

Eduardo Victor Cunha do Amaral

Caracterização de vesículas extracelulares produzidas por
isolados clínicos do fungo *Candida auris*



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2024**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Leonardo Nimrichter e coorientação do Dr. Alessandro Fernandes Valdez.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

485c Amaral, Eduardo Victor Cunha do
 Caracterização de vesículas extracelulares
 produzidas por isolados clínicos do fungo *Candida*
 auris / Eduardo Victor Cunha do Amaral. -- Rio de
 Janeiro, 2024.
 38 f.

 Orientador: Leonardo Nimrichter.
 Coorientador: Alessandro Fernandes Valdez.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2024.

 1. Infecções fúngicas. 2. *Candida*. 3. Vesículas
 extracelulares. 4. Virulência. I. Nimrichter,
 Leonardo, orient. II. Fernandes Valdez, Alessandro,
 coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): EDUARDO VICTOR CUNHA DO AMARAL DRE: 119017780

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Daniela Sales Alviano Moreno (Presidente da Banca)
 Prof. Livia de Souza Ramos
 Prof. Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto
 Prof. Dirlei Nico (Suplente)

Título da Monografia: "Caracterização de vesículas extracelulares produzidas por isolados clínicos do fungo *Candida auris*"

Local: Sala E-44, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 09 de dezembro de 2024 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 09 de dezembro de 2024.

NOTA:	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>Daniela Sales Alviano Moreno</u> Prof. Daniela Sales Alviano Moreno (Presidente da Banca)
<u>10,0</u>	<u>Livia de Souza Ramos</u> Prof. Livia de Souza Ramos
<u>10,0</u>	<u>Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto</u> Prof. Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto
	<u>Prof. Dirlei Nico (Suplente)</u>
Aluno(a):	<u>Eduardo Victor Cunha do Amaral</u> Eduardo Victor Cunha do Amaral
Orientador(a) (e coorientador):	<u>Leonardo Nimrichter</u> <u>Alessandro F. Valdez</u> Prof. Leonardo Nimrichter e Alessandro Fernandes Valdez
Coordenadora de TCC:	<u>Marinella Silva Laport</u> Prof. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais Rosane e Marcelo e a meu irmão Marcelo Victor, que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida. Meus pais nunca me deixaram parar de acreditar em mim mesmo e no caminho da educação. Meu irmão sempre esteve comigo tanto como um amigo tanto como um mentor nesse caminho. Só tenho a agradecer por sempre me apoiarem e aguentarem fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador Leonardo, que me acolheu em um momento esquisito da vida e não desistiu de mim. Agradeço imensamente por ter sido muito compreensível comigo, tendo me aceitado e orientado nesse período. Fico muito feliz de ter essa oportunidade de fazer parte do laboratório e de extrair tanto conhecimento do excelente profissional que você é. Agradeço pelos momentos descontraídos dentro e fora da dinâmica de trabalho do laboratório, que muitas vezes tornam mais leve o decorrer dos dias.

Ao meu coorientador Alessandro, obrigado por todo conhecimento que você me ensinou nesse período, e por todos os conselhos que você me deu sobre a vida profissional. Você foi uma peça essencial nessa trajetória, sempre me deixando participar das atividades do laboratório desde o início e me explicando como funcionavam. Obrigado pela companhia de almoço e pelas conversas, tanto sobre assuntos do laboratório quanto sobre outros assuntos. Agradeço imensamente pela sua orientação tanto no entendimento de protocolos quanto na minha escrita e nas minhas apresentações, sempre me impulsionando a melhorar sem perder a paciência.

A todos os membros do LAGE. Agradeço pelo convívio diário, pela boa disposição de todos em sempre ajudar e pelo impacto profissional que vocês tiveram na minha jornada. Agradeço em especial as amizades que fiz, sejam elas próximas ou não mas que espero manter por mais tempo: Camilla, Larissa, Anna Letícia, Alessandro, Vanessa, Clara e Bruna. Vocês foram parte crucial da minha jornada.

A meus amigos da graduação: Pedro, Isabela, Matheus, Ralice, Renan, Stefanie, Athirson e Vinicius. Obrigado pelo carinho, ajuda, risadas e convivência durante essa jornada. Foi ótimo estar ao lado de vocês durante esse período essencial para definir nossas vidas. Vocês tornaram esse caminho muito menos tortuoso e difícil, espero que continuemos juntos ao longo de nossas vidas.

As agências brasileiras que financiaram este estudo CNPq, FAPERJ e CAPES.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

RESUMO

EDUARDO VICTOR CUNHA DO AMARAL

CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DO FUNGO *Candida auris*

Orientador: Leonardo Nimrichter

Coorientador: Alessandro Fernandes Valdez

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os patógenos do gênero *Candida* são os agentes de infecções oportunistas mais comuns ao redor do mundo. Embora as doenças fúngicas mais comuns sejam as infecções superficiais de unha e pele, esses patógenos fúngicos são capazes de causar infecções graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos em instalações médicas. Dentre esses fungos, destaca-se a espécie *Candida auris*, um patógeno emergente de alta relevância clínica devido à sua resistência a múltiplos antifúngicos e capacidade de transmissão em ambientes hospitalares. Essa espécie tem sido associada a surtos em unidades de saúde, causando infecções invasivas com elevadas taxas de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Diante deste panorama, investigar e compreender os fatores de virulência produzidos por este patógeno, como as vesículas extracelulares (VEs), é de suma importância para o desenvolvimento de formas de prevenção e tratamento de suas infecções. As VEs são estruturas formadas por uma bicamada lipídica e que podem carrear diversas biomoléculas, com os mais diversos papéis. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e comparar VEs de oito cepas clínicas de *C. auris*, investigando aspectos como tamanho, concentração, conteúdo proteico e lipídico, e seu papel na virulência do fungo. A caracterização morfológica das VEs foi realizada utilizando técnicas como rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados revelaram que o tamanho das VEs variou de 15 a 600 nm, com maior concentração de partículas entre 15 e 200 nm. Análises do conteúdo proteico e lipídico indicaram diferenças entre as cepas refletindo a diversidade das vesículas produzidas. Além disso, a relação proteína/esterol foi analisada, apresentando variações que podem influenciar a patogenicidade das cepas. Ensaio *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* revelaram que a cepa MMC2 destacou-se pela maior virulência, enquanto as demais apresentaram taxas variadas de sobrevivência das larvas. Quando as VEs foram co-injetadas com as cepas, observou-se aumento significativo na virulência da cepa MMC1, mas sem alteração relevante para a MMC2. Esses achados sugerem que as VEs podem desempenhar papéis distintos na dinâmica da infecção, dependendo da cepa e do momento da interação. Os dados obtidos reforçam o impacto das VEs na virulência de *C. auris* e ressaltam sua complexidade biológica. As variações nos tamanhos, composições e efeitos observados destacam a necessidade de investigações adicionais para compreender os mecanismos pelos quais as VEs modulam a patogenicidade. A pesquisa também aponta o potencial das VEs como alvos terapêuticos e sua possível aplicação no desenvolvimento de estratégias vacinais. Embora os resultados avancem no entendimento do papel das VEs em *C. auris*, estudos futuros são necessários para aprofundar a compreensão de suas funções biológicas e explorar suas

aplicações na prevenção e tratamento de infecções fúngicas causadas por esse patógeno multirresistente.

Palavras-chave: Infecções fúngicas; *Candida*; Vesículas extracelulares; Virulência;

ABSTRACT

EDUARDO VICTOR CUNHA DO AMARAL

**CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES PRODUCED BY
CLINICAL ISOLATES OF THE FUNGUS *Candida auris*****Advisor:** Leonardo Nimrichter**Co-advisor:** Alessandro Fernandes Valdez

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Pathogens of the genus *Candida* are the most common agents of opportunistic infections worldwide. Although the most common fungal diseases are superficial nail and skin infections, these fungal pathogens are capable of causing invasive infections, especially in immunocompromised individuals in healthcare facilities. Among these fungi, *Candida auris* stands out as an emerging pathogen of high clinical relevance due to its resistance to multiple antifungals and ability of transmission in hospital environments. This species has been associated with outbreaks in healthcare facilities, causing invasive infections with high mortality rates, especially in immunocompromised patients. Given this scenario, investigating and understanding the virulence factors produced by this pathogen, such as extracellular vesicles (EVs), is of paramount importance for the development of ways to prevent and treat its infections. Extracellular vesicles are structures composed of a lipid bilayer that can carry several molecules, with diverse roles for fungi. In this context, the aim of this study was to isolate and compare extracellular vesicles from eight clinical strains of *C. auris*, investigating aspects such as size, concentration, protein and lipid content, and their role in fungal virulence. Morphological characterization of EVs was performed using techniques such as nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM). The results revealed that EVs ranged in size from 15 to 600 nm, with a higher concentration of particles between 15 and 200 nm. Protein and lipid content analyses indicated differences among the strains, reflecting the diversity of the vesicles produced. In addition, the protein/sterol ratio was analyzed, showing variations that may influence the pathogenicity of the strains. In vivo assays in *Galleria mellonella* larvae revealed that the MMC2 strain stood out for its greater virulence, while the others presented varied larval survival rates. When EVs were co-injected with the strains, a significant increase in the virulence of the MMC1 strain was observed, but no relevant change for MMC2. These findings suggest that EVs may play distinct roles in the infection dynamics, depending on the strain and the time of interaction. The data obtained reinforce the impact of EVs on the virulence of *C. auris* and highlight its biological complexity. The variations in sizes, compositions and effects observed highlight the need for further investigations to understand the mechanisms by which EVs modulate pathogenicity in *C. auris*. The research also points to the potential of EVs as therapeutic targets and their possible application in the development of vaccine strategies. Although the results advance the understanding of the role of EVs in *C. auris*, future studies are needed to deepen the understanding of their biological functions and explore their applications in the prevention and treatment of fungal infections caused by this multidrug-resistant pathogen.

