este atua como uma espécie de barreira física (Kaur & Singh 2014, Vila & Rozental 2016). Assim como outros microrganismos patogênicos, o *A. fumigatus* apresenta a capacidade de formação de biofilme (Seidler et al. 2008, Rajendran et al. 2011, Vila & Rozental 2016).

De maneira geral, o biofilme fúngico mais estudado na micologia médica é o da levedura patogênica *Candida albicans*. Estes podem se formar na superfície de dispositivos médicos e apresentam quatro estágios de formação: 1- fase de aderência, onde as células planctônicas se ligam à superfície (1-3 horas); 2- fase intermediária onde se inicia o processo de brotamento, que vai de 11 a 14 horas; 3- fase de maturação, onde a matriz extracelular envolve todas as camadas aderidas à superfície (20-48 horas) e, 4-fase de dispersão, onde as células presentes nas camadas mais superficiais do biofilme se libertam e aderem às superfícies ao seu redor (Vila & Rozental 2016).

O biofilme produzido por *A. fumigatus* em comparação com o de *Candida albicans* apresenta uma diferença em torno de 10 horas na formação. Este possui um período de 10 a 16 horas entre o tempo de adesão e germinação, 48 horas para o início da produção da matriz extracelular e em 72 horas se tem a produção do biofilme maduro (Seidler et al. 2008, Vila & Rozental 2016). Uma possível explicação para essa diferença pode estar associada à morfologia destes microrganismos, onde algumas leveduras levam menos tempo para crescerem quando comparadas com os fungos filamentosos.

Na revisão feita por Muszkieta et al (2013), eles avaliaram o biofilme produzido por *Aspergillus fumigatus* através de diversas abordagens “ômicas”. Nesta revisão, observou-se quais genes estavam superexpressos e envolvidos na transcrição de moléculas de transporte, metabolismo secundário, moléculas antigênicas e alergênicas durante o crescimento do

biofilme (*e.g.* transportadores ABC, *Mdr1*, *Mdr2* e *Mdr4*) (Nascimento et al. 2003), bem como identificou-se proteínas diferencialmente expressas nesta condição de crescimento (*e.g.* Asp-hemolisina, piruvato quinase, álcool desidrogenase e malato desidrogenase) (Muszkieta et al. 2013).

Já outros estudos demonstraram que alguns componentes do biofilme de *A. fumigatus* são: galactomanano, α -1,3 glucano, melanina e DNA extracelular, sendo este último relacionado à maturação do biofilme e processos de morte celular (Loussert et al. 2010, Kaur & Singh 2013).

2.6. Proteômica

Uma abordagem que pode auxiliar no estudo e descoberta de novos alvos aplicado a agravos na saúde que *A. fumigatus* pode ocasionar é a proteômica. Esta pode analisar de forma descritiva e quantitativa proteínas de uma determinada amostra e suas variações em resposta à um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado, bem como modificações e interações com outras proteínas (Barbosa et al. 2012, Zhang et al. 2013).

Na proteômica, existem três técnicas principais: a *top-down*, *middle-down* e *bottom-up*: a primeira corresponde à análise de proteínas intactas; a segunda identifica proteínas a partir de peptídeos que possuem uma cadeia longa de aminoácidos e a terceira que também analisa peptídeos oriundos de proteínas de uma amostra, porém estes apresentam uma cadeia menor de aminoácidos comparados com os resultantes da *middle-down* (Yates et al. 2009, Zhang et al. 2013, Gillet et al. 2016).

Dentro da abordagem *bottom-up*, está a proteômica *shotgun*. De forma simplificada, esta analisa peptídeos oriundos de proteínas extraídas de amostras complexas, que foram obtidos através da ação de uma enzima, geralmente a tripsina (Graham et al. 2011). Posteriormente, estes peptídeos podem ser separados por métodos cromatográficos e de acordo com sua razão massa/carga (m/z) através de um espectrômetro de massas, para então a inferência proteica ser realizada (Cantú et al. 2008, Barbosa et al. 2012, Zhang et al. 2013).

A quantificação proteica pode ocorrer de duas formas: absoluta e relativa (Aquino 2015). Na quantificação absoluta tem-se como princípio a introdução de padrões com concentração conhecida para determinar a quantidade de uma dada substância. Dentro deste tipo de quantificação existem três abordagens principais: AQUA, QconCAT e PSAQ. O AQUA é muito indicado para a determinação de modificações pós-traducionais devido sua capacidade de determinar peptídeos com modificações específicas (Zhang et al. 2013), já o QconCAT tem a capacidade de identificar diferentes proteínas simultaneamente, sendo muito útil no estudo de

complexos e vias metabólicas (Zhang et al. 2013); e o PSAQ utiliza múltiplos padrões de peptídeos para determinar sua proteína alvo, o que lhe confere uma maior cobertura de sequência e melhor confiabilidade (Gerber et al. 2003, Bantscheff et al. 2007, Shuford & Muddiman 2013, Zhang et al. 2013, Aquino 2015). Já a quantificação relativa permite estimar a abundância relativa de peptídeos em diferentes amostras, sendo esta realizada a partir de dois métodos principais: livre ou isenta de marcação (*label-free*) e dependente de marcação (Zhang et al. 2013, Aquino 2015).

A quantificação relativa *label-free* avalia as amostras comparando a intensidade dos íons oriundos dos peptídeos. Para este tipo de quantificação são utilizadas duas técnicas: a primeira, denominada XIC (cromatograma de íons extraídos), que é feita a partir de um ou mais valores de razão m/z representante de um determinado peptídeo. Nesta, a intensidade do íon precursor ao longo do tempo é plotada obtendo-se o seu valor a partir do cálculo da área abaixo da curva gerada a partir dos pontos plotados, onde quanto maior a área do pico, maior é sua concentração na amostra (Zhu et al. 2010, Zhang et al. 2013, Aquino 2015). Já a segunda técnica de quantificação é denominada contagem espectral (*spectral count*), e feita a partir da comparação do número de espectros de MS2 adquiridos e mapeados para uma dada proteína. (Zhu et al. 2010, Zhang et al. 2014).

Para a quantificação relativa dependente de marcação pode-se utilizar diferentes métodos. Dentre os marcadores existentes, tem-se aqueles que marcam metabolicamente (*e.g.* SILAC: ^{13}C e ^{15}N), quimicamente (*e.g.* iTRAQ e TMT) ou enzimaticamente (*e.g.* marcação com ^{18}O). Este tipo de marcação permite a análise simultânea de amostras produzidas em diferentes condições, a redução de possíveis vieses associado à variabilidade experimental e manipulação da amostra, além de diminuir o tempo de análise no espectrômetro de massas (Zhu et al. 2010, Zhang et al. 2013, Aquino 2015).

A identificação de proteínas de uma dada amostra pode ser feita a partir dos dados obtidos por espectrometria de massas, sendo essa ferramenta mais utilizada para estudo em larga escala de proteínas (Damaso 2017). Nesta, tem-se o espectrômetro de massas que é dividido em uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector de íons, sendo auxiliado por instrumento computacional para adquirir os dados obtidos pela análise (Figura 2) (Cantú et al. 2008, Barbosa et al. 2012). Adicionalmente, este equipamento também deve possuir uma alta sensibilidade, resolução, precisão e acurácia, visto que permitirá a diferenciação entre íons de m/z muito próximos bem como possibilita uma maior especificidade na medida da massa (Yates et al. 2009, Zhang et al. 2013, Damaso 2017).

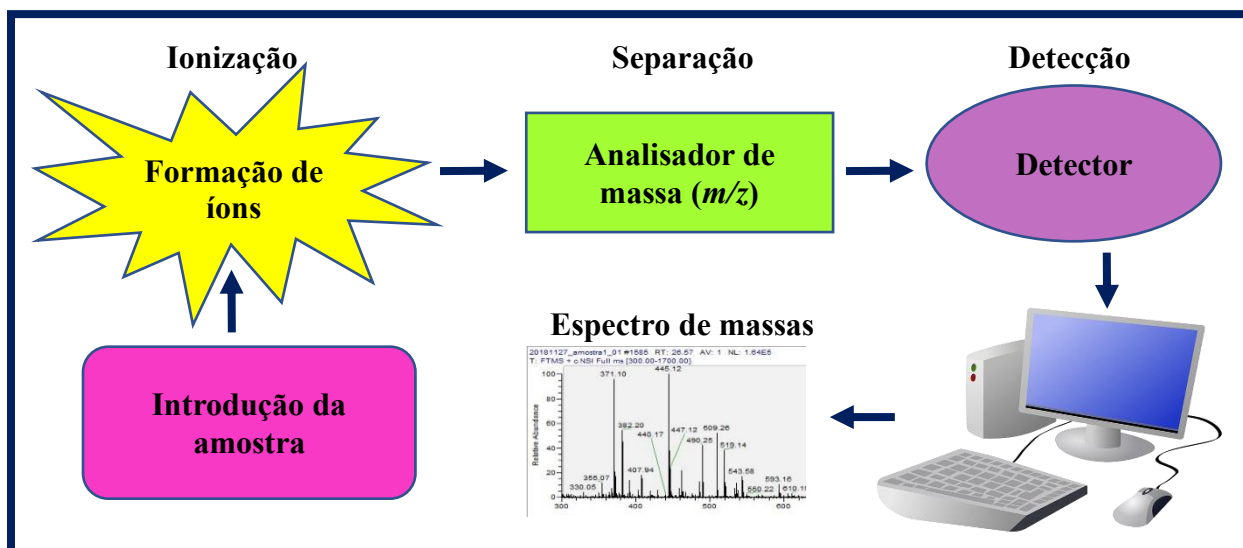


Figura 2. Esquema ilustrativo do funcionamento de um espectrômetro de massas.

Atualmente para o estudo de biomoléculas em espectrometria de massas, as fontes de ionização mais utilizadas são, o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e o ESI (*Electrospray Ionization*). Estas realizam a ionização da amostra de maneira branda, conservando a integridade da cadeia polipeptídica (Medzihradzsky & Chalkley 2015). No MALDI, as amostras são inseridas no estado sólido e uma matriz composta de um ácido orgânico de baixo peso molecular é aplicada; após o bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, permitindo a ionização dos peptídeos resultantes na amostra. Já o ESI, ao contrário do MALDI, produz íons a partir de uma solução, ao ser aplicado uma diferença de potencial entre a extremidade capilar da câmara de ionização e o orifício de entrada no espectrômetro de massas. Tal diferença resulta em um spray eletrolítico, de microgotas altamente carregadas que após a evaporação do solvente, geram formas ionizadas do analito (Aquino 2012, Barbosa et al. 2012).

Com relação aos analisadores de massas, estes são responsáveis por separar os íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z) a partir de uma diferença de potencial na voltagem, aplicação de um campo elétrico, variação na radiofrequência, entre outros (Barbosa et al. 2012). Atualmente, tem-se vários tipos e combinações, sendo que a escolha dependerá dos objetivos e necessidades do experimento. Alguns exemplos são: o quadrupolo, *ion trap*, TOF (*time of flight*), orbitrap e o FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) (Graham et al. 2011, Barbosa et al. 2012, Eliuk & Makarov 2015). Em adição, cada tipo de analisador apresenta suas limitações, e uma das alternativas para superar isso e obter melhor aproveitamento nas análises foi a elaboração de equipamentos híbridos, ou seja, que possuem dois ou mais tipos de analisadores em um mesmo instrumento (Graham et al. 2011, Barbosa et al. 2012). Um exemplo

de espectrômetro de massas híbrido é o LTQ Orbitrap Velos (*Thermo Fisher Scientific*), o qual possui dois tipos de analisadores, o *Ion Trap Linear* e o *Orbitrap*. Estes permitem a obtenção de massa do íon precursor em alta resolução através do *Orbitrap* associada a alta velocidade do LTQ em dissociar e analisar os íons parentais (Aquino 2015, Damaso 2017).

Após passarem pelo analisador, todas as informações obtidas sobre os íons são direcionadas ao detector (*e.g.* fotomultiplicadores) (Medhe 2018), que amplifica e detecta o sinal da corrente de íons presente na amostra, convertendo-o para um sistema de processamento de dados na forma de espectros (Barbosa et al. 2012, Medhe 2018). Posteriormente, estes serão usados por ferramentas computacionais para a identificação e quantificação de peptídeos/proteínas presentes na amostra estudada (Barbosa et al. 2012). Nesse sentido, três estratégias que podem ser empregadas para a identificação são: sequenciamento *de novo*, *sequence tag search*, e o *peptide spectrum match* (PSM), sendo que essa última será a utilizada neste trabalho (Aquino 2015, Medzihradzky & Chalkley 2015, Damaso 2017).

Alguns estudos proteômicos já foram realizados com *Aspergillus fumigatus*, onde foi possível identificar tanto proteínas específicas de estágios de crescimento bem como proteínas superexpressas decorrentes de alterações no meio (Asif et al. 2006, Kubitschek-Barreira et al. 2013). Kubitschek-Barreira et al (2013) conseguiram identificar proteínas expressas em diferentes estágios de crescimento de *Aspergillus fumigatus*, com especial destaque para a proteína denominada eEf3. Essa proteína foi identificada na fase de germinação de esporos e está relacionada ao processo de tradução em fungos, sendo exclusiva desses microrganismos (Dever & Green 2012, Kubitschek-Barreira et al. 2013).

Em outro estudo utilizando a proteômica para a compreensão do biofilme de *Cryptococcus neoformans*, observou-se que proteínas expressas no biofilme desse microrganismo mostravam mudanças metabólicas associadas ao processo de aquisição de energia, como por exemplo a alanina aminotransferase que poderia estar atuando na formação de piruvato (Santi et al. 2014). Vale frisar ainda que nesse trabalho, foram identificadas duas proteases (metionina aminopeptidase e metaloproteinase elastinolítica) que eram exclusivas do biofilme de *C. neoformans* e que poderiam estar atuando no processo de invasão no hospedeiro (Santi et al. 2014).

Logo, a proteômica surge como uma interessante alternativa para explorar mudanças moleculares em diferentes estados biológicos, como no biofilme e secretoma de *Aspergillus fumigatus*. De forma que, esta pode sinalizar vias metabólicas exclusivas utilizadas por este patógeno durante seu crescimento no biofilme e sua interação com o organismo do hospedeiro,

contribuindo assim para o maior entendimento de mecanismos associados a doenças como a aspergilose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Caracterizar o perfil proteico do secretoma e do biofilme por *Aspergillus fumigatus*.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a produção de biofilme por cepas fúngicas de *Aspergillus fumigatus* entre diferentes meios de cultivo;
- Avaliar de forma qualitativa e quantitativa a produção de biofilme entre as cepas fúngicas estudadas;
- Selecionar a melhor condição e cepa de *Aspergillus fumigatus* para o estudo proteico;
- Comparar os perfis de proteínas obtidos a partir do secretoma e da formação do biofilme por uma cepa de *Aspergillus fumigatus*;
- Buscar proteínas que possam estar correlacionadas com a patogenicidade de *Aspergillus fumigatus*.

4. MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo

As amostras utilizadas neste estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos – CCFE do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e estão em processo de inserção na Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane. Foram utilizadas três amostras de *Aspergillus fumigatus* que vieram conservadas pelo método de liofilização, que estavam armazenadas em ampolas de vidro e foram submetidas a um processo de reativação. Estas são: *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913, *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 e *Aspergillus fumigatus* ATCC LB-01-AP. Para isso, foi feita a desinfecção das ampolas com gaze embebida em álcool 70% e deixadas para secar. Cada ampola foi aquecida no local indicado pelo protocolo disponibilizado pelo INCQS e posteriormente, foi adicionado algumas gotas de solução salina para que o vidro quebrasse devido ao choque térmico. Após isso, a parte superior foi retirada e adicionou-se 0,5 mL de água destilada esterilizada. As amostras foram deixadas em repouso para reidratação por um tempo de 15 a 30 minutos. Posteriormente, o sedimento foi homogeneizado, sendo retirado o equivalente à 0,1 mL da suspensão e aplicado em placas contendo o meio ágar extrato de malte (MEA) durante sete dias à 28 °C.

Após esse processo de reativação, tais culturas foram autenticadas através da observação de suas características morfofisiológicas, seguindo os critérios de chave de identificação estipulados por Klich (2002). Para se obter um grau de pureza adicional das culturas, foi realizada uma cultura monospórica, onde foram plaqueadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} (Azevedo & Costa 1973). As colônias oriundas da diluição 10^{-5} foram replaqueadas em meio ágar extrato de malte (MEA) e incubadas durante sete dias à 28 °C para crescimento.

4.2. Avaliação qualitativa da formação de biofilme

Para a avaliação da formação do biofilme, as três cepas de *A. fumigatus* foram inoculadas a uma concentração de 1×10^6 esporos/mL, sendo a padronização da concentração de conídios realizada a partir da contagem em câmara de Neubauer, empregando o *software* CALIBRA®. Posteriormente, as cepas foram cultivadas em placas de petri contendo 30 mL de meio de cultura. Cinco diferentes meios de cultura foram empregados: caldo Sabouraud, caldo czapeck (CZ), caldo BHI (infusão cérebro-coração), meio mínimo (20 mg/mL de tiamina, 30 mM glicose, 26 mM glicina, 20 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 58.8 mM KH_2PO_4) e meio RPMI 1640. Estas foram incubadas a 28°C e 37°C por 36, 48 e 72 horas sem agitação, em duplicata biológica. Passado esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato-salino

(PBS) e as células não ligadas foram removidas (Mowat et al. 2007, Santi et al. 2014). Após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, as estruturas de biofilme presentes nas placas de petri com os diferentes meios foram coradas com 6 mL de uma solução de safranina a 0,5%; como um resultado positivo, espera-se que o fundo da placa de petri fique vermelho revelando a presença da matriz extracelular (Seidler et al. 2006). A composição completa dos meios utilizados para a produção do biofilme encontra-se no apêndice 8.1.

4.3. Avaliação quantitativa da produção do biofilme

O ensaio quantitativo foi realizado a partir da biomassa do biofilme conforme descrito por Mowat et al. (2007). De forma simplificada, foram utilizadas placas de microtitulação contendo 100 µL dos meios de cultura avaliados com uma concentração de 1×10^6 esporos/mL de cada cepa de *Aspergillus fumigatus*. A análise foi feita durante 72 horas, onde o crescimento fúngico foi paralisado a cada 12 horas e o meio saturado e as células não aderentes foram removidas mediante o auxílio de três lavagens com uma solução de PBS. Posteriormente, o conteúdo resultante nos poços das placas de microtitulação foram secos a temperatura ambiente e adicionou-se 100 µL de uma solução de violeta cristal a 0,005% (p/v) durante 15 minutos. Então, a solução foi removida lavando-se cuidadosamente os biofilmes com água destilada até que o excesso de corante fosse removido. Em seguida, estes foram descorados com a adição de 100 µL de etanol a 95% durante 1 minuto para a completa solubilização da solução de violeta cristal. Por último, a absorbância foi lida a 595 nm.

4.4. Análise estatística

Para analisar os dados resultantes do item 4.3, foi aplicado a ideia de modelos de regressão, onde a variável resposta foi a absorbância e as variáveis explicativas foram: cepa, meio, tempo e temperatura. Como não foram encontradas evidências sobre a normalidade da variável resposta, a análise foi conduzida utilizando os modelos lineares generalizados (GLM). O modelo que apresentou melhor ajuste foi o Gamma com função de ligação inversa. Já a validação do modelo seguiu através do teste da razão de verossimilhança e análises dos resíduos com gráficos de envelope. O *software* estatístico utilizado foi o R versão 3.4.3, com pacotes diversos e o nível de significância empregado foi de 0,05.

4.5. Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Depois de selecionada a melhor condição para produção do biofilme, as amostras foram cultivadas em placas de petri para serem analisadas por microscopia eletrônica de varredura

(MEV). Dentro de cada placa, foram adicionadas duas lamínulas para que o biofilme aderisse às mesmas. Após o período de incubação, as lamínulas foram removidas e colocadas para secar a 37°C. Posteriormente, estas lamínulas com o biofilme foram fixadas com glutaraldeído 2,5%, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora. Em seguida, estas foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas em soluções crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos em cada concentração; sendo que a última etapa (a 100%) foi feita duas vezes. Após isso, as amostras foram secas em um equipamento de ponto crítico e metalizadas com ouro. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura JSM-6010 Plus/LA (Jeol) na plataforma de microscopia (RPT07C), do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná.

4.6. Obtenção do secretoma e do biofilme para o estudo proteômico

Para o estudo proteômico, foi utilizado a cepa de *Aspergillus fumigatus* e o meio de cultura que apresentaram os melhores resultados quanto à avaliação qualitativa e quantitativa a respeito da formação de biofilme. Assim, um novo inóculo a uma concentração de 1×10^6 esporos/mL de *A. fumigatus* foi realizado em placas de petri contendo 30 mL de meio. O experimento foi feito em triplicata biológica, sendo quatro placas de petri resultantes de cada réplica biológica; o que totaliza em torno de 120 mL por réplica. Após o período de crescimento, o secretoma presente nas placas foi separado do biofilme e filtrado através de um sistema de filtração à vácuo com membrana de polietersulfona (Sartolab® RF/BT) com porosidade de 0,22 µm. Posteriormente, os secretomas obtidos foram concentrados e dessalinizados utilizando tubos de filtração (*Centriprep*®) com membranas de celulose de 3,0 kDa. Estes foram submetidos a centrifugações sucessivas por 90 minutos, à 4°C e 4400 rpm.

Já com relação a recuperação do biofilme aderido às placas de petri, foram adicionados 5 mL de solução PBS para lavagem e ressuspensão dessas comunidades microbianas. Em seguida, estes foram submetidos ao vórtex por 1 minuto e sonicação com ultrassom por 15 minutos, visando homogeneizar e quebrar interações intermoleculares presentes no biofilme. As amostras resultantes foram centrifugadas por 20 minutos, a 4°C e 4400 rpm. Posteriormente, estas foram filtradas utilizando filtros de seringa com porosidade de 0,45 µm e o sobrenadante obtido foi coletado para os demais passos da análise proteica.

4.7. Precipitação, extração e quantificação proteica

As proteínas presentes nas amostras do secretoma e no sobrenadante gerado do biofilme foram precipitadas com acetona gelada pura, utilizando uma proporção de 1:4 (secretoma/solvente; biofilme/solvente) em cada amostra. Posteriormente, foi realizado um vórtex por alguns segundos e as amostras ficaram *overnight* a -20°C . No dia seguinte, estas foram submetidas à centrifugação a 14 000 rpm por 30 minutos à 4°C , descartando-se o sobrenadante. Então, o precipitado formado foi lavado duas vezes com acetona gelada pura, em uma proporção de 1:2 (precipitado/solvente), seguido de uma centrifugação a 14 000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C em cada lavagem.

Já a extração de proteínas foi realizada com RapiGest®(Waters) preparado com bicarbonato de amônio 50 mM, para uma concentração de 0,1% (p/v). Este foi adicionado ao precipitado resultante das amostras do secretoma e do biofilme. Depois, estas amostras foram submetidas a um vórtex por alguns segundos e centrifugadas durante dois minutos a baixa rotação. A quantificação proteica foi obtida através do ensaio fluorimétrico Qubit® 3.0 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

4.8. Eletroforese unidimensional e coloração com *Coomassie R-250*

Com o intuito de observar um perfil preliminar de massa molecular das proteínas presentes em cada uma das diferentes amostras (secretoma e biofilme), foi realizado um gel de eletroforese unidimensional desnaturante. Para isso, vinte microlitros (20 μL) de cada amostra foi utilizado. Tal volume foi diluído no tampão de amostra Laemmli [2x], contendo Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol a 1%. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho seco a 100°C durante 5 minutos. Quinze microlitros (15 μL) de marcador molecular com padrões pré-corados (nº. catálogo 161-0318, @Biorad) também foram usados e aquecidos de maneira similar às amostras. O gel de poliacrilamida foi preparado a 15% (Gel de corrida: 1,15 mL de água destilada, 2,5 mL de acrilamida mix a 30%, 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 μL de SDS 10%, 50 μL de persulfato de amônio 10% e 2,0 μL de TEMED. Gel de empilhamento a 5%: 1,4 mL de água destilada, 330 μL de acrilamida mix a 30%, 250 μL de Tris 1,5M pH 8,8, 20 μL de SDS 10%, 20 μL de persulfato de amônio 10% e 2,0 μL de TEMED), conforme instruções do fabricante Mini Protean II (Sambrook et al. 1989). A eletroforese foi realizada com um tampão de corrida Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M e SDS 0,1% a 80 volts e 15 mA/gel, durante 5 horas.

Após as corridas, os géis foram deixados *overnight* em solução fixadora contendo 40% de etanol, 10% de ácido acético e água destilada. Estes foram corados durante 3 horas com

Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% solubilizados em 10% de ácido acético, 40% de etanol e água destilada. Posteriormente, os mesmos foram descorados por duas horas em uma solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada na proporção 1:4:5 (v/v/v). Então, a solução foi descartada, adicionou-se água destilada para a completa descoloração e o gel foi fotografado.

4.9. Digestão proteolítica em solução

Cem microgramas de proteínas de cada amostra foram utilizadas para a digestão em solução. Primeiramente, as amostras foram reduzidas com a adição de ditioneitol (DTT) 50 mM para uma concentração final de 10mM e incubadas a uma temperatura de 60°C por sessenta minutos. Depois, estas foram deixadas a temperatura ambiente por quinze minutos e foi adicionado iodoacetamida (IAA) a 150 mM por trinta minutos, no escuro. Posteriormente, foi adicionado novamente DTT 50 mM, porém para uma concentração final agora de 4,5 mM. O pH das amostras foi medido e em seguida a enzima tripsina (Promega) foi adicionada na proporção de 1/50 (p/p) de enzima/substrato. A reação foi incubada a 37 °C por 20 horas. No dia posterior, a reação foi paralisada com a adição de ácido trifluoroacético (TFA) 10% (v/v) para uma concentração final de 1% (v/v), deixando por cinquenta minutos a temperatura ambiente. Por último, foi feita uma centrifugação por 30 minutos, a 4°C e 12000 rpm para a remoção de todo material insolúvel (Aquino 2012, Leal 2019).

4.10. Dessalinização, concentração e quantificação dos peptídeos

Os peptídeos trípticos resultantes de cada amostra foram dessalinizados com minicolunas Zip-Tip modificado (poros R2), conforme recomendações do fabricante. Em resumo, as colunas foram hidratadas duas vezes com acetonitrila 100% por 10 minutos à temperatura ambiente e equilibradas com a adição de ácido trifluoroacético (TFA) 1%. As amostras foram introduzidas nas colunas e posteriormente foram lavadas com TFA 0,1%. A eluição dos peptídeos ocorreu com a solução de TFA 0,1% em acetonitrila 70% (Aquino 2012). Estes foram concentrados em baixa pressão no *Speed Vacuum (Genevac™ miVAC DNA Vacuum-Integrated Centrifugal Concentrator System)* e ressuspensos em ácido fórmico 0,1%. A quantificação dos peptídeos foi feita pelo ensaio fluorimétrico – Qubit 3.0® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

4.11. Análise por LC-MS/MS

A análise por LC-MS/MS foi realizada na plataforma de proteômica do Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ/RJ (RPT02A- Espectrometria de Massa – RJ). Em triplicata técnica,

foi aplicado um volume de 3µL de amostra, onde os peptídeos foram submetidos a um sistema de nanocromatografia - Easy-nLC II (Proxeon), contendo uma coluna de 20 cm de fase reversa e no qual foi aplicado um gradiente cromatográfico de 168 minutos com o aumento da concentração da fase móvel B (95% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico). Já o espectrômetro de massas usado nas análises foi um LTQ Orbitrap XL MS (*Thermo Fischer Scientific*). A aquisição dos espectros foi realizada no modo *data dependent acquisition* (DDA), alternando automaticamente entre a aquisição do *full scan* MS e MS/MS, com uma lista de exclusão de 45s. Os sete íons mais intensos, com carga igual ou superior a 2⁺ foram isolados e fragmentados por dissociação induzida pela colisão por gás (CID), usando uma energia de colisão normalizada de 35.

A aquisição dos espectros foi realizada no modo *data dependent acquisition* (DDA), alternando automaticamente entre a aquisição do *full scan* MS e MS/MS, com uma lista de exclusão de 45s. Os sete íons mais intensos, com carga igual ou superior a 2⁺ foram isolados e fragmentados por dissociação induzida pela colisão por gás (CID), usando uma energia de colisão normalizada de 35. Os parâmetros empregados na operação do espectrômetro de massas foram: voltagem no spray de 1,90 kV, *source current* de 100 µA, temperatura de 200°C no capilar, resolução de 60,000 para *m/z* de 300, intervalo de análise 300-1700 *m/z* na varredura inicial de MS1, tempo máximo de injeção de 500 ms para *full scan* e 50 ms para MS/MS, voltagem de 47 V no capilar e habilitação da *predictive automatic gain control* (AGC) sendo o valor alvo de GC para *full scan* de 5x10⁶ íons e 1x10⁵ íons para MS/MS.

4.12. Análise dos dados

Os dados obtidos da análise por espectrometria de massas foram submetidos a ferramentas de proteômica computacional para a identificação e quantificação proteica. A estratégia de identificação de peptídeos/proteínas foi por PSM (*peptide spectrum match*). Tais resultados foram analisados e as proteínas diferencialmente abundantes entre o secretoma e o biofilme foram estatisticamente apontadas e quantificadas utilizando o *software PatternLab for proteomics* (Carvalho et al. 2016). De maneira geral, as sequências proteicas de UP000002530 *Neosartorya fumigata* (strain ATCC MYA-4609/*Aspergillus fumigatus*) e UP000234474 *Aspergillus novofumigatus* IBT 16806 foram obtidas do Uniprot no dia 16 de abril de 2019. Foram adquiridas um total 9647 entradas proteicas para *Neosartorya fumigata* e 11480 para *Aspergillus novofumigatus*. Com o intuito de se obter um conjunto de identificações confiáveis, foi preparado um banco de dados do tipo “*target-decoy*”, o qual fornece estimativas falso-positivas de peptídeos, através do embaralhamento ou inversão das sequências peptídicas, e

ainda, este incluiu também uma lista de 127 sequências de contaminantes comuns a experimentos de espectrometria de massas (Elias & Gygi 2010, Aquino 2015).

Para comparar os espectros de massas sequenciais (MS/MS) obtidos experimentalmente com os espectros teóricos gerados a partir do banco de dados, foi utilizada a ferramenta de busca *Comet* (Eng et al. 2013, Carvalho et al. 2016). Neste, alguns parâmetros utilizados foram: a busca por candidatos semi-trípticos, na qual foi considerada até duas falhas de clivagem no sítio enzimático (*i.e.*, o número de possíveis ligações peptídicas não clivadas que correspondem à especificidade da enzima hidrolítica utilizada no experimento - a tripsina (Siepen et al. 2007)); a carbamidometilação da cisteína foi imposta como uma modificação fixa e a oxidação da metionina como variável. Nesta etapa, para cada espectro analisado, foi considerado uma tolerância de 40 ppm de erro para o íon precursor e o *XCorr* foi utilizado como métrica de semelhança primária. O *Search Engine Processor – SEPro* foi utilizado para filtrar as identificações proteicas, onde estas foram agrupadas pelo estado de carga do precursor e os valores estatísticos resultantes do *Comet* (*e.g.* *XCorr*, ΔCN), visando gerar um discriminador Bayesiano entre as identificações não-*decoys* e *decoys*. Com isso, a lista final de identificação foi obtida levando em consideração esse discriminador e estabelecendo um *false discovery rate* (FDR) em torno de 1%. Em adição, os resultados foram pós-processados para que fossem aceitas apenas sequências com um mínimo de seis aminoácidos, candidatos prováveis com menos de 10 ppm de erro e uma métrica de semelhança primária mínima de 1,8 para proteínas identificadas com um único espectro.

A quantificação de proteínas foi realizada no modo *label-free* (livre de marcação) utilizando os valores de *Spectrum count*, o qual considera o número de espectros de MS2 adquiridos e mapeados para uma proteína, para inferir tais abundâncias. Além disso, tais valores foram normalizados utilizando o fator de abundância espectral normalizado (NSAF), o qual se baseia tanto na quantificação de peptídeos exclusivos como os compartilhados entre proteínas (Carvalho et al. 2016, Leal 2019).

A análise diferencial das proteínas presentes no secretoma e no biofilme de *Aspergillus fumigatus* foi verificada através do módulo do Diagrama de Venn, o qual identificou proteínas exclusivas e compartilhadas em cada condição e nas diferentes temperaturas, para isso foram consideradas somente como proteínas significativamente diferenciais aquelas que apresentaram um *fold change* a partir de 2 (Carvalho et al., 2016). Esta análise considerou apenas proteínas encontradas em duas réplicas biológicas para o biofilme e o secretoma. Já para se obter informações quanto as funções das proteínas identificadas, o módulo do *Gene Ontology* foi empregado para as duas condições neste trabalho.

Por fim, foi feita uma análise de interação entre algumas proteínas identificadas neste estudo, onde foi utilizado o *software* STRING versão 11.0 (disponível em: <https://string-db.org/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultura fúngica

As culturas fúngicas reativadas e autenticadas, apresentaram as características morfofisiológicas descritas na figura 3. Nesta, é possível observar as estruturas da macrocolônia com sete dias de crescimento, das três cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizadas neste projeto.

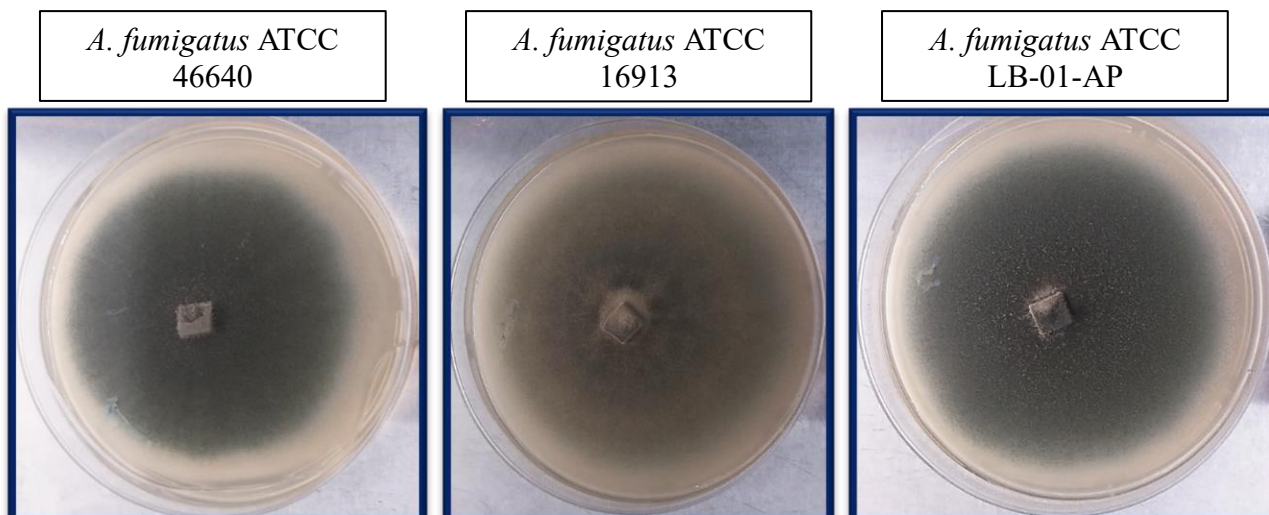


Figura 3. Macrocolônias das cepas de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640, *A. fumigatus* ATCC 16913 e *A. fumigatus* ATCC LB-01-AP com 72 horas de crescimento a 37°C em meio MEA.

