

MARIANE NOGUEIRA MARINHO

IMPACTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PROPRIEDADES
FENOTÍPICAS DE *Candida albicans*



**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

MARÇO / 2022

**Trabalho realizado no
Departamento de Microbiologia Geral,
do Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes, UFRJ, sob a orientação do
Professor Leonardo Nimrichter.**

CIP - Catalogação na Publicação

MM338i Marinho, Mariane Nogueira
Impacto de Vesículas Extracelulares em
Propriedades Fenotípicas de *Candida albicans* /
Mariane Nogueira Marinho. -- Rio de Janeiro, 2022.
1 f.

Orientador: Leonardo Nimrichter.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Vesículas Extracelulares. 2. *Candida albicans*.
3. Parede Celular. I. Nimrichter, Leonardo, orient.
II. 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: **Mariane Nogueira Marinho**
DRE: 118106405

BANCA EXAMINADORA: Prof. André Luis Souza dos Santos (Presidente)
Prof. Rodrigo Rollin Pinheiro
Profa. Daniela Sales Alviano
Prof. Allan Jefferson Guimarães (Suplente)

Título da Monografia: **“Impacto de vesículas extracelulares em propriedades fenotípicas de *Candida albicans*”**


Local: Sala virtual <https://meet.google.com/xqh-ziot-wro>
Data e hora de início: 7 de março de 2022 às 14:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi arguido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **9,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.


Rio de Janeiro, 07 de março de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
9,0	Prof. André Luis Souza dos Santos
9,0	Prof. Rodrigo Rollin Pinheiro
9,0	Profa. Daniela Sales Alviano
	Prof. Allan Jefferson Guimarães (Suplente)


Presidente da banca


Prof. André Luis Souza dos Santos


Aluno:


Mariane Nogueira Marinho

Orientador:


Prof. Leonardo Nimrichter

Coordenador
de TCC


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo ao Leo, meu orientador, por me aceitar no laboratório e pela confiança depositada em mim e no meu potencial. Obrigada pela paciência comigo durante todo esse tempo, mesmo eu sempre esquecendo de comunicar alguma coisa ou entregando tudo em cima da hora. Obrigada pelo jeito leve e descontraído de conduzir a rotina do lab, ter o ambiente que nós temos faz toda a diferença.

Aos meus pais Cristiane e Gean, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a ir além. Obrigada por todo esforço e por tudo que vocês me proporcionaram para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos e chegasse até aqui. Obrigada por todo incentivo, desde não me deixar desistir, mesmo depois de quatro ENEMs, até os últimos momentos nessa reta final em que vocês, ainda que distantes fisicamente, estiveram comigo me dando forças para continuar. Ao meu irmão, Gean Júnior, por sempre me apoiar e incentivar. Por todas as nossas conversas de todos os assuntos possíveis e por todas as risadas que você me faz dar. Muito obrigada, família! Quatro anos longe de casa foram um desafio, mas, sem dúvidas, todo esforço valeu a pena. Obrigada por tudo! Logo logo eu chego aí pra gente fazer um churrasco e cantar Bee Gees.

Aos meus avós, Edinéa e Iramar, que abriram suas portas para me receber aqui no Rio e nunca mediram esforços para que eu pudesse me sentir em casa. Obrigada, vó, por me escutar enquanto eu reclamava da faculdade e por sempre me dizer que tudo ia dar certo. E deu! Obrigada, vô, por todas as longas conversas que tivemos na cozinha, sobre biologia ou sobre a vida, e por sempre me dar um trocadinho porque “você não pode andar sem dinheiro, Mari”. O que eu aprendi com o senhor faculdade nenhuma ensina! Obrigada, tia Vivi (e Pingo), por terem sido minha companhia inúmeras vezes. Por todas as infinitas arrumações do quarto e todos os vídeos de gato. Sem dúvidas a vida foi muito mais leve aqui graças a vocês!

À minha família de Italva, em especial, minha avó Eronilta, por todo amor. Obrigada por cada ligação só pra saber se eu estava bem ou pra falar mal do presidente.

Obrigada por cada abraço apertado, nas nossas despedidas, seguido de um “Vai com Deus, minha filha. Vovó te ama muito e fica aqui morrendo de saudade!”. O coração sempre vem apertado, mas com a certeza de que tem pra onde voltar. Te amo muito, Lilita!

Às minhas amigas, Kamilla e Natane, e ao meu amigo Mateus, por sempre se fazerem presentes, longe ou perto. Poder dividir a vida há tantos anos com vocês é um presente. Obrigada por todos os conselhos, todos os abraços, todos os choros e risadas. Sou muito grata por ter a amizade de vocês há tanto tempo!

Ao Higor, meu porto seguro no Rio, mesmo não estando mais no Rio. Obrigada por tantos anos, tantas histórias e tanto amor. Obrigada por nossa amizade inabalável que o tempo e a distância nunca foram capazes de mudar. Obrigada por sempre estar aqui, fisicamente ou não, por sempre mandar um “Oi, miga. Tá bem?” do nada, pelas chamadas de vídeo pra desabafar ou contar uma novidade. Tenho muito orgulho da nossa amizade e de sempre estarmos aqui um pelo outro, dividindo nossas vitórias. “Nosso amor é caso antigo, de outros carnavais”. Sempre foi assim e espero que sempre seja!

Aos amacros, por todas as conversas no grupo ou no CA, por todas os desesperos que passamos juntos nessa graduação, por todas as festas, perrengues e risadas. Sem vocês a faculdade teria sido insustentável!

Às grandes amizades que fiz durante esses quatro anos: Adriane, Laryssa, Millena e Yan. Obrigada por segurarem a barra comigo e por estarem do meu lado sempre que precisei. A amizade de vocês é absurdamente importante pra mim!

À Bianca, Jéssica, Juliana, Victória e Vitória Fernanda. Obrigada por terem me adotado no primeiro dia de aula e por termos divididos tantos momentos, trabalhos, angústias e risadas. Obrigada por tudo!

À Vitória Fernanda, a melhor amiga que a faculdade poderia ter me dado. A pessoa que compartilhou comigo todas as dificuldades de fazer faculdade em outra cidade, a saudade de casa e a alegria quando cada uma voltava para sua terrinha. Obrigada

por dividir esse fardo comigo. Sou grata por tudo que vivemos, todos os desesperos antes das provas, todas as chamadas de vídeo só pra jogar conversa fora, por ter me ouvido tantas e tantas vezes e por sempre tentar encontrar um jeito de me ajudar. Você é o maior presente que eu recebi de Minerva!