Key-words: Fungal Infections; *Candida*; Extracellular Vesicles; Virulence

RESUMO PARA LEIGOS

EDUARDO VICTOR CUNHA DO AMARAL

CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DO FUNGO *Candida auris*

Orientador: Leonardo Nimrichter

Coorientador: Alessandro Fernandes Valdez

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os fungos são organismos microscópicos que se apresentam em diversos ambientes. *Candida* é considerado um gênero fúngico, que pode apresentar diferentes subtipos, classificados como diferentes “espécies”. Algumas dessas espécies, como por exemplo *Candida albicans* podem ser encontradas em diferentes partes dos seres humanos, geralmente sem causar danos. No entanto, quando há um desequilíbrio nos sistemas de defesa do corpo, estes fungos conseguem crescer com mais facilidade e são capazes de causar doenças. Microrganismos do gênero *Candida* são os causadores de doenças oportunistas mais comuns ao redor do mundo. Embora as doenças fúngicas mais comuns sejam as infecções superficiais de unha e pele, esses patógenos fúngicos são capazes de causar infecções graves, principalmente em indivíduos apresentando desequilíbrio nos sistemas de defesa de seu corpo. Dentro do gênero *Candida*, a espécie *Candida auris* se apresenta como um grave risco no contexto hospitalar, já que é de difícil tratamento, e de difícil remoção de superfícies. Essa espécie possui diferentes formas de garantir o sucesso de uma infecção, prolongando sua sobrevivência no ser humano. Um dos fatores que pode influenciar no decorrer de infecções causadas por este patógeno é a produção de vesículas extracelulares (VEs). As VEs são compartimentos bem menores do que as células fúngicas e que carregam fatores essenciais para diversos mecanismos realizados pelos fungos, como por exemplo os mecanismos de resistência a medicamentos. Os resultados obtidos aqui revelaram o tamanho das VEs produzidos pela espécie *C. auris*, parte de seus componentes e como essas estruturas influenciam a infecção causada por este fungo em larvas de mariposa. Esses achados sugerem que as VEs podem desempenhar papéis distintos na dinâmica da infecção. Os dados obtidos reforçam o papel das VEs de *C. auris* e ressaltam sua complexidade biológica. As variações nos tamanhos, composições e efeitos observados destacam a necessidade de investigações adicionais para compreender os mecanismos pelos quais as VEs modulam a doença causada por este fungo. A pesquisa também aponta o potencial das VEs como alvos terapêuticos e sua possível aplicação no desenvolvimento de estratégias vacinais. Embora os resultados avancem no entendimento do papel das VEs em *C. auris*, estudos futuros são necessários para aprofundar a compreensão de suas funções biológicas e explorar suas aplicações na prevenção e tratamento de infecções fúngicas causadas por esse patógeno multirresistente.

Palavras-chave: Fungos; *Candida*; Vesículas extracelulares;

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA LEIGOS	xi
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Infecções fúngicas	13
1.2 Gênero <i>Candida</i>	14
1.3 <i>Candida auris</i>	15
1.3.1 Surgimento e Epidemiologia.....	15
1.3.2 Características morfológicas.....	16
1.3.3 Tratamento e mecanismo de resistência a antifúngicos.....	17
1.3.4 Biofilme e outros fatores de virulência.....	19
1.4 Vesículas extracelulares fúngicas.....	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Microrganismos utilizados e condição de crescimento.....	24
4.2 Isolamento e quantificação de vesículas extracelulares.....	24
4.3 Dosagens de proteína e esterol das vesículas extracelulares.....	24
4.4 Análise de Rastreamento de Partículas.....	25
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	25
4.6 Ensaio de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Caracterização morfológica e composição das vesículas extracelulares.....	26
5.2 Ensaio de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	30
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas

As infecções causadas por patógenos fúngicos tem se mostrado um problema crescente em relação a saúde pública mundial, podendo se apresentar como infecções superficiais ou invasivas (Brown *et al.*, 2012; Bongomin *et al.*, 2017). Apesar das infecções fúngicas superficiais (IFS) apresentarem alta prevalência, estas são as menos prejudiciais para o hospedeiro. Por outro lado, infecções fúngicas invasivas (IFI) ocorrem em menor frequência, porém estão relacionadas a altos índices de mortalidade e morbidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Brown *et al.*, 2012). Além disso, IFI estão associadas a frequentes dificuldades de diagnóstico e a um espectro restrito de opções de tratamento clínico (Nett e Andes, 2016; Kischkel *et al.*, 2020; Valdez *et al.*, 2023). É estimado que cerca de 300 milhões de pessoas são afetadas por doenças fúngicas todos os anos, das quais 6,5 milhões de pessoas correm risco de vida resultando em aproximadamente 3,7 milhões de mortes, das quais 2,5 milhões tem sua causa atribuída diretamente aos fungos (Denning, 2024). As infecções fúngicas invasivas mais comuns são as causadas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Pneumocystis* (Denning, 2024).

As elevadas taxas de incidência, mortalidade e morbidade apresentadas ao se analisar IFI acompanham, em grande parte, o aumento contínuo da população com fatores de risco. Esse grupo inclui pacientes acometidos por doenças como a doença pulmonar obstrutiva crônica, COVID-19, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), entre outros (Badiee e Hashemizadeh, 2014; Fang *et al.*, 2023). Além disso, é importante ressaltar como fatores que levam a observação do aumento da população em risco de contrair alguma infecção fúngica invasiva, os recentes avanços da medicina moderna e da acessibilidade a procedimentos invasivos, como o uso do cateter venoso central e terapias que impactam o sistema imune, como a quimioterapia e imunoterapia para o tratamento de câncer (Badiee e Hashemizadeh, 2014; Suleyman e Alangaden, 2021; Fang *et al.*, 2023).

Ademais, o surgimento de novas espécies emergentes devido aos recentes impactos causados pelas mudanças climáticas, como é o caso da espécie *Candida auris*, e os desafios em proporcionar tratamentos adequados, são questões mundialmente reconhecidas (Nnadi e Carter, 2021; Fang *et al.*, 2023; Seidel *et al.*, 2024). Existem 4 classes de substâncias antifúngicas normalmente utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas na clínica médica: são elas os azóis (i), Polienos (ii), Equinocandinas (iii) e os análogos de pirimidina (iv), como a 5-flucitosina (Houšť, Spížek e Havlíček, 2020; Fang *et al.*, 2023). Apesar de eficientes, todas

essas moléculas estão associadas a sérias limitações farmacológicas e, além disso, o constante surgimento de cepas resistentes e multirresistentes a esses tratamentos tem por consequência a diminuição da eficácia de tratamento dos pacientes, tornando cada vez mais nítida a necessidade de desenvolvimento de terapias alternativas (Nett e Andes, 2016; Kischkel *et al.*, 2020; Valdez *et al.*, 2023)

1.2 Gênero *Candida*

Microrganismos do gênero *Candida* são leveduras que podem fazer parte da microbiota humana e são encontrados colonizando diferentes partes do organismo de indivíduos saudáveis, sendo encontrados principalmente na pele, na cavidade oral, no trato gastrointestinal e na vagina (Sardi *et al.*, 2013; Ordaya, Clement e Vergidis, 2023). No entanto, algumas dessas espécies são capazes de causar infecções, que podem apresentar-se de diferentes formas, tais como infecções mucocutâneas, infecções do trato urinário, infecções sanguíneas, sistêmicas e entre outras (Eggimann, Garbino e Pittet, 2003; Sardi *et al.*, 2013). Nesse contexto, os casos de candidíase mais relevantes, devido as taxas de mortalidade e morbidade, são os geralmente relacionados a pacientes imunocomprometidos, que sofreram procedimentos médicos invasivos ou que necessitam de tratamentos prolongados em unidades de terapia intensiva (Brown *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2013). Estimativas indicam que infecções sanguíneas causadas por espécies do gênero *Candida* afetam aproximadamente 626 mil pessoas ao redor do mundo anualmente, enquanto a incidência de casos de candidíase invasiva apresentando hemocultura negativa atinge anualmente em torno de 939 mil pessoas globalmente (Denning, 2024).

Apesar da espécie *C. albicans* permanecer sendo a mais frequente causadora de casos clínicos de candidíase, a prevalência de casos ocasionados por espécies de *Candida* não-*albicans* vem crescendo expressivamente nos últimos anos. O programa de vigilância “The SENTRY” analisou aproximadamente 20.800 isolados de candidíase invasiva coletados de 135 centros médicos em 39 países distintos. Diante disso, foi observado que a frequência de isolamento de *C. albicans* diminuiu de 57,4% dos casos entre 1997 e 2001 para 46,4% entre 2015 e 2016, enquanto houve um aumento paralelo na frequência de isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e outras espécies mais raras (Pfaller *et al.*, 2019; Tortorano *et al.*, 2021; Ordaya, Clement e Vergidis, 2023). A prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* na maioria das regiões é influenciada por diversos fatores, tais como o perfil de uso de antifúngicos na região, fatores de risco da população (Lockhart *et al.*, 2017; Thomaz *et al.*, 2018; Riera *et al.*, 2022). Na América do Sul, pesquisas relatam que de 2017 a

2022, *C. albicans* permaneceu sendo a espécie de maior prevalência, enquanto a espécie de *Candida* não-*albicans* mais frequente foi *C. parapsilosis*, como demonstrado na **figura 1** (Riera *et al.*, 2022). Além disso, comparado a isolados de *C. albicans*, os quais geralmente são susceptíveis ao antifúngico fluconazol, espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam perfis variados de susceptibilidade a antifúngicos. Ademais, o surgimento de isolados capazes de resistir a múltiplas classes de antifúngicos, como é o caso de isolados da espécie *C. auris*, trazem à tona a importância de elucidar novos caminhos para o tratamento ou prevenção das complicações causadas por esses patógenos oportunistas (Castanheira *et al.*, 2020; Ostrowsky *et al.*, 2020; Tortorano *et al.*, 2021; Riera *et al.*, 2022; Ordaya, Clement e Vergidis, 2023).