5.2. Avaliação qualitativa da formação de biofilme

As três cepas de *Aspergillus fumigatus* foram avaliadas para a formação de biofilme em cinco meios de cultura diferentes (caldo Sabouraud, caldo CZ, caldo BHI, meio mínimo e meio RPMI 1640). Nesta, verificou-se que apenas dois meios foram negativos (BHI e meio mínimo) para a produção de biofilme em todos os tempos e temperaturas (Figura 4). Pois nesses casos, o fungo cresceu de maneira acelerada, ultrapassando a etapa de biofilme e formando uma malha no meio de cultivo ou não aderiu à superfície da placa para que pudesse haver o biofilme, respectivamente.

Em um estudo realizado por Marques et al (2007), verificou-se a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* no meio BHI. Já Santi et al (2014) observou a positividade de crescimento dessas comunidades microbianas no meio mínimo para *Cryptococcus neoformans*. Em contrapartida, nossos resultados demonstram que estes meios não são os mais apropriados para a visualização de biofilme em *A. fumigatus*. Tal fato pode ser associado a diferenças nos processos metabólicos e energéticos entre esses microrganismos; e ainda a estrutura tridimensional destes biofilmes produzidos, uma vez que *A. fumigatus* possui uma maior

atividade metabólica nas células aderidas à superfície, enquanto outros microrganismos possuem tal atividade relacionada às células presentes na região superior do biofilme.

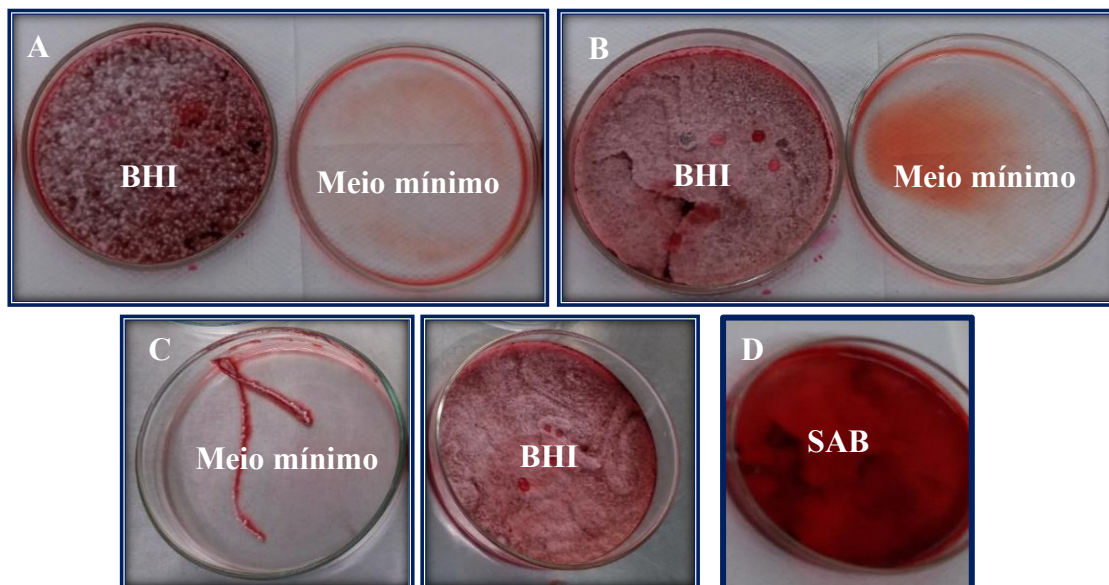


Figura 4. Placas de biofilme coradas com safranina à 28 °C e com 48 horas de crescimento, indicando que as amostras não formaram biofilme quando cultivadas nos meios BHI e meio mínimo. A) *A. fumigatus* ATCC 16913; B) *A. fumigatus* LB-01-AP; C) *A. fumigatus* ATCC 4660; D) placa positiva para a formação de biofilme no meio SAB.

Os outros três meios testados demonstraram ser positivos (CZ, SAB e RPMI 1640) independente da condição, ou seja, temperatura e tempo. Porém, observou-se que até 48 horas de crescimento à 28 °C, a cultura fúngica ainda não havia se propagado totalmente na placa de petri, sendo possível observar o biofilme. Já no tempo de 48 horas à 37 °C e 72 horas nas duas temperaturas, o microrganismo apresenta um desenvolvimento mais avançado e uma maior quantidade de esporos, o que não é favorável para as análises posteriores; pois as proteínas presentes nos conídios podem aparecer em grandes quantidades na análise proteômica, mascarando aquelas associadas ao secretoma e ao biofilme de *A. fumigatus*. Na Figura 5, pode-se observar a estrutura de biofilme revelada com o corante safranina nos meios SAB e CZ.

Shin et al. (2002) trabalharam com espécies de *Candida* oriundas da corrente sanguínea e outros sítios anatômicos de pacientes não-neutropênicos. Neste estudo, foi verificado que *Candida parapsilosis* apresentava uma maior capacidade para produzir biofilme no meio de cultura Sabouraud do que a *Candida albicans*, a levedura mais comumente encontrada associada a formação de biofilme em cateteres e outros instrumentos médicos intravenosos (Shin et al. 2002). Em nosso estudo, também foi utilizado o meio de cultivo Sabouraud (SAB) suplementado com glicose e similarmente, também se mostrou positivo para tal finalidade.

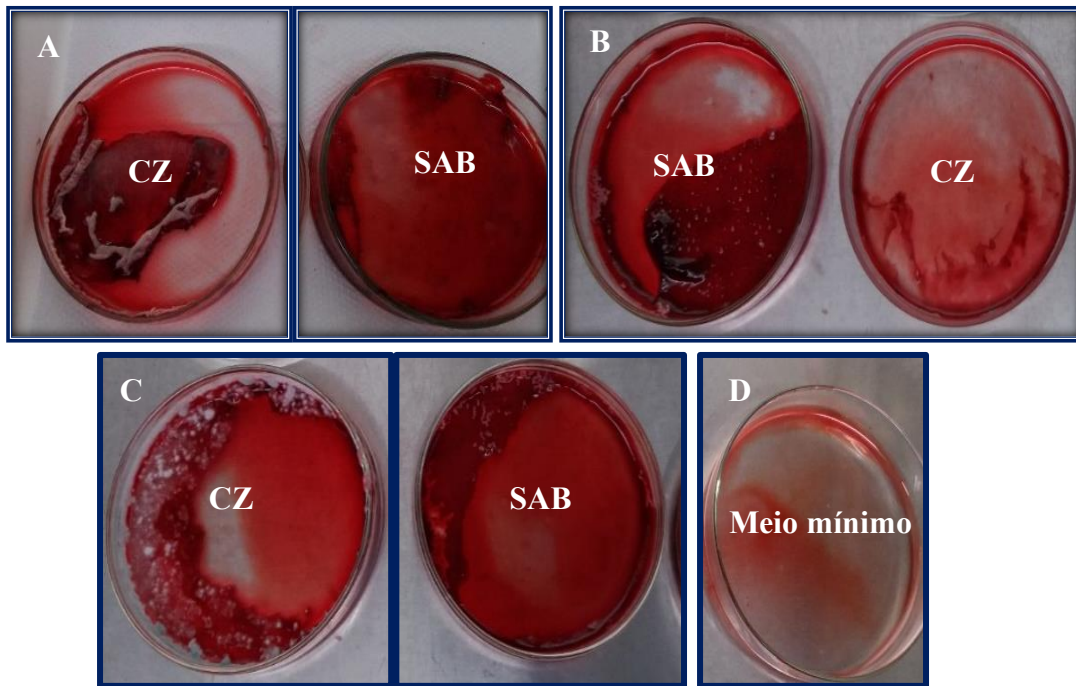


Figura 5. Placas de biofilme coradas com safranina à 28°C e com 72 horas de crescimento, mostrando a formação de biofilme quando cultivadas nos meios CZ e SAB. A) *A. fumigatus* ATCC 16913; B) *A. fumigatus* LB-01-AP; C) *A. fumigatus* ATCC 46640; D) Controle negativo.

Com relação ao meio CZ, não foram encontrados trabalhos com o mesmo verificando a formação de biofilme por microrganismos. O que é interessante para este estudo, uma vez que tal meio se mostrou positivo para este fim.

O meio RPMI 1640 é o mais utilizado nos estudos de biofilme tanto de *A. fumigatus* (Mowat et al. 2008, Rajendran et al. 2011) como o de outros microrganismos (Thomas et al. 2006). Na Figura 6, pode-se observar o biofilme de *A. fumigatus* em meio RPMI 1640 nas diferentes temperaturas com 72 horas de crescimento. Uma vantagem deste meio é que mesmo à 37 °C, a conidiação de *A. fumigatus* é menos intensa comparado aos demais meios positivos (CZ e SAB); o que permite a visualização da estrutura até no tempo de 72 horas (Anexo 8.2).

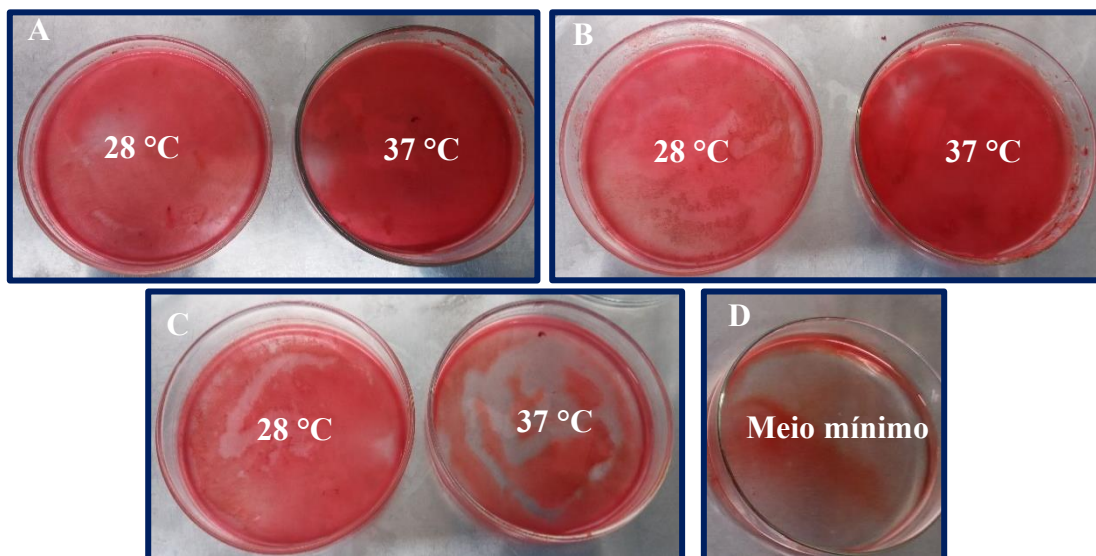


Figura 6. Placas de biofilme resultante do meio RPMI 1640 com 48 horas de crescimento, nas temperaturas de 28°C e 37°C; demonstrando positividade quando coradas com safranina. A) *A. fumigatus* ATCC 46640; B) *A. fumigatus* LB-01-AP; C) *A. fumigatus* ATCC 16913; D) Controle negativo em meio mínimo.

5.3. Avaliação quantitativa da formação de biofilme

Para esta avaliação, foram testadas as três cepas de *A. fumigatus*, os cinco meios e as duas temperaturas empregadas nos ensaios qualitativos (28°C e 37°C). Adicionalmente, para determinarmos o melhor tempo de produção do biofilme foram testados seis tempos de crescimento: 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Na figura 7, tem-se um exemplo de uma placa de 96 poços usada na quantificação dessas comunidades microbianas com relação a essas variáveis utilizadas.

Na análise estatística utilizando o *software* R versão 3.4.3, foi possível estabelecer se a relação entre as variáveis estudadas era significativa ou não. Para isso, considerou-se a absorbância como variável resposta e as demais características analisadas como meio (aqueles positivos no ensaio qualitativo e quantitativo - CZ, RPMI 1640 e SAB), tempo, cepa e temperatura, sendo as variáveis explicativas. A partir disso, gerou-se um gráfico de intervalo de confiança (Figura 8), onde se observou o comportamento dos dados. Nesta, os meios SAB e RPMI 1640 foram positivos para a produção de biofilme, porém não apresentavam uma curva de crescimento no decorrer do tempo, mantendo-se constante até o tempo de 72 horas (Figura 8). Em contrapartida, o meio CZ apresentou um aumento na sua curva de produção em todas

as cepas, indicando que seria o ideal para as análises posteriores, uma vez que apresentou a maior quantidade de biomassa para ser analisada (Figura 8).

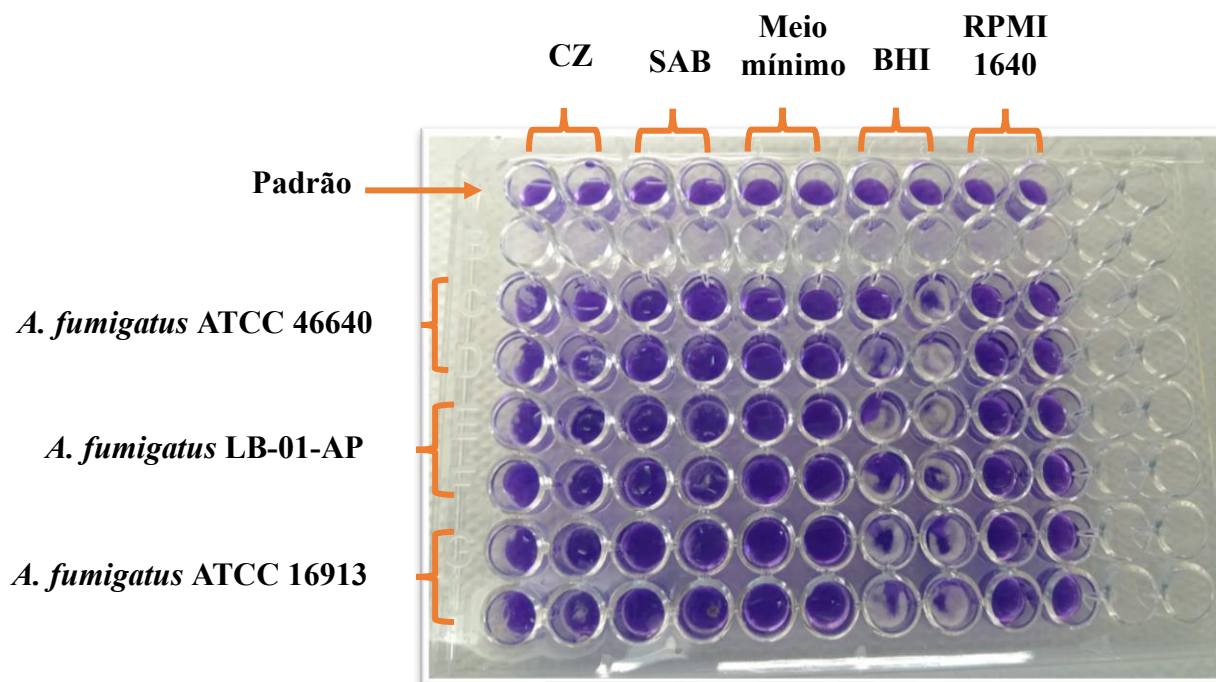


Figura 7. Visualização de uma das placas de 96 poços usada na quantificação de biofilme, contendo solução de violeta cristal corando os biofilmes oriundos das cepas de *Aspergillus fumigatus* com 24 horas de crescimento à 37°C.

Em adição, verifica-se que no meio CZ a partir de 36 horas de crescimento não houve diferença significativa na produção do biofilme e que as cepas *A. fumigatus* ATCC 46640 e *A. fumigatus* ATCC LB-01-AP se mostraram equivalentes em sua quantidade de biomassa (Figura 8). Em um estudo realizado por Beauvais et al (2007) para demonstrar a capacidade de *A. fumigatus* em formar biofilme, observou-se que a espessura dessas comunidades aumenta de acordo com o período de crescimento. De forma, que nossos dados corroboram com a literatura, uma vez que com o passar do tempo, o biofilme de *A. fumigatus* ATCC 46640 teve um aumento significativo de biomassa até 36 horas. Passado esse período, essa expansão não foi significativa estatisticamente.

Ao se observar o efeito da temperatura, nota-se que o crescimento a 28°C apresentou os melhores resultados quantitativos (Figura 8). Com relação ao efeito da temperatura, em um estudo realizado por Ramli et al. (2012) demonstrou-se que o biofilme produzido por *Burkholderia pseudomallei* era facilitado quando este era produzido à uma temperatura de 30°C em relação à 37°C. Tal característica também foi observada de maneira similar em nosso trabalho, no qual se obteve uma maior quantidade de biomassa do biofilme à 28°C. Portanto,

com os dados obtidos, é possível inferir que diferentes fatores ou variáveis podem influenciar diretamente na produção de biofilme por microrganismos, como o de *A. fumigatus*. Logo, mediante tais observações, verificou-se que a melhor condição e cepa para a continuação no estudo proteômico foi: o meio de cultura CZ, a 28°C e com cepa *A. fumigatus* ATCC 46640 durante 36 horas de cultivo. Para verificar o efeito da temperatura na formação do biofilme e se esta influencia no seu conteúdo proteico, a temperatura de 37°C também foi analisada.

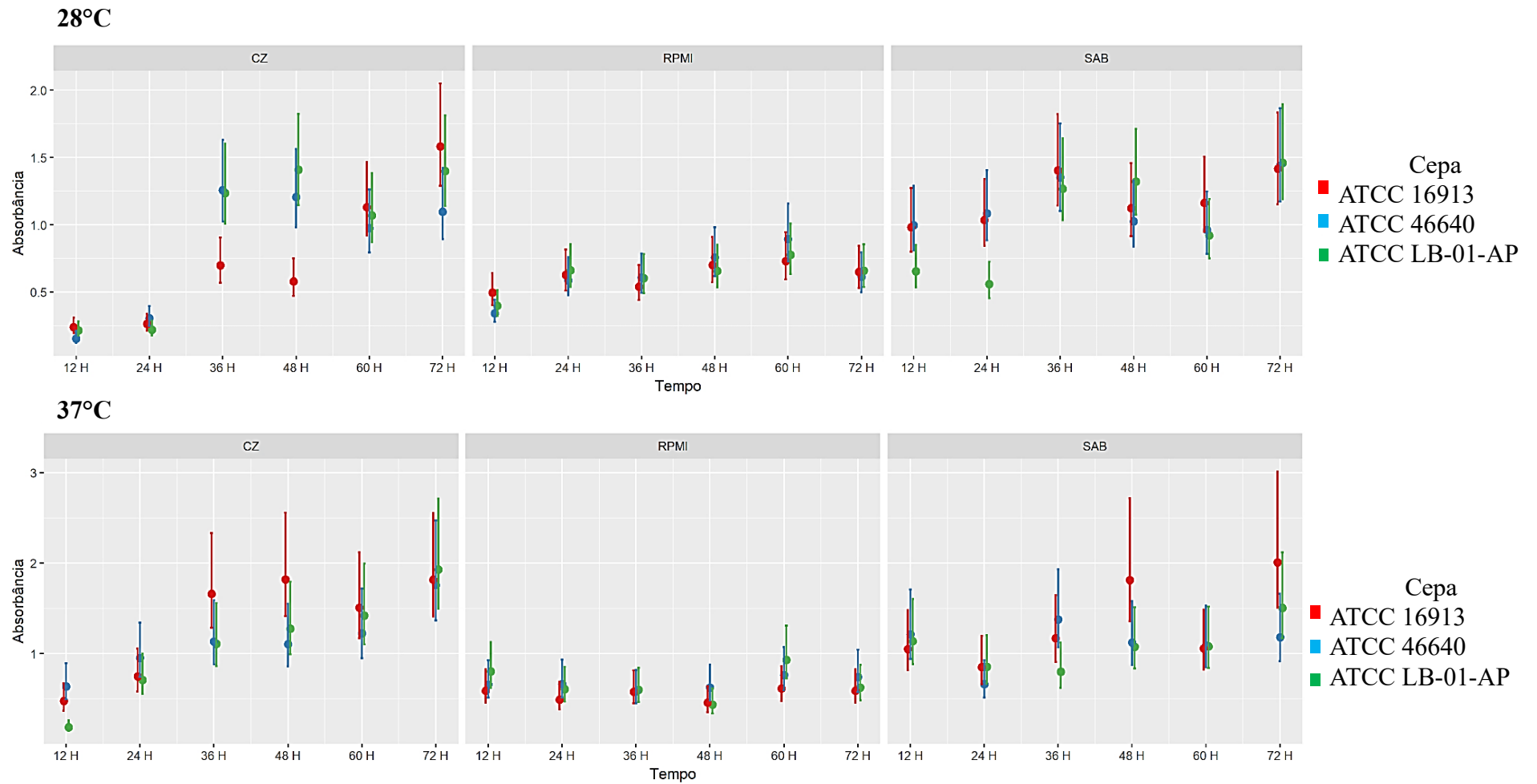


Figura 8. Gráfico do intervalo de confiança para os valores esperados da absorbância, segundo as variáveis explicativas: tempo, cepa, meio e temperatura, nos meios de cultivos positivos para a formação de biofilme.

5.4. Microscopia eletrônica de varredura

Esta técnica foi utilizada no presente estudo com o intuito de se obter uma melhor visualização da estrutura do biofilme nas diferentes temperaturas. Na Figura 9, tem-se um exemplo correspondente ao biofilme de *A. fumigatus* ATCC 46640 cultivado a 28°C. Segundo a literatura, o biofilme fúngico consiste em uma rede tridimensional de células, hifas e matriz extracelular aderidas a uma superfície (Oliveira et al. 2010b, Mitchell et al. 2015). Assim, de maneira mais detalhada, pode-se observar na figura 9 a presença de hifas já desenvolvidas formando a malha estrutural do biofilme, bem como hifas ainda em desenvolvimento. Além disso, são observados também os conídios de *A. fumigatus* ATCC 46640 envolvidos pela matriz extracelular (Figura 9), servindo esta de uma rede de conexão entre as hifas, formação de canais e anastomose. Nos estudos realizados por Reichhardt et al (2015) e González-Ramírez et al (2016) também foram observadas características de biofilme semelhantes, uma vez que eles também avaliaram a estrutura do biofilme produzido por *A. fumigatus* através da microscopia eletrônica de varredura.

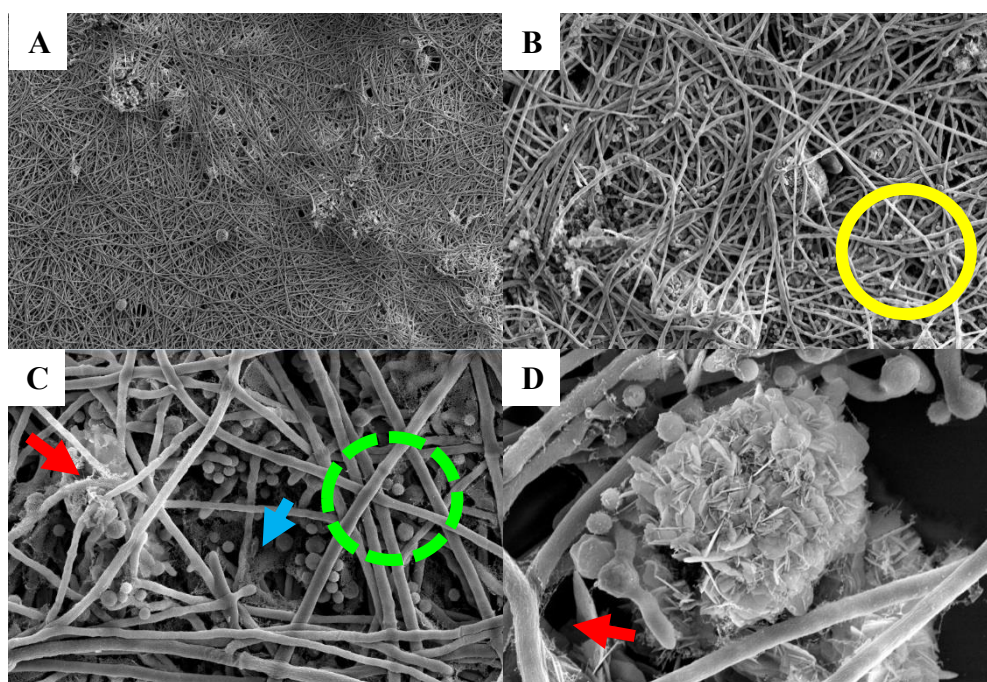


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): micrografias do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivado *in vitro* em meio CZ a 28°C durante 36 horas. As imagens A, B, C e D correspondem aos aumentos de 150x, 500x, 1500x e 3000x da estrutura do biofilme. A estrutura apontada com a seta vermelha corresponde a matriz extracelular do biofilme, a qual está revestindo as hifas e conídios de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640; a seta azul indica a presença da matriz extracelular atuando como uma rede conectiva entre as hifas fúngicas; o círculo amarelo está indicando os canais formados na malha do biofilme; e o círculo verde pontilhado está indicando as regiões de contato entre as hifas fúngicas (anastomose).

Foram também avaliadas as imagens do biofilme de *A. fumigatus* ATCC 46640 produzido a 37°C. A figura 10 ilustra as características presentes neste biofilme. Nesta, é possível observar as hifas envoltas da matriz extracelular, bem como a matriz atuando como rede conectiva entre as mesmas, envolvendo os conídios fúngicos; além de apresentar a formação de canais e interação entre as hifas, o que permite a passagem de nutrientes bem como serve de rota para a expulsão de resíduos (Figura 10) (Vila & Rozental 2016). De forma geral, as características observadas no biofilme produzido a 37°C foram bem semelhantes ao biofilme produzido a 28°C e aos biofilmes encontrados nos trabalhos de Ramírez Granillo et al. (2015), Reichhardt et al. (2015) e González-Ramírez et al. (2016).

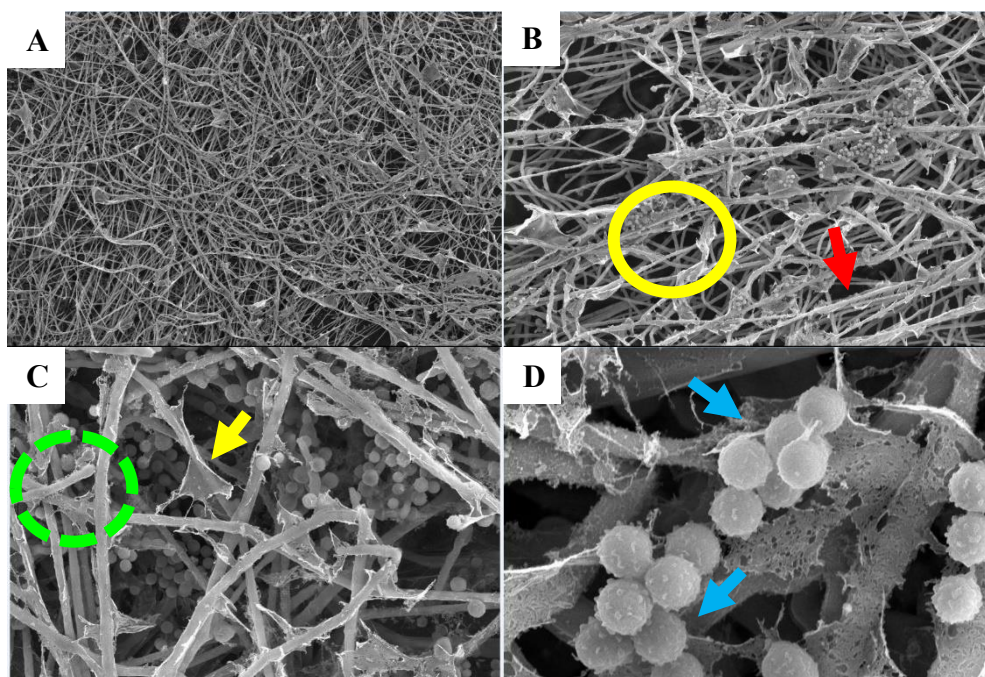


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): micrografias do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivado *in vitro* em meio CZ a 37 °C durante 36 horas. As imagens A, B, C e D correspondem aos aumentos de 150x, 500x, 1500x e 6500x da estrutura do biofilme. A seta vermelha mostra hifas fúngicas revestidas pela matriz extracelular; a seta azul indica a presença dessa matriz cobrindo os conídios fúngicos; a seta amarela indica essa matriz atuando como rede conectiva; o círculo amarelo indica os canais formados entre as hifas fúngicas; e o círculo verde pontilhado indica o contato direto entre as hifas.

Na figura 11, é possível observar características específicas do biofilme de cada temperatura de crescimento analisada. As imagens 11A e 11B correspondem ao biofilme de *A. fumigatus* ATCC 46640 cultivado a 28°C. Nestas, estão em destaque estruturas esféricas e compactas do biofilme, as quais apareceram exclusivamente nesta temperatura, e sua presença talvez tenha relação com o fato de na temperatura de 28°C ter se destacado na avaliação quantitativa; uma vez que estas estruturas tenham retido uma maior quantidade de solução corante. Outra característica importante do biofilme desta temperatura é a presença de conídios

em estágio germinativo para a formação de hifas, caracterizando assim um crescimento assíncrono deste biofilme (Figura 11A e 11B).

No trabalho de González-Ramírez et al. (2016), no qual eles verificaram por MEV os diferentes estágios de desenvolvimento do biofilme de *A. fumigatus* a 28°C, não foi verificada a presença das estruturas compactas de biofilme e os conídios em germinação foram observados apenas nos tempos de 8h-12h. Tal observação se diferencia deste estudo, uma vez que as análises microscópicas foram realizadas no tempo de 36 horas e ainda havia conídios em processo de germinação.

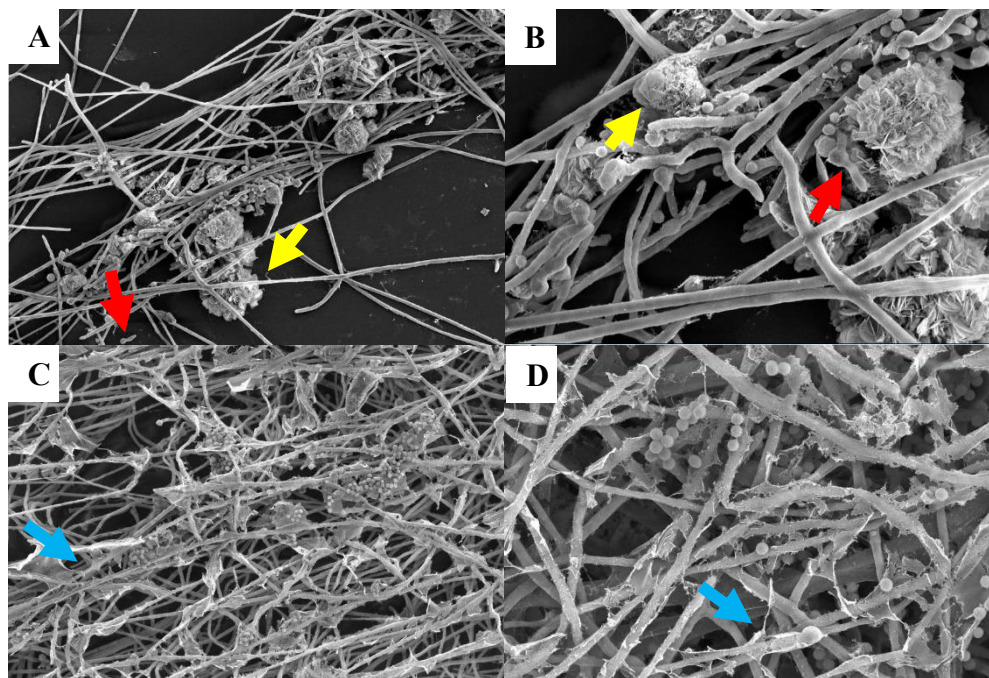


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640. Micrografias do biofilme de *Aspergillus fumigatus* cultivado a 28°C nos aumentos de 500x e 1500x (A e B) e cultivado a 37°C nos aumentos de 500x e 1500x (C e D). As setas amarelas indicam estruturas condensadas de biofilme; as setas vermelhas indicam os conídios de *Aspergillus fumigatus* em germinação; e as setas azuis indicam a presença da matriz extracelular ao longo de todo o comprimento das hifas e servindo de conexão entre elas.

Analisando ainda a figura 11, mas as imagens C e D que correspondem ao biofilme produzido a 37°C, observamos que ao longo de todo o comprimento das hifas fúngicas houve a presença da matriz extracelular, diferentemente do que foi observado à 28°C. Destaca-se ainda na Figura 11 D, a MEC atuando como rede de conexão entre as hifas e encobrindo os conídios de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 (seta azul). Ramírez Granillo et al. (2015), ao estudar o biofilme de *Aspergillus fumigatus* em antibiose com *Staphylococcus aureus*, verificou que quando cultivado de forma isolada *Aspergillus fumigatus* apresentava um biofilme bem semelhante ao encontrado neste estudo, como grande produção de MEC, fusão de hifas

(anastomoses) e formação de canais; porém, quando cultivado de maneira conjunta com a bactéria, este apresentava diminuição da MEC e alteração na estrutura celular. Tal fato chama a atenção pois, mostra a capacidade deste fungo crescer em ambientes com outros microrganismos competitivos, havendo apenas alteração em sua estrutura, mas não impedindo sua capacidade de formação de biofilme. Além disso, quando está crescendo em um modelo de infecção no hospedeiro, é comum haver outros microrganismos neste ambiente (Briard et al. 2019).

Na literatura, trabalhos como o de Reichhardt et al (2015) também observaram o biofilme de *A. fumigatus* através da microscopia eletrônica, onde evidenciaram a presença de hifas empacotadas e conectadas umas às outras por teias formadas pela MEC; em adição, neste mesmo estudo, foi feita também outra análise através da microscopia eletrônica de transmissão, no qual eles observaram estruturas tipo vesículas presentes na MEC (Reichhardt et al. 2015). Já no estudo de Brandão et al (2018), que avaliou a estrutura do biofilme de *A. fumigatus* URM6575 (de origem clínica) quando exposto à presença de elastina, foi observado que este substrato influenciava na quantidade de MEC produzida (Brandão et al. 2018). De modo que, o estudo do biofilme a partir da microscopia eletrônica de varredura ajuda a esclarecer o efeito de diferentes condições de produção na sua estrutura.

5.5. Estudo proteômico

5.5.1. Análise da extração de proteínas

A extração proteica foi feita nas diferentes condições estudadas: biofilme (28°C e 37°C) e secretoma (28°C e 37°C). Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica. A concentração de proteínas extraídas pode ser visualizada na Figura 12. Para o biofilme a 28°C obteve-se uma média de 0.978 µg/µL; enquanto para o biofilme na temperatura de 37 °C, a média foi de 1.18 µg/µL (Figura 12). Já para a concentração proteica das triplicatas correspondentes ao secretoma na temperatura de 28 °C foi observada uma média de 0.6 µg/µL; e para o secretoma na temperatura de 37 °C, a média foi de 1.78 µg/µL. De acordo com estes valores, é possível observar que há uma maior quantidade de proteínas extraídas no biofilme quando comparado com o secretoma na temperatura de 28°C, porém quando se analisa os valores para as condições na temperatura de 37°C, o secretoma apresentou um maior destaque.