À Nat, minha coorientadora no meu primeiro ano no lab. Obrigada por tudo que você ensinou, por sempre explicar tudo com tanto cuidado e por ser paciente e me explicar um zilhão de vezes as várias coisas que não entravam na minha cabeça. Obrigada por me encorajar e me fazer acreditar em mim mesma nos momentos de insegurança. Sinto muito a sua falta!

Ao João, por ter dividido tantas coisas comigo enquanto estive no lab, uma mesa minúscula, fofocas, dramas, tristezas e risadas. Obrigada, amigo!

À Iamila e Laura. Mesmo tendo chegado quase no apagar das luzes, vocês se tornaram extremamente importantes pra mim. Obrigada por acolherem meus surtos nesse fim de graduação, por me aguentarem reclamando e por termos criado um laço tão especial em tão pouco tempo.

A todos do LaGE, os que chegaram e os que já foram, por todas as conversas, cafés, risadas e ensinamentos. O tempo dividido com vocês no laboratório foi muito importante e nunca será esquecido.

Ao Gliieber, meu professor de ciências do ensino fundamental e um dos grandes responsáveis pelo meu amor pela biologia. Sou grata por tudo que aprendi com você, pelo seu jeito único de ensinar, por nossas aulas de campo, mas, principalmente, por ter plantado em mim, há tantos anos atrás, essa paixão pela ciência. Obrigada, Gui!

À Cintia, minha professora de microbiologia no curso técnico, com quem eu descobri o mundo da microbiologia e me apaixonei perdidamente. Sou eternamente grata por ter tido a oportunidade de aprender com uma professora tão ímpar! Nunca vou esquecer do quanto eu me divertia em suas aulas. Você é uma inspiração e modelo de profissional pra mim!

Aos professores da graduação que se tornaram amigos, por tantos conselhos e ensinamentos, fosse na sala de aula, no instagram ou dividindo um copo de cerveja. Profissionais como vocês me fazem admirar ainda mais o magistério!

Ao Alessandro. Obrigada por ser meu amigo, parceiro e maior apoiador. Obrigada por estar do meu lado em todos os momentos, bons ou ruins e nunca ter permitido que eu me sentisse sozinha. Por todo incentivo, por acreditar tanto em mim e sempre fazer o possível e o impossível pra me ver feliz. Sou eternamente grata por nossos caminhos terem se cruzados e por poder dividir a vida com você. Obrigada por tudo, meu bem! Principalmente por esses dois anos e meio que eu estou com seu notebook. Graças a ele eu terminei a faculdade e escrevi esse TCC :)

Aos membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho. E à todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, me ajudaram a chegar até aqui.

Por fim, agradeço às agências de fomento: CNPq, PIBIC e FAPERJ, por tornarem possível a realização desse projeto e tantos outros.

“Pelo fogo, transmutação
Sem afago, lapidando o aprendiz
O que sobra é cicatriz
A sustentação é que a manhã já vem
Logo mais amanhã já vem”

Serpente - Pitty

RESUMO

MARIANE NOGUEIRA MARINHO

IMPACTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PROPRIEDADES FENOTÍPICAS DE *Candida albicans*

Orientador: Leonardo Nimrichter

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.

Candida albicans é um fungo polimórfico, capaz de assumir diferentes formas como levedura, pseudo-hifa, hifa verdadeira, clamidósporo e células GUT. Tanto leveduras quanto hifas podem ser encontradas durante a candidíase, e a conversão entre essas morfologias está associada ao desenvolvimento da infecção. Acredita-se que as leveduras sejam essenciais para sua disseminação via corrente sanguínea, enquanto as hifas atuam na invasão tecidual. Essa transição morfológica impacta a composição da parede celular e a infecção, sendo coordenada por fatores externos como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Dados do nosso laboratório sugerem que as vesículas extracelulares (VEs) produzidas por leveduras inibem a filamentação de *C. albicans*. Além disso, enzimas envolvidas com o remodelamento da parede celular se mostram enriquecidas nesses compartimentos. Em conjunto, esses dados sugerem que as VEs podem impactar a composição da parede celular em *C. albicans*. O presente projeto tem como objetivo avaliar possíveis alterações na composição da parede celular de *C. albicans* após a interação VEs-fungo em diferentes tempos. As VEs de *C. albicans* (cepa 90028 ATCC) foram obtidas após etapas de centrifugação e ultracentrifugação e quantificadas por dosagem de proteína e Análise de Rastreamento de Partículas (NTA), esse último

apresentando populações de VEs com tamanhos variando entre 20 e 300 nm, mas com tamanho predominante próximo de 100 nm, tendo sido fornecido pela análise um diâmetro médio de 99 nm, valores condizentes com o que se tem descrito na literatura. O efeito direto das VEs foi investigado em tempos curtos de incubação (2 horas) na concentração de 300 µg/mL de proteína em PBS. O impacto a longo prazo (24 horas), relacionado a inibição da filimentação, também foi investigada. Para isso, os fungos foram tratados com as VEs (100 µg/mL) por 24 horas em indutor de diferenciação (Meio 199, pH 7). A presença e distribuição de quitina, oligômeros de quitina, manosídeos e de β-glucanas, foi investigada, respectivamente, utilizando Uvitex, WGA-Alexa 594, ConA-FITC e a quimera Dectina-1-Fc. Embora a análise por microscopia de fluorescência não tenha revelado mudanças significativas na exposição dos componentes de parede em nenhuma das duas condições, os resultados de citometria de fluxo mostraram que o tratamento com VEs em tempos longos modifica a composição da parede celular, tendo sido evidenciados aumentos na exposição de β-glucana e aumentos ainda maiores no conteúdo de manose. Dessa forma, nossos resultados mostram que a interação em tempos longos entre *C. albicans* e suas VEs, é capaz de impactar de forma significativa a composição da parede celular fúngica.

Palavras-chave: vesículas extracelulares; *C. albicans*; parede celular.

ABSTRACT

MARIANE NOGUEIRA MARINHO

IMPACTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PROPRIEDADES FENOTÍPICAS DE *Candida albicans*

Orientador: Leonardo Nimrichter

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.