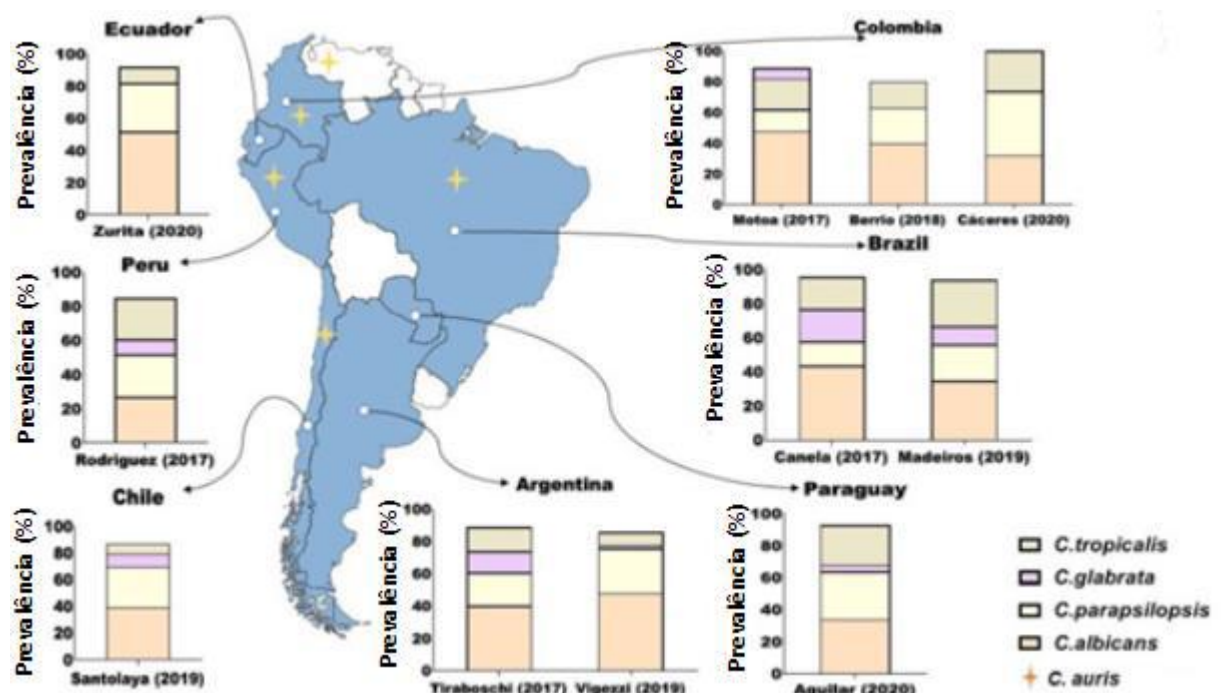


Figura 1: Epidemiologia de candidemia na América do Sul (2017-2022) (Imagem adaptada de Riera *et al.*, 2022).

1.3 *Candida auris*

1.3.1 Surgimento e epidemiologia

Dentre os fungos do gênero *Candida*, a espécie *C. auris* tem se destacado como um patógeno emergente de grande importância clínica nos últimos anos e vem sendo associado a surtos em ambientes hospitalares (Dahiya *et al.*, 2020; Sokou *et al.*, 2024). *C. auris* apresenta perfil de multirresistência aos antifúngicos e está associado a altas taxas de transmissão, devido a sua capacidade de colonizar a pele de pacientes e a sua capacidade de colonizar superfícies abióticas por longos períodos, resistindo aos desinfetantes utilizados nos ambientes hospitalares (Sexton *et al.*, 2021; Sokou *et al.*, 2024). Além disso, este patógeno está relacionado a uma alta

taxa de mortalidade em casos infecções invasivas. Um estudo realizado por Chen *et al.* estimou que a taxa de mortalidade devido a candidemia causada por *C. auris* era de 39% a 45%, chegando a 80% em pacientes apresentando outros problemas de saúde graves (Chen *et al.*, 2020).

A primeira descrição da espécie *C. auris* data de 2009, quando esse fungo foi isolado do canal auditivo de uma mulher de 70 anos em um hospital geriátrico no Japão (Sato *et al.*, 2009). Nesse mesmo ano, Kim *et al.* reportou o isolamento do que seria uma nova espécie de *Candida*, filogeneticamente próxima a isolados do complexo *C. haemulonii*, proveniente do canal auditivo de pacientes clínicos apresentando otite média crônica (Kim *et al.*, 2009). No entanto, existem indícios do isolamento deste microrganismo que datam de 1996, sugerindo que a falta de relatos anteriores aos de 2009 é também devido à dificuldade de identificação desta espécie (Lee *et al.*, 2011).

Embora os primeiros relatos de isolamento de *C. auris* sejam relativamente recentes e se concentrem principalmente na Ásia, sabe-se que este patógeno foi identificado em diversos países ao redor do mundo. Estudos visando o monitoramento epidemiológico desta espécie determinaram o aparecimento quase simultâneo de diferentes clados de *C. auris* em diferentes países do mundo (Lockhart *et al.*, 2017; Chow *et al.*, 2020; Santana, Zhao e O'Meara, 2024). Nesse contexto, ao longo dos anos, foi relatado através de estudos a possível existência de 6 clados geneticamente distintos de *C. auris* apresentando diferentes origens geográficas ao redor do mundo e associados a variações fenotípicas clinicamente relevantes, como por exemplo, variações de características como o perfil de resistência a antifúngicos, virulência e patogênese em modelos de infecção *in vivo*, colonização de hospedeiros, capacidade de resistir a desinfetantes hospitalares. Dentre esses grupos, os clados I (Ásia Meridional), II (Ásia Oriental), III (África do Sul) e IV (América do Sul) são os mais bem descritos na literatura enquanto pesquisas mais recentes sugerem a existência dos clados V (Irã) e VI (Singapura e Bangladesh) (Chow *et al.*, 2019, 2020; Forgács *et al.*, 2020; Kurakado, Matsumoto e Sugita, 2023; Lockhart *et al.*, 2017; Santana, Zhao e O'Meara, 2024; Spruijtenburg *et al.*, 2022; Suphavitai *et al.*, 2023).

1.3.2 Características morfológicas

As altas taxas de mortalidade e transmissão associadas a *C. auris* estão intimamente relacionadas a seus fatores de virulência e suas características morfológicas e fisiológicas. Assim como outras espécies do gênero *Candida*, *C. auris* é capaz de manifestar diferentes

fenótipos morfológicos, apresentando-se principalmente como leveduras arredondadas, ovais ou alongadas (Satoh *et al.*, 2009; Kathuria *et al.*, 2015; Vazquez-Munoz, Lopez e Lopez-Ribot, 2020). No cultivo *in vitro*, colônias de *C. auris* apresentam cor branca a creme em ágar Sabouraud e coloração branca com halos azuis no meio cromogênico Chromagar *Candida* Plus®, o qual permite diferenciar rapidamente colônias de *C. auris* de colônias de *C. haemulonii* (Satoh *et al.*, 2009; Kathuria *et al.*, 2015; Watkins *et al.*, 2022; Preda *et al.*, 2024). Em condições específicas, esta espécie é capaz de desenvolver pseudohifas, agregados celulares e biofilme como estratégias de adaptação as condições do meio em que está inserida, fatores que podem contribuir tanto para a transmissão quanto para colonização e infecção de hospedeiros. Além disso, se pensava que esse fungo não era capaz de realizar a troca do seu fenótipo morfológico para uma forma filamentosa, um processo bem descrito na literatura como um importante fator de virulência para algumas espécies patogênicas de *Candida*. Porém, estudos demonstraram a capacidade desta espécie em desenvolver hifas reais ao serem recuperados de infecções em camundongos (Yue *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2021; Watkins *et al.*, 2022; Preda *et al.*, 2024).

1.3.3 Tratamento e mecanismos de resistência a antifúngicos

A capacidade de apresentar ou desenvolver resistência a diferentes antifúngicos é uma das razões que torna *C. auris* um problema de saúde pública tão alarmante, uma vez que possibilita uma redução da eficácia dos tratamentos oferecidos. Os antifúngicos podem apresentar diferentes mecanismos de ação, variando conforme sua classe. As equinocandinas, como a caspofungina e a micafungina, agem impedindo a formação da parede celular fúngica, inibindo a produção de β -1-3-glucana através da inibição da enzima β -1-3-glucana sintase, o qual é um componente crucial para a parede celular deste fungo (Nett e Andes, 2016). Por sua vez, os azóis, como o fluconazol e o itraconazol, agem inibindo a síntese de ergosterol presente na membrana celular através da inibição da enzima Lanosterol C14- α -demetilase, levando ao acúmulo de precursores tóxicos e ao comprometimento da integridade da membrana celular fúngica (Nett e Andes, 2016). Os polienos, como a anfotericina B, se ligam diretamente ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, causando um estresse oxidativo além de promover a abertura de poros que comprometem a integridade desta membrana e permitem a difusão de íons. Por outro lado, a 5-flucitosina, um medicamento análogo da pirimidina, é transformada dentro da célula fúngica em dois metabólitos, os quais causam a inibição da

síntese de RNA e DNA (Waldorf e Polak, 1983; Wiederhold *et al.*, 2018; Chaabane *et al.*, 2019; Wiederhold *et al.*, 2018; Preda *et al.*, 2024).

Embora parâmetros para classificação da susceptibilidade a antifúngicos desses patógenos não terem sido estabelecidos, profissionais do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), baseados em tentativas de estabelecer estes parâmetros, estimaram que 80% a 90% dos isolados apresentaram resistência a fluconazol, 20% a 50% exibiram resistência a anfotericina B e 5% a 7% são resistentes a antifúngicos da classe das equinocandinas (CDC, 2024). Nesse sentido, o CDC recomenda o uso de equinocandinas para o tratamento inicial de adultos e crianças com mais de 2 meses de vida e o uso de anfotericina B desoxicolato para pacientes com menos de 2 meses de vida acometidos por complicações causadas por este patógeno. É importante ressaltar que o perfil de susceptibilidade a antifúngicos observado nessa espécie pode variar de acordo com o clado a qual a cepa analisada faz parte (Spivak e Hanson, 2018; Chow *et al.*, 2020; CDC, 2024; Santana, Zhao e O'Meara, 2024). São observados diversos mecanismos de resistência a antifúngicos em *C. auris*. Mutações em alvos dos fármacos, superexpressão desses alvos ou de bombas de efluxo, ativação de vias de resposta a estresse, modificações metabólicas e formação de biofilme são alguns deles (Chaabane *et al.*, 2019; Chybowska, Childers e Farrer, 2020; Preda *et al.*, 2024).

Bombas de efluxo são proteínas que podem transportar moléculas através da membrana celular, tornando possível expelir moléculas de risco para fora da célula. Duas famílias de bombas de efluxo são de importante destaque para o mecanismo de resistência a antifúngicos, são elas a superfamília de facilitadores principais (MFS) e os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (Chaabane *et al.*, 2019; Morschhäuser *et al.*, 2007; Retzer-Muehlbauer *et al.*, 2003). Estudos indicaram a presença de superexpressão de genes em *C. auris* homólogos a genes de transportadores MFS e ABC antes relatados para *C. albicans* como importantes mecanismos de resistência a azóis (Rybak *et al.*, 2019; Chybowska, Childers e Farrer, 2020). Além disso, foram observadas mutações no gene ERG11, gene que codifica a enzima lanosterol C14- α -demetilase, contribuindo para o aumento de resistência a azóis (Healey *et al.*, 2018; Chaabane *et al.*, 2019; Preda *et al.*, 2024). Outro mecanismo de importância já observado em *C. albicans* e outras espécies do gênero *Candida* é a ocorrência de mutações nos genes FKS1 e FKS2, os quais codificam a enzima β -1-3-Glucana sintase, alvo das equinocandinas (Preda *et al.*, 2024).