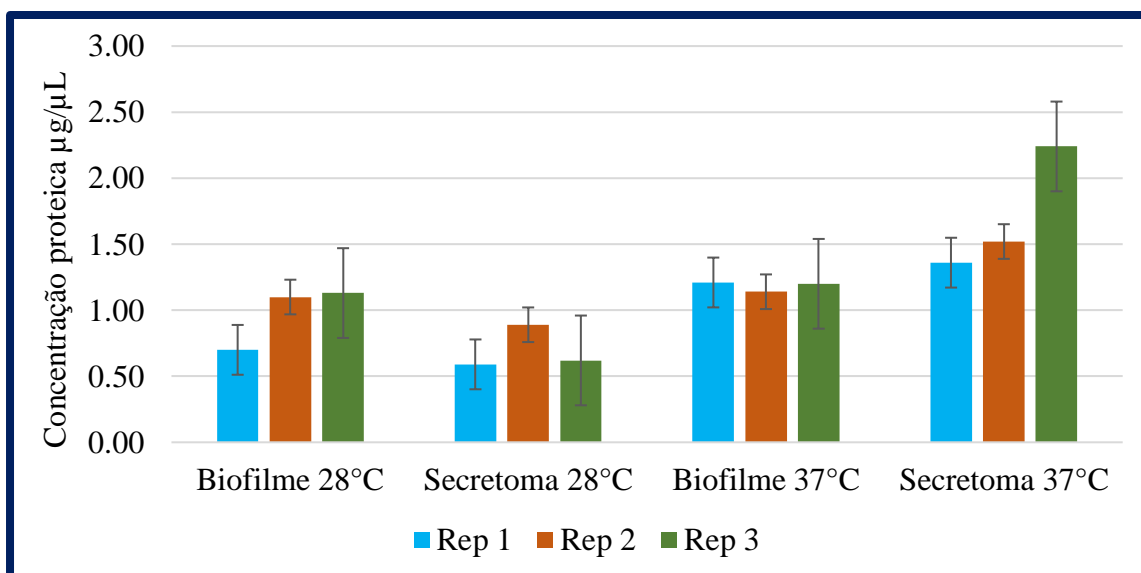


Figura 12. Dados da concentração de proteínas do biofilme e secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C e 37°C, com o respectivo desvio padrão. Experimento realizado em triplicata biológica.

5.5.2. Gel de eletroforese unidimensional

Um gel de eletroforese unidimensional foi realizado a fim de verificar se havia diferenças preliminares no perfil proteico oriundos de cada condição. Neste, observou-se a presença de bandas com massa molecular na faixa de ~50 KDa para ambas as condições e para as duas temperaturas (Figuras 13 e 14). Nas amostras resultantes do biofilme, foi verificada a presença de uma banda diferencial com massa molecular de 10 KDa na temperatura de 28°C, já para a temperatura de 37°C foram verificadas bandas distintas entre aproximadamente 20 KDa e 37 KDa (Figura 13). Algumas possíveis sugestões dessas proteínas de acordo com estes valores sejam proteínas não caracterizadas e de ligação ao IgE, como por exemplo, a pectato liase. Já quanto as bandas diferenciais no secretoma (Figura 14), foi observada apenas bandas únicas com massa molecular de ~37 KDa na temperatura de 37°C. De acordo com a lista de proteínas gerada a partir da espectrometria de massas, um exemplo das proteínas com esta massa molecular é uma provável endopoligalacturonase B, uma importante proteína de interesse industrial. Contudo, experimentos mais específicos são necessários para a confirmação de tais sugestões proteicas.

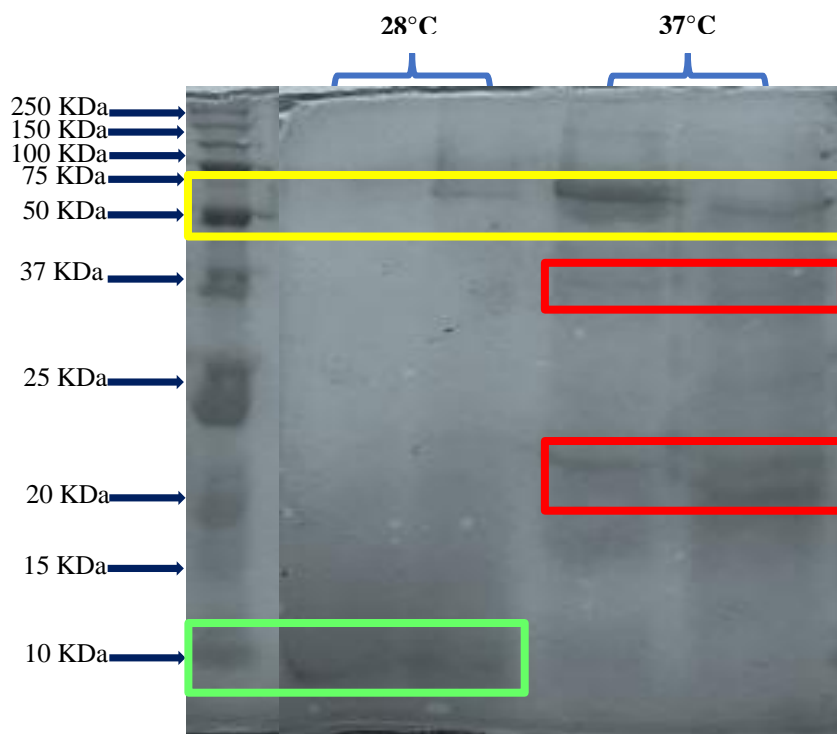


Figura 13. Eletroforese unidimensional demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras de biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C e 37°C; sendo que em cada amostra foi aplicado 30µg de proteína. A caixa amarela está indicando uma banda característica para as duas temperaturas; a caixa vermelha indica as bandas diferenciais presentes na temperatura de 37°C e a caixa verde indica uma banda diferencial presente na temperatura de 28°C.

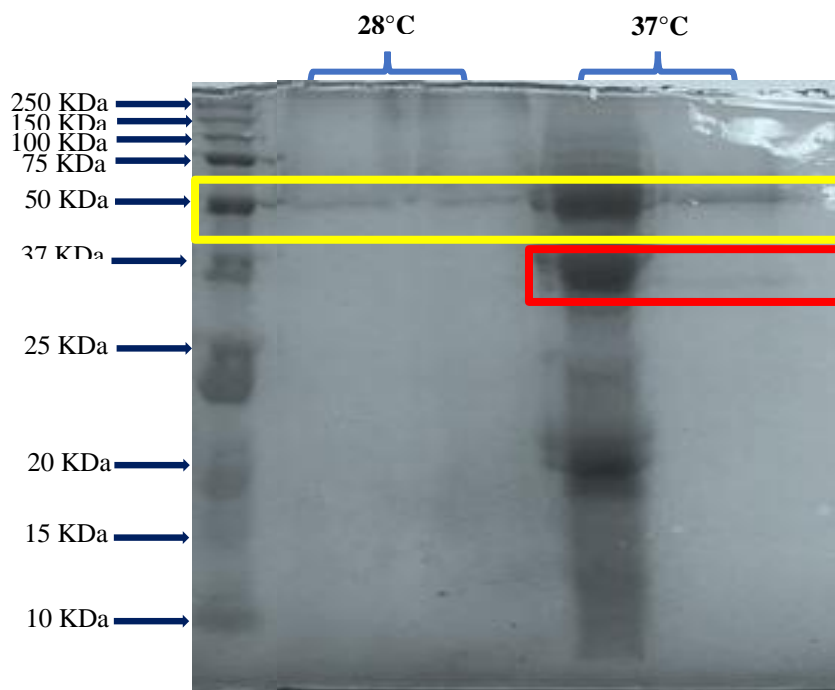


Figura 14. Eletroforese unidimensional das amostras de secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C e 37°C; sendo que em cada amostra foi aplicado 30µg de proteína. A caixa amarela indica a banda proteica característica das duas temperaturas e a vermelha indica as bandas diferenciais presentes em cada temperatura.

5.5.3. Análise proteômica

5.5.3.1. Perfil Cromatográfico

Os peptídeos presentes nos secretomas e biofilmes de *A. fumigatus* ATCC 46640 foram separados através de um sistema de nanocromatografia líquida. Com relação aos cromatogramas de íons obtidos em nossa análise com o gradiente de 168 minutos, as figuras 15, 16, 17 e 18 ilustram alguns desses exemplos de réplicas técnicas das amostras de biofilme e secretoma nas temperaturas de 28°C e 37°C.

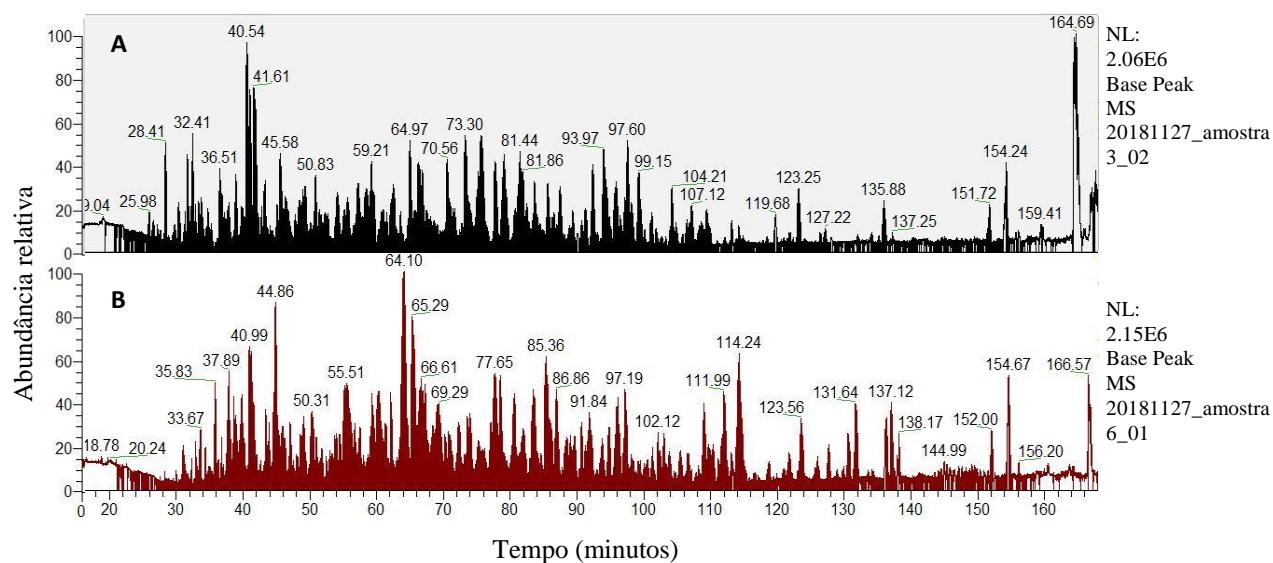


Figura 15. Perfil cromatográfico das amostras de biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivados a 28°C (A) e 37°C (B).

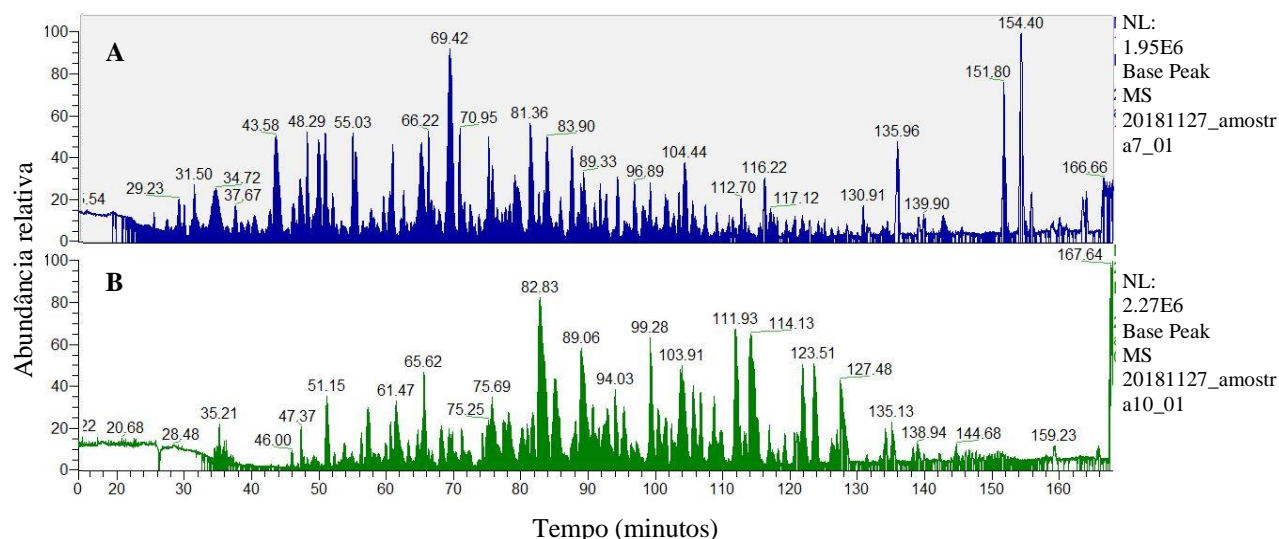


Figura 16. Perfil cromatográfico das amostras de secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivados a 28°C (A) e 37°C (B).

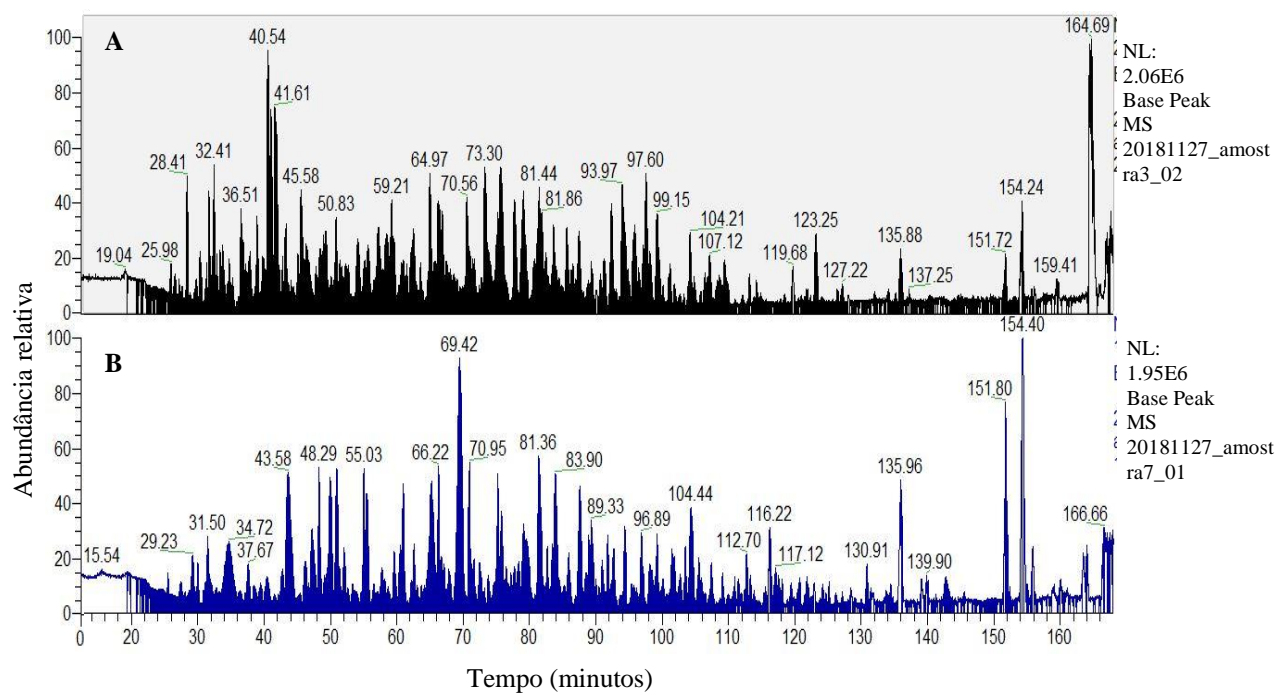


Figura 17. Perfil cromatográfico das amostras de biofilme (A) e secretoma (B) de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivado a 28°C.

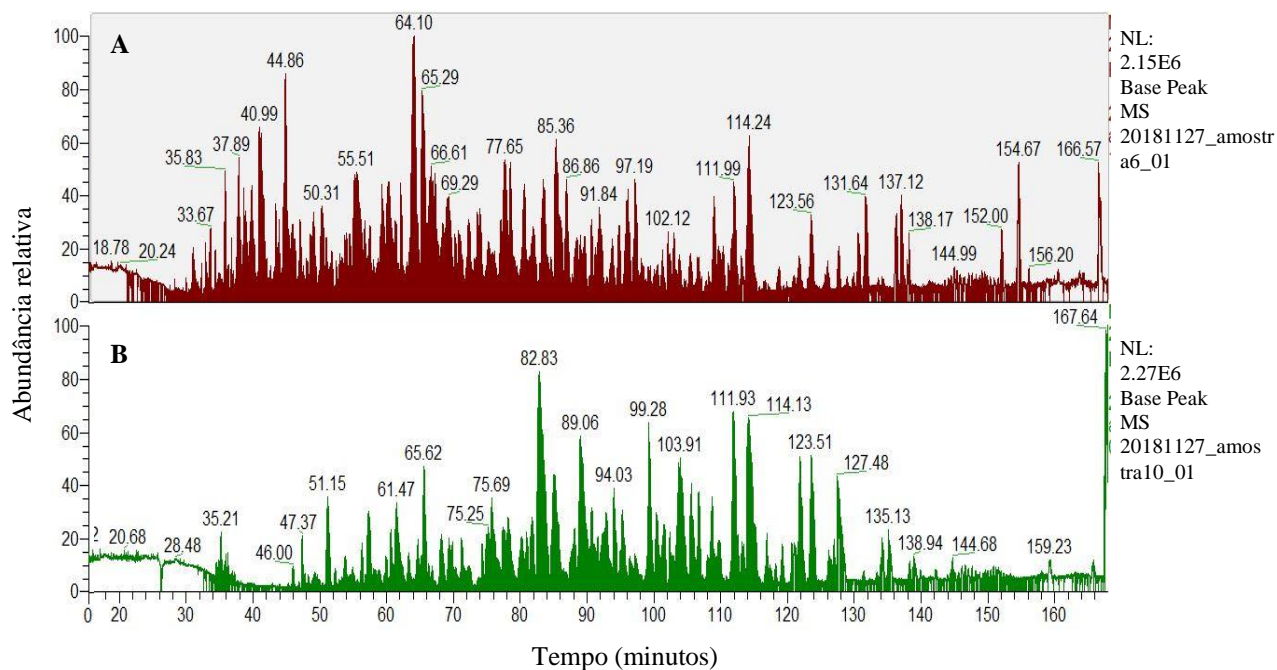


Figura 18. Perfil cromatográfico das amostras de biofilme (A) e secretoma (B) de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 cultivado a 37°C.

5.5.3.2. Identificação proteica

As proteínas presentes no biofilme e secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 foram inferidas através do *software Patternlab for proteomics* (Carvalho et al. 2016). Para o biofilme, foram identificados um total de 740 proteínas (com redundância), 17,721 espectros, 2,910 peptídeos e 383 proteínas únicas, independente da temperatura. Para o secretoma, foram detectadas 325 proteínas (com redundância), 9,769 espectros, 1,383 peptídeos e 179 proteínas únicas também independentes do efeito da temperatura. A lista completa das proteínas identificadas para ambas as condições se encontra disponível no apêndice 8.3. De forma geral, as proteínas identificadas foram classificadas de acordo com as diversas funções que desempenham ou possuem associadas ao processo biológico, componente celular e função molecular.

Houve uma maior quantidade de proteínas presentes no biofilme quando comparado com o secretoma, isso pode estar associado ao fato de que além da matriz extracelular presente na composição do biofilme, há também a presença de hifas e conídios, adicionando à composição proteica do biofilme, proteínas de membrana celular e intracelulares. Na análise com o *Gene ontology* (Figuras 19 e 20), foi observado que grande parte dessas proteínas presentes no biofilme e secretoma estavam associadas à função molecular (GO0003674), representando 43% e 43,1% respectivamente; e ainda, que um grande número dessas proteínas estava associado à atividade catalítica, as quais pertencem a diferentes famílias, tais como hidrolases, oxidoredutases, transferases, isomerases, liases, entre outras (Figura 19A e 20A).

Alguns exemplos de enzimas identificadas para as duas condições foram: a endo-1,3-beta-glucanase Eng11, quitinases e superóxido dismutase. Estas proteínas desempenham funções associadas à obtenção de nutrientes para a degradação de fontes de carbono e nitrogênio, atuam na digestão da parede celular, crescimento e morte celular, bem como na proteção celular contra o estresse oxidativo (Xia et al. 2001, Bauermeister et al. 2010, Oliveira et al. 2010a, Oliveira 2013, Barroncas 2013). Outra proteína encontrada nessas condições que pode ser citada é a triosefosfato isomerase, que está associada à via glicolítica, mas quando presente na membrana celular de alguns microrganismos pode atuar também como um importante fator de virulência (Miranda-Ozuna et al. 2016). Em estudos realizados com *Paracoccidioides brasiliensis* e *Staphylococcus aureus*, esta foi observada por estar atuando como adesina (Pereira et al. 2007). No primeiro caso, a triosefosfato isomerase de *P. brasiliensis* foi localizada na parede celular e foi suposto que esta estava exercendo um papel de adesina, visto que esta interagiu com pneumócitos e células da linhagem Vero (Pereira et al. 2007).

Com relação ao processo biológico (GO 0008150), este correspondeu a aproximadamente 33% para cada condição estudada, sendo que a maioria das proteínas identificadas estavam associadas ao processo celular e processo metabólico no biofilme (40,4% e 38,5%) e secretoma (35% e 43,7%), respectivamente (Figura 19B e 20B). Dentre as proteínas relacionadas a essa característica em ambas as condições, tem-se a proteína Ecm33, a qual possui propriedades típicas de proteínas ancoradas à GPI e desempenha um papel importante na organização da parede celular fúngica (Romano et al. 2006, Champer et al. 2016). Em um estudo com *Candida albicans*, a Ecm33 foi descrita por atuar na biogênese, morfogênese, tolerância ao estresse, interações patógeno-hospedeiro e sobrevivência da parede celular (Gil-Bona et al. 2016). Em trabalhos anteriores com *Aspergillus fumigatus*, foi observado que cepas mutantes de Ecm33 demonstravam uma organização alterada da parede celular e que estas eram mais susceptíveis às espécies reativas de oxigênio (Chabane et al. 2006, Abad et al. 2010).

Dentre as proteínas associadas ao processo celular, destacam-se as lacases (Abr2 e TilA), que geralmente atuam no processo de síntese do pigmento do conídio fúngico DNH (dihidroxinaftaleno). Este pigmento é importante, pois atua como mecanismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio, auxiliam no processo de invasão celular e no hospedeiro humano evitando o reconhecimento fúngico pelos padrões associados a membrana do patógeno (PAMPs), devido o mascaramento dos epítomos (Sugareva et al. 2006, Sapmak et al. 2015, Upadhyay et al. 2016, Raffa et al. 2019, Perez-Cuesta et al. 2019, Chang et al. 2019).

Em processo metabólico foram identificadas as proteínas Gel1, Gel2 e Gel4 estando presentes no biofilme e secretoma. Estas são glucanosil transferases pertencentes à família 72 das glicosil hidrolases e foram implicadas por atuarem no processo de alongamento do β -1,3 glucano da parede celular fúngica (Abad et al. 2010, Mouyna et al. 2013). Segundo Gastebois et al. (2010), o gene que codifica para Gel4 é o mais expresso durante o crescimento de *Aspergillus fumigatus*. Em adição, a proteína Gel 4 foi identificada em um estudo proteômico com diferentes espécies de *Aspergillus* e *Scedosporium*, onde se verificou que por ser expressa em outras espécies de fungos, esta proteína poderia ser utilizada como potencial candidato a vacina devido à proteção cruzada (Ramirez-Garcia et al. 2018). Outra proteína identificada e relacionada a processo metabólico foi a álcool desidrogenase, que em *Saccharomyces cerevisiae* esta pode atuar em processos fermentativos e respiratórios (Thompson et al. 2018). Em *A. fumigatus*, esta pode estar associada aos mecanismos de adaptação à hipóxia, uma vez que quando presente no organismo do hospedeiro humano, este usa a fermentação alcoólica para suprir a necessidade de oxigênio (Grahl et al. 2011, Thompson et al. 2018).

Por fim, quando avaliada a função do componente celular (GO 0005575), foi observada uma distribuição de 24,9% para o biofilme e 25,7% para o secretoma, onde grande parte das proteínas estavam inseridas dentro de parte celular (biofilme: 43% e secretoma: 42%) e organelas (biofilme: 16,6% e secretoma: 16,4%) para as duas condições, respectivamente (Figura 19C e 20C).

Aquelas que estavam associadas a parte da membrana celular de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 estavam presentes em maior quantidade no biofilme. Um exemplo disso é a proteína A do domínio CFEM (*Common in Fungal Extracellular Membrane*) ancorada à GPI, sendo que proteínas com este domínio geralmente estão associadas à interação patógeno hospedeiro (Vaknin et al. 2014, Zhu et al. 2017). Estudos realizados com *C. albicans* demonstraram que estas proteínas estão associadas à estabilidade da parede celular, bem como à sensibilidade frente a agentes danificadores da parede celular e redução na capacidade para formar biofilme (Heilmann et al. 2011, Pérez et al. 2011). Já em um estudo realizado por (Vaknin et al. 2014), foi observado que *Aspergillus fumigatus* produz três tipos de proteínas com domínio CFEM e que estas estão classificadas de A-C; sendo que a proteína A do domínio CFEM apresenta uma maior expressão durante o processo de germinação e crescimento da hifa, etapas estas que estão ocorrendo durante o processo de formação do biofilme. Além disso, foi observado ainda nesse estudo que as proteínas de domínio CFEM atuam na estabilidade da parede celular e membrana plasmática, porém não estão associadas com a virulência de *Aspergillus fumigatus* (Vaknin et al. 2014).

Na seção organelas do *Gene ontology*, dentre as proteínas inferidas tem-se a heptacetídeo hidrolase Ayl1. Segundo a literatura, esta atua no processo de síntese do pigmento da parede celular de *Aspergillus fumigatus* (Upadhyay et al. 2016). Resumidamente, Ayl1 é necessária para que Alb1, outra proteína que atua na via biossintética de melanina reduza o heptacetídeo naftropona YWA1 em 1,3,6,8-THN que posteriormente resultará em DHN-melanina (Fujii et al. 2004, Upadhyay et al. 2016). Esta foi descrita para estar localizada nos endossomos, local onde as moléculas de melanina chegam até a parede celular e sendo este mecanismo utilizado para facilitar a melanogênese durante o processo de conidiação (Tsai et al. 1998, 2001, Upadhyay et al. 2016).

Uma proteína que pode estar associada ao processo de divisão celular é a proteína SDA1 e neste trabalho foi encontrada exclusiva para o biofilme. Estudos demonstram que em *Saccharomyces cerevisiae*, esta proteína apresenta uma localização nuclear e que sua depleção ou inativação causam uma parada no ciclo celular, resultando no bloqueio do processo de brotamento e replicação do DNA (Buscemi et al. 2000, Zimmerman & Kellogg 2001). Em

Trichoderma atroviride, foi observado que genes homólogos aos que codificam proteínas semelhantes a SDA1 desempenham um papel importante na passagem de células da fase G0 para a G1, sugerindo que esses genes podem desempenhar um papel importante na regeneração de hifas que sofreram algum dano (Hernández-Oñate et al. 2012).

A ribonuclease T2 foi identificada somente no secretoma de *Aspergillus fumigatus*. Esta faz parte de uma subclasse específica de endorribonucleases que clivam RNA de fita simples desempenhando diversas funções como: maturação do mRNA, rRNA e tRN em diferentes microrganismos (Luhtala & Parker 2010, Hameş & Demir 2015). De acordo com Luhtala & Parker (2010), estas são tipicamente secretadas pela célula e devem atuar no processo de eliminação do RNA intra e extracelular (Hameş & Demir 2015).

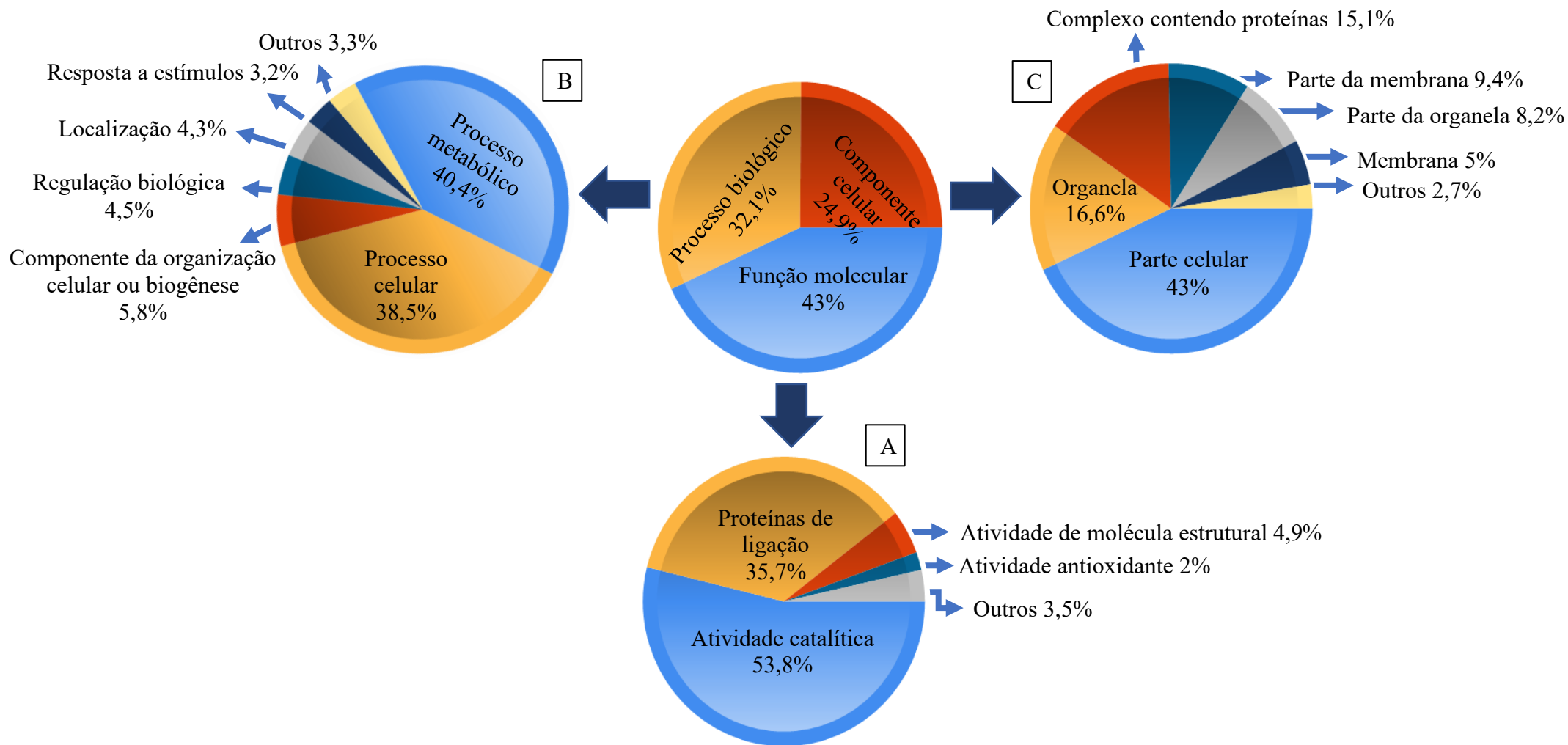


Figura 19. Análise da distribuição percentual das proteínas do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640, de acordo com as diferentes funções. **A)** função molecular; **B)** processo biológico; **C)** componente celular.

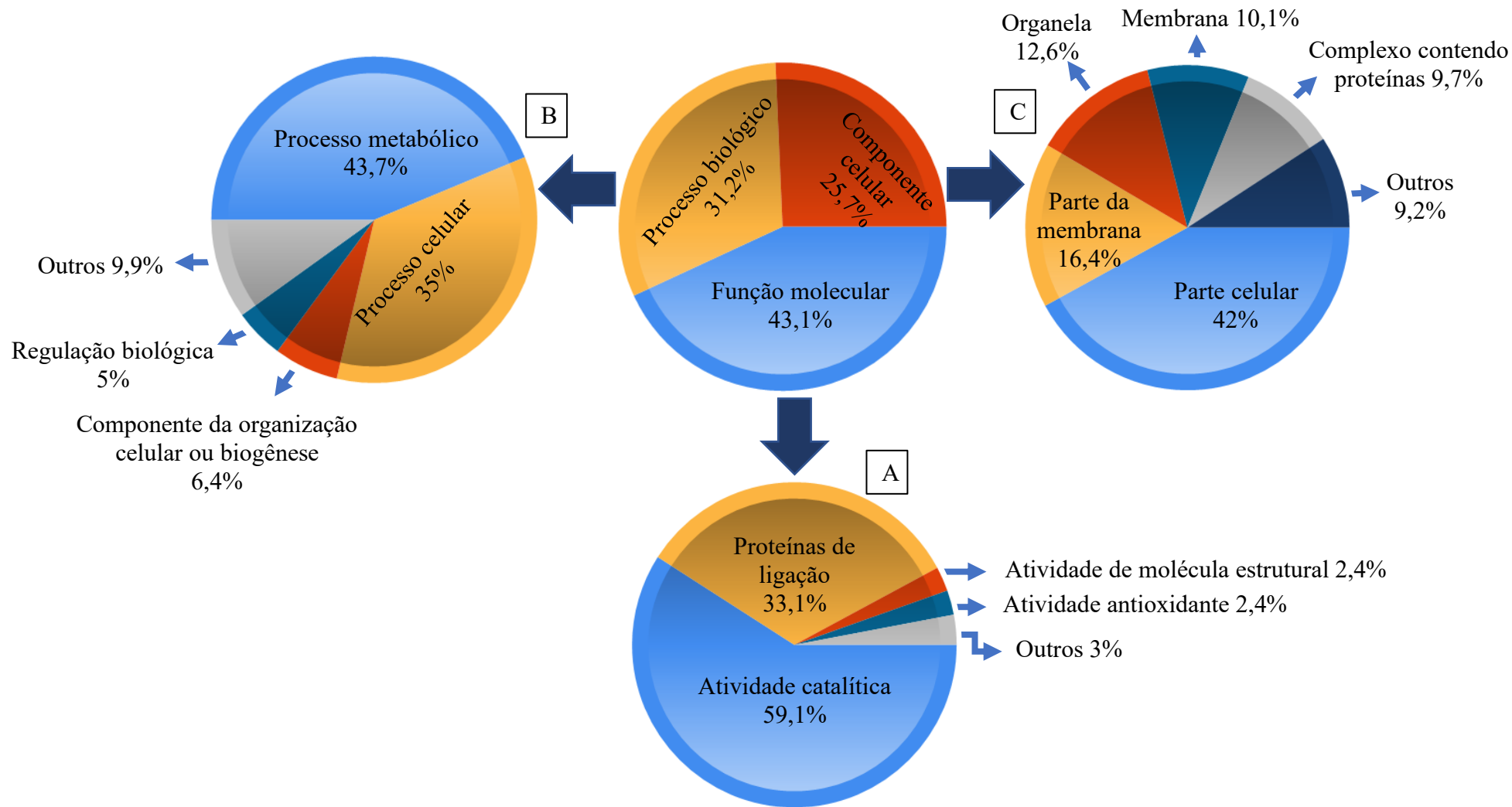


Figura 20. Análise da distribuição percentual das proteínas do secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640, de acordo com as diferentes funções. **A)** função molecular; **B)** processo biológico; **C)** Componente celular.