Candida albicans is a polymorphic fungi, with the ability to grow in distinct morphologies such as yeast, pseudohypha, true hypha, chlamyospore and GUT cells. Yeast and hypha forms can be observed during candidiasis, and the conversion between these forms is associated with the infection's development. Yeasts are associated to bloodstream dissemination, while hyphae are responsible for tissue invasion. This morphological transition impacts the cell wall composition and is coordinated by external factors such as pH, temperature and nutrient availability. Recent results from our group suggest that Extracellular Vesicles (EVs) produced by *C. albicans* yeasts are regulators of *C. albicans* filamentation. Moreover, enzymes involved in the cell wall remodeling seems to be enriched in these compartments. Together, these data suggest that EVs can impact *C. albicans* cell wall composition. This study aims to evaluate possible alterations in the cell wall components of *C. albicans* yeasts after interaction with EVs. The EVs were obtained from *C. albicans* yeasts (strain 90028 ATCC) after a series of centrifugations and ultracentrifugation steps and the EVs content was measured by protein quantification and Nanoparticles Tracking Analysis (NTA). The EV population displayed a range between 20 and 300 nm, consistent with what has been described in the literature. The

direct effect of EVs was investigated in short times incubation (2 hours) at a concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of protein, in PBS. The long-term impact (24 hours), related to the inhibition of morphological transition, were investigated as well. The yeasts were incubated with EVs (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours in hyphae inducing (Medium 199, pH 7). The presence and distribution of chitin, chitin oligomers, mannosides and β -glucans, were investigated, respectively, using Uvitex, WGA-Alexa 594, ConA-FITC and Dectina-1-Fc chimera. Even though the analysis by fluorescence microscopy did not reveal significant changes of cell wall content for both experimental conditions, the flow cytometry results suggest that the long time treatment with EVs significantly modifies the cell wall composition. Our results displayed an increase in β -glucan exposure and mannose content. Therefore, our results suggest that the long-term interaction between *C. albicans* and its EVs can significantly impact the composition of the fungal cell wall.

Key-words: extracellular vesicles; *C. albicans*; cell wall.

RESUMO PARA LEIGOS

MARIANE NOGUEIRA MARINHO

IMPACTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PROPRIEDADES FENOTÍPICAS DE *Candida albicans*

Orientador: Leonardo Nimrichter

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.

Candida albicans é um fungo naturalmente encontrado nos seres humanos em locais como a mucosa vaginal, oral e intestinal. Esse microrganismo coexiste em nosso organismo de forma pacífica, sem nos causar danos, porém há situações, como problemas nos sistemas de defesas do corpo, em que essa harmonia pode ser desequilibrada e desencadear uma doença chamada candidíase. O fungo pode utilizar alguns artifícios para ter mais sucesso durante a infecção como o chamado polimorfismo, que consiste em mudar sua forma para alcançar outros lugares do corpo, e a formação de biofilme, que é uma estrutura complexa formada por várias células fúngicas com o objetivo de se protegerem e tornar mais difícil sua eliminação. Outro mecanismo utilizado é a produção de vesículas extracelulares, que nada mais são do que pequenas partículas que atuam como bolsas, levando e trazendo informações para a célula fúngica. Ao sair e entrar na célula, as vesículas passam por uma estrutura chamada parede celular, que se encontra ao redor de toda a célula e é formada por diversos componentes. Ela é responsável por dar forma à célula e, no processo de mudança de forma, essa estrutura sofre várias alterações para que essa mudança possa acontecer. Além disso, a parede celular também é responsável por permitir a comunicação com outras células e com o meio externo.

Muitos pesquisadores já estudaram o papel das vesículas e viram que elas carregam diversas substâncias e desempenham diferentes funções. Recentemente, pesquisadores do nosso laboratório viram que as vesículas também agem sobre a própria célula de onde ela veio. Nesse estudo, foram descobertos diferentes efeitos causados pela interação das células com as vesículas, como a inibição da mudança de forma e da formação do biofilme. Questionamos, então, se essa interação estaria afetando a já mencionada parede celular. Escolhemos quatro dos seus principais componentes e, utilizando marcadores específicos para cada um deles, avaliamos os fungos que passaram pela interação com as vesículas e os que não passaram. Nossos resultados mostraram que, nos fungos que passaram pela interação, houve um aumento importante em dois dos componentes marcados, mostrando que, depois da interação, eles estão aumentando em quantidade ou se tornando mais expostos. Esses resultados são ainda um pequeno passo, mas são importantes para que possamos entender cada vez mais a função das vesículas extracelulares e como essa relação com a célula funciona. Dessa forma, estaremos cada vez mais perto de encontrar mais soluções para doenças negligenciadas como a candidíase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade morfológica de <i>C. albicans</i>	3
Figura 2. Invasão tecidual por <i>C. albicans</i>	4
Figura 3. Etiologia da candidíase invasiva em diferentes países e regiões.	5
Figura 4. Organização estrutural da parede celular de diferentes patógenos fúngicos.....	7
Figura 5. Mecanismos de ação de antifúngicos (A) e mecanismos de resistência desenvolvidos pelos fungos (B).....	10
Figura 6. Produção de vesículas extracelulares por fungos.....	12
Figura 7. Análise do perfil das VEs de Ca 90028 através de Análise de Rastreamento de Partículas.....	19
Figura 8. Representação gráfica da MFIs medidas por Citometria de Fluxo... ..	21
Figura 9. Microscopia Óptica de Fluorescência da interação em tempo curto...22	
Figura 10. Representação gráfica da MFIs medidas por Citometria de Fluxo..	23
Figura 11. Microscopia Óptica de Fluorescência da interação em tempo longo.. ..	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ARP – Análise de Rastreamento de Partículas
- BHI – Infusão de cérebro e coração
- BSA – Albumina Sérica Bovina
- CA – *Candida albicans*
- CG – *Candida glabrata*
- CK – *Candida krusei*
- CP – *Candida parapsilosis*
- CT – *Candida tropicalis*
- ConA – Concanavalina A
- DLS – Espalhamento de luz dinâmico
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- GAFFI – Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas
- GalXM – Galactoxilomanana
- GXM – Glucoroxilomanana
- MFI – Intensidade Média de Fluorescência
- MVB – Corpos multivesiculares
- NTA – *Nanoparticles Tracking Analysis*
- PBS – Tampão fosfato-salino
- PBS/BSA 1% – Tampão fosfato-salino contendo 1% de Albumina Sérica Bovina
- VE – Vesícula Extracelular
- WGA – Aglutinina de germe de trigo

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia das doenças fúngicas.....	1
1.2	Candidíases.....	1
1.3	Parede Celular Fúngica.....	6
1.4	Antifúngicos e Resistência	8
1.5	Vesículas Extracelulares.....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	14
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos.....	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Cultura de <i>C. albicans</i>	16
4.2	Isolamento de Vesículas Extracelulares de <i>C. albicans</i>	16
4.3	Dosagem de Proteína Total e Esterol	16
4.4	Análise de Rastreamento de Partículas (ARP) (<i>Nanoparticles Tracking Analysis</i> – NTA).....	17
4.5	Tratamento das leveduras de <i>C. albicans</i> com Vesículas Extracelulares.....	17
4.6	Microscopia óptica de fluorescência e Citometria de Fluxo	18
4.7	Análises estatísticas	19
5	RESULTADOS	19
5.1	Avaliação do Perfil Vesicular.....	19
5.2	Avaliação da interação Fungo x VEs	20
6	DISCUSSÃO.....	25
7	CONCLUSÕES.....	28