1.3.4 Biofilme e outros fatores de virulência

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas e aderidas em superfícies abióticas ou bióticas envoltas por uma matriz extracelular, composta por proteínas, lipídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, minerais e água (López, Vlamakis e Kolter, 2010; Du *et al.*, 2020). Em ambientes hospitalares, o biofilme pode ser formado tanto em tecidos humanos, como a pele de pacientes, quanto em dispositivos médicos, como em cateteres, facilitando a transmissão e persistência de patógenos (Hall-Stoodley, Costerton e Stoodley, 2004; Du *et al.*, 2020). Além disso, tal estrutura está relacionada ao aumento de resistência a antifúngicos e desinfetantes, uma vez que dificulta a chegada destes compostos nas células. Nesse contexto, a capacidade de espécies do gênero *Candida* de formar biofilme apresenta um grande desafio para instituições médicas (Kühbacher, Burger-Kentischer e Rupp, 2017; Omardien e Teska, 2024).

A estrutura do biofilme de *C. auris* é similar a estrutura observada em outras espécies de *Candida*, apresentando grandes quantidades de polissacarídeos como glucanas e mananas (Dominguez *et al.*, 2018, 2019; Omardien e Teska, 2024). Estudos na literatura acerca da qualidade do biofilme de *C. auris* apresentam divergências. Sherry *et al.* demonstrou que *C. auris* não era capaz de desenvolver biofilme equivalente ao de *C. albicans* (Sherry *et al.*, 2017). No entanto, um estudo recente realizado no Brasil relatou diversas cepas clínicas de *C. auris* capazes de produzir uma carga maior de biofilme do que cepas de *C. albicans*, a qual é a espécie de *Candida* descrita como mais virulenta (Melo *et al.*, 2023). Ademais, Singh *et al.* analisou isolados de *C. auris* provenientes de infecção ou colonização em pacientes clínicos e concluiu que a maioria dos isolados provenientes de sítios de colonização apresentavam fenótipo agregativo, os quais exibiam uma quantidade de biomassa do biofilme similar ao biofilme de *C. albicans* (Singh *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2023).

Outros fatores de grande importância para a patogenicidade e sobrevivência de espécies de *Candida* são a expressão e secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares e a produção de vesículas extracelulares. Nesse contexto, as proteases aspárticas (*Secreted Aspartyl Protease-SAP*) se destacam nesse quesito, uma vez que podem estar envolvidos em diversos processos, como na aquisição de nutrientes, em processos de invasão e lesão de tecidos e no escape da resposta imune do hospedeiro (Naglik, Challacombe e Hube, 2003; Preda *et al.*, 2024). Além disso, a liberação de vesículas extracelulares contendo diversas moléculas pode modular mudanças morfológicas, interações com hospedeiros e mecanismos de resistência a antifúngicos (Honorato *et al.*, 2022; Horton, Holt e Nett, 2023). Nesse sentido, é fundamental a elucidação dessas estruturas, uma vez que seu entendimento pode contribuir tanto para a

elaboração de novos tratamentos, bem como para o desenvolvimento de tecnologias vacinais, já que tais vesículas sabidamente carregam antígenos fúngicos (Zamith-Miranda et al 2018).

1.4 Vesículas extracelulares fúngicas

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas liberadas por todos os tipos celulares, compostas por uma bicamada lipídica e que podem carrear lipídios, fosfolipídios, proteínas, pigmentos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e outras moléculas associadas com virulência e processos imunobiológicos (Rodrigues *et al.*, 2015; Zamith-Miranda *et al.*, 2018; Piffer *et al.*, 2021). A liberação de VEs já vem sendo estudada em bactérias Gram-negativas desde 1967, porém foram isoladas de fungos pela primeira vez apenas em 2007 (Chatterjee e Das, 1967; Rodrigues *et al.*, 2007; Zamith-Miranda *et al.*, 2018). Esta grande diferença de tempo entre a identificação e caracterização de VEs de fungos e bactérias Gram negativas se deve principalmente a presença da parede celular em fungos, a qual separa a membrana plasmática do meio externo, o que indicava que era pouco provável a existência desse mecanismo de liberação de vesículas em fungos (Zamith-Miranda *et al.*, 2018).

Três principais hipóteses eram utilizadas para explicar como as vesículas atravessavam a parede celular. Na primeira hipótese, a pressão de turgor direcional forçaria a passagem das vesículas pela parede celular. Nesse modelo, a espessura da parede e o tamanho de poros encontrados nesta também funcionariam como reguladores da passagem das VEs. Por outro lado, a segunda hipótese seria baseada no remodelamento da parede celular causado por enzimas de síntese e degradação associadas as vesículas, as quais promoveriam a passagem para o meio extracelular. Por fim, a terceira hipótese envolve a presença de poros, permitindo a passagem das vesículas extracelulares que seriam impulsionadas pelo crescimento da parede celular (Rodrigues et al., 2015; Zamith-Miranda et al., 2018). Um estudo recente realizado por Valdez *et al.* explorou a segunda hipótese no fungo *Histoplasma capsulatum*, seus resultados sugeriram que tal mecanismo está presente mas que os dados não excluem a possibilidade dos outros mecanismos (Valdez *et al.*, 2023).

VEs ganharam enorme atenção na pesquisa médica e no entendimento de doenças infecciosas. Vesículas fúngicas podem transportar uma variedade de moléculas, como o polissacarídeo capsular glucuronoxilomanana (GXM), o qual tem um papel importante durante a patogênese de *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2007; Jnana *et al.*, 2023). Bielska *et al.* demonstraram que VEs isoladas de cepas virulentas de *C. gatti* são eficientemente internalizadas por macrófagos previamente infectados por cepas não virulentas da mesma

espécie. Ademais, VEs provenientes de cepas virulentas poderiam levar ao aumento da velocidade de crescimento fúngico dentro de fagócitos (Bielska *et al.*, 2018; Honorato *et al.*, 2022). Além disso, VEs possuem papel fundamental na produção de biofilmes formados por *C. albicans* e na sua resistência a antifúngicos (Zarnowski *et al.*, 2018, 2021; Honorato *et al.*, 2022).

Assim como *C. albicans*, *C. auris* é capaz de produzir VEs tanto em seu desenvolvimento planctônico quanto desenvolvendo biofilme. No entanto, o conteúdo destes compartimentos e suas propriedades apresentam diferenças (Zamith-Miranda *et al.*, 2021; Honorato *et al.*, 2022; Zarnowski *et al.*, 2022; Horton, Holt e Nett, 2023). Uma comparação feita por Zamith-Miranda *et al.* utilizando vesículas de *C. auris* e *C. albicans* produzidas durante o crescimento planctônico demonstrou que embora ambas as vesículas contivessem moléculas de RNA, esteróis, proteínas e lipídios, o conteúdo específico destas apresentava variação significativa entre as espécies, indicando que promoviam efeitos diferentes (Zamith-Miranda *et al.*, 2021; Horton, Holt e Nett, 2023). Além disso, este grupo de pesquisadores demonstrou que VEs de *C. auris* são capazes de induzir um aumento na adesão a células epiteliais, ao contrário do observado para VEs produzidas por *C. albicans* (Zamith-Miranda *et al.*, 2021; Horton, Holt e Nett, 2023). Uma comparação realizada entre VEs extraídas de um isolado resistente a azóis e um isolado suscetível a azóis demonstrou diferenças tanto no seu conteúdo quanto em sua funcionalidade, sugerindo que ocorra uma possível alteração destas VEs quando este microrganismo é submetido a compostos antifúngicos (Amatuzzi *et al.*, 2022; Horton, Holt e Nett, 2023). Chan *et al.* demonstrou que VEs isoladas de uma cepa de *C. auris* proveniente de um hospital em Hong Kong, apresentando resistência a azóis e suscetibilidade a anfotericina B, foram capazes de induzir resistência a anfotericina B, porém não geravam o mesmo efeito quando em contato com *C. albicans*. Da mesma forma, VEs de *C. albicans* não foram capazes de induzir resistência quando em contato com este isolado clínico de *C. auris* (Chan *et al.*, 2022).

Por fim, Zarnowski *et al.* analisou VEs produzidas por *C. auris* durante a formação de biofilme, comparando seu conteúdo com o de VEs de outras espécies de *Candida*. Foi observado uma quantidade de glucanas e mananas na mesma proporção observada para VEs de outras espécies de *Candida*. Além disso, a análise proteômica revelou grande variedade de proteínas encontradas, porém demonstrou que algumas proteínas eram observadas na maioria dos conteúdos de VEs analisados (Zarnowski *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, infecções fúngicas sofreram um grande aumento em sua incidência, se caracterizando cada vez mais como um problema em ambientes nosocomiais. Embora a espécie *C. albicans* seja o principal agente etiológico do gênero *Candida* relacionado a quadros de candidíase invasiva em ambientes hospitalares ao redor do mundo, espécies de *Candida* não-*albicans* tem se destacado devido ao aumento na frequência de infecções e a capacidade de apresentar resistência aos principais antifúngicos utilizados para o tratamento na clínica médica. Nesse contexto, a espécie *C. auris* se destaca como um importante patógeno emergente, capaz de apresentar um perfil de multirresistência aos antifúngicos e altas taxas de transmissão em instalações médicas. Tais características são influenciadas por seus fatores de virulência, como a produção de biofilme, a secreção de enzimas hidrolíticas e na liberação de VEs. Estudos apontam que as VEs apresentam diversos papéis durante a infecção fúngica, atuando como estruturas de comunicação e de modulação da resposta imunológica. Além disso, a chegada de componentes envolvidos com a virulência no meio extracelular pode influenciar de forma direta ou indireta a sobrevivência do fungo. Nesse sentido, entender, elucidar e comparar VEs produzidas por diferentes cepas de *C. auris* pode ser útil no entendimento do papel desses compartimentos durante a infecção causada por *C. auris*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo comparar aspectos físicos e químicos das VEs produzidas por oito cepas clínicas de *C. auris* (MMC1 a MMC8), além de avaliar o envolvimento das mesmas durante o desenvolvimento da candidíase *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar VEs de isolados clínicos de *C. auris* e quantificar a concentração de proteína e esterol presente nas vesículas;
- Determinar a quantidade e o tamanho das VEs;
- Avaliar o tamanho e a morfologia das VEs de *C. auris*;
- Avaliar o impacto das VEs durante a infecção por *C. auris* no modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos utilizados e condições de crescimento

Os isolados clínicos de *C. auris* (MMC1 a MMC8) foram adquiridos do Centro Médico Montefiore (*Montefiore Medical Center* – MMC) e gentilmente cedidos pelo Dr. Joshua Nosanchuk (Albert Einstein College of Medicine). Todas as cepas foram mantidas em estoques armazenados em meio BHI 20% glicerol na temperatura de -80 °C. Antes do uso, para o isolamento de vesículas extracelulares, cada cepa foi inoculada em placas contendo meio Sabouraud sólido. As placas foram cultivadas por 24 horas e armazenadas na geladeira por um período máximo de 14 dias. Para cada isolamento uma colônia foi transferida para meio Sabouraud líquido e incubadas a 30 °C por 24 horas em um agitador a 150 rpm.