5.5.3.3. Análise diferencial do biofilme e secretoma nas diferentes temperaturas

Após a análise geral do secretoma e do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640, foi então realizada a avaliação destes levando em consideração o efeito da temperatura para ambos. Nas figuras 21 e 22, encontram-se os diagramas de Venn das proteínas diferencialmente expressas no biofilme a 28°C e 37°C, e no secretoma 28°C e 37°C, respectivamente.

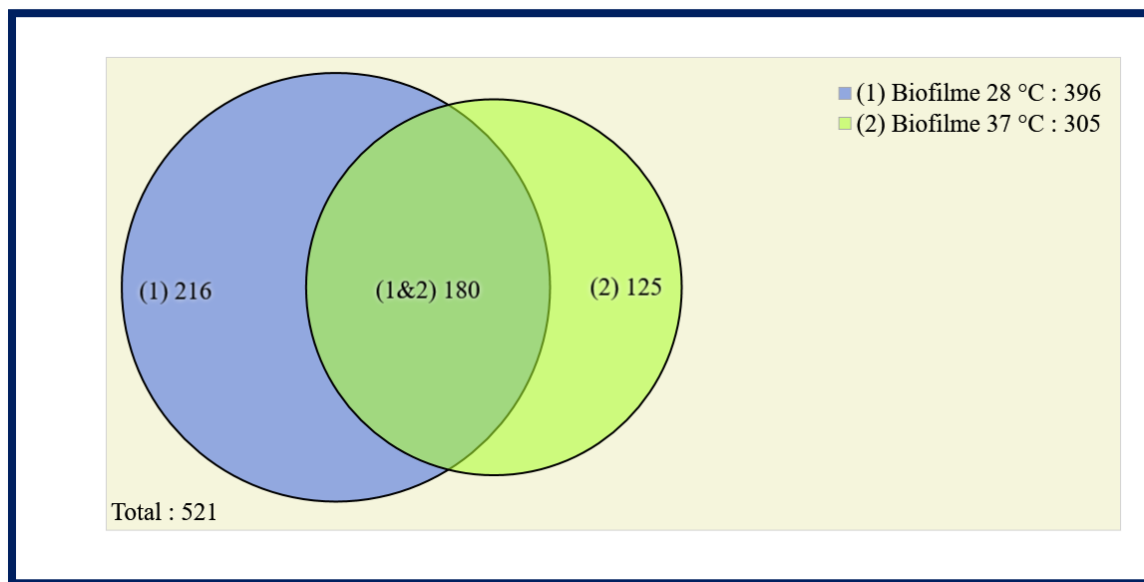


Figura 21. Diagrama de Venn do biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 comparando as proteínas identificadas exclusivamente nas temperaturas de 28°C (azul) e 37°C (verde), e ainda as compartilhadas entre ambas as temperaturas (verde escuro).

Para o biofilme foram identificadas um total de 521 proteínas, sendo 216 proteínas identificadas apenas para a temperatura de 28°C e 125 proteínas identificadas apenas para a temperatura de 37°C, além de um total de 180 proteínas compartilhadas entre as duas condições (Figura 21). Em uma análise mais detalhada entre essas proteínas, verificou-se a presença de hidrofobina especificamente no biofilme a 28°C. De acordo com a literatura, *A. fumigatus* apresenta sete tipos de hidrofobinas, porém duas são mais estudadas: a primeira é RodA com aproximadamente 16 KDa e a segunda é RodB com aproximadamente 14 KDa (Paris et al. 2003, Valsecchi et al. 2017). Em nosso estudo, ambos os tipos de hidrofobinas foram identificadas. De forma geral, tais proteínas são insolúveis, estão presentes na camada mais externa da parede celular fúngica e desempenham um papel de hidrofobicidade; possibilitando assim, uma melhor fluabilidade e dispersão dos conídios pelas correntes de ar, além de atuarem no mecanismo de evasão do sistema imune (Aimanianda et al. 2009, Valsecchi et al. 2017). A presença dessas hidrofobinas na parede celular fúngica permite que *Aspergillus fumigatus* quando dentro do organismo do hospedeiro possa ficar imperceptível, pois a camada

hidrofóbica formada por RodA juntamente com a camada de melanina na superfície dos esporos fúngicos faz com que estes fiquem latentes, evitando que os esporos sejam reconhecidos pelos PAMPs, impedindo o processo de inflamação e dano tecidual (Bayry et al. 2012, Valsecchi et al. 2017). Além disso, a presença de RodA confere resistência às armadilhas de neutrófilos e morte por macrófagos alveolares (Paris et al. 2003, Bruns et al. 2010, Bayry et al. 2012, Valsecchi et al. 2017).

Já a proteína subunidade beta do complexo de proteína G (CpcB) foi identificada apenas no biofilme da espécie estudada, na temperatura de 37°C (Figura 21). De acordo com Cai et al (2015), essa proteína está localizada no citoplasma e associada ao processo de crescimento fúngico, mais especificamente à propagação das hifas e produção dos conídios. Adicionalmente, tais autores observaram que cepas mutantes desta proteína apresentam menor capacidade de invasão tecidual quando comparadas com cepas do tipo selvagem devido à essa capacidade de crescimento das hifas (Cai et al. 2016). Em nosso estudo, acreditamos que o fato dela ter sido observada apenas nesta temperatura pode ser resultante da velocidade do crescimento de *Aspergillus fumigatus* que é mais acelerada a 37°C.

Ao analisarmos o secretoma levando em consideração a temperatura, um total de 242 proteínas foram observadas, onde 112 eram exclusivas a 28°C e 49 a 37°C, além de compartilharem um total de 81 proteínas (Figura 22).

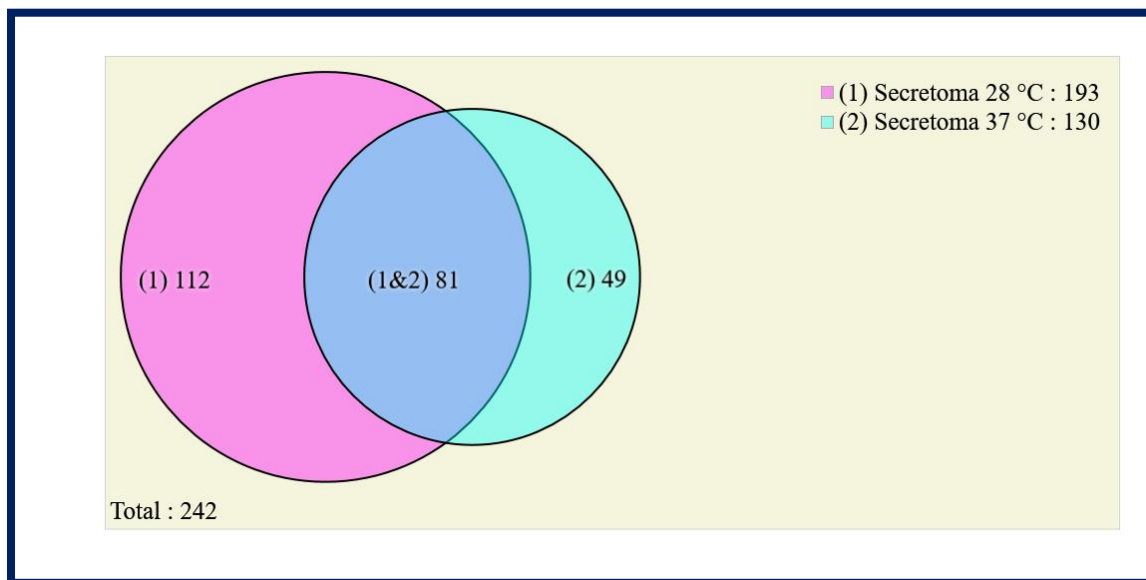


Figura 22. Diagrama de Venn do secretoma de *A. fumigatus* ATCC 46640 comparando as proteínas identificadas exclusivamente nas temperaturas de 28°C (rosa) e 37°C (verde), e ainda as compartilhadas entre as duas temperaturas (azul).

Dentre as proteínas identificadas apenas no secretoma a 28°C, está a quitinase classe III, específica para fungos filamentosos. Esta faz parte de uma família de proteínas responsável

pela síntese de quitina, um componente assinatura da estrutura da parede celular fúngica (Fontaine et al. 2000, Orlean & Funai 2019). Uma mutação nos genes que codificam esta proteína pode resultar em hifas fúngicas muito ramificadas, caracterizando assim um crescimento alterado; e ainda, quando está crescendo no ambiente em competição com outros fungos, a produção de quitinases auxilia na degradação das paredes celulares de fungos competidores (Mellado et al. 2003, Rovenich et al. 2014). Em contrapartida, no secretoma à 37°C, a proteína inibidora de elastase (AFUEI) foi exclusiva dessa condição. É sabido que *Aspergillus fumigatus* apresenta a capacidade de produção de proteases com atividade elastinolítica e que estas enzimas atuam em sua capacidade de invasão tecidual, tornando este um fator chave em sua virulência (Kolattukudy et al. 1993, Smith et al. 2015). Contudo, além da elastase produzida por *A. fumigatus* durante o processo invasivo, existe também a presença da elastase leucocitária a qual atua na infiltração tecidual e processo inflamatório. Por isso, acredita-se que o inibidor de elastase de *A. fumigatus* esteja atuando para suprimir o processo inflamatório durante o estabelecimento da infecção (Olivares 2016).

De forma complementar, foi verificado também a abundância das proteínas tanto nas duas condições estudadas (biofilme e secretoma) como sob o efeito da temperatura. Na figura 23, tem-se as proteínas mais abundantes no biofilme e no secretoma de acordo com o *fold change*. A lista com todas as proteínas que apresentaram *fold change* significativo encontra-se no apêndice 8.4. Para o biofilme, duas proteínas denominadas proteína de biossíntese de tiamina com a massa molecular de 38,3 KDa e 38,2 KDa, se destacaram com um *fold change* de 11.16 e 10,86, respectivamente. Estas atuam no processo de síntese de tiamina, de acordo com Nakamura et al. (2011), a expressão do gene *Nmt1* só ocorre em meios que há ausência de tiamina. Foi observado também que o gene *nmt1* está associado a regulação da expressão gênica mediada por tiamina em *Aspergillus oryzae* (Kubodera et al. 2003). No secretoma, as proteínas mais abundantes foram: uma proteína não caracterizada com a massa molecular de 37,1 KDa e a endo-beta-1,4-glucanase D, uma enzima que atua na degradação das ligações beta-1,4 glicosídicas da celulose para transformá-la em glicose; sendo este um possível vestígio do estilo de vida saprófita de *Aspergillus fumigatus* (Odeniyi et al. 2012).

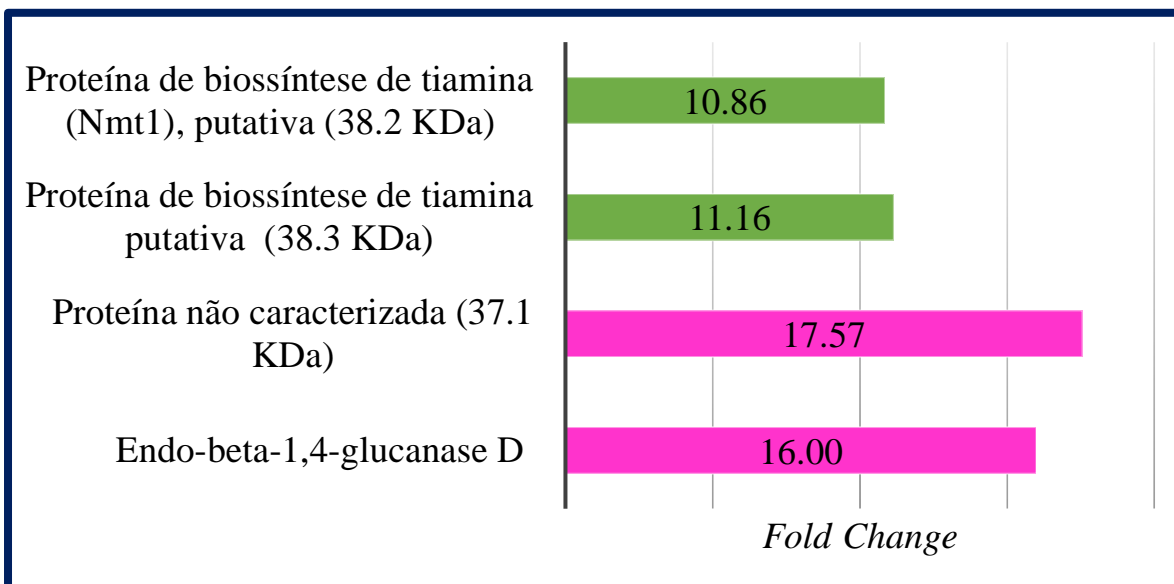


Figura 23. Proteínas mais expressas no biofilme (verde) e no secretoma (rosa) de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 independentes da temperatura.

As figuras 24 e 25 representam as proteínas mais abundantes no biofilme e no secretoma nas duas temperaturas estudadas, respectivamente. Para o biofilme a 28°C, as proteínas mais abundantes foram: a metionina sintase independente de cobalamina e a beta-frutofuranosidade putativa, com *fold change* em torno de 9,82 e 11,9 (Figura 24). A metionina sintase independente de cobalamina atua na produção de metionina para a formação de proteínas e no ciclo metabólico de carbono. Uma característica dessa enzima é que ela não é produzida por mamíferos, o que a torna um interessante alvo diagnóstico ou terapêutico (Ubhi & Robertus 2015, Rody & Oliveira 2018). Já a beta-frutofuranosidase é uma enzima classificada na família das hidrolases e atua na conversão de sacarose em D-glicose e D-frutose; sendo um atrativo principalmente para a área industrial, uma vez que o xarope originário desta conversão é mais doce do que a sacarose e não cristaliza em altas concentrações (Giraldo 2011, Rustiguel et al. 2015). Na temperatura a 37°C, as proteínas com maiores *fold change* no biofilme foram duas proteínas não caracterizadas (Figura 24).

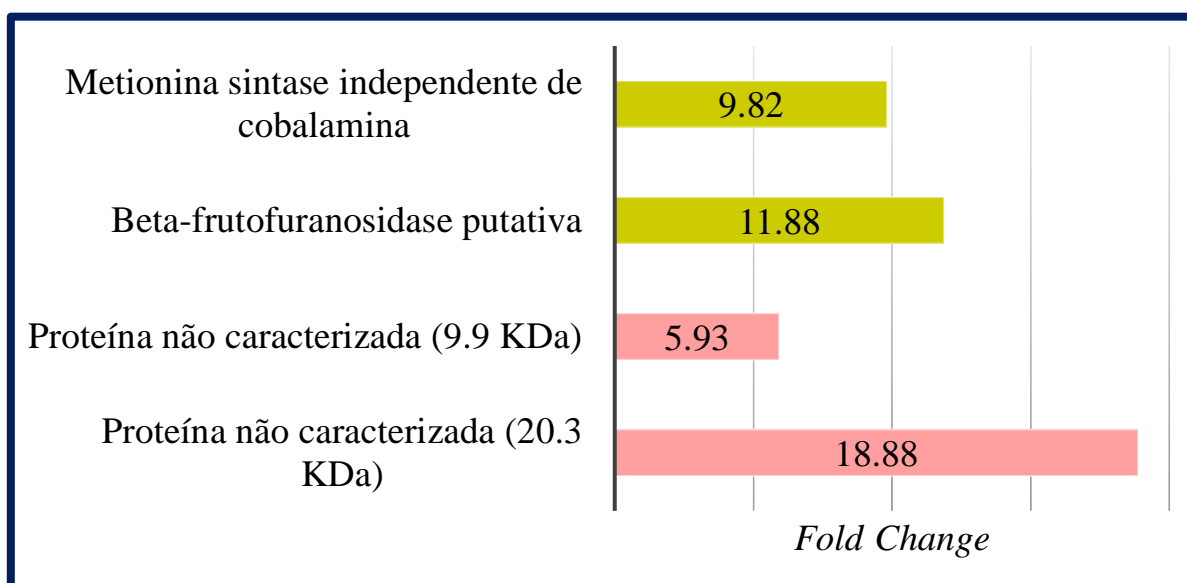


Figura 24. Proteínas mais expressas no biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28 °C (verde) e 37 °C (rosa).

Para o secretoma na temperatura de 28°C, as proteínas que se destacaram quanto a abundância foram: a frutose-bifosfato aldolase classe II e a mio-inositol-fosfato sintase putativa (Figura 25). A frutose-bifosfato aldolase classe II atua no processo de glicólise de microrganismos, sendo esta classe encontrada apenas em bactérias e fungos (de Amorim et al. 2018). Em *Candida albicans*, esta enzima foi descrita como ligante ao plasminogênio (de Amorim et al. 2018). De forma semelhante, no estudo realizado por Chaves et al. (2015) foi verificado que a frutose bifosfato aldolase de *Paracoccidioides* também apresentou a capacidade de ligação ao plasminogênio e que esta pode estar envolvida no processo de aderência, invasão e disseminação fúngica.

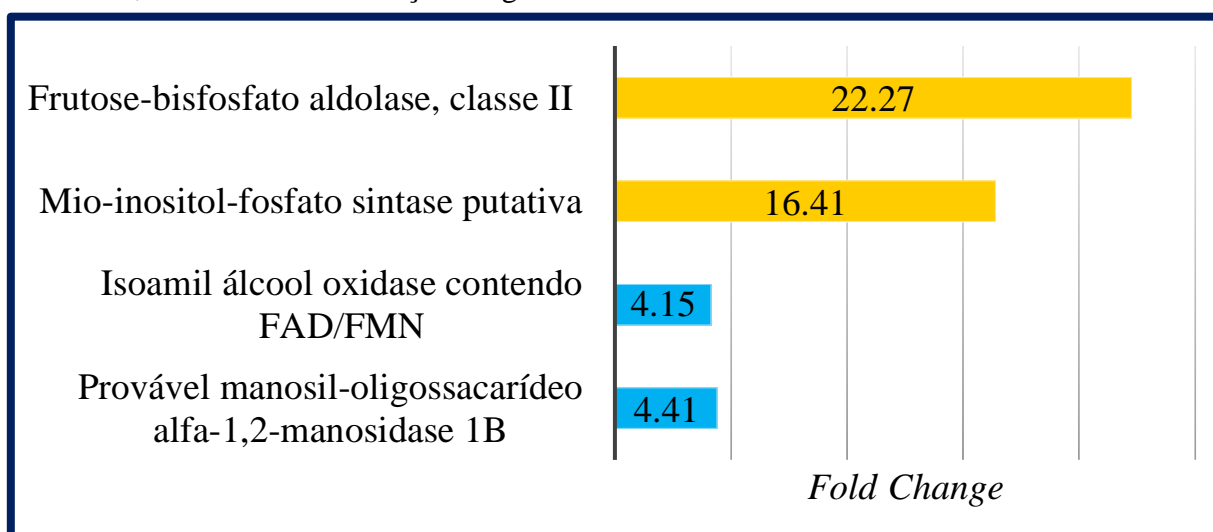


Figura 25. Proteínas mais expressas no secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 nas temperaturas de 28°C (laranja) e 37°C (azul)

A mio-inositol-fosfato sintase catalisa a conversão de D-glucose-6-fosfato para 1L-mio-inositol-1-fosfato, que corresponde a primeira etapa para a formação de produtos que contêm inositol, sendo esta essencial para a síntese de fosfolipídeos (Croze & Soulage 2013, Hazra et al. 2019). O inositol produzido através da ação desta enzima atua em diversos processos celulares, tais como, regulação do crescimento, biogênese da membrana, osmotolerância, entre outros (Croze & Soulage 2013, Nisa et al. 2016).

No secretoma a 37°C, as proteínas que mais chamaram atenção devido aos valores de *Fold change* foram: a isoamil-álcool oxidase contendo FAD/FMN e uma provável manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B. A isoamil álcool oxidase contendo FAD/FMN faz parte das álcool oxidases, as quais convertem álcoois primários e secundários em aldeídos e cetonas com liberação de peróxido de hidrogênio (Goswami et al. 2013, Pickl et al. 2015). A manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B também conhecida como manosidase 1B faz parte da família 47 das glicosil hidrolases e atua na biossíntese de N-glicanos (*e.g.* beta-1,3-glucano) da parede celular fúngica, além de ser necessária para a morfogênese (Mora-Montes et al. 2010, Ramirez-Garcia et al. 2018).

5.5.4. Principais alérgenos de *Aspergillus fumigatus*

Após a análise mais detalhada das proteínas expressas nas diferentes condições, verificou-se os principais alérgenos ou “Asps” de *Aspergillus fumigatus* identificados neste experimento (Tabela 2); visto que estes são importantes pois, estão relacionados a patogenicidade, correspondendo a adesinas, pigmentos, metabólitos secundários tóxicos ou enzimas que são expressos durante o crescimento de *Aspergillus fumigatus* (Banerjee & Kurup 2003, Pomés et al. 2016, Thakur & Shankar 2016).

O primeiro alérgeno identificado foi o Asp f1, também conhecido como ribotoxina mitogilina, que foi descrito em associação ao processo de crescimento de *Aspergillus fumigatus* (Banerjee & Kurup 2003). De acordo com Olombrada et al. (2017), não se sabe ao certo qual a sua função biológica, porém acredita-se que este exerça um papel no processo de conidiação, uma vez que durante este estágio de desenvolvimento existe um aumento na sua produção e posteriormente este valor declina (Banerjee & Kurup 1998, 2003). Esta proteína é considerada um dos principais alérgenos de interação com IgE de *Aspergillus fumigatus* sendo reconhecida em grande parte dos indivíduos sensibilizados (Banerjee & Kurup 2003). De forma geral, as ribotoxinas atuam bloqueando a síntese de proteínas através da degradação de uma região específica no RNA ribossomal de células eucarióticas e procarióticas; contudo na literatura, não foi identificado um receptor celular para esta proteína, por isso acredita-se que esta consiga

adentrar as células que apresentem alguma alteração na permeabilidade celular (Arruda et al. 1990, Olombrada et al. 2017).

O alérgeno Asp f2 foi identificado apenas no biofilme. Esta apresenta reatividade ao IgE em soro de pacientes com Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e é homólogo com a proteína de ligação ao fibrinogênio Pra1 de *Candida albicans* e Asp nd 1 de *Aspergillus nidulans* (Banerjee et al. 1998). Em adição, a Asp f2 já foi estudada para se tornar um provável candidato a vacina (Thakur & Shankar 2016).

A peroxirredoxina Asp f3 também foi identificada somente no biofilme, sendo que tal proteína atua no processo de inativação de espécies reativas de oxigênio (Hillmann et al. 2016). Estudos demonstraram que esta possui sequências de identidade com duas proteínas de *Candida boidinii*, as quais apresentam epítomos de ligação com IgE em comum, sendo este muito importante para o diagnóstico sorológico de pacientes com ABPA (Shen et al. 2001, Kurup 2003). E ainda, já foi apontado que Asp f3 colaborou na proteção de camundongos neutropênicos e com imunossupressão induzida por corticosteroides contra a aspergilose, demonstrando assim informações da possível interação patógeno-hospedeiro (Champer et al. 2016).

A superóxido dismutase [Mn] mitocondrial ou Asp f6, encontrada exclusivamente no biofilme, atua no processo de desintoxicação dos superóxidos gerados dentro das células fúngicas devido seu metabolismo, estando presente somente nas hifas de *Aspergillus fumigatus* (Schwienbacher et al. 2005a, Lambou et al. 2010). Quando presente no organismo do hospedeiro atua no mecanismo de defesa fúngica, eliminando as espécies reativas de oxigênio geradas pelos fagócitos. Tal proteína já foi identificada presente no soro de pacientes com ABPA através da ligação ao IgE e é reativo nos testes cutâneos para sensibilização ao *Aspergillus fumigatus* (Kurup 2003).

O alérgeno Asp f8 ou proteína ribossômica ácida P2 é uma proteína associada a síntese de proteínas que são altamente conservadas entre eucariotos (Abad et al. 2010). Essas proteínas apresentam a capacidade de induzir respostas IgG em pacientes com doenças autoimunes, além de proteínas ribossômicas P2 de *A. fumigatus* serem reconhecidas por anticorpos IgE de indivíduos sensibilizados pelo fungo e mostrarem reatividade cruzada humoral significativa com a proteína P2 humana; estando também associada a invasão e destruição tecidual (Mayer et al. 1999, Abad et al. 2010).

O alérgeno Asp f9 ou provável glicosidase Crf1 é uma proteína associada ao processo de septação das hifas de *Aspergillus fumigatus* (Suh et al. 2012). De acordo com Champer et al. (2016), a secreção de Crf1 para o ambiente pode estar associada à inibição do crescimento

de outros fungos competidores através da degradação de suas paredes celulares. Além disso, foi identificado que esta apresenta imunização contra aspergilose e por ter homologia com proteínas de *Candida albicans* também protege contra candidíase (Stuehler et al. 2011, Champer et al. 2016, Parente-Rocha et al. 2017).

A proteína do choque térmico 90 (Hsp90) ou Asp f12 pertence a família de proteínas do choque térmico que atuam em resposta ao estresse e manutenção da integridade celular (Lamoth et al. 2014). Acredita-se que esta seja uma das proteínas mais abundantes, estando presente em grandes quantidades antes mesmo do estresse celular e agindo no processo de dobra e regulação de outras proteínas (Picard 2002, Tiwari et al. 2015). Durante a etapa de crescimento fúngico, esta é importante para o processo de conidiação, viabilidade dos esporos e crescimento das hifas, uma vez que Hsp90 juntamente com a calcineurina atuam juntas em uma via durante o processo de reprodução assexuada (Tiwari et al. 2015); e ainda, pode conferir resistência antifúngica à caspafungina sendo considerada um alvo para o tratamento antifúngico (Cowen & Lindquist 2005, Lamoth et al. 2012, 2016, Cowen 2013).

Dentre os alérgenos encontrados tanto no biofilme como no secretoma neste trabalho, tem-se ainda: a Asp f13, a Asp f15, Asp f22 e Asp f34. A serina protease alcalina (Asp f13) ou Alp2 pertence à família das subtilisinas e apresenta relação com uma proteinase vacuolar de *S. cerevisiae* (PrB) e uma proteinase de *A. niger* (PEPC) (Rementria et al. 2005; Reichard et al. 2000). Acredita-se que esta esteja localizada em uma fração da parede celular de *Aspergillus fumigatus*, sendo essencial para o fornecimento de aminoácidos para a síntese de proteínas específicas do seu desenvolvimento (Tiwari et al. 2015, Bui et al. 2016). Quando associado a doenças, a Asp f13 possui um papel importante na asma e quando em conjunto com Asp f2 induzem a inflamação pulmonar (Reichard et al. 2000, Namvar et al. 2015).

O alérgeno Asp f15 não está muito descrito de forma individual na literatura, porém sempre é citado em trabalhos que estudam os alérgenos de *Aspergillus fumigatus* e já foi mencionado ser idêntico ao Asp f13 (Simon-Nobbe et al. 2008).

Já a enolase ou alérgeno Asp f22 já foi encontrada em outros estudos na superfície de uma variedade de outros fungos, tais como: *C. albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii* e *Saccharomyces cerevisiae* (Funk et al. 2016). Essa proteína está associada a interação patógeno-hospedeiro sendo um importante ligante ao plasminogênio, o que contribui para a patogenicidade fúngica, podendo ainda ser um potencial alvo para o diagnóstico da aspergilose causada por *A. fumigatus* (Funk et al. 2016).

Por último, tem-se a proteína de parede celular PhiA, a qual é homóloga com a proteína de *Aspergillus nidulans*, possuindo importância no processo de formação das fiáides e,

consequentemente na competência de esporulação deste fungo (Melin et al. 2003, Glaser et al. 2009). Adicionalmente, esta demonstra capacidade de ligação ao anticorpo IgE e vem sendo estudada como um provável alvo para a criação de vacinas contra infecções causadas por *Aspergillus* (Thakur & Shankar 2016).

Tabela 2. Principais alérgenos de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 identificados neste estudo.

ALÉRGENO	NOME	MASSA MOLECULAR (KDa)	CONDIÇÃO ENCONTRADA	NSAF*
Asp f 1	Família mitogilina	19564.8	Biofilme/Secretoma	0.00270404/ 0.012596313
Asp f 2		32799.6	Biofilme	0.000100122
Asp f 3	Proteína Peroxisomal	18423.4	Biofilme	0.001108489
Asp f 6	Superóxido dismutase Mn	23357.8	Biofilme	0.000147798
Asp f 8	Proteína ribossomal P2	11116.6	Biofilme	0.002423362
Asp f 9	Provável glicosidase crf1	40241.2	Biofilme/Secretoma	0.000497651/ 0.000526175
Asp f 12	Proteína do choque térmico 90	80572.3	Secretoma	0.00022897
Asp f 13	Serina protease alcalina	15985.8	Biofilme/Secretoma	0.00374358/ 0.008811894
Asp f 15		15915.6	Biofilme/Secretoma	0.005853597/ 0.014737133
Asp f 22	Enolase	47297.3	Biofilme/Secretoma	0.002810871/ 0.000579967
Asp f 34	Proteína da parede celular PhiA	19376.3	Biofilme/Secretoma	0.001621789/ 0.004618648

Fonte: http://www.allergen.org/index.php_Allergen_nomenclature_Who/IUIS_allergen_nomenclature_sub-committee. *NSAF (Fator de abundância espectral normalizado)

5.5.5. Rede de interações

Com o objetivo de visualizar a rede de interação entre algumas proteínas identificadas neste estudo foi utilizado o software STRING versão 11.0, disponível em <https://string-db.org/>. A primeira rede de interação analisada foi com a ribonuclease mitogilina ou a Asp f1, a qual como mencionado anteriormente, é um dos principais alérgenos de *Aspergillus fumigatus*. Na figura 26, é possível observar que esta mostrou interação com outros alérgenos (Asp f2, Asp f3, Asp f6, Asp f9 e Asp f13), presentes no secretoma e biofilme, também produzidos por esta espécie.

De maneira geral, os alérgenos Asp f1, Asp f2, Asp f3, Asp f6, Asp f9 e Asp f13 vêm sendo descritos na literatura devido seu papel no desenvolvimento de estratégias para a identificação de ABPA, aspergilose invasiva, e sensibilização fúngica causadas por *Aspergillus fumigatus* (Pomés et al. 2016, Thakur & Shankar 2016, Janahi et al. 2017, Vitte et al. 2017). Todos estes apresentam a capacidade de interação com o sistema imune do hospedeiro, porém Asp f3, Asp f6 e Asp f13 possuem proteínas homólogas em humanos e no modelo murino de infecção; já Asp f1, Asp f2 e Asp f9 não apresentam homologia e somente Asp f1 e Asp f2 demonstram regiões de interação com células B e T, o que os torna ótimos candidatos a vacinas e alvos terapêuticos (Thakur & Shankar 2016).

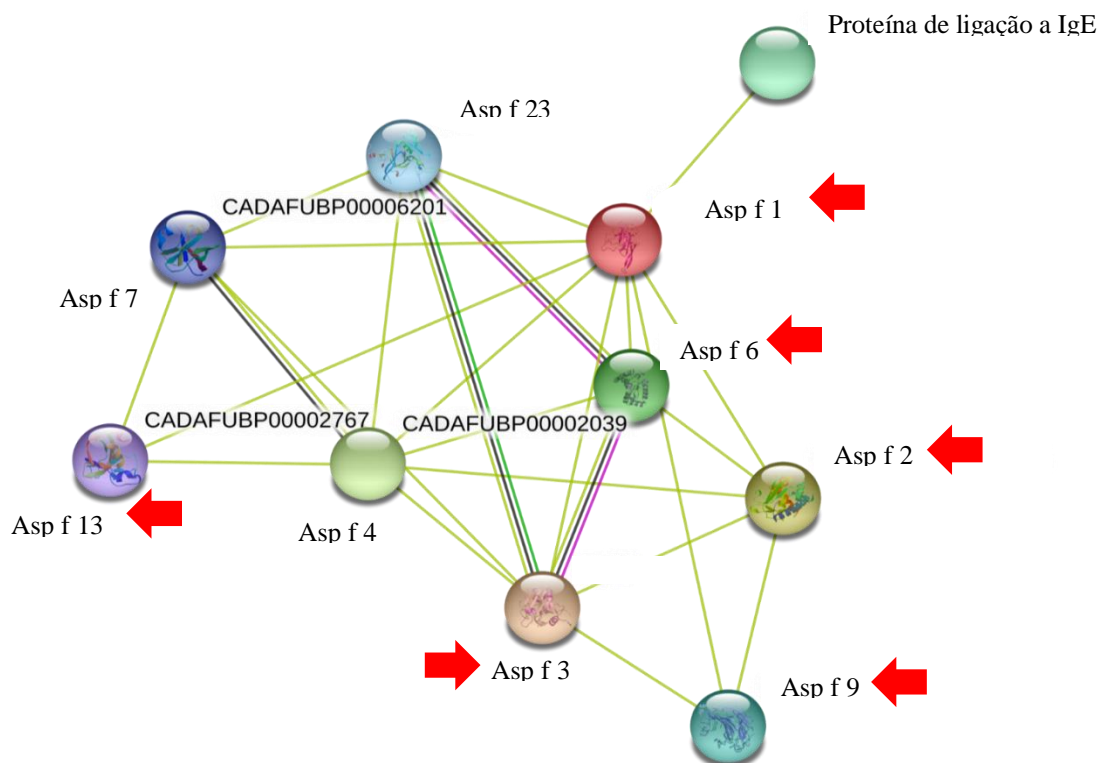


Figura 26. Rede de interação entre os principais alérgenos de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 identificados neste estudo.

Uma outra característica observada na presença de alérgenos é o tipo de reação causada por *Aspergillus fumigatus* pois, pacientes com ABPA apresentam anticorpos IgE contra os antígenos de *A. fumigatus* Asp f2, Asp f4, e/ou Asp f6. Já os indivíduos com asma atópica, geralmente possuem anticorpos IgE contra os antígenos Asp f1 e/ou Asp f3 (Janahi et al. 2017).