8 REFERÊNCIAS 29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das doenças fúngicas

De acordo com o “Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas” (GAFFI), cerca de 300 milhões de pessoas são afetadas por infecções fúngicas graves, 25 milhões destas apresentando alto risco de morte ou morbidade, e seus principais causadores são *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis* spp. (Brown *et al.*, 2012). Além da comum negligência, outros aspectos acabam por dificultar a situação, como as deficiências no tratamento e diagnósticos das doenças. Como seres eucarióticos, os patógenos fúngicos apresentam grande similaridade com as células humanas, o que dificulta o desenvolvimento de antifúngicos (Rodrigues e Nosanchuk, 2020). Além disso, a capacidade de infecção a múltiplos tecidos (em indivíduos imunocomprometidos) e a capacidade de transição em sua morfologia (Rodrigues e Nosanchuk, 2020) permite que o patógeno se estabeleça por mais tempo no organismo, tornando o tratamento mais longo e, conseqüentemente, mais caro.

Outro problema enfrentado no combate às infecções fúngicas são os efeitos colaterais observados com o uso de medicamentos antifúngicos, como é o caso da classe dos poliênicos. Esses medicamentos atuam induzindo estresse na célula por meio de interações hidrofóbicas com o ergosterol presente na membrana plasmática fúngica, que aumenta a permeabilidade celular e provoca o extravasamento do conteúdo celular. Os efeitos colaterais acontecem, nesse caso, quando este fármaco é capaz de interagir também com o colesterol presente nas células mamíferas além de apresentar alta nefrotoxicidade (Odds, Brown e Gow, 2003). Soma-se a isso o aumento de cepas resistentes aos antifúngicos de uso corrente, em especial aos derivados azólicos (Fisher *et al.*, 2018).

1.2 Candidíases

Dentre os patógenos fúngicos citados anteriormente, o gênero de maior importância, se tratando de infecções oportunistas, é *Candida* spp. (Pfaller e Diekema, 2007). Os fungos deste gênero são ascomicetos tipicamente comensais, podendo ser

encontrados no meio-ambiente, assim como na microbiota de humanos e outros mamíferos (McManus e Coleman, 2014), porém algumas espécies são responsáveis por causar infecções de natureza oportunista, com destaque para candidemias e candidíases invasivas, as infecções fúngicas mais comumente associadas aos sistemas de saúde. *C. albicans* é a espécie mais frequentemente encontrada nesses cenários, porém a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans*, principalmente *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, vêm aumentando com o passar do tempo (Tortorano *et al.*, 2021). Análises realizadas em 135 centros médicos de 39 países pelo Programa de Monitoramento Antimicrobiano SENTRY, evidenciaram uma diminuição da frequência com que se via *C. albicans* de 57,4%, entre 1997 e 2001, para 46,4%, entre 2015 e 2016, e, ao mesmo tempo, um aumento na frequência de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e outras espécies mais raras. (Tabela 1) (Pfaller *et al.*, 2019). Essa distribuição pode variar de acordo com diversos fatores como distribuição geográfica e o ambiente em que se encontram as populações de pacientes (UTIs, enfermarias, neonatal, etc.), por exemplo (Tortorano *et al.*, 2021).

Tabela 1. Distribuição de espécies em isolados do gênero *Candida*. Adaptado de (Pfaller *et al.*, 2019).

Ano	Nº de testados	% por espécie				
		CA	CG	CP	CT	CK
1997-2001	5067	57.4	16.0	12.3	9.1	2.5
2006-2008	2647	51.2	15.9	16.8	10.7	2.1
2009-2011	4080	45.3	18.9	17.6	10.0	2.6
2012-2014	4928	46.3	19.3	15.1	8.6	3.2
2015-2016	3653	46.4	19.6	14.4	8.3	2.8

Abreviaturas: CA, *C. albicans*; CG, *C. glabrata*; CK, *C. krusei*; CP, *C. parapsilosis*; CT, *C. tropicalis*.

Existem diversos fatores de virulência associados ao processo de colonização e invasão de tecidos por *C. albicans* (Höfs, Mogavero e Hube, 2016). Dentre eles destaca-se o polimorfismo, que confere ao fungo a capacidade de assumir diferentes formas como leveduras, células opacas, pseudo-hifas, hifas verdadeiras, clamidósporos e células GUT (Figura 1).

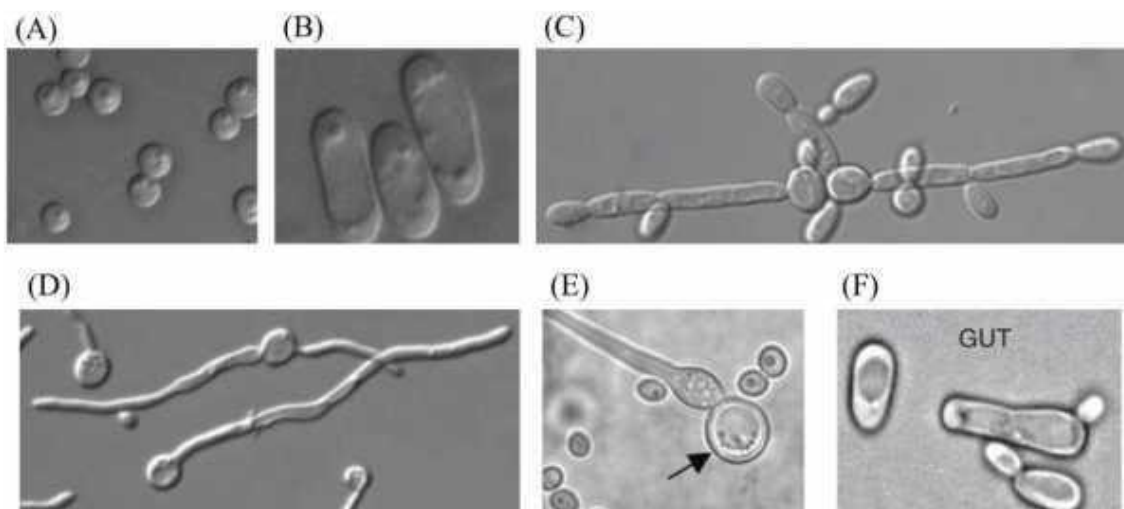


Figura 1. Diversidade morfológica de *C. albicans*. (A) Células leveduriformes, (B) Células Opacas, (C) Pseudo-hifa, (D) Hifas, (E) Clamidosporo e (F) Células GUT (*gastrointestinally induced transition*) (Pande, Chen e Noble, 2013).