4.2 Isolamento de vesículas extracelulares de *C. auris*

As leveduras cultivadas em meio Sabouraud líquido por 24 h foram contadas e diluídas para uma densidade final de 3.5×10^7 células por mL em meio Sabouraud. Alíquotas de 200 µL dessas suspensões celulares foram distribuídas em placas de Petri contendo meio Sabouraud sólido e foram incubadas por 24 horas a 30 °C para atingir um crescimento confluyente. Para cada isolamento um total de 20 placas de Petri foram utilizadas. As células foram recuperadas de cada placa utilizando raspadores e transferidas para tubos contendo 20 mL de tampão PBS previamente esterilizados através de filtração. As células suspensas foram coletadas após a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após isso, o sobrenadante foi centrifugado mais uma vez a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após essa etapa, o sobrenadante foi filtrado utilizando filtros de seringa com poros de 0,45 µm e centrifugado a 37000 rpm por 1 hora a 4 °C uma última vez. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em um volume variando de 200 a 350 µL de PBS estéril. Por fim, no intuito de verificar a esterilidade das vesículas extracelulares isoladas, 5 µL de cada ressuspensão foram inoculados em placas de petri contendo meio Sabouraud sólido, as quais foram incubadas por 24 horas.

4.3 Dosagens de proteínas e esteróis das vesículas extracelulares

As dosagens de proteínas foram feitas utilizando o kit comercial BSA Pierce™ BCA Protein Assay Kit enquanto as dosagens de esterol foram feitas utilizando o kit Amplex Red Cholesterol Assay Kit, seguindo as orientações dos fabricantes.

4.4 Análise de Rastreamento de Partículas (*Nanoparticles Tracking Analysis* – NTA)

Os tamanhos e concentração de VEs foram medidos usando o analisador de rastreamento de nanopartículas ZetaView (NTA; Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Alemanha). Para medições, as amostras foram diluídas entre 1:10000 a 1:20000 em PBS previamente filtrado (0,22 µm) para uma faixa de concentração ideal para o software NTA (ZetaView Software versão 8.02.31, Particle Metrix GmbH). Os parâmetros do software foram temperatura a 23 ° C, sensibilidade de 30 a 85 quadros por segundo (fps), velocidade do obturador de 55 e duração do pulso do laser igual à duração do obturador. Os parâmetros de aquisição foram definidos para brilho mínimo de 20, tamanho máximo de 200 pixels e tamanho mínimo de 5 pixels. Partículas de poliestireno (Microtrac GmbH, Haan, Alemanha) com tamanho médio de 100 nm foram utilizadas para calibrar o instrumento antes das leituras das amostras. Os dados foram analisados utilizando o software ZetaView (versão 8.02.31) e GraphPad Prism 8 (GraphPad, CA, EUA). Para os gráficos de distribuição de tamanho, o número de partículas detectadas em cada ponto foi normalizado para o número total de partículas em cada amostra, e os resultados foram expressos como o número relativo de partículas/mL. Essa normalização foi realizada para facilitar a visualização da distribuição de tamanhos entre os grupos. A concentração de VEs por célula fúngica foi calculada dividindo o número total de partículas detectadas em cada isolado pelo número final de células em sua respectiva cultura de 48 horas.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia e o tamanho das VEs foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando a técnica de coloração negativa. Resumidamente, um volume de 5 µL da suspensão concentrada de VEs foram adsorvidas por 30 segundos em um filme Formvar em uma grade de cobre de malha 300 revestida com carbono. O excesso da amostra foi removido com papel filtro. Em seguida, as amostras foram contrastadas com acetato de uranila 2,5% por 30 s. As VEs foram visualizadas usando um microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai Spirit) operado a 120 kV. O software ImageJ (versão 1.53K) foi utilizado para medir o diâmetro de 150 a 200 VEs para cada cepa. Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad, CA, EUA).

4.6 Ensaios de virulência em *Galleria mellonella*

Para investigar o impacto das VEs de *C. auris* durante a infecção, dois protocolos foram testados usando larvas de *G. mellonella* como modelo. Foram utilizados 10 insetos (0,3 g cada)

por condição experimental. As larvas foram inoculadas com 10 µL de suspensões fúngicas contendo 2×10^8 leveduras/mL em PBS (2×10^6 leveduras/inseto) na hemocele através do último proleg usando uma seringa de insulina de 0,3 mL (31 G). As leveduras foram lavadas com PBS, enumeradas e imediatamente utilizadas para infectar as larvas. Somente PBS foi usado como controle negativo. A mortalidade dos insetos foi acompanhada durante 10 dias. Em uma segunda estratégia experimental, para avaliar o impacto das VEs na patogênese, as leveduras de *C. auris* foram co-injetadas com VEs obtidas de *C. auris* cultivada em meio Sabouraud sólido e a sobrevivência do inseto foi acompanhada por 10 dias. Todas as larvas foram colocadas em placas de Petri estéreis e mantidas no escuro a 37 °C. A morte foi avaliada pela falta de movimento em resposta à estimulação. Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad, CA, EUA). Para tal, o teste log-rank Mantel-Cox foi utilizado para realizar a análise estatística, onde $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $****p < 0,0001$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica e composição das vesículas extracelulares

Para comparar o perfil morfológico das VEs isoladas das diferentes cepas clínicas de *C. auris*, foram realizadas duas técnicas, NTA e MET. Através dos dados obtidos, foi possível observar que as diferentes VEs possuem perfis de tamanhos variados de acordo com cada cepa analisada, conforme mostrado nas **figuras 2 e 3**. A partir da análise de NTA, foi visto que as VEs isoladas possuem tamanhos que variam entre 15 e 600 nm e a maior quantidade de partículas liberadas possui tamanho de 15 a 200 nm (**Tabela 1 e Figura 2**). Além disso, foi possível observar pequenas diferenças nos perfis de distribuição de tamanho das VEs de cada cepa quando comparadas entre si, ao se analisar os dados obtidos por NTA. Os perfis de distribuição de tamanho das VEs e as concentrações de partículas por mL, analisados através de NTA, podem ser observados na **Figura 2**.

Quando analisados através das imagens de microscopia, foi possível observar que os valores de tamanho médio das VEs de cada cepa apresentaram maior diferença quando comparados entre as cepas do que os valores obtidos através do NTA (**Tabela 1**). Além disso, as imagens de microscopia mostraram que as VEs das cepas MMC1 e MMC2 apresentaram os menores perfis de distribuição de diâmetro entre os isolados analisados (**Tabela 1**). As informações observadas nas figuras 2 e 3 foram resumidas na **tabela 1**.

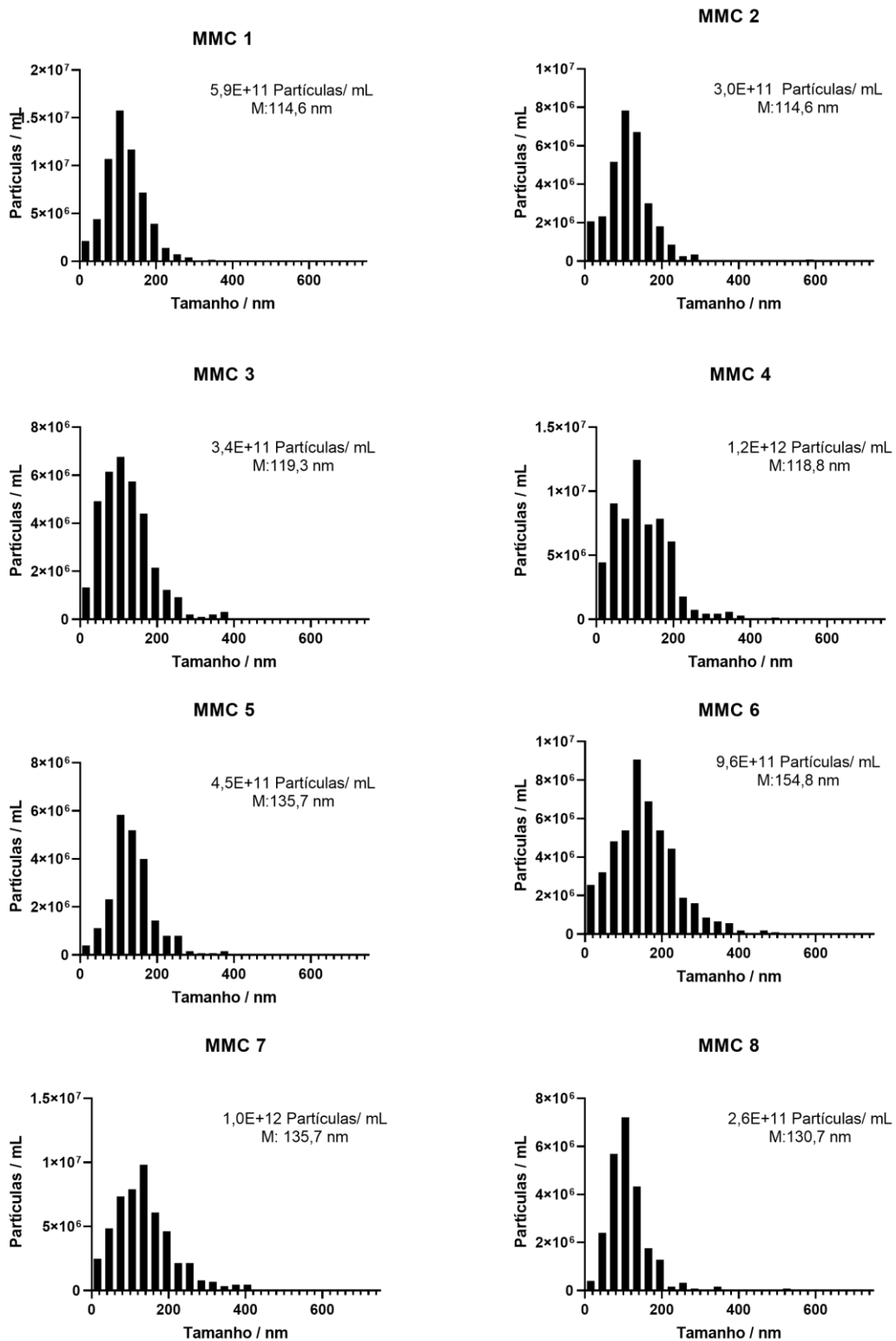


Figura 2: Distribuições de tamanho e concentração (partícula/mL) das vesículas extracelulares. Os dados foram obtidos através de NTA. MMC 1 a MMC8 correspondem aos diferentes isolados utilizados. (M-Tamanho médio das vesículas encontradas).