A segunda rede de interação analisada foi com a proteína catalase A (Figura 27). Nesta, foi observada a interação de catalase A com outras proteínas identificadas neste estudo como a tiorredoxina putativa, tiorredoxina redutase, glutaciona redutase e proteína quinase ativada por mitógeno hog1. Estas estão associadas ao Hog1, que é uma via de sinalização responsável pela indução dos principais sistemas antioxidantes e atuam através da eliminação do superóxido e peróxido de hidrogênio que são produzidos durante o crescimento fúngico e metabolismo (Mendoza-Martínez et al. 2017)

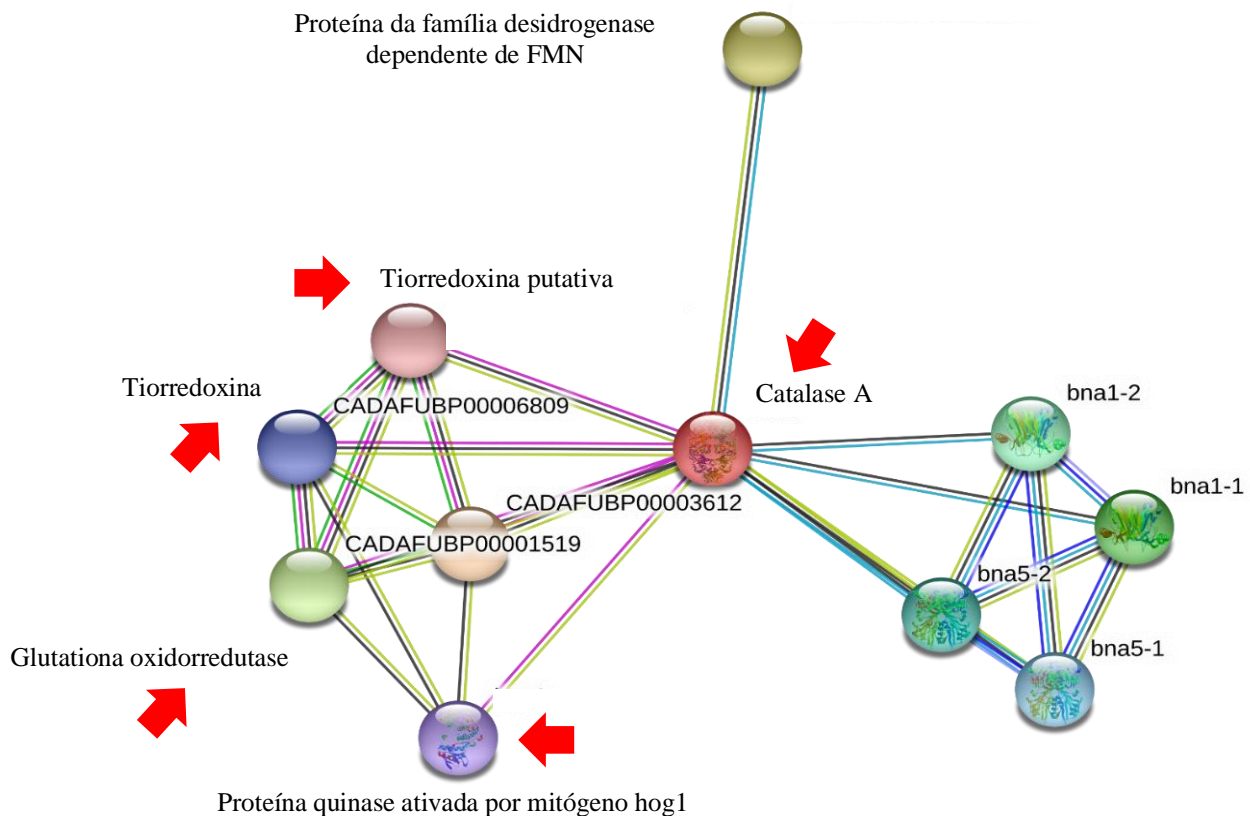


Figura 27. Rede de interação da proteína Catalase A com as proteínas quinase ativada por mitógeno hog1, glutaciona redutase, tiorredoxina putativa e tiorredoxina redutase.

Adicionalmente, na figura 28 tem-se a rede de interações da proteína endoquitinase B1. As quitinasas são enzimas com capacidade de clivagem da quitina, um dos principais componentes da parede celular fúngica, estando envolvidas também na degradação e

remodelação da parede celular de outros fungos (Schwienbacher et al. 2005b, Hartl et al. 2012, Krolicka et al. 2018). A quitosanase atua na degradação da quitosana, uma forma parcialmente desacetilada de quitina. Em um estudo realizado por Schwienbacher et al. (2005a) com *Aspergillus fumigatus*, foi observado que este secretou de maneira abundante as proteínas quitinase, quitosanase e a protease aspártica, aspergiloepsina 1, e que este fato estava associado ao crescimento fúngico em um meio de cultivo mais ácido (Schwienbacher et al. 2005b, Watson et al. 2011). A beta-hexosaminidase ou N-acetil- β -D-glucosaminidase também foi identificada nesta rede (Figura 28). Esta faz parte da família 20 das glicosil hidrolases sendo a segunda classe de enzimas capazes de degradar a quitina (Hartl et al. 2012, Gushulak et al. 2012). Além do que, tais enzimas apresentam uma importância industrial pelo seu papel na produção de oligossacarídeos de quitina e quito-oligossacarídeos de quitosana (Krolicka et al. 2018). Em nosso estudo, esta proteína apareceu devido as alterações relacionadas a morfogênese deste fungo, sendo importantes para o processo de germinação e formação das hifas, uma vez que como mencionado anteriormente estas atuam na remodelação da parede celular.

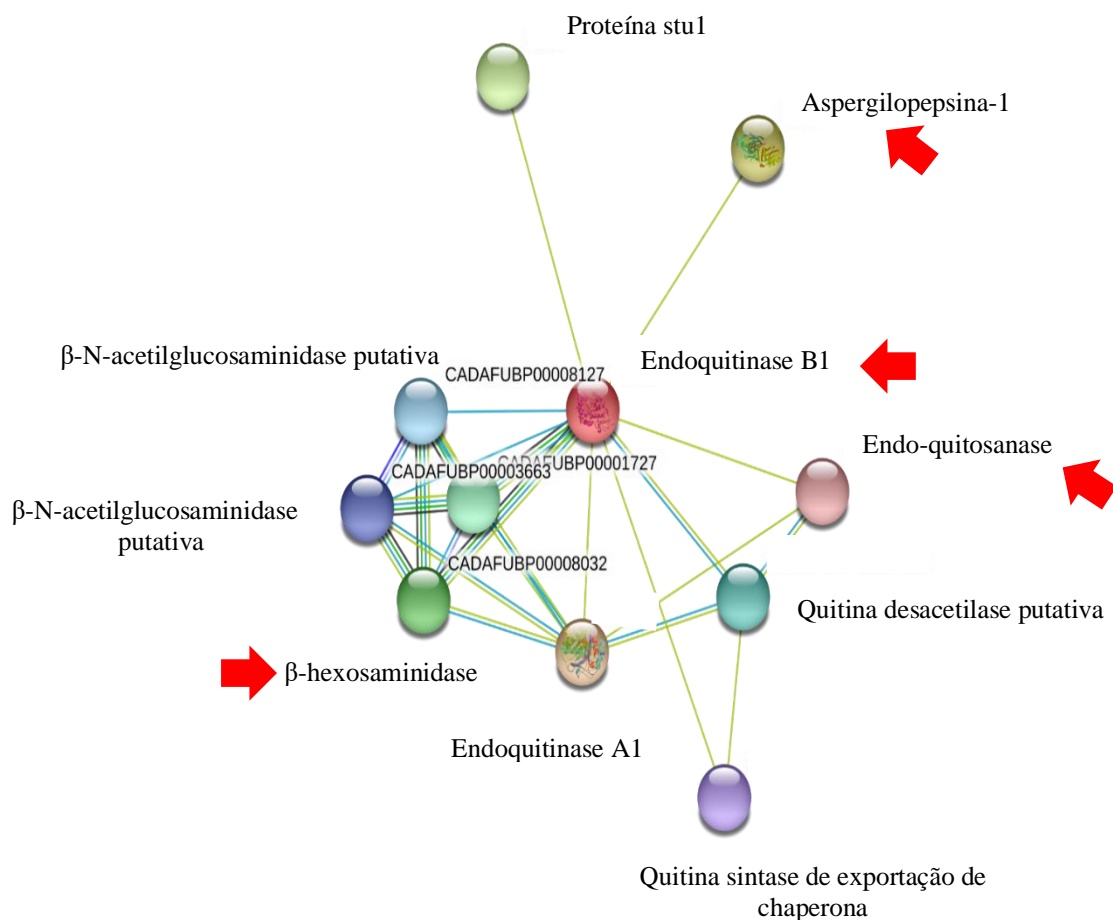


Figura 28. Rede de interação da proteína endoquitinase B1 com as proteínas endo-quitosanase, beta-hexosaminidase e aspergiloepsina -1 identificadas neste trabalho.

Portanto, a partir deste estudo, verificou-se uma variedade de proteínas expressas por *Aspergillus fumigatus* durante o seu crescimento, como estavam relacionadas entre si e ainda, que estas apresentavam diferenças significativas quando analisados o biofilme e o secretoma nas diferentes temperaturas. Vale ressaltar também que foram encontradas proteínas associadas a patogenicidade, nesse caso principalmente os alérgenos, os quais estavam presentes em sua maioria no biofilme. O que é interessante visto a função dessas comunidades microbianas na interação patógeno-hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, foi possível observar que entre os cinco meios estudados, os meios BHI e meio mínimo não se mostraram adequados para a produção de biofilme pelas cepas de *Aspergillus fumigatus* estudadas. Entretanto, os meios CZ, sabouraud (SAB) e RPMI 1640 se destacaram positivamente no ensaio qualitativo de formação dessas comunidades microbianas em todas as condições empregadas.

Na análise quantitativa, os meios SAB e RPMI 1640 não apresentaram uma curva de crescimento no decorrer do tempo, se mantendo constante, diferentemente do meio CZ que mostrou um aumento na formação de biofilme em todas as cepas estudadas. Logo, verifica-se que fatores como o tempo e temperatura podem influenciar diretamente nessa produção. De modo que, mediante os dados gerados qualitativamente e quantitativamente, a melhor condição para o estudo proteômico da produção do biofilme e do secretoma foi usando a cepa *A. fumigatus* ATCC 46640, a 28 °C, no meio de cultivo CZ, com 36 horas de crescimento.

Na análise por microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *Aspergillus fumigatus* nas temperaturas de 28°C e 37°C, foram observadas estruturas características da matriz extracelular; visto que na temperatura a 28 °C havia a presença de estruturas compactas e uma maior quantidade de conídios em germinação, e a 37 °C houve uma maior quantidade de matriz extracelular ao longo de todo o comprimento das hifas fúngicas.

Quanto ao rendimento da extração proteica de cada condição, na temperatura de 28°C o biofilme apresentou um melhor resultado quando comparado com o secretoma. Em contrapartida, na temperatura a 37°C o secretoma se destacou. Já no gel de eletroforese unidimensional, foram observadas bandas distintas com massa molecular de 10 KDa no biofilme a 28°C e bandas de 20 e 37 KDa na temperatura de 37°C. No secretoma, verificou-se bandas diferenciais apenas na temperatura de 37°C com aproximadamente 37 KDa; e ainda, para ambas as condições, houve a presença de uma banda a ~50 KDa.

Na análise por proteômica *shotgun* com os dados obtidos, foi possível observar que apesar da cepa estudada (*Aspergillus fumigatus* ATCC 46640) não estar se desenvolvendo em um modelo de infecção diretamente, grande parte de suas proteínas identificadas tanto no biofilme quanto no secretoma estavam relacionadas com algum mecanismo utilizado por esta espécie para adaptação e evasão no ambiente hospedeiro de acordo com a literatura (*e.g.* os alérgenos). De forma que, boa parte dessas proteínas já estão sendo estudadas como alvos para terapia ou diagnóstico das doenças dentro do espectro de infecções causadas por *Aspergillus fumigatus*.

Portanto, o presente trabalho forneceu informações complementares sobre a caracterização do perfil proteico do secretoma e da formação de biofilme por uma cepa de *Aspergillus fumigatus*, em especial de proteínas relacionadas a possíveis interações patogênicas entre o fungo e o hospedeiro humano, as quais podem servir de alicerce para futuros estudos em modelos de infecção *in vitro* e/ou *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 27: 155–182.
- Agarwal R, Aggarwal AN, Garg M, Saikia B, Chakrabarti A 2014. Cut-off values of serum IgE (total and *A. fumigatus* -specific) and eosinophil count in differentiating allergic bronchopulmonary aspergillosis from asthma. *Mycoses* 57: 659–663.
- Agarwal R, Aggarwal AN, Sehgal IS, Dhooria S, Behera D, Chakrabarti A 2015. Performance of serum galactomannan in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycoses* 58: 408–412.
- Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, Moss R, Denning DW, ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 43: 850–873.
- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latgé J-P 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460: 1117–1121.
- Alshareef F, Robson GD 2014. Genetic and virulence variation in an environmental population of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 160: 742–751.
- Alves GSB, Freire AKL, Bentes A dos S, Pinheiro JF de S, Souza JVB de, Wanke B, Matsuura T, Jackisch-Matsuura AB 2016. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. *Mycoses* 59: 509–515.
- Ameen M 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin. Dermatol.* 28: 197–201.
- Amorim AL de, Lima AVM de, Rosário AC de A do, Souza ÉT dos S, Ferreira JV, Hagemelin LI da S 2018. Molecular modeling of inhibitors against fructose bisphosphate aldolase from *Candida albicans*. *Silico Pharmacol.* 6: 2.

- Aquino PF de 2012. Prospecção de candidatos a biomarcadores oncológicos de cânceres gástricos por espectrometria de massas. MANAUS/UFAM
- Aquino PF de 2015. Avaliação proteômica da margem de ressecção de pacientes com câncer gástrico por espectrometria de massas. RJ/UFRJ
- Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD 2014. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol.* 22: 120–127.
- Arruda LK, Platts-Mills TA, Fox JW, Chapman MD 1990. *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J. Exp. Med.* 172: 1529–1532.
- Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Riemenschneider B, Monod M, Reichard U 2006. Proteome of Conidial Surface Associated Proteins of *Aspergillus fumigatus* Reflecting Potential Vaccine Candidates and Allergens. *J. Proteome Res.* 5: 954–962.
- Askew DS 2008. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 331–337.
- Azevedo JL de, Costa SOP da 1973. *Exercícios práticos de genética: para cursos de graduação e pós-graduação.* São paulo.
- Banerjee B, Greenberger PA, Fink JN, Kurup VP 1998. Immunological Characterization of Asp f 2, a Major Allergen from *Aspergillus fumigatus* Associated with Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Infect. Immun.* 66: 5175–5182.
- Banerjee B, Kurup VP 1998. Molecular biology of *Aspergillus* allergens. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 18: 601–618.
- Banerjee B, Kurup VP 2003. Molecular biology of *Aspergillus* allergens. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8: s128-39.
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 1017–1031.

- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT de, Tajara EH 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev. Assoc. Médica Bras.* 58: 366–375.
- Barnes PD, Marr KA 2006. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 20: 545–561, vi.
- Barroncas JF 2013. Proteases e quitinases de fungos anamórficos de insetos da Amazônia com uso potencial em biocontrole.
- Bauermeister A, Rezende MI, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa A de M 2010. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. 31: 12.
- Bayry J, Aïmanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé J-P 2012. Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLOS Pathog.* 8: e1002700.
- Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, Paris S, Mallet A, Prévost M-C, Latgé JP 2007. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* 9: 1588–1600.
- Ben-Ami R, Kontoyiannis DP 2009. Pathogenesis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. In: Comarú Pasqualotto A (Ed.), *Aspergillosis Diagn. Prev.*, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 345–379.
- Bhabhra R, Miley MD, Mylonakis E, Boettner D, Fortwendel J, Panepinto JC, Postow M, Rhodes JC, Askew DS 2004. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect. Immun.* 72: 4731–4740.
- Borghi E, Borgo F, Morace G 2016. Fungal Biofilms: Update on Resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 931: 37–47.
- Brakhage AA, Bruns S, Thywissen A, Zipfel PF, Behnsen J 2010. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 409–415.
- Brandão I de SL, Oliveira-Moraes HM da S, Motta CM de S, Oliveira NT de, Magalhães OMC, Brandão I de SL, Oliveira-Moraes HM da S, Motta CM de S, Oliveira NT de, Magalhães

- OMC 2018. Elastin increases biofilm and extracellular matrix production of *Aspergillus fumigatus*. *Braz. J. Microbiol.* 49: 675–682.
- Briard B, Mislin GLA, Latgé J-P, Beauvais A 2019. Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Pulmonary Bacteria: Current State of the Field, New Data, and Future Perspective. *J. Fungi* 5.
- Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC 2012a. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4: 165rv13.
- Brown GD, Denning DW, Levitz SM 2012b. Tackling human fungal infections. *Science* 336: 647.
- Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimanianda V, Nietzsche S, Thywißen A, Jeron A, Latgé J-P, Brakhage AA, Gunzer M 2010a. 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.* 6: e1000873.
- Bruns S, Seidler M, Albrecht D, Salvenmoser S, Remme N, Hertweck C, Brakhage AA, Kniemeyer O, Müller F-MC 2010b. Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin gliotoxin. *Proteomics* 10: 3097–3107.
- Bui D-C, Lee Y, Lim JY, Fu M, Kim J-C, Choi GJ, Son H, Lee Y-W 2016. Heat shock protein 90 is required for sexual and asexual development, virulence, and heat shock response in *Fusarium graminearum*. *Sci. Rep.* 6: 28154.
- Cadena J, Thompson GR, Patterson TF 2016. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30: 125–142.
- Cai Z, Chai Y, Zhang C, Feng R, Sang H, Lu L 2016. Molecular Characterization of G β -Like Protein CpcB Involved in Antifungal Drug Susceptibility and Virulence in *A. fumigatus*. *Front. Microbiol.* 7.
- Cantú MD, Carrilho E, Wulff NA, Palma MS 2008. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quím. Nova* 31: 669–675.

- Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, Moresco JJ, Yates Iii JR, Barbosa VC 2016. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* 11: 102–117.
- Chabane S, Sarfati J, Ibrahim-Granet O, Du C, Schmidt C, Mouyna I, Prevost M-C, Calderone R, Latgé J-P 2006. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Ecm33p Influences Conidial Cell Wall Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3259–3267.
- Champer J, Ito JI, Clemons KV, Stevens DA, Kalkum M 2016. Proteomic Analysis of Pathogenic Fungi Reveals Highly Expressed Conserved Cell Wall Proteins. *J. Fungi* 2.
- Chang P-K, Scharfenstein LL, Mack B, Wei Q, Gilbert M, Lebar M, Cary JW 2019. Identification of a copper-transporting ATPase involved in biosynthesis of *A. flavus* conidial pigment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Chaves E, Weber S, Bão S, Pereira L, Bailão A, Borges C, Soares C 2015. Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC Microbiol.* 15: 53.
- Cowen LE 2013. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 16: 377–384.
- Cowen LE, Lindquist S 2005. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309: 2185–2189.
- Croze ML, Soulage CO 2013. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie* 95: 1811–1827.
- Damaso JCG 2017. Sequenciamento De Novo de Peptídeos Utilizando Grafos para Espectros de Massa Multiplex.
- Denning DW, Cadranet J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, Ullmann AJ, Dimopoulos G, Lange C, European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* 47: 45–68.

- Dever TE, Green R 2012. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4: a013706.
- Dewi IMW, Veerdonk FL van de, Gresnigt MS 2017. The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi* 3.
- Dhooria S, Agarwal R 2014. Diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a case-based approach. *Future Microbiol.* 9: 1195–1208.
- Di Chiacchio N, Madeira CL, Humaire CR, Silva CS, Fernandes LHG, Dos Reis AL 2014. Superficial mycoses at the Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo between 2005 and 2011. *An. Bras. Dermatol.* 89: 67–71.
- Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Ramírez ON, Córdoba S, Refojo N, Arenas R, Delhaes L, Reyes-Montes M del R 2009. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 427–433.
- Elias JE, Gygi SP 2010. Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 604: 55–71.
- Eliuk S, Makarov A 2015. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 8: 61–80.
- Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR 2013. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* 13: 22–24.
- Flemming H-C, Wingender J 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623–633.
- Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, Vorgias CE, Diaquin M, Latgé JP 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* 275: 27594–27607.
- Fujii I, Yasuoka Y, Tsai H-F, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Ebizuka Y 2004. Hydrolytic Polyketide Shortening by Aylg1p, a Novel Enzyme Involved in Fungal Melanin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279: 44613–44620.

- Funk J, Schaarschmidt B, Slesiona S, Hallström T, Horn U, Brock M 2016. The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 306: 59–68.
- Gastebois A, Fontaine T, Latgé J-P, Mouyna I 2010. β -(1-3)-Glucanoyltransferase Gel4p Is Essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 9: 1294–1298.
- Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 6940–6945.
- Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC, Association With The LIFE Program 2016. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* 59: 145–150.
- Gibbons JG, Rokas A 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol.* 21: 14–22.
- Gil-Bona A, Reales-Calderon JA, Parra-Giraldo CM, Martinez-Lopez R, Monteoliva L, Gil C 2016. The Cell Wall Protein Ecm33 of *Candida albicans* is Involved in Chronological Life Span, Morphogenesis, Cell Wall Regeneration, Stress Tolerance, and Host–Cell Interaction. *Front. Microbiol.* 7.
- Gillet LC, Leitner A, Aebersold R 2016. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* 9: 449–472.
- Giraldo MA 2011. Purificação e caracterização bioquímica da invertase extracelular produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus*: UNESP. 106 f.
- Glaser AG, Kirsch AI, Zeller S, Menz G, Rhyner C, Cramer R 2009. Molecular and immunological characterization of Asp f 34, a novel major cell wall allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Allergy* 64: 1144–1151.
- Godet C, Philippe B, Laurent F, Cadranel J 2014. Chronic pulmonary aspergillosis: an update on diagnosis and treatment. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 88: 162–174.

- González-Ramírez AI, Ramírez-Granillo A, Medina-Canales MG, Rodríguez-Tovar AV, Martínez-Rivera MA 2016. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC Microbiol.* 16: 243.
- Goswami P, Chinnadayala SSR, Chakraborty M, Kumar AK, Kakoti A 2013. An overview on alcohol oxidases and their potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4259–4275.
- Graham C, McMullan G, Graham RLJ 2011. Proteomics in the microbial sciences. *Bioeng. Bugs* 2: 17–30.
- Grahl N, Puttikamonkul S, Macdonald JM, Gamcsik MP, Ngo LY, Hohl TM, Cramer RA 2011. In vivo Hypoxia and a Fungal Alcohol Dehydrogenase Influence the Pathogenesis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *PLOS Pathog.* 7: e1002145.
- Greenberger PA, Bush RK, Demain JG, Luong A, Slavin RG, Knutsen AP 2014. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2: 703–708.
- Guinea J 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 Suppl 6: 5–10.
- Gushulak L, Hemming R, Martin D, Seyrantepe V, Pshezhetsky A, Triggs-Raine B 2012. Hyaluronidase 1 and β -Hexosaminidase Have Redundant Functions in Hyaluronan and Chondroitin Sulfate Degradation. *J. Biol. Chem.* 287: 16689–16697.
- Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T, Kamei K 2017. Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and trypanidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus* (O Kniemeyer, Ed.). *PLOS ONE* 12: e0177050.
- Hameş EE, Demir T 2015. Microbial ribonucleases (RNases): production and application potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 1853–1862.
- Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth V 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 533–543.

- Hazra A, Dasgupta N, Sengupta C, Das S 2019. MIPS: Functional dynamics in evolutionary pathways of plant kingdom. *Genomics*.
- Heilmann CJ, Soghoian AG, Siliakus AR, Dekker HL, Brul S, Koster CG de, Koning LJ de, Klis FM 2011. Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile. *Microbiology* 157: 2297–2307.
- Heinekamp T, Schmidt H, Lapp K, Pätz V, Shopova I, Köster-Eiserfunke N, Krüger T, Kniemeyer O, Brakhage AA 2015. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. *Semin. Immunopathol.* 37: 141–152.
- Hillmann F, Bagramyan K, Straßburger M, Heinekamp T, Hong TB, Bzymek KP, Williams JC, Brakhage AA, Kalkum M 2016. The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* 6: 33396.
- Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 649–669.
- Hohl TM, Feldmesser M 2007. *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Eukaryot. Cell* 6: 1953–1963.
- Janahi IA, Rehman A, Al-Naimi AR 2017. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Ann. Thorac. Med.* 12: 74–82.
- Kamai Y, Chiang LY, Lopes Bezerra LM, Doedt T, Lossinsky AS, Sheppard DC, Filler SG 2006. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with vascular endothelial cells. *Med. Mycol.* 44 Suppl 1: S115-117.
- Kaur S, Singh S 2014. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 52: 2–9.
- Kniemeyer O 2011. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *PROTEOMICS* 11: 3232–3243.
- Knutsen AP 2015. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin. Exp. Allergy* 45: 298–299.

- Knutsen AP 2017. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13: 11–14.
- Kolattukudy PE, Lee JD, Rogers LM, Zimmerman P, Ceselski S, Fox B, Stein B, Copelan EA 1993. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect. Immun.* 61: 2357–2368.
- Kosmidis C, Denning DW 2015. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 70: 270–277.
- Krolicka M, Hinz SWA, Koetsier MJ, Joosten R, Eggink G, Broek LAM van den, Boeriu CG 2018. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a Thermostable Enzyme for Chitin and Chitosan Depolymerization. *J. Agric. Food Chem.* 66: 1658–1669.
- Kubitschek-Barreira PH, Curty N, Neves GWP, Gil C, Lopes-Bezerra LM 2013. Differential proteomic analysis of *Aspergillus fumigatus* morphotypes reveals putative drug targets. *J. Proteomics* 78: 522–534.
- Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, Yamashita N, Nishimura A, Nakai S, Gomi K, Hanamoto H 2003. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* 555: 516–520.
- Kumar A, Ahmed R, Singh PK, Shukla PK 2011. Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. *J. Proteomics* 74: 1104–1112.
- Kumar A, Reddy LV, Sochanik A, Kurup VP 1993. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 1024–1030.
- Kurup VP 2003. Fungal allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 416.
- Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge J-P 2010. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 75: 910–923.

- Lamoth F, Juvvadi PR, Fortwendel JR, Steinbach WJ 2012. Heat Shock Protein 90 Is Required for Conidiation and Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 11: 1324–1332.
- Lamoth F, Juvvadi PR, Soderblom EJ, Moseley MA, Asfaw YG, Steinbach WJ 2014. Identification of a key lysine residue in heat shock protein 90 required for azole and echinocandin resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 1889–1896.
- Lamoth F, Juvvadi PR, Steinbach WJ 2016. Heat shock protein 90 (Hsp90): A novel antifungal target against *Aspergillus fumigatus*. *Crit. Rev. Microbiol.* 42: 310–321.
- Latgé JP 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 310–350.
- Latgé J-P 2003. *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist* 17: 56–61.
- Leal JC 2019. Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313). FIOCRUZ/ILMD
- Loussert C, Schmitt C, Prevost M-C, Balloy V, Fadel E, Philippe B, Kauffmann-Lacroix C, Latgé JP, Beauvais A 2010. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* 12: 405–410.
- Lovero G, De Giglio O, Montagna O, Diella G, Divenuto F, Lopuzzo M, Rutigliano S, Laforgia N, Caggiano G, Montagna MT 2016. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem. *Ann. Ig. Med. Prev. E Comunita* 28: 282–287.
- Low SY, Dannemiller K, Yao M, Yamamoto N, Peccia J 2011. The Allergenicity of *Aspergillus fumigatus* conidia is influenced by growth temperature. *Fungal Biol.* 115.
- Luhtala N, Parker R 2010. T2 Family Ribonucleases: Ancient enzymes with diverse roles. *Trends Biochem. Sci.* 35: 253–259.
- Marques SC, Rezende J das GOS, Alves LA de F, Silva BC, Alves E, Abreu LR de, Piccoli RH 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass

surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 38: 538–543.

Maturu VN, Agarwal R 2015. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Allergy* 45: 1765–1778.

Mayer C, Appenzeller U, Seelbach H, Achatz G, Oberkofler H, Breitenbach M, Blaser K, Cramer R 1999. Humoral and Cell-mediated Autoimmune Reactions to Human Acidic Ribosomal P2 Protein in Individuals Sensitized to *Aspergillus fumigatus* P2 Protein. *J. Exp. Med.* 189: 1507–1512.

McCotter SW, Horianopoulos LC, Kronstad JW 2016. Regulation of the fungal secretome. *Curr. Genet.* 62: 533–545.

Medhe S 2018. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 3: 51–58.

Medzihradzky KF, Chalkley RJ 2015. Lessons in *de novo peptide sequencing* by tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 34: 43–63.

Melin P, Schnürer J, Wagner EGH 2003. Characterization of phiA, a gene essential for phialide development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol. FG B* 40: 234–241.

Mellado E, Dubreucq G, Mol P, Sarfati J, Paris S, Diaquin M, Holden DW, Rodriguez-Tudela JL, Latgé JP 2003. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG-/chsE*) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol. FG B* 38: 98–109.

Mendoza-Martínez AE, Lara-Rojas F, Sánchez O, Aguirre J 2017. NapA Mediates a Redox Regulation of the Antioxidant Response, Carbon Utilization and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* 8.

Miranda-Ozuna JFT, Hernández-García MS, Brieba LG, Benítez-Cardoza CG, Ortega-López J, González-Robles A, Arroyo R 2016. The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* Is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose That Functions as a Laminin- and Fibronectin-Binding Protein. *Infect. Immun.* 84: 2878–2894.

- Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR 2015. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 4092–4097.
- Mora-Montes HM, Robledo-Ortiz CI, González-Sánchez LC, López-Esparza A, López-Romero E, Flores-Carreón A 2010. Purification and biochemical characterisation of endoplasmic reticulum α 1,2-mannosidase from *Sporothrix schenckii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 79–85.
- Mouyna I, Hartl L, Latgé J-P 2013. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* 4.
- Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G 2007. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 56: 1205–1212.
- Mowat E, Lang S, Williams C, McCulloch E, Jones B, Ramage G 2008. Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 1281–1284.
- Muszkietka L, Beauvais A, Pätz V, Gibbons JG, Anton Leberre V, Beau R, Shibuya K, Rokas A, Francois JM, Kniemeyer O, Brakhage AA, Latge JP 2013. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various “omics” approaches. *Front. Microbiol.* 4.
- Nakamura Y, Arai A, Takebe Y, Masuda M 2011. A chemical compound for controlled expression of nmt1-driven gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Anal. Biochem.* 412: 159–164.
- Namvar S, Warn P, Farnell E, Bromley M, Fraczek M, Bowyer P, Herrick S 2015. *Aspergillus fumigatus* proteases, Asp f 5 and Asp f 13, are essential for airway inflammation and remodelling in a murine inhalation model. *Clin. Exp. Allergy* 45: 982–993.
- Nisa Z, Chen C, Yu Y, Chen C, Mallano AI, Xiang-bo D, Xiao-li S, Yan-ming Z 2016. Constitutive Overexpression of Myo-inositol-1-Phosphate Synthase Gene (GsMIPS2) from Glycine soja Confers Enhanced Salt Tolerance at Various Growth Stages in Arabidopsis. *J. Northeast Agric. Univ. Engl. Ed.* 23: 28–44.

- Odeniyi OA, Onilude AA, Ayodele MA 2012. Characteristics of a β -1,4-D endoglucanase from *Trichoderma virens* wholly applied in a palm-fruit husk-based diet for poultry layers. *Braz. J. Microbiol.* 43: 1467–1475.
- Olivares M 2016. Study of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity and identification of putative virulence genes
- Oliveira IM de 2013. Nitroreductases: um estudo das possíveis funções na resposta ao estresse oxidativo.
- Oliveira I, Bonatto D, Antonio J, Henriques JA 2010a. Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 2.
- Oliveira MMM de, Brugnetra DF, Piccoli RH 2010b. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz Impresso* 69: 277–284.
- Oliveira M, Caramalho R 2014. *Aspergillus fumigatus*: a mere bioaerosol or a powerful biohazard? *Nova Acta Científica Compostel. Biología* 21.
- Oliveira LA, Fernandes OCC, Jesus MA, Bentes JLS, Andrade SL, Souza AQL, Santos C 2016. *Diversidade Microbiana da Amazônia*. L.A. Oliveira, Manaus.
- Olombrada M, Lázaro-Gorines R, López-Rodríguez JC, Martínez-del-Pozo Á, Oñaderra M, Maestro-López M, Lacadena J, Gavilanes JG, García-Ortega L 2017. Fungal Ribotoxins: A Review of Potential Biotechnological Applications. *Toxins* 9: 71.
- Orlean P, Funai D 2019. Priming and elongation of chitin chains: Implications for chitin synthase mechanism. *Cell Surf.* 5: 100017.
- O’Toole GA 2003. To Build a Biofilm. *J. Bacteriol.* 185: 2687–2689.
- Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G 2014. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Mol. Basel Switz.* 19: 1085–1119.

- Parente-Rocha JA, Bailão AM, Amaral AC, Taborda CP, Pაცეც JD, Borges CL, Pereira M 2017. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. *Mediators Inflamm.* 2017.
- Paris S, Debeauvais J-P, Cramer R, Carey M, Charlès F, Prévost MC, Schmitt C, Philippe B, Latgé JP 2003. Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1581–1588.
- Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, Silva JLM da, Felipe MSS, Santana JM de, Mendes-Giannini MJS, Almeida Soares CM de 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res.* 7: 1381–1388.
- Pérez A, Ramage G, Blanes R, Murgui A, Casanova M, Martínez JP 2011. Some biological features of *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins containing the CFEM domain. *FEMS Yeast Res.* 11: 273–284.
- Perez-Cuesta U, Aparicio-Fernandez L, Guruceaga X, Martin-Souto L, Abad-Diaz-de-Cerio A, Antoran A, Buldain I, Hernando FL, Ramirez-Garcia A, Rementeria A 2019. Melanin and pyomelanin in *Aspergillus fumigatus*: from its genetics to host interaction. *Int. Microbiol.*
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR 2006. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. *Clin. Infect. Dis.* 43: S3–S14.
- Picard D 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59: 1640–1648.
- Pickl M, Fuchs M, Glueck SM, Faber K 2015. The substrate tolerance of alcohol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 6617–6642.
- Pomés A, Chapman MD, Wünschmann S 2016. Indoor Allergens and Allergic Respiratory Disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16: 43.
- Raffa N, Osherov N, Keller NP 2019. Copper Utilization, Regulation, and Acquisition by *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1980.

- Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, Lappin DF, Jones B, Lang S, Majithiya JB, Warn P, Williams C, Ramage G 2011. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 2092–2097.
- Ramírez Granillo A, Canales MGM, Espíndola MES, Martínez Rivera MA, Lucio VMB de, Tovar AVR 2015. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol.* 15.
- Ramirez-Garcia A, Pellon A, Buldain I, Antoran A, Arbizu-Delgado A, Guruceaga X, Rementeria A, Hernando FL 2018. Proteomics as a Tool to Identify New Targets Against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the Context of Cystic Fibrosis. *Mycopathologia* 183: 273–289.
- Ramli NSK, Guan CE, Nathan S, Vadivelu J 2012. The Effect of Environmental Conditions on Biofilm Formation of *Burkholderia pseudomallei* Clinical Isolates. *PLOS ONE* 7: e44104.
- Reichard U, Cole GT, Hill TW, Rüchel R, Monod M 2000. Molecular characterization and influence on fungal development of ALP2, a novel serine proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 290: 549–558.
- Reichhardt C, Ferreira JAG, Joubert L-M, Clemons KV, Stevens DA, Cegelski L 2015. Analysis of the *Aspergillus fumigatus* Biofilm Extracellular Matrix by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Eukaryot. Cell* 14: 1064–1072.
- Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol.* 22: 1–23.
- Rody HVS, Oliveira LO de 2018. Evolutionary history of the cobalamin-independent methionine synthase, gene family across the land plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 120: 33–42.

- Romano J, Nimrod G, Ben-Tal N, Shadkchan Y, Baruch K, Sharon H, Osherov N 2006. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. *Microbiology* 152: 1919–1928.
- Roux A, Gonzalez F, Roux M, Mehrad M, Menotti J, Zahar J-R, Tadros V-X, Azoulay E, Brillet P-Y, Vincent F, Groupe de recherche respiratoire en réanimation en onco-hématologie (Grrr-OH) 2014. Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med. Mal. Infect.* 44: 185–198.
- Rovenich H, Boshoven JC, Thomma BP 2014. Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20: 96–103.
- Rustiguel CB, Jorge JA, Guimarães LHS 2015. Characterization of a thermo-tolerant mycelial β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4: 362–369.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Santi L, Beys-da-Silva WO, Berger M, Calzolari D, Guimarães JA, Moresco JJ, Yates JR 2014. Proteomic Profile of *Cryptococcus neoformans* Biofilm Reveals Changes in Metabolic Processes. *J. Proteome Res.* 13: 1545–1559.
- Sapmak A, Boyce KJ, Andrianopoulos A, Vanittanakom N 2015. The pbrB Gene Encodes a Laccase Required for DHN-Melanin Synthesis in Conidia of *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffeii*. *PLOS ONE* 10: e0122728.
- Sardi JDCO, Pitangui NDS, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS 2014. Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev. Iberoam. Micol.* 31: 22–29.
- Schmiedel Y, Zimmerli S 2016. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Med. Wkly.* 146: w14281.
- Schweer KE, Bangard C, Hekmat K, Cornely OA 2014. Chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 57: 257–270.

- Schwienbacher M, Israel L, Heesemann J, Ebel F 2005a. Asp f6, an *Aspergillus* allergen specifically recognized by IgE from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis is differentially expressed during germination. *Allergy* 60: 1430–1435.
- Schwienbacher M, Weig M, Thies S, Regula JT, Heesemann J, Ebel F 2005b. Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions. *Med. Mycol.* 43: 623–630.
- Segal BH, Walsh TJ 2006. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173: 707–717.
- Seidler M, Salvenmoser S, Müller F-MC 2006. In vitro effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28: 568–573.
- Seidler MJ, Salvenmoser S, Muller F-MC 2008. *Aspergillus fumigatus* Forms Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility on Bronchial Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4130–4136.
- Shen H-D, Lin W-L, Tam MF, Chou H, Wang C-W, Tsai J-J, Wang S-R, Han S-H 2001. Identification of vacuolar serine proteinase as a major allergen of *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clin. Exp. Allergy* 31: 295–302.
- Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1244–1248.
- Shuford CM, Muddiman DC 2013. Absolute Quantification of Proteins by Mass Spectrometry. In: *Encycl. Anal. Chem.*, American Cancer Society, pp. 1–26.
- Siepen JA, Keevil E-J, Knight D, Hubbard SJ 2007. Prediction of missed cleavage sites in tryptic peptides aids protein identification in proteomics. *J. Proteome Res.* 6: 399–408.
- Silva-Rocha WP, Azevedo MF de, Chaves GM 2017. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J. Mycol. Medicale* 27: 57–64.

- Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M 2008. The Spectrum of Fungal Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145: 58–86.
- Smith K, Rajendran R, Kerr S, Lappin DF, Mackay WG, Williams C, Ramage G 2015. *Aspergillus fumigatus* enhances elastase production in *Pseudomonas aeruginosa* co-cultures. *Med. Mycol.* 53: 645–655.
- Stuehler C, Khanna N, Bozza S, Zelante T, Moretti S, Kruhm M, Lurati S, Conrad B, Worschech E, Stevanović S, Krappmann S, Einsele H, Latgé J-P, Loeffler J, Romani L, Topp MS 2011. Cross-protective TH1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Blood* 117: 5881–5891.
- Sugareva V, Härtl A, Brock M, Hübner K, Rohde M, Heinekamp T, Brakhage AA 2006. Characterisation of the laccase-encoding gene *abr2* of the dihydroxynaphthalene-like melanin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *Arch. Microbiol.* 186: 345–355.
- Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé J-P, Steinbach WJ 2014. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5: a019786.
- Suh M-J, Fedorova ND, Cagas SE, Hastings S, Fleischmann RD, Peterson SN, Perlin DS, Nierman WC, Pieper R, Momany M 2012. Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. *Proteome Sci.* 10: 30.
- Szalewski DA, Hinrichs VS, Zinniel DK, Barletta RG 2018. The pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*, drug resistance, and nanoparticle delivery. *Can. J. Microbiol.* 64: 439–453.
- Thakur R, Shankar J 2016. In silico Identification of Potential Peptides or Allergen Shot Candidates Against *Aspergillus fumigatus*. *BioResearch Open Access* 5: 330–341.
- Thomas DP, Bachmann SP, Lopez-Ribot JL 2006. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics* 6: 5795–5804.
- Thompson CE, Freitas LB, Salzano FM, Thompson CE, Freitas LB, Salzano FM 2018. Molecular evolution and functional divergence of alcohol dehydrogenases in animals, fungi and plants. *Genet. Mol. Biol.* 41: 341–354.

- Tiwari S, Thakur R, Shankar J 2015. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnol. Res. Int.*
- Tracy MC, Okorie CUA, Foley EA, Moss RB 2016. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *J. Fungi* 2: 17.
- Tsai H-F, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Chung KJ 1998. The Developmentally Regulated alb1 Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. *J. Bacteriol.* 180: 3031–3038.
- Tsai H-F, Fujii I, Watanabe A, Wheeler MH, Chang YC, Yasuoka Y, Ebizuka Y, Kwon-Chung KJ 2001. Pentaketide Melanin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* Requires Chain-length Shortening of a Heptaketide Precursor. *J. Biol. Chem.* 276: 29292–29298.
- Ubhi DK, Robertus JD 2015. The Cobalamin-Independent Methionine Synthase Enzyme Captured in a Substrate-Induced Closed Conformation. *J. Mol. Biol.* 427: 901–909.
- Upadhyay S, Xu X, Lowry D, Jackson JC, Roberson RW, Lin X 2016. Subcellular Compartmentalization and Trafficking of the Biosynthetic Machinery for Fungal Melanin. *Cell Rep.* 14: 2511–2518.
- Vaknin Y, Shadkchan Y, Levdansky E, Morozov M, Romano J, Osherov N 2014. The three *Aspergillus fumigatus* CFEM-domain GPI-anchored proteins (CfmA-C) affect cell-wall stability but do not play a role in fungal virulence. *Fungal Genet. Biol.* 63: 55–64.
- Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T 2016. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30: 1–11.
- Valsecchi I, Dupres V, Stephen-Victor E, Guijarro JI, Gibbons J, Beau R, Bayry J, Coppee J-Y, Lafont F, Latgé J-P, Beauvais A 2017. Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi* 4.
- Veerdonk FL van de, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé J-P 2017. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 15: 661–674.
- Vila TVM, Rozental S 2016. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. *Fungal Pathog.*

- Vitte J, Ranque S, Carsin A, Gomez C, Romain T, Cassagne C, Gouitaa M, Baravalle-Einaudi M, Bel NS-L, Reynaud-Gaubert M, Dubus J-C, Mège J-L, Gaudart J 2017. Multivariate Analysis as a Support for Diagnostic Flowcharts in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Proof-of-Concept Study. *Front. Immunol.* 8: 1019.
- Vivek-Ananth RP, Mohanraj K, Vandanashree M, Jhingran A, Craig JP, Samal A 2018. Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Sci. Rep.* 8: 6617.
- Wagener J, Echtenacher B, Rohde M, Kotz A, Krappmann S, Heesemann J, Ebel F 2008. The Putative α -1,2-Mannosyltransferase AfMnt1 of the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Is Required for Cell Wall Stability and Full Virulence. *Eukaryot. Cell* 7: 1661–1673.
- Wartenberg D, Lapp K, Jacobsen ID, Dahse H-M, Kniemeyer O, Heinekamp T, Brakhage AA 2011. Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 602–611.
- Watson DS, Feng X, Askew DS, Jambunathan K, Kodukula K, Galande AK 2011. Substrate Specificity Profiling of the *Aspergillus fumigatus* Proteolytic Secretome Reveals Consensus Motifs with Predominance of Ile/Leu and Phe/Tyr. *PLoS ONE* 6.
- Xia G, Jin C, Zhou J, Yang S, Zhang S 2001. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268: 4079–4085.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A 2009. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11: 49–79.
- Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates JR 2013. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* 113: 2343–2394.
- Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L 2014. High-Throughput Proteomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 7: 427–454.
- Zhou H, Hu H, Zhang L, Li R, Ouyang H, Ming J, Jin C 2007. O-Mannosyltransferase 1 in *Aspergillus fumigatus* (AfPmt1p) is crucial for cell wall integrity and conidium morphology, especially at an elevated temperature. *Eukaryot. Cell* 6: 2260–2268.

Zhu W, Smith JW, Huang C-M 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 840518.

Zhu W, Wei W, Wu Y, Zhou Y, Peng F, Zhang S, Chen P, Xu X 2017. BcCFEM1, a CFEM Domain-Containing Protein with Putative GPI-Anchored Site, Is Involved in Pathogenicity, Conidial Production, and Stress Tolerance in *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* 8.

8. APÊNDICE

8.1. Composição dos meios de cultivo utilizados neste trabalho

Czapek concentrado	
NaNO ₃	30 g
KCl	5.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5.0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 g
Água destilada	100 mL

Czapek Dox Ágar	
Czapek concentrado	10.0 mL
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Sacarose	30.0 g
Ágar bacteriológico	17.5 g
Água destilada	1000 mL

Meio mínimo	
Glicina	26 mM
Glicose	30 mM
MgSO ₄	20 mM
KH ₂ PO ₄	58,8 mM
Tiamina	20 mg/mL

Meio BHI	
Peptona	10.0 g
Infusão de coração de vaca	10.0 g
Infusão de cérebro de vitela	7,50 g
Dextrose	2.0 g
Fosfato dissódico	2.5 g
Cloreto de Sódio	5.0 g
Ágar Bacteriológico	15.0 g
Água destilada	1000 mL

Meio Saboraud	
Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL

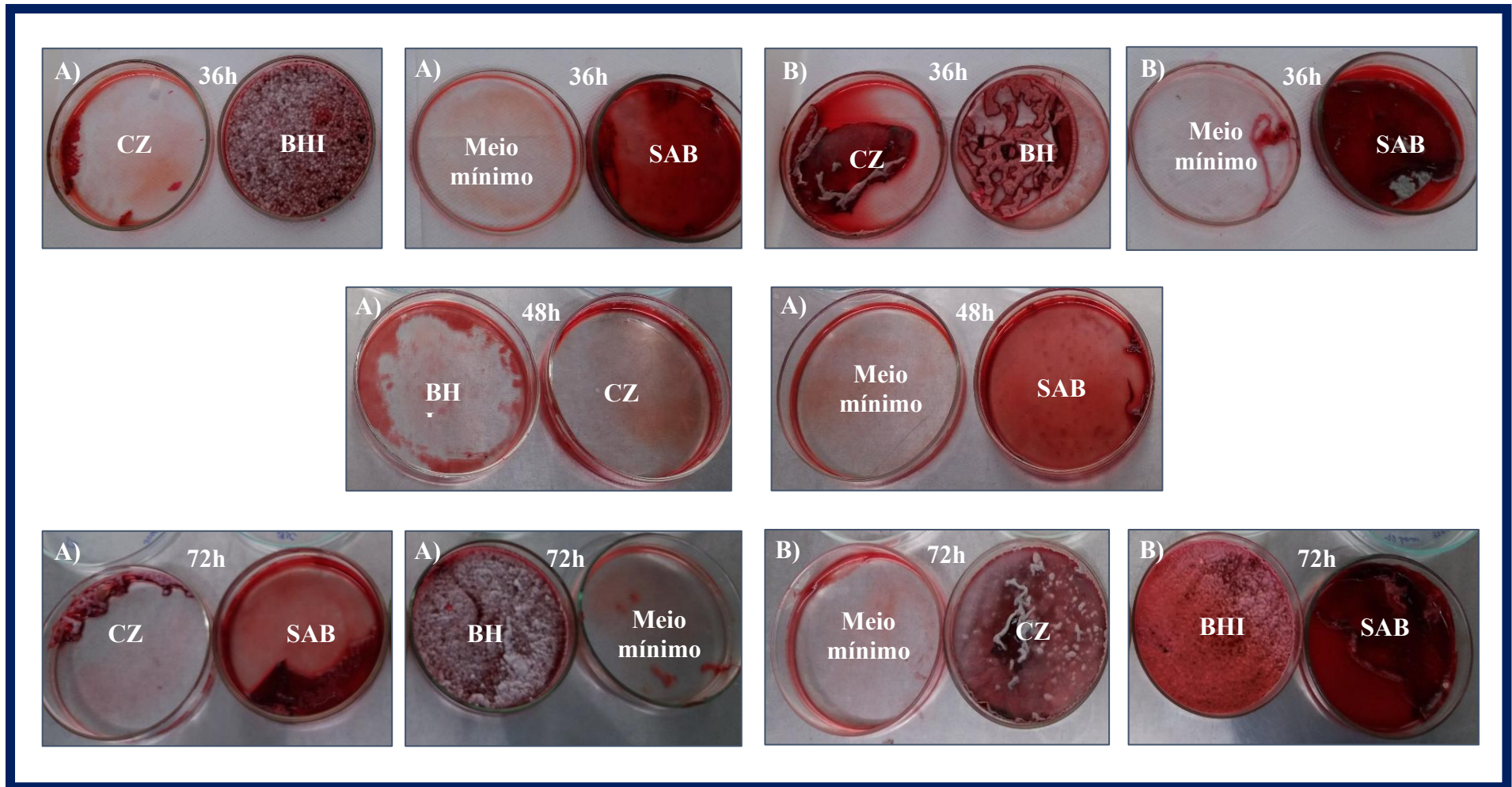
*Observações:

1. Deve-se ajustar o pH final de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C para o meio BHI. Vale ressaltar que o ágar bacteriológico não foi adicionado em nenhum dos meios pois os meios deveriam ser líquidos.

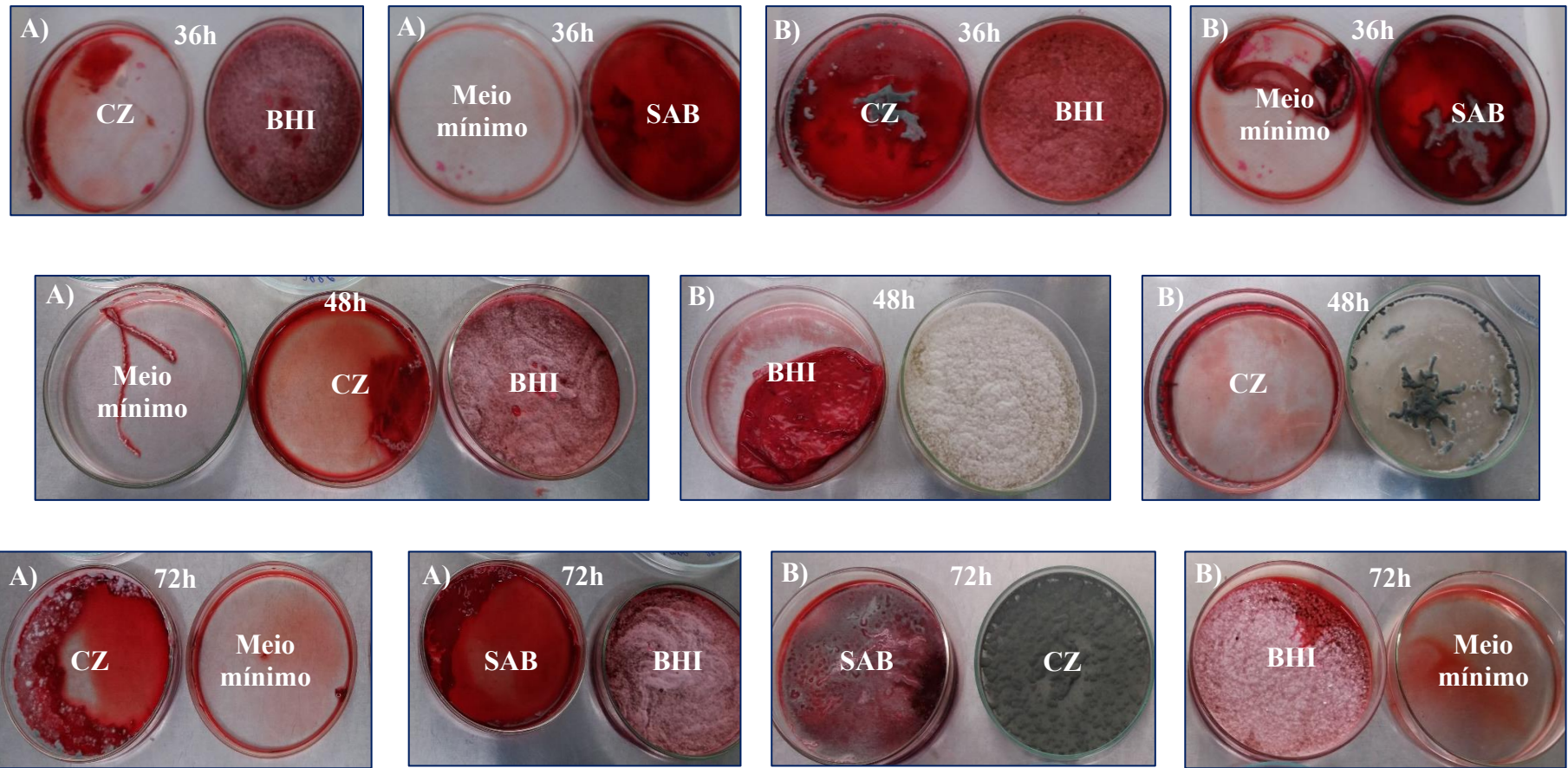
2. A composição do meio RPMI 1640 - código R 8758, está disponível no site de vendas da empresa e pode ser acessada através do link:

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation/r8758for.pdf>

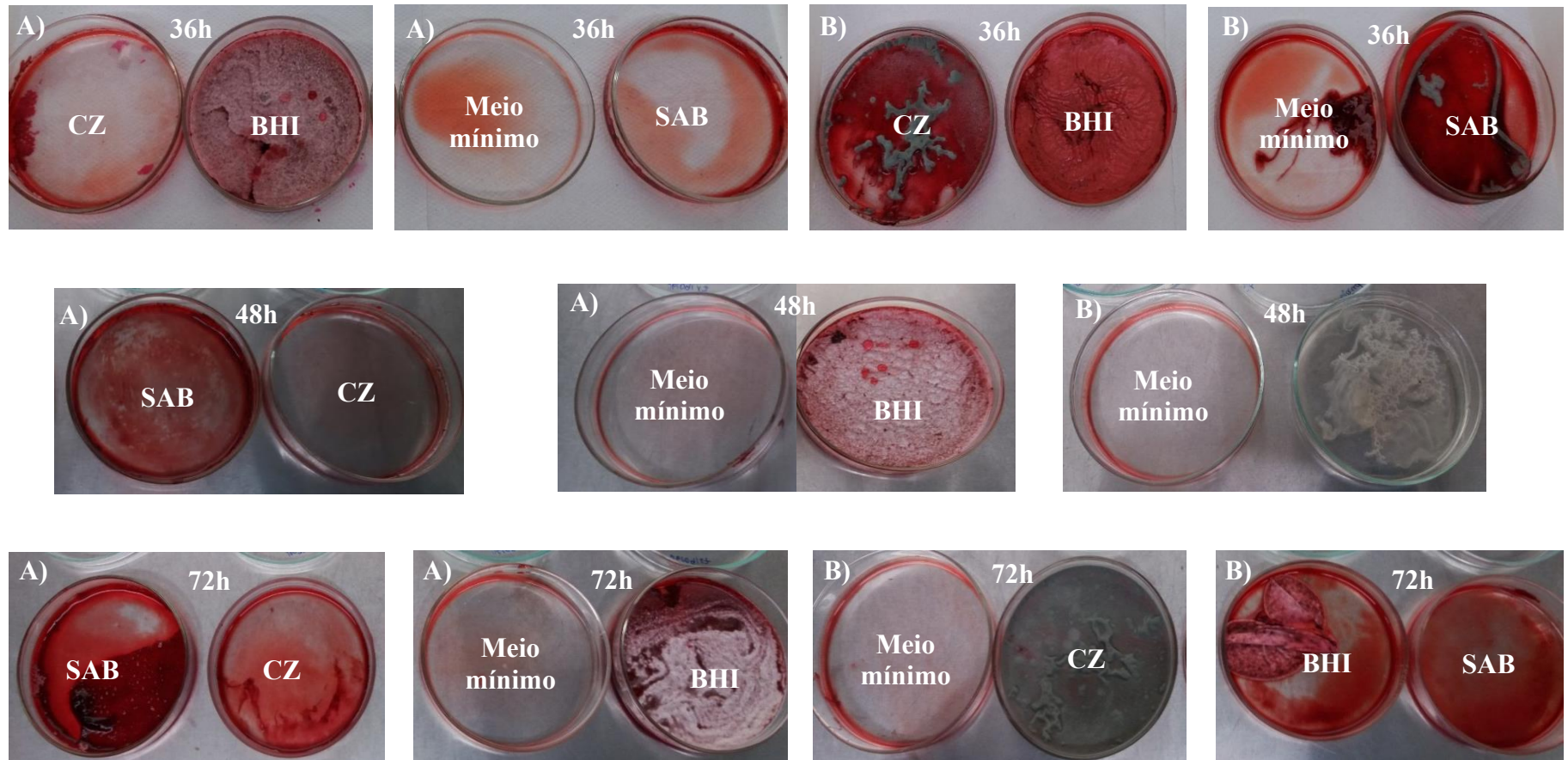
8.2. Placas de biofilme coradas com safranina.



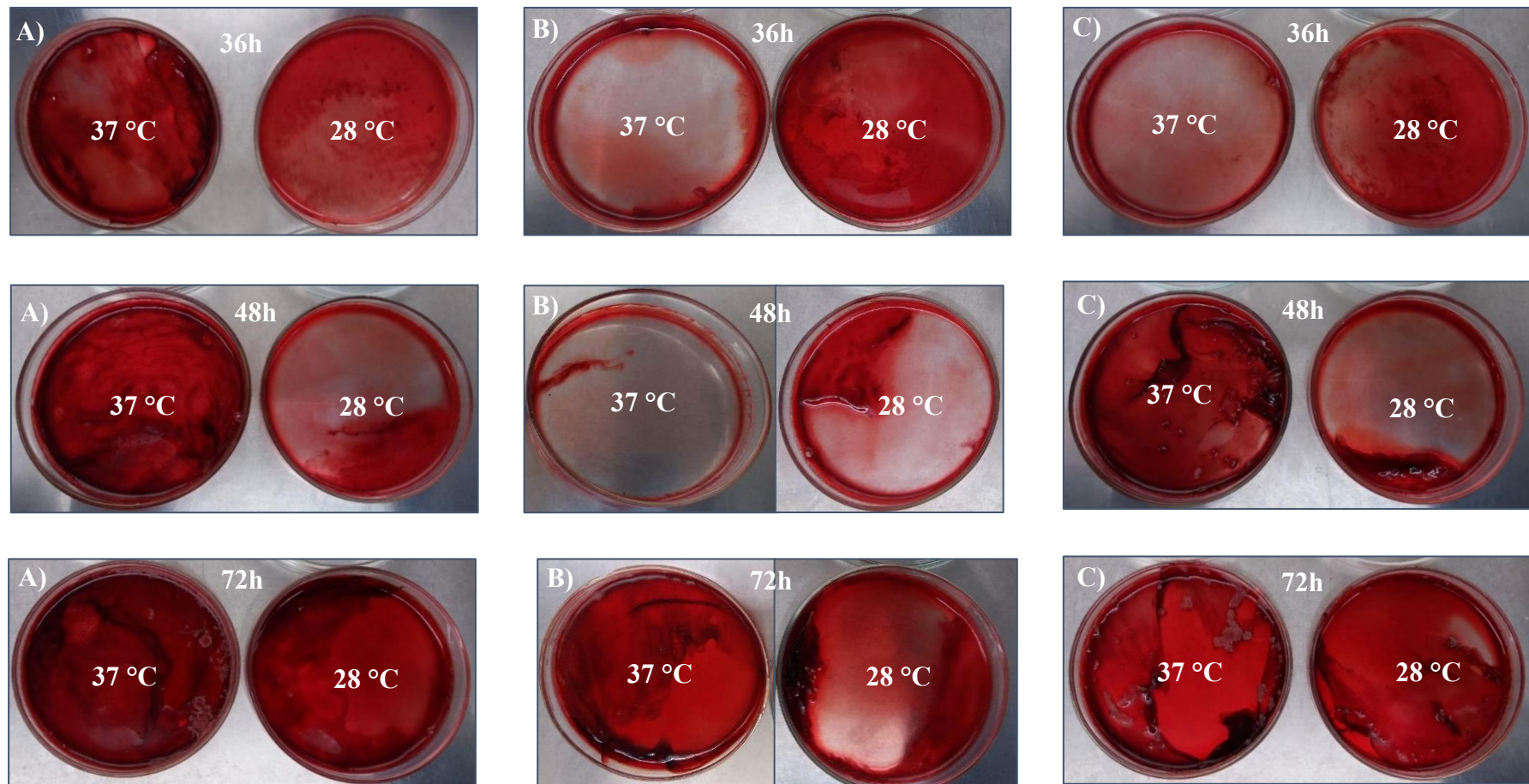
Apêndice 1 - Placas de biofilme coradas com safranina correspondentes à cepa *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913. **A:** corresponde às placas incubadas à 28°C e seus respectivos tempos; **B:** corresponde às placas incubadas a 37°C e seu tempo de crescimento.



Apêndice 2 - Placas de biofilme coradas com safranina correspondentes à cepa *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640. **A**: corresponde às placas incubadas à 28°C e seus respectivos tempos; **B**: corresponde às placas incubadas a 37°C e seu tempo de crescimento



Apêndice 3 - Placas de biofilme coradas com safranina correspondentes à cepa *Aspergillus fumigatus* ATCC LB-01-AP. **A:** corresponde às placas incubadas à 28°C e seus respectivos tempos; **B:** corresponde às placas incubadas a 37°C e seu tempo de crescimento.



Apêndice 4. Placas de biofilme coradas com safranina crescidas a 28 °C e 37 °C em meio RPMI 1640 nos diferentes tempos de crescimento. Cada letra corresponde a uma cepa de *Aspergillus fumigatus* com cada tempo de incubação empregada. **A)** *A. fumigatus* 46640; **B)** *A. fumigatus* 16913; **C)** *A. fumigatus* LB-01-AP.

8.3. Proteínas identificadas no biofilme e secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640

Tabela 3. Lista de proteínas identificadas com redundância no biofilme de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 em ordem alfabética

Nome da proteína	Massa molecular (Da)	NSAF*	Spectrum count
1,2-dihidroxi-3-keto-5-metilpentene dioxigenase	17866.8	0.001517398	22
1,2-dihidroxi-3-keto-5-metilpentene dioxigenase	20817.3	0.001116886	19
1,3-beta-glucanosiltransferase	48140.3	0.002848539	125
1,3-beta-glucanosiltransferase	50780.5	0.002122235	96
1,3-beta-glucanosiltransferase Bgt1	33045.2	0.00247623	73
1,3-beta-glucanosiltransferase gel1	48029.4	0.005653619	247
1,3-beta-glucanosiltransferase gel2	51667.1	0.002439453	112
1,3-beta-glucanosiltransferase gel4	58817	0.001227159	65
12-oxofitodienoato redutase putativa	45960.6	0.001644213	65
12-oxofitodienoato redutase, putativa	45992.7	0.001745395	69
26S subunidade reguladora de proteassoma S5A	29966	0.000665093	18
2-isopropilmalato sintase	69142.5	0.000115689	7
2-isopropilmalato sintase	71132.4	0.00011263	7
3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase	25275.8	0.002185124	49
3-carboxi-cis,cis-mucoante enzima lactonizante	41420.6	0.001583555	60
3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase putativa	35821.6	0.000336701	11
3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase putativa	33681.7	0.000162161	5
3-isopropilmalato desidrogenase	38963.2	0.00212006	75
3-isopropilmalato desidrogenase	39006.2	0.002798479	99
4-aminobutirato transaminase GatA	55154.5	0.000808597	39
4-aminobutirato transaminase gata	50902.2	0.000450801	20
5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamato-homocisteína S-metiltransferase	86810.4	0.010867198	813
6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintase	18573.8	0.004150048	71
60S ribosomal protein L22, putativa	13395.9	0.001061117	12
Acetil-CoA acetiltransferase putativa	41172.5	0.000412804	16
Acetil-CoA acetiltransferase, putativa	40865.4	0.000415915	16
Acetilornitina aminotransferase	52573.2	8.49765E-05	4
Ácido dihidroxi-desidratase mitocondrial, putativo	57822.3	0.000171795	9

Acil-CoA:6-aminopenicilanic-ácida-aciltransferase, putativa	34946.9	9.57953E-05	3
Aconitato hidratase, mitocondrial	83581.2	0.000524013	39
Aconitato hidratase, mitocondrial	85457.2	0.00046011	35
Adenilil-sulfato quinase	23552.3	0.000294196	6
Adenilil-sulfato quinase	23565.4	0.000294196	6
Adenina fosforibosiltransferase 1	23585.3	9.53539E-05	2
Adenina fosforibosiltransferase 1	23588.3	9.53539E-05	2
Adenosilhomocisteinase	48862.1	0.000138252	6
Adenosilhomocisteinase	48440.9	0.000139182	6
Adenosina quinase putativa	36817.3	0.000122437	4
Adenosina quinase putativa	38349.2	8.84264E-05	3
Agmatinase putativa	42500.4	0.000184748	7
Agmatinase, putativa	42135.3	0.000185221	7
Alanina aminotransferase putativa	54413	8.36032E-05	4
Alanina aminotransferase, putativa	55082.4	8.26019E-05	4
Álcool desidrogenase contendo zinco putativa	36901.1	0.001240297	41
Álcool desidrogenase contendo zinco, putativo	37454.3	0.000596305	20
Álcool isoamílico oxidase contendo FAD / FMN MreA	61309.2	0.001703177	94
Aldeído desidrogenase Ald3 putativo	60594.2	0.000111446	6
Aldeído desidrogenase, putativa	60003.9	0.000131675	7
Aldeído redutase (AKR1), putativo	37165.4	0.000774393	25
Aldeído redutase putativa	37000.3	0.000619515	20
Aldose 1-epimerase putativa	35978	0.000126169	4
Aldose 1-epimerase putativa	82414.9	0.000348581	25
Aldose 1-epimerase, putativa	36066.1	0.000126169	4
Alérgeno Asp f 15	15915.6	0.005853597	86
Alérgeno Asp F13	15985.8	0.00374358	55
Alérgeno principal Asp f 2	32799.6	0.000100122	3
Alérgeno principal Asp F1	19563.8	0.00270404	46
Alfa, alfa-trehalose glucohidrolase TreA / Ath1	116927.2	9.65102E-06	1
Alfa-1,2-Manosidase	55257.2	0.002241953	109
Alfa-aminoadipato redutase subunidade maior putativa	156594.6	4.36229E-05	6
Alfa-galactosidase	48990.9	2.31452E-05	1
Alfa-galactosidase	52634.9	0.001010929	47
Alfa-galactosidase	56271.8	0.00222275	110
Alfa-glucosidase AgdA putativa	108421.3	9.4244E-05	9
Alpha-aminoadipato redutase subunidade maior, putative	157062	1.45206E-05	2

Amidase putativa	64979.6	6.77309E-05	4
Amidase putativa	65639.6	6.75099E-05	4
Amino oxidase	76372.2	6.05909E-05	4
Amino peptidase	106141.9	0.000564519	52
Amino peptidase	98457.6	0.000596204	51
Amino peptidase	110675.2	0.000167715	16
Amino peptidase	108620.9	0.000363765	34
Aminotransferase aminoácidos de cadeia ramificada	40847.5	0.000109191	4
Aminotransferase aminoácidos de cadeia ramificada	43961.7	0.000286662	11
Aminotransferase classe V	41805.7	0.001447353	54
Aminotransferase putativa	46448.2	0.000267147	11
Anidrase carbônica	26007.3	0.003312501	73
Anidrase carbônica	26022.3	0.004537672	100
Argininosuccinato liase	51900.6	0.001605397	72
Argininosuccinato liase	49231.3	0.001787018	76
Aril-álcool desidrogenase, putativa	65271.5	6.88579E-05	4
Aspartato aminotransferase putativa	47888.5	0.000473496	20
Aspartato aminotransferase putativa	48396.7	0.002510228	107
Aspartato aminotransferase, putativa	47844.6	0.000355122	15
Aspartato aminotransferase, putativa	51132.9	0.003485397	158
Aspartato-semialdeído desidrogenase	39358.1	0.003819145	134
Aspartato-semialdeído desidrogenase	39387.2	0.005700217	200
Aspartil amino peptidase	55956.2	0.000380953	19
Aspartil amino peptidase	53613.4	0.002812068	134
Aspartil amino peptidase	54835	0.002524891	123
Aspartil amino peptidase vacuolar Lap4 putativa	55971.2	0.000401004	20
Aspartil-tRNA sintetase Dps1, putativa	61570.7	5.59237E-05	3
Aspergillopepsina, putativa	28960.3	0.000261449	7
Aspergillopepsina, putativa	29041.4	0.000261449	7
Aspergillopepsina-1	41569.5	0.003169248	121
Asp-hemolisina	15171.2	0.008112967	109
ATP fosforibosiltransferase	37226.4	0.000267566	9
ATP fosforibosiltransferase His1, putativo	33849.2	0.000294662	9
ATPase da membrana plasmática	109027.1	0.000156914	15
ATPase da membrana plasmática	108905	0.000282732	27
Beta-frutofuranosidase putativa	57192.6	0.001408974	70
Beta-frutofuranosidase, putativa	57209.6	0.001811538	90
Beta-glucosidase secretada sun1	43458.9	0.000449821	18
Beta-hexosaminidase	70882.5	8.19801E-05	5
Beta-hexosaminidase	67363.5	8.62158E-05	5