Destas formas, as mais encontradas em biofilmes e tecidos infectados são leveduras, pseudohifas e hifas (Noble, Gianetti e Witchley, 2017) e acredita-se que as leveduras sejam essenciais para sua melhor disseminação via corrente sanguínea, enquanto as hifas atuam na invasão de tecidos (Jacobsen *et al.*, 2012; Zhu e Filler, 2010), como pode ser visto na representação abaixo (Figura 2).

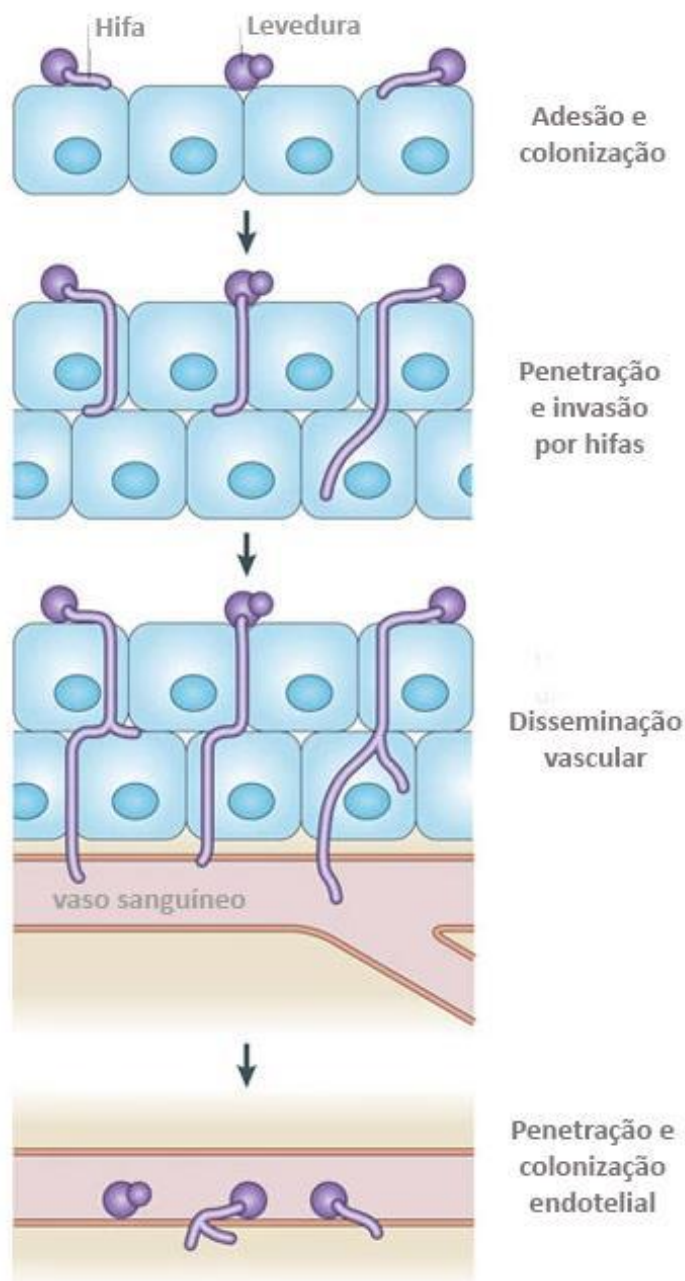


Figura 2. Invasão tecidual por *C. albicans*. A infecção se inicia pela adesão das leveduras ao epitélio e posterior mudança morfológica para a forma de hifa, permitindo que o fungo penetre o tecido do hospedeiro. Ao alcançar a corrente sanguínea o fungo retorna para a forma de levedura para que possa se disseminar pelo sangue e alcançar novos sítios do organismo. Nesses novos sítios o processo de transição para a forma de hifa e penetração tecidual se repetem, estabelecendo a infecção. Adaptado de (Gow et al., 2012)

Essas mudanças são desencadeadas por sinais do ambiente que se assemelham a condições pouco favoráveis ao crescimento do comensal, tais como, temperaturas elevadas, pH neutro ou baixa de nutrientes, estimulando, então, mudanças morfológicas, não sendo difícil concluir que essas trocas têm impacto na alteração da característica do fungo de comensal para patógeno oportunista (Polke, Hube e Jacobsen, 2015).

A incidência mundial de candidíase invasiva é dificilmente estimada com precisão por conta de diversos fatores, dentre eles diferentes critérios de diagnóstico e categorização. Além disso, poucos estudos baseados em grandes populações, somados a subnotificação e baixa vigilância, fazem com que existam grandes lacunas no conhecimento epidemiológico em diversas regiões do mundo (Quindós *et al.*, 2018b; Toda *et al.*, 2019). Além disso, apesar de *C. albicans* ainda ser a espécie predominante, vem sendo observada uma mudança na etiologia das candidíases invasivas, estando cada vez mais presentes infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*. Na maior parte dos países, quase todos os isolados de sangue (> 90%) pertencem a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Figura 3) (Quindós *et al.*, 2018b).

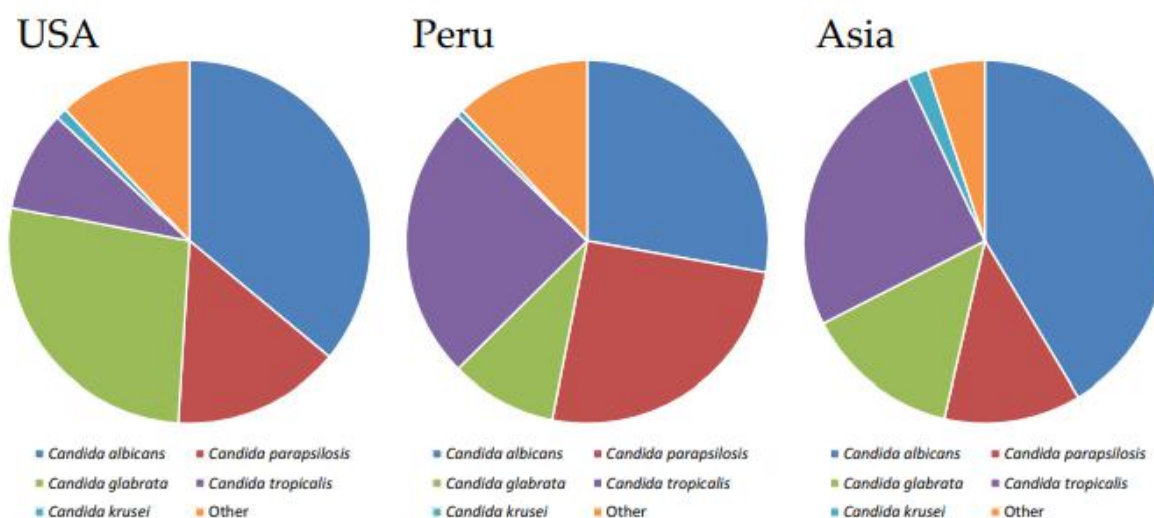


Figura 3. Etiologia da candidíase invasiva em diferentes países e regiões. Adaptado de (Quindós *et al.*, 2018a)