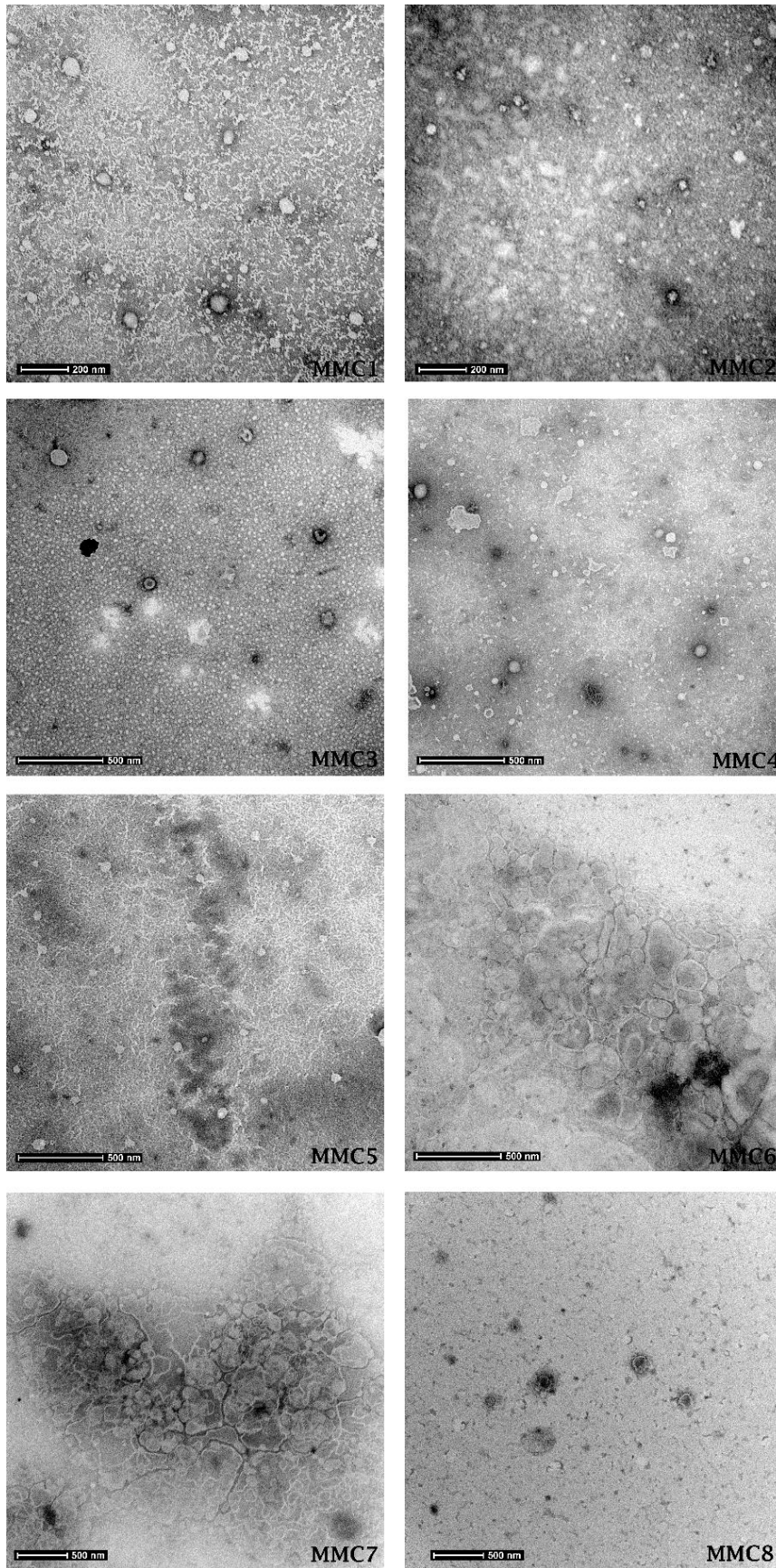


Figura 3: Análise de VEs dos oito isolados clínicos através de microscopia eletrônica de transmissão.

Tabela 1: Distribuição dos tamanhos médios de VEs de diferentes cepas de *C. auris*.

Cepa	Média de tamanho (NTA) nm	Intervalo de tamanho (NTA) nm	Média de tamanho (MET) nm	Intervalo de tamanho (MET) nm
MMC1	114,6	15-375	66,4	20-300
MMC2	114,6	15-585	40,3	17-150
MMC3	119,3	15-375	105,5	35-370
MMC4	118,8	15-465	90,5	20-300
MMC5	135,7	15-375	95,7	30-375
MMC6	154,8	15-400	110,7	30-300
MMC7	135,7	15-405	120,9	45-280
MMC8	130,7	15-525	141,7	45-450

Em conjunto com a análise do tamanho relativo das VEs isoladas de diferentes isolados clínicos de *C. auris*, também foi possível analisar a quantidade de partículas liberadas pelas diferentes cepas utilizadas. Conforme mostrado na **Figura 3** e na **Figura 4A**, pudemos notar um perfil similar de quantidade de VEs secretadas pelos isolados estudados, sendo as cepas MMC4, MMC6 e MMC7 as que mais tiveram partículas liberadas. Após isso, foi realizada a dosagem do conteúdo total de proteínas e lipídeos das VEs isoladas, que revelou apresentarem diferenças entre as cepas analisadas, com destaque a cepa MMC1.

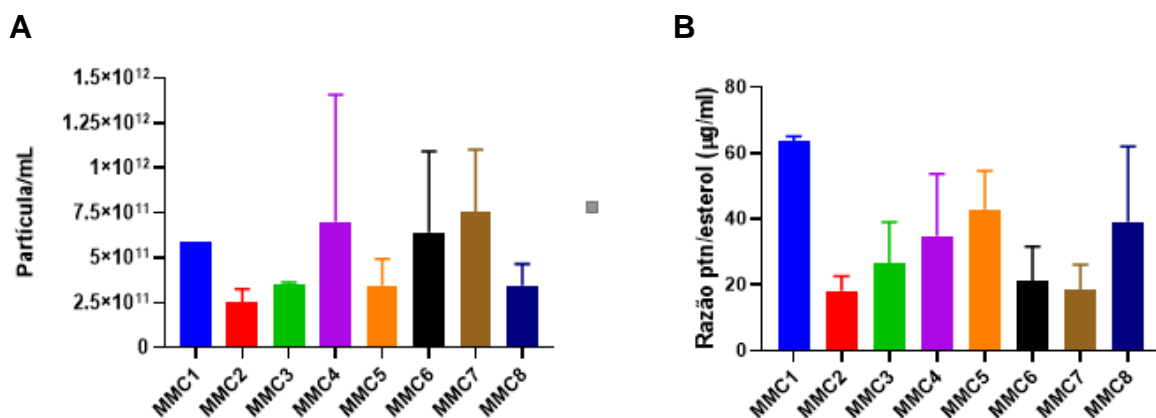


Figura 4: Perfil de produção de VEs pelas diferentes cepas de *C. auris*. Concentração de partículas liberadas analisadas pela técnica de NTA (A). Razão entre as quantidades de proteína e esterol presentes em VEs (B).

5.2 Ensaio de virulência em *Galleria mellonella*

Com o intuito de investigar o impacto das VEs na infecção por *C. auris*, primeiro foi realizada a inoculação de cada isolado clínico em grupos de larvas de *G. mellonella*. De acordo com os resultados obtidos, foi observado que as larvas inoculadas com a cepa MMC2 e MMC3 apresentaram a menor taxa de sobrevivência, apresentando diferenças significativas quando comparadas com as larvas infectadas com as cepas MMC1, MMC4 e MMC5 (**Figura 5A**). Em seguida, foi realizada a inoculação de vesículas isoladas das cepas MMC1 e MMC2, as quais foram escolhidas por serem, respectivamente, resistente a fluconazol e sensível a fluconazol, em larvas de *G. mellonella* em conjunto com a infecção por esses isolados clínicos. Com base nos dados analisados, foi possível notar um aumento significativo da virulência da cepa MMC1 quando co-injetada tanto com VEs próprias quanto com VEs isoladas da cepa MMC2. No entanto, quando analisadas curvas de sobrevivência de infecção por MMC2 co-injetadas com VEs previamente isoladas, não foi possível notar diferença significativa comparado a infecção por MMC2 sem a inoculação das VEs.