Beta-xilanase	34083.4	6.58974E-05	2
Beta-xilanase	41934.4	0.000260602	10
Beta-xilanase	42091.5	0.000416963	16
Cadeia pesada de miosina de classe II putativa	275414.6	0.000198721	48
Carbonil redutase putativa	31535.7	0.000809373	23
Carbonil redutase, putativo	31431.6	0.001055703	30
Carboxipeptidase	52519.5	0.000717257	33
Carboxipeptidase putativa	43857.4	9.80653E-05	4
Carboxipeptidase S1, putativa	54070	0.00069962	33
Carnitina acetil transferase	73091.1	0.000112455	7
Catalase	65435.4	0.000124435	7
Catalase	84174.5	9.70794E-05	7
Catalase	79853.1	0.002472782	174
Catalase A	84562.8	9.65617E-05	7
Catalase B	79843	0.003567059	251
Catalase-peroxidase	83691.8	1.3631E-05	1
Celulase extracelular CelA/alérgeno Asp F7-like, putativo	35535.3	0.000781957	26
Chaperona molecular chaperone Mod-E/Hsp90	80355.2	0.000381551	26
Chaperona molecular Hsp70	69599.6	0.000794591	49
Cianate hidratase	17796.2	0.007177463	111
Cianato hidratase	17056.8	0.007725829	115
Cianovirina-N	12600.3	0.000279619	3
Cianovirina-N	11676.7	0.000780822	8
Cisteína sintase (O-acetilserina (Tiol) - liase) (Csase)	40086.6	0.000697163	25
Citidina desaminase	14919.2	0.000440251	6
Citocromo b5 putativo	14702.2	0.002190007	29
Citocromo b5, putativo	23878.5	0.001525662	32
Citocromo C oxidase cobre chaperone Cox17, putativo	8283.8	0.000408391	3
Citrato ATP liase putativa, subunidade 1	71842.1	0.000267702	17
Citrato liase ATP, subunidade 1, putativo	78760.7	0.000257218	18
Clatrina de cadeia leve	26053.7	0.000213758	5
Clatrina de cadeia pesada	191068.7	7.39433E-05	12
Clatrina de cadeia pesada	192798.4	7.33318E-05	12
Complexo de fator de transcrição RNA polimerase I e III Tbp, putativo	30481	0.00018279	5
Complexo E3 ubiquitina ligase SCF subunidade sconC	18111.9	0.000785764	12
Componente de proteassoma Prs3 putativo	28488.3	0.000396394	10

Componente do complexo do fator de transcrição putativo RNA polimerase I e III Tbp	28275.9	0.000195945	5
Componente do proteassoma Pre2 putativo	32694.3	0.000174762	5
Componente do proteassoma Prs3 putativo	28506.2	0.000396394	10
Concanavalina do tipo A lectina/glucanase	41800.8	0.000156361	6
Coproporphyrinogen III oxidase, putative	50129	0.000188107	8
Cupin do tipo RmlC	18304.1	0.000498597	8
Cupin domain protein	19363.9	0.000354716	6
Cupin domain protein	21661	0.000844563	16
Cupin domain protein	13942.8	0.000162927	2
Deformilase formiltetrahydrofolato putativa	32249.8	0.00031888	9
Deoxiribose-fosfato aldolase, putativo	28384.3	0.000156164	4
Desidratase ácido dihidroxi mitocondrial putativo	64742.7	0.000153146	9
Difosfatase inorgânica putativa	31108	0.001692964	45
Difosfatase inorgânica, putativa	43578.4	0.001358552	52
Dihidrolipoil desidrogenase	54855.6	2.01674E-05	1
Dihidrolipoil desidrogenase	54918.6	2.01674E-05	1
Dihidroorotase do tipo homodimeric	36307.5	0.000371709	12
Dihidroxi ácido desidratase Ilv3, putativo	64698.1	0.000443883	26
Dihidroxi-ácido desidratase Ilv3	59664.5	0.000535769	29
Dipeptidil peptidase 3	79108.2	0.000438385	30
Dipeptidil peptidase 3	87202.8	0.000477503	36
Dipeptidil peptidase 5	79677.6	0.000373084	26
Dipeptidil peptidase secretada EF-hand	79493.5	0.000172192	12
Endo-1,3-beta-glucanase Eng1	16983.9	0.000833226	12
Endo-1,3-beta-glucanase Eng1	100331.3	7.75388E-05	7
Endo-1,3-beta-glucanase Eng1	104901.8	0.000127465	12
Endo-1,4-beta-xilanase C	35181	0.000127334	4
Endo-1,4-beta-xilanase xynf11a	24460.5	0.000589897	13
Endo-arabinase, putativa	35574.3	0.000191591	6
Endo-beta-1,4-glucanase D	33730.5	0.000188679	6
Endoglucanase putativa	37997.3	0.000224301	8
Endoglucanase, putativa	38341.5	0.000471529	17
Endoglucanase, putativa	31607.3	3.56755E-05	1
Endoglucanase, putativa	54337.6	6.13393E-05	3
Endopeptidase aspártica Pep1	41683.7	0.001885834	72
Endopeptidase do complexo proteassoma	27293.6	0.000372452	9
Endopeptidase do complexo proteassoma	28184.3	8.02007E-05	2
Endopeptidase do complexo proteassoma	29691.2	0.000930386	25
Endopeptidase do tipo aspártica putativa	67825.7	0.000275674	17
Endo-poligalacturonase extracelular	37626.6	8.52684E-05	3

Endopoligalacturonase B provável	37649.7	8.52684E-05	3
Endoquitinase B1	47574.4	7.16806E-05	3
Endo-quitosanase	34811.3	0.000601505	20
Endo-quitosanase	35099.5	0.000601505	20
Endoribonuclease da família L-PSP putativa	13733.8	0.001105668	14
Enolase	47258.3	0.003472252	147
Enolase/alérgeno Asp F 22	47297.3	0.002810871	119
Enzima ativadora de ubiquitina E1	159397.9	0.00030687	42
Espermidina sintase	33317.6	0.002373886	67
Espermidina sintase	33405.7	0.002189233	62
Etanolamina quinase, putativa	48624.6	0.000145717	6
Eukaryotic translation initiation factor eIF-5A	21132.2	0.00188597	35
Exo-beta-1,3-glucanase Exg0	97264.8	9.04559E-05	8
Exo-beta-1,3-glucanase Exg0	100540.3	0.000240348	22
Exo-beta-1,3-glucanase putativa	84066.3	3.86041E-05	3
Exo-beta-1,3-glucanase putativa	86311.4	0.000179039	14
Exo-beta-1,3-glucanase, putativa	86653.5	0.000179039	14
Exo-beta-1,3-glucanase, putativa	82442.9	9.29669E-05	7
Exo-beta-1,3-glucanase, putativa	84113.2	7.72082E-05	6
Família de fosfatases proteicas Ser/Thr	71242.7	0.000148743	9
Família de proteína endonuclease/exonuclease/fosfatase	64206.1	0.000306797	18
Família de proteína endonuclease/exonuclease/fosfatase	64040.1	0.001519446	89
Família de proteína nitrilase (Nit3), putativa	31714.5	0.001310952	37
Família do domínio Aha1	42311.7	8.18936E-05	3
Fator de alongamento da tradução eEF-1 subunidade gama, putativa	54130.8	4.2929E-05	2
Fator de alongamento da tradução eEF-1 subunidade gama, putativa	24342.8	0.000188107	4
Fator de alongamento de tradução eucariótico subunidade 1 Eef1-beta	26289	0.000349228	8
Fator de alongamento Gama 1	46322.8	5.01012E-05	2
Fitase extracelular, putativa	58312.4	0.000330602	17
Flavina oxidorreductase dependente de NADH, putativa	47001.1	0.000140442	6
Formamidase FmdS	38591.2	0.000618985	21
Formamidase FmdS	45180.6	0.000453105	18
Formato desidrogenase	39625.2	0.000345824	12
Formato desidrogenase	45699.7	0.000643524	26
Formiltetrasidrofolato deformilase, putativa	32215.8	0.00031888	9

Fosfatase alcalina	66288.7	6.82897E-05	4
Fosfatase alcalina	66236.6	6.81772E-05	4
Fosfoacetilglucosamine mutase	56649	0.000594592	30
Fosfoacetilglucosamine mutase	61459.4	0.000493532	27
Fosfodiesterase tipo PLC	40633.9	0.000190582	7
Fosfoglicerato mutase, 2,3-bisfosfoglicerato-independente	57384.9	0.005053571	254
Fosfoglicerato mutase independente de 2,3-bisfosfoglicerato	57400	0.007242125	364
Fosfoglicerato quinase	47444	0.000587835	25
Fosfoglicerato quinase	44715.7	0.000645068	26
Fosfoglucumutase	60445.7	0.00328086	176
Fosfoglucumutase PgmA	59626.3	0.002216977	117
Fosforibosil-aminoimidazol-succinocarboxamida sintase	33222.3	0.000103805	3
Fosfoserina fosfatase putativa	33307.9	0.000139809	4
Fosfotransferase	54284.7	0.00124573	59
Fosfotransferase	54156.6	0.001309072	62
Fructose-bisphosphate aldolase, class II	39747.9	0.007529511	262
Frutose-1,6-bisfosfatase	38646.5	0.000117234	4
Frutose-1,6-bisfosfatase Fbp1, putativa	38637.5	0.000146542	5
Frutose-bisfosfato aldolase, class II	39093.8	0.004982441	170
Ftase extracelular putativa	57802.1	0.000296161	15
Galactomanoproteína da parede celular rica em serina-treonina Mpl	27326.9	0.003752208	103
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	36615.7	0.000890299	29
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	36261.6	0.005464596	178
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	36099.5	0.000747896	24
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	36273.6	0.009458228	309
Glicosidase	46539.9	0.000513792	22
Glicosidase	47057.8	0.000114954	5
Glicoside hidrolase	47287.4	0.002028607	90
Glicosil hidrolase putativa	36663.9	0.000613739	21
Glicosil hidrolase putativa	78946.4	4.19428E-05	3
Glicosil hidrolase putativa, família 18	46395	0.000631439	26
Glicosil hidrolase, putativo	36715	0.001227479	42
glucano endo-1,6-beta-glucosidase B	44796.6	0.000387971	15
Glucoamilase	67040.5	9.83762E-05	6
Glucooligossacarídeo oxidase putativa	51403.7	0.000521642	24
Glucooligossacarídeo oxidase, putativa	51425.7	0.000695522	32
Glucose-6-fosfato isomerase	61259.1	0.009934303	531
Glucose-6-fosfato 1-epimerase	35189.8	0.000845891	26
Glucose-6-fosfato epimerase	61401.1	0.006903498	369

Glutamato desidrogenase	46503.5	0.000648119	27
Glutamato desidrogenase	49318.9	0.000609911	27
Glutamina-frutose-6-fosfato t	97245.4	0.000749024	64
Glutaminase GtaA	75956.1	2.99447E-05	2
Glutaminase GtaA	76081.9	2.99447E-05	2
Glutationa redutase	60149.4	0.001307243	70
Glutationa redutase	51285.5	0.002520716	115
Glutationa sintetase	56434.7	0.000569126	28
Glutationa sintetase	57087	0.000862158	43
Heptacetídeo hidrolase			
Hidrofobina	16074.1	0.001041096	16
Hidrofobina	14290.2	0.001182388	16
Hidrofobina	16084.2	0.001041096	16
Hidrolase da família Alpha / beta fold, putativa	31810.4	0.000460605	13
Hidrolase peptídica	53178.2	0.000521466	25
Hidrolase peptídica	49303.8	0.001332768	59
Hidrolase peptídica	56649.1	0.000493602	25
Homocisteína sintase CysD	46675.8	0.003242031	136
Homocisteína sintase CysD	46847.8	0.004910724	206
Homólogo de protease neutra 2	39362.6	8.38856E-05	3
Homólogo de proteína CSN12	51193.4	0.000113691	5
Homólogo de proteína GrpE	28354.8	0.000206918	5
Hsc70 cochaperona (SGT), putativo	35703.3	9.10196E-05	3
Hsp70 chaperona Hsp88	79853.7	0.000420211	29
Hsp70 chaperona Hsp88	79976.9	0.001028793	71
Importina subunidade beta-2 putativa	104841.2	2.2083E-05	2
Importina subunidade beta-2, putativa	105082.4	2.2083E-05	2
Importina subunidade beta-4 putativa	121650.9	7.55864E-05	8
Importina subunidade beta-4, putativa	121507.7	7.55864E-05	8
Isocitrato liase	66678	6.87435E-05	4
Isocitrato liase	71888.8	6.37651E-05	4
Lacase TlaA	65487	5.20766E-05	3
Lactoilglutationa liase	33300.4	0.002879785	81
Lactoilglutationa liase	36489	0.002732877	84
L-asparaginase	39741	0.000491362	18
Lipase extracelular, putativo	31405.5	0.000103805	3
Malato desidrogenase	36036.1	0.005461175	180
Malato desidrogenase	35858.1	0.008276715	272
Malato desidrogenase dependente de NAD	34770.5	0.000188107	6
Malato desidrogenase, dependente de NAD	34714.4	0.000219458	7

Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	42959.2	0.005386264	202
Manitol-1-fosfato desidrogenase	42835.2	0.004426336	166
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase F	47279.5	7.08623E-05	3
Manose-6-fosfato isomerase	49880	6.79161E-05	3
Metalopeptidase de processamento de A-feromônio Ste23	131957.4	4.47874E-05	5
Metalopeptidase de processamento de A-feromônio Ste23	131975.3	4.48262E-05	5
Metalopeptidase MepB	81840.4	0.000361239	25
Metaloproteinase extracelular mep	68647.5	8.15922E-05	5
Metionina sintetase independente da cobalamina MetH/D	86822.5	0.012270711	918
Mio-inositol-fosfato sintase putative	58541.3	0.00608354	314
Mio-inositol-fosfato sintase, putativa	58616.6	0.006161038	318
Monooxigenase putative	48029	2.42293E-05	1
NAD binding Rossmann fold oxidoreductase, putative	39926.6	0.000143693	5
NADH: flavina oxidoreductase/proteína da família NADH oxidase	40639.6	8.43415E-05	3
NADH: flavina oxidoreductase/proteína da família NADH oxidase	41243.9	8.32109E-05	3
Nitrilase, putativa	30124.8	0.000453105	12
Nitrilase, putativa	30177.8	0.000453105	12
Nucleoporina SONB, putativa	208823.3	1.5644E-05	3
Nucleoside difosfato quinase	16875.7	0.027386188	405
Nucleoside difosfato quinase	16903.7	0.031646262	468
O-metiltransferase	43633.4	5.34671E-05	2
O-metiltransferase putativa	44357.7	5.26509E-05	2
Ornitina aminotransferase	49026.1	2.29909E-05	1
Ornitina aminotransferase	49068.3	2.29909E-05	1
Oxidoreductase de dissulfeto de nucleotídeo piridina putativa	36138.4	0.000836345	27
Oxidoreductase	29423.6	0.000110454	3
Oxidoreductase, ligante-FAD, putativa	50444.8	0.000174983	8
Oxigenase dependente de FAD, putativa	54974	0.006876856	337
Oxirredutase dependente de FAD, putativa	51217.9	0.000192781	9
Oxirredutase GMC, putativa	72086.7	0.000112107	7
Oxirredutase, família da desidrogenase/redutase de cadeia curta	30055.9	0.00021629	6
Pantoato--beta-alanine ligase	35400.4	3.20306E-05	1
Pantoato--beta-alanine ligase	37669.5	3.02511E-05	1
Pectato liase putativa	33749.9	0.000193381	6
Pectato liase putativa	37732.2	0.000342013	12
Pectina liase B	39008	0.00030348	11

Pectina liase putativa	39662.7	0.000299486	11
Peptídeo antimicrobiano secretado, putativo	10548.2	0.000614608	6
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	18845.5	0.000363014	6
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	22908.9	0.000742528	15
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	17692	0.0058394	92
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	22258.2	0.000302807	6
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	17711.9	0.023357599	368
Peptidil-prolil cis-trans isomerase B	22927.9	0.000742528	15
Peptidilprolil isomerase	12006.1	0.014502725	157
Peptidilprolil isomerase	13055.6	0.001896747	22
Peroxiredoxina	18439.4	0.001293237	21
Peroxirredoxina Asp f3	18423.4	0.001108489	18
Poli (A) + proteína transportadora de RNA (UbaA) putativa	114596.1	0.000130833	13
Poliubiquitina putative	34237.3	0.00848024	250
Polubiquitina UbiD / Ubi4 putativo	35159.7	0.008237176	250
Profilina	13932	0.001026692	13
Profilina	14464.3	0.003118983	41
Protease ácida	58009.7	0.000169914	9
Protease alcalina 1	42146.4	0.002361842	92
Protease alcalina 2	52589.5	0.001149544	55
Protease aspártica celular	43009.5	0.001654293	63
Proteasome component Pup3 putative	21063.7	0.00010777	2
Proteína 1 ativadora de GTPase específica de Ran, putativa	27608.6	0.000460748	11
Proteína 1A de ligação a FK506	12104.2	0.016719702	181
Proteína A do domínio CFEM ancorada a GPI	26776.8	0.000203526	6
Proteína alcS	29000.9	0.000228218	6
Proteína alvo de proteína mitocondrial (Mas1), putativa	45420.4	0.000225455	9
Proteína ancorada GPI, putativo	22457.8	0.000280884	6
Proteína ativadora específica de GTPase Ran 1 putativa	53039.6	6.56188E-05	3
Proteína BMH2	30822.3	0.000720044	19
Proteína contendo domínio DUF1348	15829.6	0.000311155	4
Proteína contendo domínio NAP	40911.5	0.000146128	5
Proteína contendo domínio PP2C	46432.5	9.62409E-05	4
Proteína contendo domínio TRP	78959.3	1.43097E-05	1
Proteína contendo o domínio NAC	37082.7	0.000857056	28
Proteína da biogênese da parede celular / glutationa transferase (Gto1), putativa	50413.6	0.001382631	58

Proteína da família aminotransferase (LoIT), putativa	49683.7	0.000776513	34
Proteína da família 14-3-3	30067	0.000878065	23
Proteína da família 14-3-3 ArtA	29095.6	0.003290073	83
Proteína da família 14-3-3 ArtA, putativa	29065.6	0.003290073	83
Proteína da família adenosina deaminase	66187.2	7.05001E-05	4
Proteína da família alfa-1,2-manosidase putativa	91126.5	6.27785E-05	5
Proteína da família alfa-1,2-manosidase, putativa	92674.2	0.000221962	18
Proteína da família da desidrogenase de cadeia curta / redutase, putativa	29612.2	0.001451402	39
Proteína da família da desidrogenase/redutase de cadeia curta putativa	28416.6	0.001394952	36
Proteína da família de repetição PT	223887.6	0.000147798	31
Proteína da família Dienelactona hidrolase	26886.7	0.000717878	17
Proteína da família Dienelactona hidrolase	27773.7	0.000247312	6
Proteína da família Dienelactona hidrolase	34969.7	0.000554827	17
Proteína da família Dienelactona hidrolase	26907.7	0.000971247	23
Proteína da família enzimática lactonizante mandelato racemase/muconato	49851.5	0.000183519	8
Proteína da família enzimática lactonizante mandelato racemase/muconato	47201.2	0.00031572	13
Proteína da família fitanoil-CoA dioxigenase	35383.7	0.000226316	7
Proteína da família fumarilacetoacetato hidrolase	25735.6	0.001337831	30
Proteína da família fumarilacetoacetato hidrolase	26215	0.001408802	32
Proteína da família fumarilacetoacetato hidrolase	28277.8	0.000519292	13
Proteína da família fumarilacetoacetato hidrolase	67548.7	4.88014E-05	3
Proteína da família nitrilase putativa	31664.4	0.001275521	36
Proteína da família nitroredutase putativa	24325.4	0.001621016	34
Proteína da família nitroredutase, putativa	24280.5	0.003051323	64
Proteína da família YjgH	15919.1	0.002261023	33
Proteína da parede celular PhiA	19278.2	0.000848024	15
Proteína da parede celular PhiA	19376.3	0.001621789	29
Proteína da parede celular putativa	19201	0.000172432	3
Proteína da parede celular, putativa	19242.9	0.001264498	22
Proteína de biogênese da parede celular Ecm15 putativa	12567.4	8.99643E-05	1
Proteína de biogênese da parede celular Ecm15, putativa	12617.5	8.99643E-05	1

Proteína de biogênese de parede celular putativa Ecm15	41904.7	0.000224301	8
Proteína de biossíntese de tiamina (Nmt1), putativa	38280.4	0.009650117	319
Proteína de biossíntese de tiamina putativa	38302.4	0.009438359	312
Proteína de choque térmico (Sti1), putativa	64972.8	3.53706E-05	2
Proteína de choque térmico 70	68787.2	9.8689E-05	6
Proteína de choque térmico 90	80572.3	0.00038101	26
Proteína de controle de divisão celular Cdc48	90188	8.84264E-05	7
Proteína de controle de divisão celular Cdc48	90144	7.57941E-05	6
Proteína de domínio CHCH	27518.6	0.000238751	6
Proteína de domínio La de ligação de RNA	44509.7	0.001247746	48
Proteína de domínio NPP1	24548.7	0.000397919	9
Proteína de domínio NPP1, putative	24523.8	0.000397919	9
Proteína de domínio PWWP	66537.4	5.11329E-05	3
Proteína de domínio SUN	42118.3	0.000333738	13
Proteína de domínio taumatina antigênico putativa	17320.2	0.000929272	15
Proteína de estabilidade do mRNA	17639.8	0.000185854	3
Proteína de ligação a fosfatidiletanolamina	24671.4	0.000233016	5
Proteína de ligação a fosfatidiletanolamina putativa	19562.6	0.000288991	5
Proteína de ligação a IgE	20512.7	0.000413836	8
Proteína de ligação a IgE	20456.7	0.002069179	40
Proteína de ligação a IgE, putativa	21139.4	0.00081544	16
Proteína de ligação a microtúbulos HOOK3, putativa	92972	1.26323E-05	1
Proteína de ligação a poliadenilato	79423.2	0.000239619	17
Proteína de ligação à progesterona putativa	14444.2	0.000244391	3
Proteína de ligação a quitina, putativa	29778.1	0.000642159	18
Proteína de ligação ao hotspot de recombinação (Translin) putativa	26372	0.000132075	3
Proteína de ligação ao poliadenilato, citoplasmática e nuclear	81376.3	0.000233573	17
Proteína de ligação ao RNA do domínio KH	49065.9	0.000220125	10
Proteína de ligação ao RNA do domínio KH	48294.5	0.000222972	10
Proteína de membrana integral	30914.1	0.00010557	3
Proteína de montagem de nucleossomo Nap1, putativa	48288.5	0.000635918	26
Proteína de organização de parede celular ancorada por GPI Ecm33	41352.8	0.001117772	43

Proteína de parede celular ancorada à GPI, putativa	16275.8	0.000189254	3
Proteína de parede celular ancorada à GPI, putativa	39538.6	0.004127636	154
Proteína de processamento de rRNA Bystin putativa	55185.2	4.15498E-05	2
Proteína de processamento de rRNA Bystin, putativo	55000.1	4.16334E-05	2
Proteína de repetição anquirina (Yar1) putativa	23137.3	0.000369496	8
Proteína de repetição WD	146006.7	1.59413E-05	2
Proteína de segregação vacuolar (Pep7) putativa	74689.8	7.69784E-05	5
Proteína de transferência de fosfatidilglicerol/fosfatidilinositol	19052.9	0.000236478	4
Proteína de WW	28908.6	0.001851794	46
Proteína de WW	28355.9	0.000531607	13
Proteína dissulfeto-isomerase	56207	0.000459374	23
Proteína dissulfeto-isomerase	56134	0.000460262	23
Proteína do domínio aldolase / aducina de classe II	31672.8	0.000284423	8
Proteína do domínio aldolase / aducina de classe II	31680	0.00024887	7
Proteína do domínio da junta de zinco (Byr3) putativa	19841.6	0.000326712	6
Proteína do domínio da taumatina extracelular, putativa	18695.5	0.000350708	6
Proteína do domínio de ligação do ligante do tipo AraC, putativa	23633.1	0.000388578	8
Proteína do domínio de ligação FAD	55481.7	0.000281248	14
Proteína do domínio de ligação FAD	54607.6	0.001836549	90
Proteína do domínio de ligação FAD	51474.1	0.000106659	5
Proteína do domínio DlpA	30468.1	0.00014675	4
Proteína do domínio DUF907	79336.5	1.43097E-05	1
Proteína do domínio DUF967	20269.5	0.002806599	51
Proteína do domínio LysM, putativa	26582.4	0.000123165	3
Proteína do domínio relacionado ao YCII	11785.1	0.001820111	19
Proteína do domínio UPF0047	18272.2	0.001015548	16
Proteína do domínio UPF0047	16293.2	0.001149544	16
Proteína do domínio UPF0160 MYG1 putativa	39983.9	0.000284228	10
Proteína do tipo pectina liase	82388.1	0.000106385	8
Proteína ecm33	41461.8	0.004055174	156
Proteína extracelular rica em serina, putativa	85412.4	9.04135E-05	7

Proteína extracelular rica em serina-treonina	26483	0.000855675	22
Proteína extracelular, putativa	74483.7	0.001234453	84
Proteína mitocondrial antigênica HSP60 putativa	61952.7	0.000299116	17
Proteína mitocondrial antigênica HSP60, putativa	61893.7	0.000299626	17
Proteína não caracterizada	21076.2	0.001104901	22
Proteína não caracterizada	114481.9	0.000706922	74
Proteína não caracterizada	25543.6	0.000346306	8
Proteína não caracterizada	17186.7	0.000405721	6
Proteína não caracterizada	39908.6	0.003035147	115
Proteína não caracterizada	27002.3	0.000238751	6
Proteína não caracterizada	9961.6	0.000959928	9
Proteína não caracterizada	49525	6.66045E-05	3
Proteína não caracterizada	35032.8	0.000390411	12
Proteína não caracterizada	28055.6	0.000795838	22
Proteína não caracterizada	49290.9	0.000161295	7
Proteína não caracterizada	17959.8	0.000197692	3
Proteína não caracterizada	49497.8	9.07534E-05	4
Proteína não caracterizada	180165.6	7.22647E-05	12
Proteína não caracterizada	30171.1	0.000117123	3
Proteína não caracterizada	35273	0.00013613	4
Proteína não caracterizada	9094.5	0.001915906	15
Proteína não caracterizada	88675.6	5.24507E-05	4
Proteína não caracterizada	74752.3	6.03259E-05	4
Proteína não caracterizada	18764.9	0.000112455	2
Proteína não caracterizada	12332.3	0.000795838	8
Proteína não caracterizada	203283.9	2.79015E-05	5
Proteína não caracterizada	36357.3	9.52076E-05	3
Proteína não caracterizada	25081.9	0.0006198	13
Proteína não caracterizada	15303.9	0.000466732	6
Proteína não caracterizada	17101.8	0.000715754	11
Proteína não caracterizada	40112.6	0.000697163	25
Proteína não caracterizada	27939.6	0.000577062	14
Proteína não caracterizada	19461	0.00040234	7
Proteína não caracterizada	22977.3	0.000622669	13
Proteína não caracterizada	15600.7	0.000283449	4
Proteína não caracterizada	29205.8	0.000913948	25
Proteína não caracterizada	39843.9	0.00013613	5
Proteína não caracterizada	18220	0.002771221	45
Proteína não caracterizada	10391.3	0.000319976	3
Proteína não caracterizada	21910	0.000153652	3

Proteína não caracterizada	24998.7	0.000877553	19
Proteína não caracterizada	202542.1	1.62161E-05	3
Proteína não caracterizada	9770.5	0.001705367	15
Proteína não caracterizada	16247.8	0.000189254	3
Proteína não caracterizada	30779.4	0.000373498	10
Proteína não caracterizada	21387	0.000779841	15
Proteína não caracterizada	51211.4	0.000113691	5
Proteína não caracterizada	15678.3	0.000220125	3
Proteína não caracterizada	61403.8	5.21642E-05	3
Proteína não caracterizada	25820.9	0.001149544	26
Proteína não caracterizada	14582.1	0.000463249	6
Proteína não caracterizada	20211.9	0.000218961	4
Proteína não caracterizada	193203.5	0.000710012	119
Proteína não caracterizada	13864.3	7.77887E-05	1
Proteína não caracterizada	64851.4	5.21642E-05	3
Proteína não caracterizada	14737.7	0.000220125	3
Proteína não caracterizada	37646	8.71845E-05	3
Proteína não caracterizada	26321.9	0.000247312	6
Proteína não caracterizada	24083.6	0.000558077	13
Proteína não caracterizada	23699.8	0.003651492	78
Proteína não caracterizada	11749.6	0.007320207	75
Proteína não caracterizada	17718	0.000113691	2
Proteína não caracterizada	10211.2	0.000326712	3
Proteína não caracterizada	49079.7	0.000137032	6
Proteína não caracterizada	9139.6	0.001915906	15
Proteína não caracterizada	211938.3	3.75434E-05	7
Proteína não caracterizada	10161.9	0.001279904	12
Proteína não caracterizada	20457.1	0.003706817	67
Proteína não caracterizada	36645.3	0.000825133	26
Proteína não caracterizada	49707.7	8.91887E-05	4
Proteína não caracterizada	35844.8	0.000357877	11
Proteína não caracterizada	15288.9	0.000466732	6
Proteína não caracterizada	42225	0.002069179	80
Proteína não caracterizada	12663.4	0.000773525	8
Proteína não caracterizada	67905	0.000293623	17
Proteína não caracterizada	27885.1	0.000125152	3
Proteína não caracterizada	30046.4	0.002438675	66
Proteína não caracterizada	34210.5	0.000129729	4
Proteína não caracterizada	14552.2	0.000235134	3
Proteína não caracterizada	26206.6	0.000128787	3
Proteína não caracterizada	14862.6	0.000226552	3
Proteína não caracterizada	31600.3	0.000289396	8
Proteína não caracterizada	9428.7	0.000114954	1

Proteína não caracterizada	49421	0.000599094	26
Proteína não caracterizada	15909.8	0.008118652	113
Proteína não caracterizada	10871.4	0.000527852	5
Proteína não caracterizada	11592.5	0.00162852	17
Proteína não caracterizada	40473.7	8.36595E-05	3
Proteína não caracterizada	24999.7	0.001062302	23
Proteína não caracterizada	17037.7	0.000676202	10
Proteína não caracterizada	23346.5	0.001063596	22
Proteína não caracterizada	26145.9	8.51514E-05	2
Proteína não caracterizada	36539.4	0.000730642	25
Proteína não caracterizada	22012.9	0.002472921	49
Proteína não caracterizada	30487.3	0.000936987	24
Proteína não caracterizada	20348	0.002777056	51
Proteína não caracterizada	42757.1	0.000297011	12
Proteína não caracterizada	25390.5	0.000346306	8
Proteína não caracterizada	32341	0.000201543	6
Proteína não caracterizada	33906.9	0.000257842	8
Proteína não caracterizada	20315.4	0.000389362	7
Proteína não caracterizada	30549.2	0.000346145	9
Proteína não caracterizada	32553.7	0.000177156	5
Proteína não caracterizada	62852.6	5.11329E-05	3
Proteína não caracterizada	12105.6	0.001423747	15
Proteína não caracterizada	9881.6	0.000959928	9
Proteína não caracterizada	22901.2	0.001005851	21
Proteína não caracterizada	39139.7	8.38856E-05	3
Proteína não caracterizada	25987.8	0.00371391	84
Proteína não caracterizada	23716.6	0.001243283	28
Proteína não caracterizada	18112.8	0.000527179	8
Proteína não caracterizada	37141.1	0.000775197	26
Proteína não caracterizada	18562.6	0.000587835	10
Proteína não caracterizada	24574.8	0.000342013	8
Proteína quinase ativada por mitógeno	41924.4	0.000367477	13
Proteína quinase ativada por mitógeno hog1	41915.4	0.000367477	13
Proteína ribossomal 40S S0	30357.3	0.000258647	7
Proteína ribossomal 40S S0	32084.2	0.000243843	7
Proteína ribossomal 40S S1	29178.9	0.000484964	12
Proteína ribossomal 40S S1	29164.9	0.000484964	12
Proteína ribossomal 40S S11	15804.3	0.000551781	8
Proteína ribossomal 40S S13	16789.3	0.001027738	15
Proteína ribossomal 40S S13	16473.2	0.001258284	18
Proteína ribossomal 40S S14	15361.1	0.000570808	8
Proteína ribossomal 40S S4	29424.7	0.000237837	6

Proteína ribossomal 40S S4	25694.4	0.000671811	15
Proteína ribossomal 40S S5 putativa	29454.7	0.000237837	6
Proteína ribossomal 40S S7	22525.2	0.00163634	31
Proteína ribossomal 40S S7	22812.4	0.001492691	29
Proteína ribossomal 40S S8	22780.2	0.000463249	9
Proteína ribossomal 60S	10928.4	0.000282161	3
Proteína ribossomal 60S	11074.5	0.000470268	5
Proteína ribossomal 60S L12	18181.9	0.000304291	5
Proteína ribossomal 60S L20	17374.5	0.000349523	5
Proteína ribossomal 60S L22	14383.7	0.000993206	12
Proteína ribossomal 60S L27a, putativa	16733	0.000277742	4
Proteína ribossomal 60S L28 putativa	16722.9	0.000208307	3
Proteína ribossomal 60S L5, putativa	35443.2	0.000134362	4
Proteína ribossomal 60S L7	34213.2	0.000243843	7
Proteína ribossomal 60S L9 putativa	21867.8	0.000323309	6
Proteína ribossomal 60S L9, putativa	21811.7	0.000323309	6
Proteína ribossomal ácida 60S P0	33456.2	0.00033054	10
Proteína ribossomal ácida 60S P1	11103.5	0.000186412	2
Proteína ribossomal ubiquitina/40S fusão S27a	17613.4	0.017131187	255
Proteína ribossômica ácida 60S P2	11116.6	0.002423362	26
Proteína rica em lisina conservada, putativa	56950.9	0.000114742	6
Proteína rica em serina-treonina ancorada à GPI	24551.4	0.000129324	3
Proteína rica em serina-treonina ancorada à GPI	25450.9	0.000331069	8
Proteína rica em serina-treonina ancorada à GPI	16522.8	0.000501619	8
Proteína SDA1	95088	0.000183438	15
Proteína semelhante a RraA	29745.4	7.52429E-05	2
Proteína semelhante a YjgF	21770	0.000413836	8
Provável alfa-galactosidase B	49153.2	0.000462903	20
Provável beta-glucosidase L	78314	0.000111999	8
Provável carboxipeptidase AFUA_6G06800	46331.7	0.000493781	21
Provável endo-beta-1,4-glucanase D	35694.2	0.000355733	12
Provável glicosidase crf1	40241.2	0.000497651	19
Provável glicosidase crf2	46663.1	0.001471312	63
Provável glucano endo-1,3-beta-glucosidase eglC	44605.9	0.00285324	123
Provável glucano endo-1,6-beta-glicosidase B	44748.6	0.000444142	17
Provável leucina aminopeptidase 2	54163	0.001424883	69