No Brasil, em 2016, um estudo realizado em 16 hospitais da rede pública e privada das cinco regiões do país mostrou que a maior parte dos casos de candidemia foram causados por *C. albicans* (34%), seguidos por 24,1% de *C. parapsilosis* e das demais espécies de *Candida* não-*albicans* em menor porcentagem (Doi *et al.*, 2016). Além disso, um estudo realizado em 8 hospitais no estado do Paraná entre 2016 e 2017, demonstrou que cânceres e cirurgias são as condições mais associadas à doença (Oliveira, *et al.*, 2021). De acordo com outros diversos estudos no Brasil, a mortalidade associada a

candidemia é muito alta, geralmente excedendo a estimativa já elevada de 50% dos casos (Colombo *et al.*, 2006, 2014; Wisplinghoff *et al.*, 2014). Diante de tais dados, faz-se seja cada vez mais necessário o estudo dos fungos do gênero *Candida*, em especial *C. albicans*, a fim de que sejam descobertas novas informações que possam auxiliar na prevenção à infecção ou facilitem seu tratamento.

1.3 Parede Celular Fúngica

A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica que se encontra ao redor da membrana plasmática e desempenha papéis fundamentais para a viabilidade da célula, além de atuar em processos importantes como de morfogênese e patogênese (Gow, Latge e Munro, 2017). Dentre as diversas funções dessa estrutura, podemos destacar a manutenção da integridade celular, conferência de rigidez e plasticidade à célula, proteção contra estresses do ambiente (Agostinho *et al.*, 2018; Gow, Latge e Munro, 2017; Pontón, 2008) além de funcionar como ponte de interação com o meio externo por intermédio de receptores e adesinas (Pontón, 2008).

A composição da parede celular atua de forma importante na ecologia dos fungos e responde diretamente a condições do ambiente (Gow, Latge e Munro, 2017), sendo bastante variada, apresentando não só componentes como polissacarídeos e proteínas, mas também lipídeos e pigmentos (Gow, Latge e Munro, 2017) (Figura 4). Sua estrutura é heterogênea e complexa, formando uma malha onde diferentes estruturas se encontram de forma covalentemente ligada ou não. Os principais polissacarídeos da parede celular fúngica são as glucanas, que representam de 50-60% de seu peso seco, sendo a β -1,3-D-glucana um dos componentes estruturais mais importantes (Garcia-Rubio *et al.*, 2019). O conteúdo de quitina na parede celular das leveduras de *C. albicans* representa 1-2% de seu peso seco, mas esse número chega a ser até dez vezes maior quando o fungo assume a forma filamentosa (Garcia-Rubio *et al.*, 2019). Outro componente importante são as glicoproteínas que apresentam função de manutenção do formato celular, auxílio no processo de adesão, proteção, absorção de moléculas, transmissão de sinais e síntese e reorganização dos componentes da parede (Bowman e Free, 2006; Pontón, 2008). Muitos desses componentes são conservados para a maioria das espécies fúngicas, sendo observadas na maioria delas (Coronado *et al.*, 2007) como a quitina e as β -glucanas; enquanto que outros são vistos como espécie-específicos (Gow, Latge e Munro, 2017)

(Figura 4), como o maior conteúdo de proteínas manosiladas na parte mais externa da parede de leveduras de *Candida* e *Saccharomyces* (Gow, Latge e Munro, 2017) e a presença de α -1,3-glucana recobrendo a camada de β -1,3-glucana em *Histoplasma capsulatum* como forma de evasão ao sistema imune (Rappleye, Eissenberg e Goldman, 2007). Algumas espécies fúngicas apresentam ainda em sua parede celular a melanina, um pigmento de elevado peso molecular que atua como importante fator de virulência para essas espécies, auxiliando na invasão e disseminação do fungo (Garcia-Rubio *et al.*, 2019).

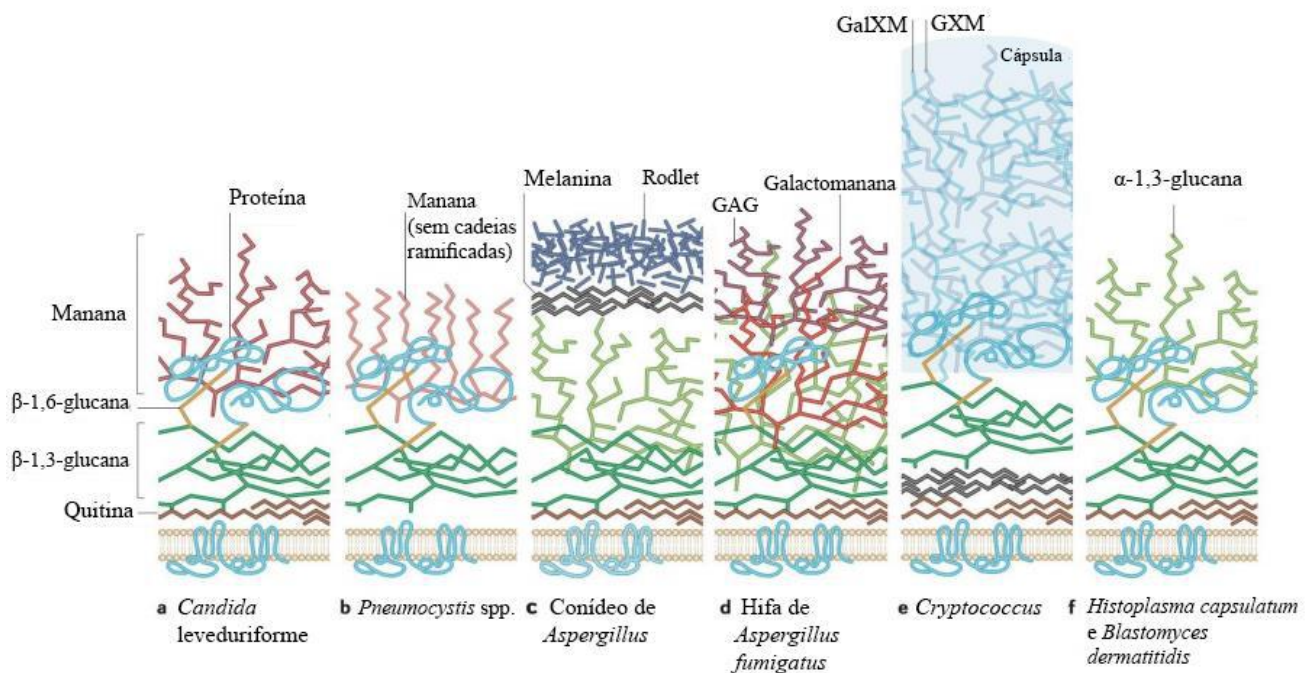


Figura 4. Organização estrutural da parede celular de diferentes patógenos fúngicos – Adaptada de Gow; Latge; Munro, 2017