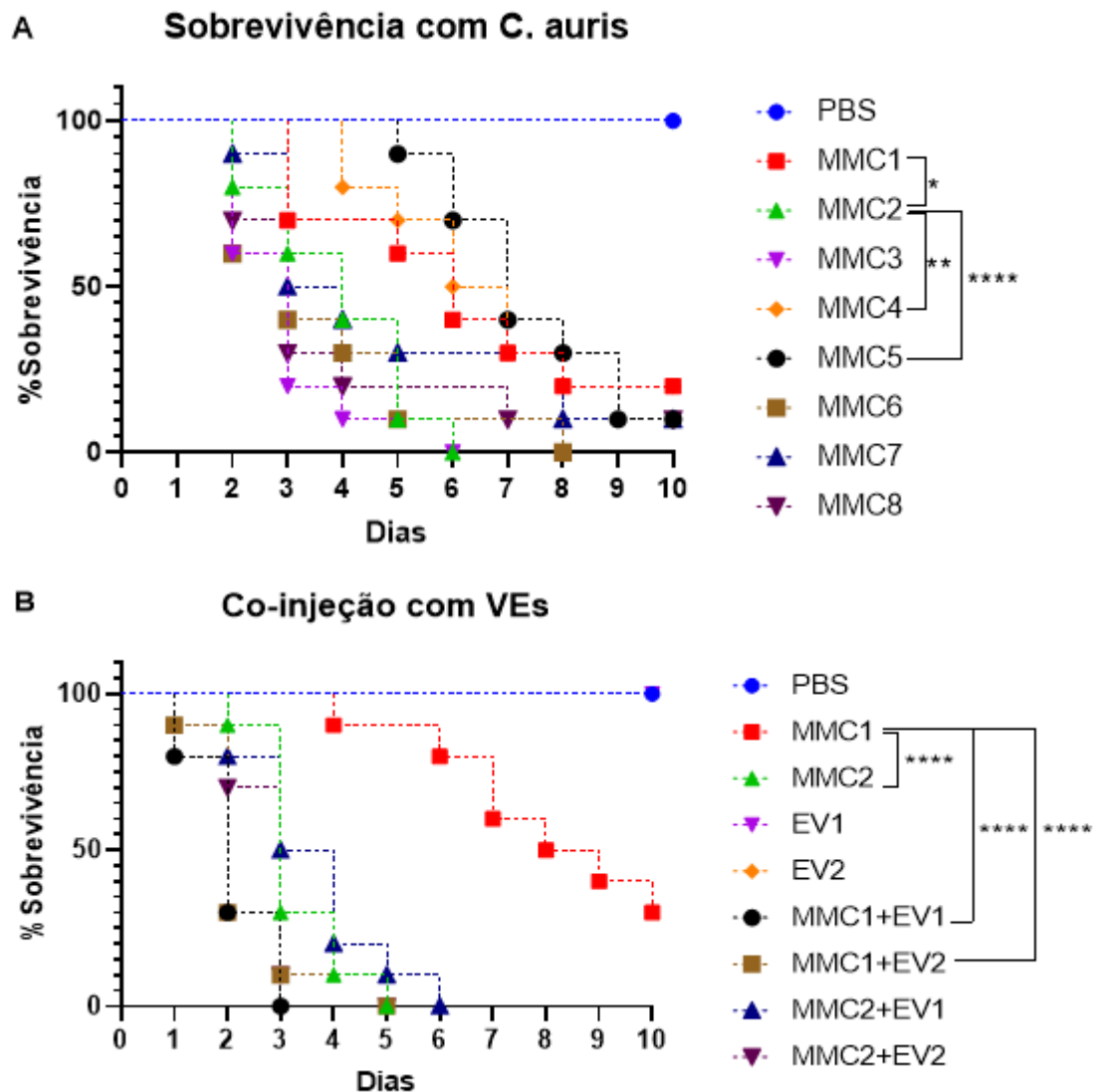


Figura 5: Curvas de sobrevivência em modelo de larvas de *Galleria mellonella* após a inoculação de diferentes cepas de *C. auris* (A) e após a co-injeção com VEs isoladas previamente (B). Análise estatística realizada através do teste log-rank Mantel-Cox, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

Com base em dados da literatura, o tamanho das VEs produzidas por fungos pode variar entre 20 e 1000 nm de diâmetro (Vargas *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2019; Karkowska-kuleta *et al.*, 2020; Honorato *et al.*, 2022; Medeiros *et al.*, 2024). Nesse sentido, estudos específicos investigando VEs produzidas por *C. auris* sugerem tamanhos que variam de 20 a 800 nm (Rocha *et al.*, 2021; Zamith-Miranda *et al.*, 2021; Amatuzzi *et al.*, 2022; Chan *et al.*, 2022). Uma vez que o tamanho das VEs pode estar relacionado com a função ou o tipo de biogênese, nossos objetivos pretendiam investigar e caracterizar os aspectos morfológico de VEs isoladas de oito cepas clínicas de *C. auris* (Bielska *et al.*, 2018; Rizzo, Rodrigues e Janbon, 2020).

Seguindo as recomendações do MISEV (*Minimal information for studies of extracellular vesicles*), utilizamos as técnicas de MET e NTA, consideradas como técnicas padrão para a análise de VEs (Welsh *et al.*, 2024). Nossas análises confirmaram a variação da VEs de *C. auris* entre 15 e 600 nm, coerentes com os resultados observados por Rocha *et al.* (Rocha *et al.*, 2021). Por outro lado, a análise de um número maior de cepas nos possibilitou observar que diferentes cepas podem apresentar VEs de tamanhos distintos, com as VEs menores sendo prevalentes. Apesar das VEs estudadas apresentarem variação do tamanho entre 15 e 600 nm, observamos um número maior de partículas entre os tamanhos de 15 e 200 nm, corroborando com os resultados observados na literatura (Amatuzzi *et al.*, 2022). Esses resultados foram ainda mais significativos quando a análise foi realizada utilizando a técnica de MET, o que sugere que a análise do tamanho através de MET pode refletir melhor o tamanho real das VEs.

Assim como o tamanho das VEs, a razão entre as concentrações totais de proteína e esterol pode refletir em diferenças na virulência de cada cepa fúngica, uma vez que tal medida pode sugerir quais são os principais componentes presentes nas VEs. Nesse contexto, nossos dados mostraram que todas as cepas utilizadas tiveram razões entre 20 e 60 ug/mL, ao contrário dos resultados observados por Zamith-Miranda *et al.*, os quais mostraram concentrações de proteína por esterol mais baixas (Zamith-Miranda *et al.*, 2021). Tal diferença nos resultados analisados pode ser devido a diferenças nos métodos de isolamento das VEs.

Em seguida, realizamos a análise da virulência de cada uma das cepas utilizadas. Para tal, utilizamos o modelo *in vivo* de infecção em larvas de *G. mellonella*. As larvas de *G. mellonella* se destacam como excelentes modelos para experimentos *in vivo* devido as semelhanças funcionais e anatômicas de seu sistema imune inato em relação a outros organismos mais complexos (Asai *et al.*, 2021; Garcia-Bustos *et al.*, 2021). Além disso, este modelo oferece outras vantagens, tais quais baixos custos de aquisição e gerenciamento, capacidade de tolerar incubação a 37 °C, ausência de limitações éticas e facilidade de manipulação, sem a necessidade de treinamento rígido (Asai *et al.*, 2021). Tal modelo já foi amplamente utilizado para investigar a virulência de *C. auris*. Nossos resultados se mostraram coerentes quando comparados com os dados observados na literatura para a curva de sobrevivência deste microrganismo no modelo de *G. mellonella* (Carvajal *et al.*, 2021; Garcia-Bustos *et al.*, 2021; Hernando-Ortiz *et al.*, 2021). Além disso, nossos dados mostraram curvas de sobrevivência distintas para cada cepa, sendo a cepa MMC 2 a mais virulenta. Tal diferença na virulência das cepas poderia ser explicado por uma possível diferença dos clados de origem

desses isolados clínicos (Welsh *et al.*, 2019; Chow *et al.*, 2020). No entanto, são necessários mais estudos acerca dos clados de origem destas cepas para confirmar tal observação.

Uma vez que as VEs podem estar intrinsicamente ligadas a virulência desses microrganismos, nós decidimos averiguar como tais estruturas produzidas por essas cepas seriam capazes de impactar na infecção em larvas de *G. mellonella*. Estudos na literatura apontam que a imunização de larvas com VEs é capaz de causar um efeito protetivo quando submetidos a infecção por patógenos fúngicos (Colombo *et al.*, 2019; Vargas *et al.*, 2021; Aor *et al.*; 2024). No entanto, nossos resultados mostraram que a co-injeção de VEs pode alterar a virulência de células fúngicas de forma distinta. Nossos dados mostraram um aumento na virulência da cepa MMC1 e ausência de diferença significativa em relação a cepa MMC2 quando co-injetadas com VEs. Tais resultados contrastam com os resultados obtidos por Honorato *et al.*, onde células fúngicas tratadas com VEs apresentam uma diminuição da virulência (Honorato *et al.*, 2022). Mais estudos são necessários para elucidar como as VEs alteram o curso da infecção, visto que o momento de inoculação das VEs, seja antes, durante ou após o começo da infecção pode alterar no seu resultado.

7 CONCLUSÃO

No decorrer deste trabalho, foi possível identificar que as VEs isoladas das 8 cepas de *C. auris* possuem tamanho de 15 a 600 nm e tem seu tamanho médio na faixa de 15 a 200 nm. Além disso, foi observado como a concentração de partículas e a composição proteica e lipídica pode variar entre os isolados clínicos estudados. Por fim, foi possível investigar o perfil de virulência das cepas utilizadas e como as VEs podem alterar este perfil quando co-injetadas. Nesse sentido, a cepa MMC 2 apresentou a maior virulência dentre as cepas analisadas enquanto a cepa MMC 1 foi a cepa que menos levou a morte das larvas. Ademais, a co-injeção de células fúngicas e VEs foi capaz de aumentar a virulência da cepa MMC1, evidenciando que as VEs podem ser um fator essencial na infecção causada por este fungo. No entanto, a co-injeção de *C. auris* e VEs não causou diferença para a cepa MMC 2. Diante desse panorama, muito ainda precisa ser elucidado quanto as características funcionais e estruturais das VEs e seus impactos em infecções causadas por estas cepas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A., J. *et al.* Extracellular vesicles in bacterial and fungal diseases – Pathogenesis to diagnostic biomarkers. **Virulence**, v. 14, n. 1, p. 2180934, 2023.
- AMATUZZI, R. F. *et al.* Caspofungin Affects Extracellular Vesicle Production and Cargo in *Candida auris*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 990, 21 set. 2022.
- AOR, A. C. *et al.* Extracellular Vesicles from *Scedosporium apiospermum* Mycelial Cells: Implication for Fungal-Host Interplays. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 277, 9 abr. 2024.
- ASAI, M. *et al.* Innate Immune Responses of *Galleria mellonella* to *Mycobacterium bovis* BCG Challenge Identified Using Proteomic and Molecular Approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 619981, 9 fev. 2021.
- BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 2, p. 195–204, fev. 2014.
- BIELSKA, E. *et al.* Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1556, 19 abr. 2018.
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017.
- BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.
- CARVAJAL, S. K. *et al.* Pathogenicity Assessment of Colombian Strains of *Candida auris* in the *Galleria mellonella* Invertebrate Model. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 6, p. 401, 21 maio 2021.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 1, p. 105799, jan. 2020.
- CHAABANE, F. *et al.* Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2788, 2019.
- CHAN, W. *et al.* Induction of amphotericin B resistance in susceptible *Candida auris* by extracellular vesicles. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 1900–1909, 2020.
- CHATTERJEE, S. N.; DAS, J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. **Journal of General Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1–11, out. 1967.
- CHEN, J. *et al.* Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and meta-analysis of global epidemiology and mortality of *Candida auris*. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 827, 11 nov. 2020.
- CHOW, N. A. *et al.* Potential Fifth Clade of *Candida auris*, Iran, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1780–1781, set. 2019.
- CHOW, N. A. *et al.* Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. **mBio**, v. 11, n. 2, p. e03364-19, 28 abr. 2020.
- CHYBOWSKA, A. D.; CHILDERS, D. S.; FARRER, R. A. Nine Things Genomics Can Tell Us About *Candida auris*. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 351, 2020.
- COLOMBO, A. C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan and Sterylglucoside Are Required for Host Protection in an Animal Vaccination Model. **mBio**, v. 10, n. 2, p. e02909-18, 2 abr. 2019.