Provável manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B	53788.5	0.004994569	238
Provável pectato liase A	33782.9	0.000966906	30
Provável pectina liase A	39740.7	0.000571747	21
Provável pectinesterase A	34517.8	6.38635E-05	2
Provável Xaa-Pro aminopeptidase P	72616.4	0.002499467	158
Provável Xaa-Pro aminopeptidase pepP	51893.3	4.42132E-05	2
Putative alpha-glucosidase AgdA	110862.2	9.21911E-05	9
Putative NAD binding Rossmann fold oxidoreductase	39728.5	0.000143693	5
Putative ribosome associated DnaJ chaperone Zuotin	51128.2	4.63941E-05	2
Putative tripeptidyl-peptidase	65809.5	8.59293E-05	5
Quitinase classe V putativa	49024	0.001287489	56
Quitinase Classe V, putativa	46446.2	0.001141448	47
Quitinase Classe V, putativa	49047	0.001356462	59
Quitinase Classe V, putativa	49833.6	6.99047E-05	3
Redutase de sulfito putativa	165778.9	0.000596088	87
Redutase sorbitol/xilulose V = 1 putativa	25057.2	0.000663198	15
Regulador da transcrição PAB1642 putativo	28005	0.000293203	7
Regulador de transcrição PAB1642, putativo	34253.2	0.000239014	7
Ribonuclease guanil-específica extracelular RntA	14005.6	0.003553933	45
Ribonuclease guanil-específica extracelular T1 putativa	13871.6	0.001184644	15
Ribonuclease mitogilina	19564.8	0.00270404	46
Ribonuclease putativa T2	31539.8	0.000180242	5
Ribonuclease T2 putativa	29246.7	3.94881E-05	1
Ribose 5-fosfate isomerase A	28341	0.005667419	149
Ribose 5-fosfato isomerase A	28412.1	0.004564365	120
Ribosome associated DnaJ chaperone Zuotin, putative	51206.3	4.63941E-05	2
Ribosome biogenesis protein Urb1, putative	126701	3.68181E-05	4
Ribulose-fosfato 3-epimerase	23439.8	0.001498704	31
Ribulose-fosfato 3-epimerase	34592.3	0.000991619	30
Sacaropina desidrogenase Lys9, putativo	49400.2	2.29909E-05	1
Serina carboxilpeptidase extracelular, putativa	64183.8	5.42617E-05	3
Serina peptidase, putativa	58521.3	5.91194E-05	3
Serina protease alcalina Alp1	42056.3	0.000667477	26
Serina proteinase celular	52520.4	0.001024139	49
S-metil-5'-tioadenosina fosforilase	88619.5	8.98527E-05	7

S-metil-5'-tioadenosina fosforilase	37564	0.000968037	32
Sorbitol / xilulose redutase Sou1-like, putativo	28184	0.000583415	15
Subunidade alfa complexa associada a polipeptídeo nascente	21941	0.001420025	28
Subunidade beta da sintase do ácido graxo, putativa	231879.8	4.94546E-06	1
Subunidade beta do complexo G-proteína CpcB	34966.4	0.000196441	6
Subunidade beta do complexo G-proteína CpcB	34939.4	0.000196441	6
Subunidade beta do proteassoma	28901.7	0.000198959	5
Subunidade beta do proteassoma	25228.4	0.000442132	10
Subunidade beta do proteassoma	28830.7	0.000756046	19
Subunidade beta do proteassoma	23807.7	0.00046814	10
Subunidade de citrato liase ATP (Acl), putativa	52866.7	0.000638635	30
Subunidade de citrato liase ATP (Acl), putativa	52808.6	0.000638635	30
Subunidade do fator de alongamento de tradução eucariótica 1 Eef1-beta, putativo	25211.5	0.000501343	11
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	28701.4	0.000394881	10
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	31775.1	0.000867944	25
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	26885.4	0.000420565	10
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	27886.1	8.14637E-05	2
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	30467.8	0.000293501	8
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	28719.4	0.000394881	10
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	28170.2	0.000486866	12
Subunidade do tipo alfa do proteassoma	30425.8	0.000293501	8
Subunidade reguladora da proteína fosfatase 2a 65 kd	69185.2	1.67953E-05	1
Subunidade reguladora da proteína fosfatase 2a 65 kd	69129.2	1.67953E-05	1
Sulfato adenililtransferase	64145.1	5.40726E-05	3
Sulfato adenililtransferase	64275.2	5.40726E-05	3
Sulfidril oxidase	25745.9	8.91887E-05	2
Sulfito reductase, putativa	168488.5	0.000642392	95
Superóxido dismutase	23369.8	0.000147798	3
Superóxido dismutase	22861.7	0.005471386	110
Superóxido dismutase	25119.8	0.007861072	174
Superóxido dismutase [Cu-Zn]	15880.8	0.019482526	290
Superóxido dismutase [Cu-Zn]	15938.9	0.028551978	425
Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial	23357.8	0.000147798	3
Telômero e proteína associada ao ribossomo Stm1, putativo	36852.6	0.000187539	6

Tiamina tiazol sintase	35451	0.000373948	12
Tiorredoxina redutase	39593	0.000360581	13
Tiorredoxina redutase	42145.5	0.000343104	13
Tiorredoxina redutase putativa	42102.3	0.008113358	298
Tiorredoxina redutase citoplasmática putativa	42785.8	0.001309945	49
Tiorredoxina redutase gliT	35963.4	0.001951471	63
Tiorredoxina redutase putativa	42805.7	0.010587119	395
Tirosinase putativa	41989.6	0.000270128	10
Transaldolase	34504	0.00707355	214
Transaldolase	35408.5	0.008142601	255
Transcetolase	74708.7	0.001346176	89
Transcetolase	74762.7	0.001905822	126
Transferase dependente de PLP	56518.8	0.000360205	18
Transportador de fosfatidilinositol, putativo	37282.6	0.000250052	8
Transportador de zinco ZIP putativa	54148	0.000238293	12
Transportador de zinco ZIP putativo	52655.3	0.000245357	12
Treonina sintase Thr4 putativa	52283.8	0.001446672	66
Treonina sintase Thr4, putativo	56076.7	0.0017175	84
Trioseofosfato Isomerase	27213.4	0.005669549	137
Trioseofosfato Isomerase	30438.1	0.000108145	3
Trioseofosfato Isomerase	28032.7	0.008971829	222
Tripeptidil-peptidase sed2	65779.6	0.000154673	9
tRNA wybutosine- sintetizando protein 2	49852.2	2.30935E-05	1
Ubiquitina (UbiC) putativa	17643.5	0.016795281	250
Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase	27028.9	0.000248301	6
Ubiquitina UbiA putativa	16188.6	0.016976008	233
UPF0619 Proteína de membrana ancorada a GPI AFUA_3G00880	21574.5	0.000850347	18
Urease	91085.7	3.70378E-05	3
Urease	90835.8	3.70378E-05	3
Vacuolar protease A	43309.7	0.001845624	71
Verruculogênio sintase	32627.6	0.000711058	20
Xantina-guanina fosforibosil transferase Xpt1 putativa	19432	0.001076451	18
Xantina-guanina fosforibosil transferase Xpt1 putativa	19475	0.00125586	21

Legenda: *NSAF (Fator de abundância espectral normalizado)

Tabela 4. Lista de proteínas identificadas com redundância no secretoma de *Aspergillus fumigatus* ATCC 46640 em ordem alfabética

Nome da Proteína	Massa molecular (Da)	NSAF*	Spectrum count
1,3-beta-glucanosiltransferase	48140.3	0.007935122	156
1,3-beta-glucanosiltransferase	50780.5	0.001924437	39
1,3-beta-glucanosiltransferase Bgt1	33045.2	0.011811624	156
1,3-beta-glucosaniiltransferase gel1	48029.4	0.017575386	344
1,3-beta-glucosaniiltransferase gel2	51667.1	0.001798842	37
1,3-beta-glucosiltransferase gel4	58817	0.00311843	74
3-isopropilmalato desidrogenase	38963.2	0.000378578	6
3-isopropilmalato desidrogenase	39006.2	0.00050477	8
5-metiltetrahidropteroiltriglutamato--homocisteína S-metiltransferase	86810.4	0.004445598	149
Aconitato hidratase, mitocondrial	83581.2	5.99824E-05	2
Aconitato hidratase, mitocondrial	85457.2	5.86868E-05	2
Álcool desidrogenase contendo zinco	36901.1	0.000202572	3
Álcool desidrogenase contendo zinco putativo	37454.3	0.000199653	3
Álcool isoamílico oxidase contendo FAD / FMN	61309.2	0.003518585	87
Aldose 1-epimerase putativa	50683.4	0.000451824	9
Alérgeno Asp f 15	15915.6	0.014737133	97
Alérgeno Asp f 7	27446.4	0.000342122	4
Alérgeno Asp F13	15985.8	0.008811894	58
Alérgeno do tipo Asp F7	27214.2	0.000259475	3
Alérgeno principal Asp F1	19563.8	0.012727524	97
Alfa-1,2-Manosidase	55257.2	0.00408608	89
Alfa-galactosidase	56271.8	0.002255199	50
Alfa-galactosidase	48990.9	0.000671615	13
Alfa-galactosidase	52634.9	0.000288065	6
Alfa-glucosidase AgdA	108421.3	0.000958323	41
Alfa-glucosidase putativa AgdA	110862.2	0.000571615	25
Amidase	64979.6	0.000188979	5
Aminotransferase, class V	41805.7	0.000239308	4
Aspartato-semialdeído desidrogenase	39358.1	0.000190853	3
Aspartato-semialdeído desidrogenase	39387.2	0.000190853	3
Aspartic endopeptidase Pep1	41683.7	0.008652657	148
Aspergillopepsina	28960.3	0.003418133	41
Aspergillopepsina	29041.4	0.002084227	25
Aspergillopepsina	27978.7	0.000257545	3
Aspergillopepsina-1	41569.5	0.013622088	233
Asp-hemolisina	15171.2	0.005648706	34
Beta-frutofuranosidase	57209.6	0.0141974	316

Beta-frutofuranosidase putativa	57192.6	0.00947991	211
Beta-galactosidase B putativa	111346.2	4.55938E-05	2
Beta-glucosidase	91874.6	0.00188572	69
Beta-glucosidase secretada sun1	43458.9	0.000669369	12
Beta-hexosaminidase	70882.5	3.65978E-05	1
Beta-hexosaminidase	67363.5	0.000115466	3
Beta-xilanase	34083.4	0.001765088	24
Beta-xilanase	41934.4	0.000290847	5
Beta-xilanase	42091.5	0.001919589	33
BSA	69207.4	0.000114135	3
Cadeia pesada putativa de miosina de classe II	275414.6	0.000767002	83
Carboxipeptidase	61510.9	8.35199E-05	2
Carboxipeptidase	52519.5	0.000630698	13
Carboxipeptidase	59696.2	8.60083E-05	2
Carboxipeptidase	61221.8	8.3823E-05	2
Carboxipeptidase S1	54070	0.000662511	14
Catalase	79853.1	0.006249132	197
Catalase B	79843	0.007391106	233
Celulase extracelular CelA/alérgeno do tipo Asp F7	35535.3	0.000335658	5
Celulase extracelular putativa CelA	33791.4	0.000139116	2
Chaperona molecular Hsp70	69599.6	0.000144785	4
Chaperona molecular Mod-E/Hsp90	80355.2	0.000229295	7
Citidina deaminase	14919.2	0.000491346	3
Citocromo b5	23878.5	0.000638523	6
Citocromo b5 putativo	14702.2	0.001011383	6
Concanavalina do tipo A lectina/glucanase	41800.8	0.000349016	6
Coproporfirinogênio III oxidase	50129	5.24846E-05	1
Coproporfirinogênio III oxidase putativo	41904.7	6.25833E-05	1
Dipeptidil peptidase secretada	79493.5	0.000384354	12
Dipeptidil-peptidase 5	79677.6	0.000960884	30
Endo-1,3-beta-glucanase Eng11	100331.3	4.94502E-05	2
Endo-1,3-beta-glucanase Eng11	104901.8	4.74194E-05	2
Endo-1,4-beta-xilanase C	35181	0.001421122	20
Endo-arabinase putative	35574.3	0.000427653	6
Endo-beta-1,4-glucanase D	33730.5	0.004000956	57
Endoglucanase	38341.5	0.000495297	8
Endoglucanase	54337.6	4.56388E-05	1
Endoglucanase	31607.3	0.000557423	7
Endopeptidase do tipo aspártico	67825.7	0.00068773	19
Endo-poligalacturonase extracelular	37626.6	0.000190329	3

Endoquitinase B1	47574.4	0.000479998	9
Endo-quitosanase	34811.3	0.00087271	13
Endo-quitosanase	35099.5	0.001006973	15
Enolase	47258.3	0.000579967	11
Enolase/alérgeno Asp F 22	47297.3	0.000579967	11
Enzima lactonizing 3-carboxy-cis, cis-mucoante	41420.6	0.010309482	175
Exo-beta-1,3-glucanase	86653.5	0.001969634	69
Exo-beta-1,3-glucanase	82442.9	0.000444671	15
Exo-beta-1,3-glucanase	84113.2	0.001378701	48
Exo-beta-1,3-glucanase Exg0	97264.8	0.00050477	20
Exo-beta-1,3-glucanase Exg0	100540.3	0.001609455	66
Exo-beta-1,3-glucanase putativa	84066.3	0.001263809	44
Exo-beta-1,3-glucanase putativa	86311.4	0.000713635	25
Família de adenosina deacinaase CECR1 putativa	65802.1	0.000321857	8
Família de proteína endonuclease/exonuclease/fosfatase	64206.1	0.002510962	66
Família de proteína endonuclease/exonuclease/fosfatase	64040.1	0.009298268	244
Fator de iniciação da tradução eucariótica eIF-5A	21132.2	0.004570537	38
Fosfoglicerato mutase, independente de 2,3-bisfosfoglicerato	57384.9	0.000710561	16
Fosfoglicerato mutase, independente de 2,3-bisfosfoglicerato	57400	0.001021432	23
Frutose-bifosfato aldolase classe II	39747.9	0.00089807	14
Galactomanoproteína parede celular rica em serina-treonina Mp1	27326.9	0.003821769	47
Gama-glutamiltanspeptidase	53568	0.000140812	3
Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase	36261.6	0.0018502	27
Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase	36273.6	0.002596281	38
Glicosidase	46539.9	0.000625551	12
Glicosídeo hidrolase	36715	0.005153576	79
Glicosídeo hidrolase	47287.4	0.006943066	138
Glicosil hidrolase família 61	39154	6.06122E-05	1
Glicosil hidrolase putativa família 18	46395	0.001192609	22
Glucano endo-1,6-beta-glucosidase B putativa	44796.6	0.000635064	11
Glucoamilase	67040.5	0.001061337	29
Glucooligossacarídeo oxidase	51425.7	0.003881217	80
Glucose-6-fosfato isomerase	61401.1	0.000751679	18
Glucose-6-fosfato isomerase	61259.1	0.001879197	45

Glucosilacarídeo oxidase putativo	51403.7	0.000921789	19
Glutaminase GtaA	75956.1	0.002005202	60
Glutaminase GtaA	76081.9	0.002138882	64
Glutaciona redutase	60149.4	0.000416845	10
Glutaciona redutase	51285.5	0.000489264	10
Hidrolase putativa da família alpha/beta	31951.7	0.004191581	53
Hidrofobina	14290.2	0.000659807	4
Hidrolase da família Alfa/beta fold putativa	92674.2	0.000495445	18
Hidrolase da família Alpha / beta fold putativa	31810.4	0.011704793	148
Hidrolase peptídica	53178.2	0.001489886	32
Hidrolase peptídica	49303.8	0.006454006	128
Hidrolase peptídica	56649.1	0.001806914	41
Inibidor de elastase AFUEI	9388.7	0.001592637	6
Isoamil álcool oxidase	60463.5	0.001312582	32
Isoamil álcool oxidase	111675.5	8.89056E-05	4
Lacase abr2	65229.8	0.000157364	4
Lactoilglutaciona liase	33300.4	0.000634866	8
Lactoilglutaciona liase	36489	0.000580962	8
L-asparaginase	42129.2	0.000287946	5
L-asparaginase	39741	0.008043028	132
Lisofosfolipase	68197.2	0.000218893	6
Lisofosfolipase 1	68082.9	0.000218893	6
Mannano endo-1,4-beta-manosidase F	47279.5	0.00147628	28
Metaloproteinase extracelular mep	68647.5	0.000364247	10
Metionina sintetase independente da cobalamina MetH / D	86822.5	0.004356089	146
Mio-inositol-fosfate sintase	58616.6	0.000129737	3
Mio-inositol-fosfato sintase putativa	58541.3	0.000129737	3
Mitogilina ribonuclease	19564.8	0.012596313	96
Nucleosídeo difosfato quinase	16875.7	0.009358045	62
Nucleosídeo difosfato quinase	16903.7	0.012225833	81
Oxigenase dependente de FAD	54974	0.015167749	333
Oxirredutase ligada ao FAD fmqD	54497.8	0.000836375	18
Pectato liase putativa	37732.2	0.001145119	18
Pectato putativo	33749.9	0.000215825	3
Pectina liase A putativa (Fragmento)	39341.3	0.00018328	3
Pectina liase B	39008	0.001108476	18
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	17692	0.000850058	6
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	17711.9	0.002550174	18

Peptidil-prolil cis-trans isomerase Cpr7 putative	41124.7	6.19122E-05	1
Peptidil-prolil cis-trans isomerase D	41764.1	6.12553E-05	1
Polibiuquitina UbiD / Ubi4	35159.7	0.000294181	4
Poliubiquitina putativa	34237.3	0.000302862	4
Protease ácida	58009.7	0.000632114	15
Protease alcalina 1	42146.4	0.006417972	112
Protein ecm33	41461.8	0.009979993	172
Proteína da família 14-3-3 ArtA putativa	29095.6	0.002035036	23
Proteína da família 14-3-3 ArtA	29065.6	0.002035036	23
Proteína da família adenosina desaminase	66281.3	0.001455622	37
Proteína da família adenosina desaminase	66187.2	0.004642253	118
Proteína da família alfa-1,2-manosidase	89348.2	2.82659E-05	1
Proteína da família alfa-1,2-manosidase putativa	91126.5	0.000364335	13
Proteína da família de repetição PT	223887.6	3.19261E-05	3
Proteína da família fosfoglicerato mutase	20764.3	0.000243087	2
Proteína da família Glicerofosforil diéster fosfodiesterase	46370.4	0.000379466	7
Proteína da parede celular	19242.9	0.001924437	15
Proteína da parede celular PhiA	19376.3	0.004618648	37
Proteína de biossíntese de tiamina (Nmt1)	38280.4	0.000540193	8
Proteína de choque térmico 90 Hsp90	80572.3	0.00022897	7
Proteína de domínio La de ligação de RNA	44509.7	0.000232093	4
Proteína de ligação a IgE	20512.7	0.002078392	18
Proteína de ligação a IgE	20456.7	0.00577331	50
Proteína de ligação a IgE	21139.4	0.000682559	6
Proteína de ligação a quitina	29778.1	0.009476192	119
Proteína de organização de parede celular ancorada por GPI Ecm33	41352.8	0.001856743	32
Proteína de parede celular ancorada à GPI	39538.6	0.014119183	236
Proteína dissulfeto-isomerase	56207	0.000312071	7
Proteína dissulfeto-isomerase	56134	0.000312674	7
Proteína do domínio de ligação FAD	60336.3	0.000615273	15
Proteína do domínio de ligação FAD	55481.7	0.001210714	27
Proteína do domínio de ligação FAD	61256.2	0.000122836	3
Proteína do domínio de ligação FAD	54607.6	0.002687379	59

Proteína do domínio NPP1	24548.7	0.000296067	3
Proteína do domínio NPP1	24523.8	0.000296067	3
Proteína do domínio SUN putativo	42118.3	0.00068764	12
Proteína do domínio taumatina antigênico	17320.2	0.025167483	182
Proteína do domínio UPF0047	18272.2	0.000141676	1
Proteína do domínio UPF0047	16293.2	0.00016037	1
Proteína do domínio WW	28355.9	0.000912776	10
Proteína do tipo pectina liase	53412.9	9.50339E-05	2
Proteína extracelular	74483.7	0.000557649	17
Proteína extracelular de taumatina	18695.5	0.002609406	20
Proteína extracelular do domínio taumatina	18704.7	0.000913292	7
Proteína extracelular putativa do tipo SCP	32628.5	0.002092591	28
Proteína extracelular rica em serina	85412.4	0.001268543	44
Proteína extracelular tipo SCP	33780	0.002020658	28
Proteína extracelular rica em serina-treonina	26483	0.005469452	63
Proteína não caracterizada	21076.2	0.00650198	58
Proteína não caracterizada	17186.7	0.000301872	2
Proteína não caracterizada	19457.3	0.001990797	15
Proteína não caracterizada	39908.6	0.010898595	185
Proteína não caracterizada	27002.3	0.004085727	46
Proteína não caracterizada	9961.6	0.002142672	9
Proteína não caracterizada	49525	4.95563E-05	1
Proteína não caracterizada	35032.8	0.000217861	3
Proteína não caracterizada	28055.6	0.000968947	12
Proteína não caracterizada	35273	0.000227894	3
Proteína não caracterizada	74752.3	0.000639609	19
Proteína não caracterizada	27939.6	0.000920049	10
Proteína não caracterizada	22977.3	0.002352089	22
Proteína não caracterizada	29205.8	0.00995539	122
Proteína não caracterizada	39843.9	0.00109389	18
Proteína não caracterizada	18220	0.000412379	3
Proteína não caracterizada	21910	0.000685938	6
Proteína não caracterizada	21387	0.012765107	110
Proteína não caracterizada	85777.5	0.000273833	9
Proteína não caracterizada	25820.9	0.004046251	41
Proteína não caracterizada	20211.9	0.00207717	17
Proteína não caracterizada	95530	7.94492E-05	3
Proteína não caracterizada	14737.7	0.000491346	3
Proteína não caracterizada	10125	0.001282958	5
Proteína não caracterizada	24083.6	0.006132645	64

Proteína não caracterizada	23699.8	0.013897742	133
Proteína não caracterizada	42581.1	0.00110494	20
Proteína não caracterizada	11749.6	0.013507367	62
Proteína não caracterizada	49079.7	0.000101957	2
Proteína não caracterizada	10161.9	0.000714224	3
Proteína não caracterizada	20457.1	0.00037048	3
Proteína não caracterizada	42225	0.013625012	236
Proteína não caracterizada	30046.4	0.014763178	179
Proteína não caracterizada	14862.6	0.000505691	3
Proteína não caracterizada	31600.3	0.002503113	31
Proteína não caracterizada	49421	0.002725928	53
Proteína não caracterizada	41956.2	6.14182E-05	1
Proteína não caracterizada	14871.9	0.002496566	16
Proteína não caracterizada	15909.8	0.02293287	143
Proteína não caracterizada	18519	0.004425052	32
Proteína não caracterizada	17037.7	0.001660298	11
Proteína não caracterizada	23346.5	0.001942422	18
Proteína não caracterizada	36539.4	0.00228323	35
Proteína não caracterizada	22012.9	0.005181898	46
Proteína não caracterizada	20348	0.015679094	129
Proteína não caracterizada	42757.1	0.001270681	23
Proteína não caracterizada	32341	0.003374012	45
Proteína não caracterizada	32553.7	0.00110721	14
Proteína não caracterizada	12105.6	0.003813563	18
Proteína não caracterizada	9881.6	0.002142672	9
Proteína não caracterizada	22901.2	0.003955786	37
Proteína não caracterizada	25987.8	0.015987628	162
Proteína não caracterizada	23716.6	0.002676041	27
Proteína não caracterizada	37141.1	0.018168457	273
Proteína não caracterizada	18562.6	0.002099385	16
Proteína não caracterizada AFUA_6G02800	24574.8	0.003626211	38
Proteína putativa de biossíntese de tiamina	38302.4	0.000540193	8
Proteína ribossomal 40S S0	30357.3	0.000742283	9
Proteína ribossomal 40S S0	32084.2	0.000699795	9
Proteína ribossomal 60S L5	35443.2	0.00037489	5
Proteína rica em serina-treonina ancorada à GPI	24551.4	0.000288665	3
Proteína rica em serina-treonina ancorada à GPI	25450.9	0.000831357	9
Provável alfa-galactosidase B	49153.2	0.001859858	36
Provável arabino endo-1,5-alfa-L- arabinosidase C	35023.6	0.000215825	3

Provável beta-galactosidase B	111593.3	4.55039E-05	2
Provável beta-glucosidase A	94675.7	0.002274935	86
Provável endo-beta-1,4-glucanase D	35694.2	0.006219956	94
Provável endopoligalacturonase B	37649.7	0.000190329	3
Provável glicosidase crf1	40241.2	0.000526175	9
Provável glicosidase crf2	46663.1	0.001355359	26
Provável glucano 1,3-beta-glucosidase A	45640.3	0.000166538	3
Provável glucano endo-1,3-beta-glucosidase eglC	44605.9	0.01045927	202
Provável glucano endo-1,6-beta-glicosidase B	44748.6	0.000641479	11
Provável leucina aminopeptidase 2	54163	0.006545389	142
Provável manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B	53788.5	0.013303205	284
Provável pectato Liase A	33782.9	0.002446013	34
Provável pectina Liase A	39740.7	0.00036463	6
Provável pectinesterase A	34517.8	0.000570203	8
Putative extracellular guanil-específica ribonuclease T1	13871.6	0.016394437	93
Quitinase classe III	46187	0.000773211	15
Quitinase classe V	46446.2	0.003089941	57
Quitinase classe V	49047	0.000667138	13
Quitinase classe V putativa	49024	0.000410546	8
Ribonuclease guanil-específica extracelular RntA	14005.6	0.023622093	134
Ribonuclease T2	29246.7	0.001762843	20
Ribonuclease T2 Putativa	31539.8	0.001206964	15
Ribose 5-fosfato isomerase A	28412.1	0.000339606	4
Ribose 5-fosfato isomerase A	28341	0.000339606	4
Serina carboxilpeptidase extracelular	64183.8	0.000322982	8
Serina peptidase	58521.3	0.003255047	74
Serina peptidase putativa	58709.4	0.001187652	27
Serina protease alcalina Alp1	42056.3	0.00120337	Asp f15
Sulfidril oxidase	25745.9	0.00019908	2
Superoxido dismutase [Cu-Zn]	15880.8	0.026092362	174
Superoxido dismutase [Cu-Zn]	15938.9	0.037489026	250
Tiorredoxina redutase	42805.7	0.022853932	382
Tiorredoxina redutase citoplasmática putativa	42785.8	0.004475434	75
Tiorredoxina redutase putativa	42102.3	0.019568482	322
Transportador de zinco ZIP	54148	0.000132975	3
Transportador de zinco ZIP putativo	52655.3	0.000136916	3
Triosefosfate isomerase	27213.4	0.001662713	18

Triosefosfate isomerase	28032.7	0.001894367	21
Tripeptidil peptidase SED3	58546.9	0.000261433	6
Tripeptidil-peptidase putativa	65809.5	0.001227548	32
Tripeptidil-peptidase sed2	65779.6	0.002071487	54
Tripeptidil-peptidase sed3	65217.1	0.000271229	7
Ubiquitina (UbiC)	17643.5	0.000599824	4
Ubiquitina / 40S proteína ribossômica S27a fusão	17613.4	0.000599824	4
UPF0619 Proteína de membrana ancorada a GPI	21574.5	0.006959607	66

Legenda: *NSAF (Fator de abundância espectral normalizado)

8.4. Proteínas identificadas no biofilme e no secretoma com *fold change* significativo.

Tabela 5. Proteínas identificadas no biofilme com *fold change* significativo

Nome	<i>Fold Change</i>
Nucleoside difosfato quinase	2.38
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	2.38
Triosefosfato isomerase	2.66
Enolase/allergeno Asp F 22	3.35
Ribose 5-fosfato isomerase A	3.47
Triosefosfato isomerase	3.81
Enolase	4.13
Ribose 5-fosfato isomerase A	4.21
Fosfoglicerato mutase, 2,3-bisfosfoglicerato-independente	4.80
Glucose-6-fosfato isomerase	5.02
Fosfoglicerato mutase, 2,3-bisfosfoglicerato-independente	5.12
Glucose-6-fosfato isomerase	6.27
Proteína de biossíntese de tiamina (Nmt1) putative	10.86
Proteína de biossíntese de tiamina putativa	11.16

Tabela 6. Proteínas identificadas no secretoma com *fold change* significativo

Nome	<i>Fold change</i>
Isoamil álcool oxidase MreA contendo FAD/FMN	2.09
Fator de iniciação da tradução eucariótica eIF-5A	2.18
Oxigenase dependente de FAB putativa	2.21
Alérgeno Asp f 15	2.36
Endo-arabinase, putativa	2.41
Catalase	2.42
Tiorredoxina redutase, putative	2.42
Beta-xilanase	2.44
Glucooligossacarídeo oxidase putativa	2.51
Proteína não caracterizada (15 KDa)	2.59
1,3-beta-glucanosiltransferase	2.76
Tiorredoxina redutase putativa	2.84
Provável manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B	2.93
1,3-beta-glucanosiltransferase gel1	2.99
1,3-beta-glucanosiltransferase gel4	3.01
Proteína ecm33	3.01
Proteína da parede celular ancorada à GPI, putativa	3.16
Exo-beta-1,3-glucanase	3.22
Protease alcalina 1	3.29
Glicosídeo hidrolase	3.43
Proteína não caracterizada (39 KDa)	3.44

Peptídeo hidrolase	3.88
Tiorredoxina redutase citoplasmática putativa	3.90
Provável glucano endo-1,3-beta-glucosidase eglC	4.17
Proteína não caracterizada (25 KDa)	4.22
Proteína não caracterizada (22 KDa)	4.48
Proteína não caracterizada (23 KDa)	4.57
Glucopoligossacarídeo oxidase, putativa	4.88
Proteína não caracterizada (21 KDa)	4.92
Peptídeo hidrolase	4.96
Provável leucina aminopeptidase 2	5.24
Proteína extracelular rica em serina-treonina	5.28
Ribonuclease putativa T2	5.42
Proteína não caracterizada (49 KDa)	5.69
Peptídeo hidrolase	5.74
Beta-frutofuranosidase putativa	5.91
Proteína não caracterizada (29 KDa)	5.92
Proteína da família endonuclease/exonuclease/fosfatase	6.13
Proteína não caracterizada (25 KDa)	6.17
Beta-frutofuranosidase	6.45
Hidrolase da família alfa / beta	6.67
Proteína de ligação a quitina putativa	7.55
Proteína não caracterizada (56 KDa)	7.76
Exo-beta-1,3-glucanase, putative	7.88
UPF0619 proteína ancorada a GPI AFUA_3G00880	8.41
3-carboxi-cis,cis-mucoante enzima lactonizante	8.43
Proteína não caracterizada (24 KDa)	8.52
Proteína não caracterizada (21 KDa)	9.12
Provável endo-beta-1,4-glucanase D	9.56
Hidrolase da família alfa/beta, putativa	13.23
L-asparaginase	13.51
Proteína antigênica do domínio da taumatina, putativa	14.87
Endo-beta-1,4-glucanase D	16.00
Proteína não caracterizada (37 KDa)	17.57

Tabela 7. Proteínas identificadas no biofilme nas diferentes temperaturas com *fold change* significativo

Nome	<i>Fold change</i>	Temperatura
Proteína não caracterizada (18 KDa)	1.99	28°C
Triosefosfato isomerase	2.00	28°C
Transaldolase	2.03	28°C
Beta-frutofuranosidase, putativa	2.21	28°C
Proteína não caracterizada (11 KDa)	2.47	28°C
Transaldolase	2.48	28°C

Peptidilprolil isomerase	2.56	28°C
Proteína 1A de ligação ao FK506	2.62	28°C
Proteína da família nitroreductase, putativa	2.82	28°C
Provável Xaa-Pro aminopeptidase P	2.87	28°C
Treonina sintase Thr4, putativa	3.15	28°C
Argininosuccinato liase	3.31	28°C
Metionina sintase independente de cobalamina MetH/D	3.44	28°C
Argininosuccinato liase	3.47	28°C
Cianato hidratase	3.83	28°C
Cianato hidratase	3.93	28°C
12-oxofitodienoato redutase putativa	4.33	28°C
12-oxofitodienoato redutase	4.98	28°C
Fosfoglucomutase PgmA	6.27	28°C
Fosfoglucomutase	8.93	28°C
Frutose-bisfosfato aldolase, class II	14.14	28°C
Mio-inositol-fosfato sintase, putativo	14.89	28°C
Mio-inositol-fosfato sintase, putativo	16.41	28°C
Frutose-bifosfato aldolase, class II	22.27	28°C
Ubiquitina UbiA, putativa	2.52	37°C
Galactomanoproteína da parede celular rica em serina-treonina Mp1	2.76	37°C
Tioredoxina redutase, putativa	2.84	37°C
Poliubiquitina putativa	2.97	37°C
1,3-beta-glucanosiltransferase gel1	3.01	37°C
Tioredoxina redutase putativa	3.17	37°C
Proteína não caracterizada (39 KDa)	3.25	37°C
1,3-beta-glucanosiltransferase	3.39	37°C
Alfa-1,2-Manosidase	3.45	37°C
Alérgeno Asp f 15	3.51	37°C
Isoamil álcool oxidase contendo FAD/FMN MreA	4.15	37°C
Provável manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B	4.42	37°C
Proteína de domínio WW (28 KDa)	10.83	37°C

Tabela 8. Proteínas identificadas no secretoma nas diferentes temperaturas com *fold change* significativo

Nome	<i>Fold change</i>	Temperatura
Proteína de ligação à quitina, putativa	2.23	28°C
Possível hidrolase da família alfa/beta	2.53	28°C
Proteína não caracterizada (29 KDa)	3.39	28°C
Proteína não caracterizada (21 KDa)	3.39	28°C
Proteína extracelular rica em serina-treonina	3.69	28°C
Proteína não caracterizada (37 KDa)	3.73	28°C
Beta-frutofuranosidase, putativa	6.15	28°C

Proteína da família endonuclease/exonuclease/fosfatase	7.09	28°C
Metionina sintase independente de cobalamina MetH/D	9.83	28°C
Beta-frutofuranosidase putativa	11.19	28°C
Tioredoxina redutase citoplasmática putativa	2.17	37°C
Provável manosil-oligossacarídeo alfa-1,2-manosidase 1B	2.18	37°C
Tioredoxina redutase, putativa	2.35	37°C
Proteína não caracterizada (42 KDa)	2.39	37°C
Proteína ecm33	2.47	37°C
Glicosil hidrolase, putativa	2.73	37°C
Protease alcalina 1	2.78	37°C
Tioredoxina redutase putativa	2.87	37°C
Superóxido dismutase [Cu-Zn]	3.01	37°C
Proteína não caracterizada (20 KDa)	3.77	37°C
Enzima lactonizante 3-carboxi-cis, cis-mucoante	3.85	37°C
Quitinase classe V, putativa	4.58	37°C
Difosfato quinase de nucleosídeo	5.04	37°C
Difosfato quinase de nucleosídeo	5.64	37°C
Proteína não caracterizada (99 KDa)	5.94	37°C
Proteína não caracterizada (20 KDa)	18.89	37°C