Como já mencionado, um dos principais mecanismos de virulências de *C. albicans* é a sua capacidade de alteração morfológica. Esse processo impacta também na composição de sua parede celular, sendo a principal alteração o aumento no conteúdo de quitina da mesma (Braun e Calderone, 1978). A parede celular de *C. albicans* possui uma estrutura de camada dupla, composta principalmente por um esqueleto mais interno formado por β -1,3 e β -1,6-glucana e quitina, e uma camada fibrilar mais externa, que se acredita ser predominantemente composta por proteínas manosiladas (Lenardon *et al.*, 2020). As moléculas de β -1,3-glucana são as mais abundantes na parede de *C. albicans*,

assim como em outros fungos (Garcia-Rubio *et al.*, 2019). Essas moléculas se encontram na parte mais interna da parede, ligadas a β -1,6-glucanas, que juntas conectam a parte mais interna da parede celular à parte mais externa (Brown e Gordon, 2005). As moléculas de β -1,6-glucana são responsáveis por associar diversas proteínas da parede ao esqueleto de β -1,3-glucana e quitina, através de proteínas GPI (glicosilfosfatidil inositol) (Klis, Groot, de e Hellingwerf, 2001). As unidades de manana presentes na parede podem se apresentar em diferentes formas, como mananas N e O ligadas e manoproteínas (Shibata *et al.*, 2007). As mananas são moléculas menos rígidas que as β -glucanas e a quitina e por essa razão não conferem forma à célula (Garcia-Rubio *et al.*, 2019). Por outro lado, sua baixa permeabilidade e porosidade são mecanismos importantes contra a ação de antifúngicos e as defesas do hospedeiro (Gow e Hube, 2012), além de ser descrita como um mecanismo de evasão ao sistema imunológico, uma vez que esta camada de manana (mais externa) oculta a camada de β -glucana (mais interna), um alvo facilmente reconhecido pelo sistema imunológico (Hernández-Chávez *et al.*, 2017).

1.4 Antifúngicos e Resistência

Atualmente, existem quatro principais classes de antifúngicos utilizados para o tratamento das infecções fúngicas, são eles: azóis, polienos, equinocandinas e flucitosina. (Tortorano *et al.*, 2021). Os antifúngicos conhecidos como azóis atuam inibindo a ação da enzima 14- α -esterol demetilase, que converte o lanosterol em ergosterol. Essa inibição leva ao acúmulo de intermediários tóxicos na membrana e à redução de ergosterol na mesma. Essa redução impacta a estrutura e função da membrana, inviabilizando a célula (Sanguinetti, Posteraro e Lass-Flörl, 2015). A classe das equinocandinas também tem ação inibitória, impedindo que a enzima β -1,3-glucana sintase produza β -1,3-glucana, componente fundamental da parede celular fúngica. Sem essa enzima em funcionamento, a célula produz uma parede celular defeituosa, o que compromete de forma fatal a viabilidade do fungo (Sanguinetti, Posteraro e Lass-Flörl, 2015). Os antifúngicos da classe dos poliênicos são os mais antigos e seus principais representantes são a Afotericina B e a Nistatina. Esses compostos atuam se ligando ao ergosterol e formando

poros na membrana da célula fúngica, permitindo a saída de íons e componentes intracelulares, o que leva a célula à morte (Tortorano *et al.*, 2021). Por fim, temos a Flucitosina, um antifúngico que age na síntese de ácidos nucleicos. A droga entra na célula por meio de permeases e é convertida em dois metabólitos que inibem os processos de transcrição, replicação do DNA e síntese proteica. (Figura 5A)

Apesar de amplamente utilizados, os antifúngicos disponíveis atualmente encontram diversas limitações que dificultam o sucesso do tratamento, como a alta toxicidade dos compostos poliênicos, causada pela similaridade entre os esteróis presentes nas membranas das células humanas (colesterol) e das células fúngicas (ergosterol) (Odds, Brown e Gow, 2003), e o fato de o tratamento ser geralmente longo e dispendioso. Entretanto, o maior desafio enfrentado atualmente é o crescente número de cepas fúngicas resistentes aos fármacos disponíveis. Essa resistência pode ser primária, também chamada intrínseca, quando a resistência é uma característica de todos os isolados da espécie, sem que tenha havido o contato prévio do fungo com o fármaco, como é o caso da resistência ao fluconazol; ou secundária/adquirida, quando a resistência é estabelecida após o contato com a droga, geralmente pelo tratamento prolongado (Tortorano *et al.*, 2021).

Diversos mecanismos de resistência já foram descritos para as espécies de *Candida* frente às diferentes classes de antifúngicos. Para os azóis, o mecanismo mais utilizado é a ativação de bombas de efluxo para reduzir a concentração de droga dentro da célula (Figura 5B). Além disso, mutações no gene *ERG11* que codifica a enzima 14- α -esterol demetilase, impedem que os azóis se liguem ao sítio enzimático (Figura 5B) (Löffler *et al.*, 1997), bem como a super expressão de *ERG11* devido a mutações no fator de transcrição UPC2 em *C. albicans* (Flowers *et al.*, 2012). Esses mecanismos podem ocorrer de forma simultânea, produzindo efeitos aditivos ou até mesmo gerando resistência cruzada entre os diferentes azóis (Perlin, Rautemaa-Richardson e Alastruey-Izquierdo, 2017).