- DAHIYA, S. *et al.* *Candida auris* and Nosocomial Infection. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 4, p. 365–373, 1 mar. 2020.
- DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet. Infectious Diseases**, p. S1473-3099(23)00692–8, 12 jan. 2024.
- DOMINGUEZ, E. *et al.* Conservation and Divergence in the *Candida* Species Biofilm Matrix Mannan-Glucan Complex Structure, Function, and Genetic Control. **mBio**, v. 9, n. 2, p. e00451-18, 3 abr. 2018.
- DOMINGUEZ, E. G. *et al.* Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance. **mSphere**, v. 4, n. 1, p. e00680-18, 2 jan. 2019.
- DU, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008921, out. 2020.
- EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, nov. 2003.
- FAN, S. *et al.* Filamentous growth is a general feature of *Candida auris* clinical isolates. **Medical Mycology**, v. 59, n. 7, p. 734–740, 1 jul. 2021.
- FANG, W. *et al.* Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. **Journal of Biomedical Science**, v. 30, n. 1, p. 42, 19 jun. 2023.
- FORGÁCS, L. *et al.* Comparison of *in vivo* pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1160–1169, 2020.
- GARCIA-BUSTOS, V. *et al.* Characterization of the Differential Pathogenicity of *Candida auris* in a *Galleria mellonella* Infection Model. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 1, p. 10.1128/spectrum.00013-21, 9 jun. 2021.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, fev. 2004.
- HEALEY, K. R. *et al.* Limited ERG11 Mutations Identified in Isolates of *Candida auris* Directly Contribute to Reduced Azole Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01427-18, out. 2018.
- HERNANDO-ORTIZ, A. *et al.* Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1063–1075, dez. 2021.
- HONORATO, L. *et al.* Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in *Candida albicans*. **mBio**, v. 13, n. 3, p. e00301-22, 2022.
- HORTON, M. V.; HOLT, A. M.; NETT, J. E. Mechanisms of pathogenicity for the emerging fungus *Candida auris*. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 12, p. e1011843, 21 dez. 2023.
- HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal Drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 106, 12 mar. 2020.
- KARKOWSKA-KULETA, J. *et al.* Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1722, 18 jul. 2020.
- KATHURIA, S. *et al.* Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1823–1830, jun. 2015.
- KIM, M.-N. *et al.* *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 6, p. e57-61, 15 mar. 2009.

- KISCHKEL, B. *et al.* Therapies and Vaccines Based on Nanoparticles for the Treatment of Systemic Fungal Infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 463, 2020.
- KÜHBACHER, A.; BURGER-KENTISCHER, A.; RUPP, S. Interaction of Candida Species with the Skin. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 32, 7 jun. 2017.
- KURAKADO, S.; MATSUMOTO, Y.; SUGITA, T. Comparing the virulence of four major clades of Candida auris strains using a silkworm infection model: Clade IV isolates had higher virulence than the other clades. **Medical Mycology**, v. 61, n. 11, p. myad108, 6 nov. 2023.
- LEE, W. G. *et al.* First three reported cases of nosocomial fungemia caused by Candida auris. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3139–3142, set. 2011.
- LOCKHART, S. R. *et al.* Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 15 jan. 2017.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 7, p. a000398, jul. 2010.
- MEDEIROS, E. G. *et al.* Comprehensive characterization of extracellular vesicles produced by environmental (Neff) and clinical (T4) strains of Acanthamoeba castellanii. **mSystems**, v. 9, n. 6, p. e01226-23, 2024.
- MORSCHHÄUSER, J. *et al.* The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the MDR1 Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in Candida albicans. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. e164, 2 nov. 2007.
- MUNHOZ DA ROCHA, I. F. *et al.* Cellular and Extracellular Vesicle RNA Analysis in the Global Threat Fungus Candida auris. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e0153821, 22 dez. 2021.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400–428, set. 2003.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, mar. 2016.
- NNADI, N. E.; CARTER, D. A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 4, p. e1009503, abr. 2021.
- OMARDIEN, S.; TESKA, P. Skin and hard surface disinfection against Candida auris – What we know today. **Frontiers in Medicine**, v. 11, 7 fev. 2024.
- ORDAYA, E. E.; CLEMENT, J.; VERGIDIS, P. The Role of Novel Antifungals in the Management of Candidiasis: A Clinical Perspective. **Mycopathologia**, v. 188, n. 6, p. 937–948, dez. 2023.
- OSTROWSKY, B. *et al.* Candida auris Isolates Resistant to Three Classes of Antifungal Medications - New York, 2019. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 1, p. 6–9, 10 jan. 2020.
- PFALLER, M. A. *et al.* Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida Species From 1997-2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S79–S94, mar. 2019.
- PIFFER, A. C. *et al.* The paradoxical and still obscure properties of fungal extracellular vesicles. **Molecular Immunology**, v. 135, p. 137–146, 1 jul. 2021.
- PREDA, M. *et al.* Pathogenesis, Prophylaxis, and Treatment of Candida auris. **Biomedicines**, v. 12, n. 3, p. 561, 1 mar. 2024.
- REIS, F. C. G. *et al.* A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in Cryptococcus gattii. **mSphere**, v. 4, n. 2, p. e00080-19, 20 mar. 2019.

- RIERA, F. O. *et al.* Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 7, p. 877, 30 jun. 2022.
- RIZZO, J.; RODRIGUES, M. L.; JANBON, G. Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 346, 15 jul. 2020.
- RODRIGUES, M. L. *et al.* Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 48–59, jan. 2007.
- RODRIGUES, M. L. *et al.* Traveling into Outer Space: Unanswered Questions about Fungal Extracellular Vesicles. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. e1005240, 3 dez. 2015.
- RYBAK, J. M. *et al.* Abrogation of Triazole Resistance upon Deletion of CDR1 in a Clinical Isolate of *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. e00057-19, abr. 2019.
- SANTANA, D. J.; ZHAO, G.; O'MEARA, T. R. The many faces of *Candida auris*: Phenotypic and strain variation in an emerging pathogen. **PLOS Pathogens**, v. 20, n. 3, p. e1012011, 1 mar. 2024.
- SARDI, J. C. O. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10–24, jan. 2013.
- SATOH, K. *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41–44, jan. 2009.
- SCHUETZER-MUEHLBAUER, M. *et al.* Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Efflux pumps and antibiotic resistance of microorganisms. v. 22, n. 3, p. 291–300, 1 set. 2003.
- SEIDEL, D. *et al.* Impact of climate change and natural disasters on fungal infections. **The Lancet. Microbe**, v. 5, n. 6, p. e594–e605, jun. 2024.
- SEXTON, D. J. *et al.* Positive Correlation Between *Candida auris* Skin-Colonization Burden and Environmental Contamination at a Ventilator-Capable Skilled Nursing Facility in Chicago. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. 7, p. 1142–1148, 12 maio 2021.
- SOKOU, R. *et al.* *Candida auris* Infection, a Rapidly Emerging Threat in the Neonatal Intensive Care Units: A Systematic Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 6, p. 1586, jan. 2024.
- SPIVAK, E. S.; HANSON, K. E. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. e01588-17, fev. 2018.
- SPRUIJTENBURG, B. *et al.* Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 2405–2411, dez. 2022.
- SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 1027–1053, dez. 2021.
- SUPHAVILAI, C. *et al.* **Discovery of the sixth *Candida auris* clade in Singapore**medRxiv, , 6 ago. 2023. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2023.08.01.23293435v1>>. Acesso em: 20 jun. 2024
- THOMAZ, D. Y. *et al.* An Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2997, 2018.
- TORTORANO, A. M. *et al.* Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5543–5553, 2021.
- VALDEZ, A. F.; ZAMITH-MIRANDA, D.; *et al.* Micro- and nanoparticles as platforms for the treatment of fungal infections: present and future perspectives. **Future Microbiology**, v. 18, n. 15, p. 1007–1011, nov. 2023.

- VALDEZ, A. F.; SOUZA, T. N. DE; *et al.* Traversing the Cell Wall: The Chitinolytic Activity of *Histoplasma capsulatum* Extracellular Vesicles Facilitates Their Release. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 11, p. 1052, nov. 2023.
- VARGAS, G. *et al.* Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 389–407, mar. 2015.
- VARGAS, G. *et al.* Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. **Cellular Microbiology**, v. 22, n. 10, p. e13238, out. 2020.
- VAZQUEZ-MUNOZ, R.; LOPEZ, F. D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Silver Nanoantibiotics Display Strong Antifungal Activity Against the Emergent Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris* Under Both Planktonic and Biofilm Growing Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1673, 2020.
- WALDORF, A. R.; POLAK, A. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, n. 1, p. 79–85, jan. 1983.
- WATKINS, R. R. *et al.* Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. **Pathogens and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 46–65, 21 out. 2022.
- WELSH, J. A. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, 2024.
- WELSH, R. M. *et al.* Insights into the Unique Nature of the East Asian Clade of the Emerging Pathogenic Yeast *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 10.1128/jcm.00007-19, 28 mar. 2019.
- WIEDERHOLD, N. P. *et al.* Oral glucan synthase inhibitor SCY-078 is effective in an experimental murine model of invasive candidiasis caused by WT and echinocandin-resistant *Candida glabrata*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 448–451, fev. 2018.
- YUE, H. *et al.* Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2018.
- ZAMITH-MIRANDA, D. *et al.* Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes and Infection**, 20th Anniversary of Microbes & Infection. v. 20, n. 9, p. 501–504, 1 out. 2018.
- ZAMITH-MIRANDA, D. *et al.* Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. **mSystems**, v. 6, n. 4, p. e00822-21, 2021.
- ZARNOWSKI, R. *et al.* *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS Biology**, v. 16, n. 10, p. e2006872, 8 out. 2018.
- ZARNOWSKI, R. *et al.* Coordination of fungal biofilm development by extracellular vesicle cargo. **Nature Communications**, v. 12, p. 6235, 29 out. 2021.
- ZARNOWSKI, R. *et al.* A common vesicle proteome drives fungal biofilm development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 38, p. e2211424119, 20 set. 2022.