A resistência às equinocandinas envolve, assim como um dos mecanismos de resistência aos azóis, a aquisição de mutações em genes. No caso das equinocandinas, essas mutações acontecem nos genes *FKS*, que codificam as subunidades catalíticas da β -1,3-glucana sintase. (Figura 5B) (Perlin, Rautemaa-Richardson e Alastruey-Izquierdo, 2017). A resistência aos compostos poliênicos envolve, geralmente, a seleção de espécies menos susceptíveis durante a terapia com o fármaco e casos de resistência adquirida são

bastante raros (Perlin, Rautemaa-Richardson e Alastruey-Izquierdo, 2017). O principal mecanismo envolvido na resistência aos compostos poliênicos é a diminuição do conteúdo de ergosterol na membrana celular, dessa forma, o tratamento com azóis, que agem justamente diminuindo a concentração de ergosterol na membrana, pode promover resistência ao antifúngicos poliênicos na célula (Vazquez *et al.*, 1998). Há também a indução de resistência por alterações em alguns genes *ERG* (*ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG6*, *ERG11*) (Tortorano *et al.*, 2021) (Figura 5B). Por fim, a resistência à flucitosina, assim como à outras classes de antifúngicos, ocorre por meio de mutações em genes, nesse caso nos genes *FCY2*, *FCY1* e *FUR1*, e emerge quando o tratamento se dá por monoterapia (Arendrup e Patterson, 2017). (Figura 5B)

Apesar de muitos fatores genéticos e mecanismos do processo de resistência já terem sido elucidados, os fatores biológicos mais fundamentais ainda não estão bem compreendidos (Perlin, Rautemaa-Richardson e Alastruey-Izquierdo, 2017). Dessa forma, é de extrema importância que se estude cada vez mais a fundo as infecções fúngicas e seus agentes causadores, conhecendo cada vez mais suas estruturas e seu metabolismo.

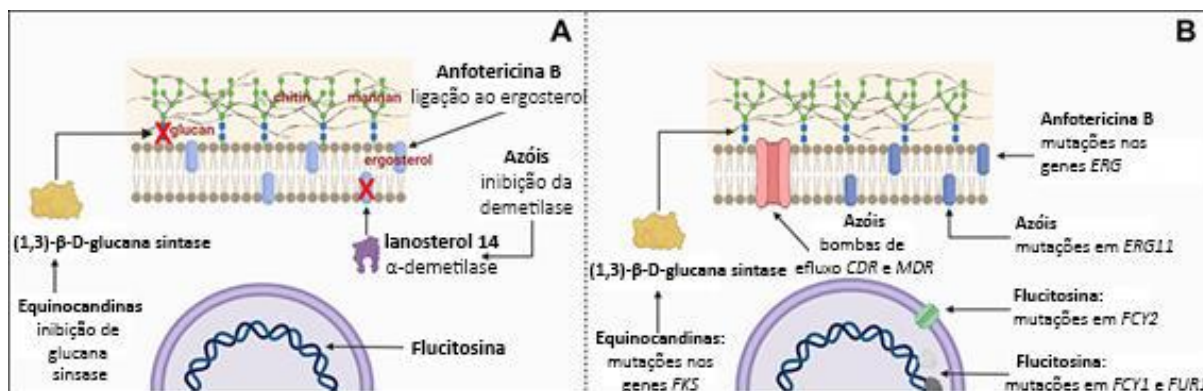


Figura 5. Mecanismos de ação de antifúngicos (A) e mecanismos de resistência desenvolvidos pelos fungos (B). Adaptado de (Tortorano et al., 2021).

1.5 Vesículas Extracelulares

Vesícula Extracelular (VE) é o nome dado a partículas compostas por uma bicamada lipídica que, depois de liberadas por uma célula, conseguem alcançar o meio extracelular (Rizzo, Rodrigues e Janbon, 2020). A produção e liberação de VEs são

processos que ocorrem em todos os tipos celulares estudados até o momento (Joffe *et al.*, 2016). Em células fúngicas, esse mecanismo foi sugerido em meados de 1970 (Takeo *et al.*, 1973), mas o primeiro isolamento de VEs foi publicado em 2007 (Rodrigues *et al.*, 2007a). Nesse trabalho, VEs foram isoladas a partir de sobrenadante de cultura do fungo *C. neoformans*. Após 14 anos, VEs já foram detectadas em vinte diferentes espécies, tanto em fungos filamentosos quanto em leveduriformes (Rizzo, Rodrigues e Janbon, 2020), como *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix shenckii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* (Albuquerque *et al.*, 2008), *P. brasiliensis* (Vallejo *et al.*, 2011a), *Malassezia sympodialis* (Gehrmann *et al.*, 2011) , *Pichia fermentans* (Leone *et al.*, 2018), entre outros. Apesar de se ter um conhecimento muito menos amplo sobre VEs de fungos filamentosos se comparado a leveduras, sua presença já foi confirmada em várias espécies, como *Trichoderma reesei* (Paula, de *et al.*, 2019), *Alternaria infectoria* (Silva *et al.*, 2014), *Trichophyton interdigitale* (Bitencourt *et al.*, 2018) e *Rhizopus delemar* (Liu *et al.*, 2018), por exemplo.

As VEs fúngicas apresentam uma bicamada lipídica e sua composição varia entre as espécies. Estes compartimentos já foram descritos carregando lipídeos (glicolipídeos neutros, esteróis e fosfolipídeos) (Albuquerque *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2015), proteínas (como por exemplo lipases, proteases, fosfatase, urease e lacase) (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2007a, 2008; Vargas *et al.*, 2015), polissacarídeos (glucuronoxilomanana [GXM], epítomos de α -galactosil e manose e resíduos de N-acetilglucosamina) (Peres da Silva *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2007a; Vallejo *et al.*, 2011a) , pigmentos (Eisenman *et al.*, 2009), diferentes classes de RNA: miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA e mRNA (Peres da Silva *et al.*, 2015), descritos como fatores e reguladores de virulência em diferentes espécies fúngicas, e até mesmo príons, como descrito mais recentemente (Toledo Martins, de *et al.*, 2019). Dessa forma, é possível concluir que estes compartimentos parecem ter papel importante no estabelecimento e desenvolvimento da doença, no carregamento de informações e no estabelecimento de comunicação entre células.

Apesar de diversos estudos já terem sido realizados e muitas informações importantes terem sido obtidas, ainda não é possível precisar os mecanismos pelos quais as VEs são produzidas e liberadas (Rizzo, Rodrigues e Janbon, 2020). O que podemos afirmar é que a produção de vesículas é modulada pelas condições do ambiente ou do hospedeiro (Rizzo, Rodrigues e Janbon, 2020).

De forma geral, os mecanismos de biogênese de VEs propostos até o momento são: a) liberação de exossomos derivados de corpos multivesiculares (MVBs); b) brotamento ou “shedding” de microvesículas a partir da membrana plasmática; ou, como demonstrado por estudos do nosso grupo, c) através de um mecanismo de subtração citoplasmática, no qual a membrana sofre uma invaginação, um remodelamento, seguida pela fusão com a membrana, dando origem a uma vesícula extracelular (Deatherage e Cookson, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013) (Figura 6. Uma vez que ocorrem diferentes processos de biogênese na célula de forma simultânea, são formadas e liberadas vesículas de tamanhos e composições distintas a todo momento (Rodrigues *et al.*, 2008) .

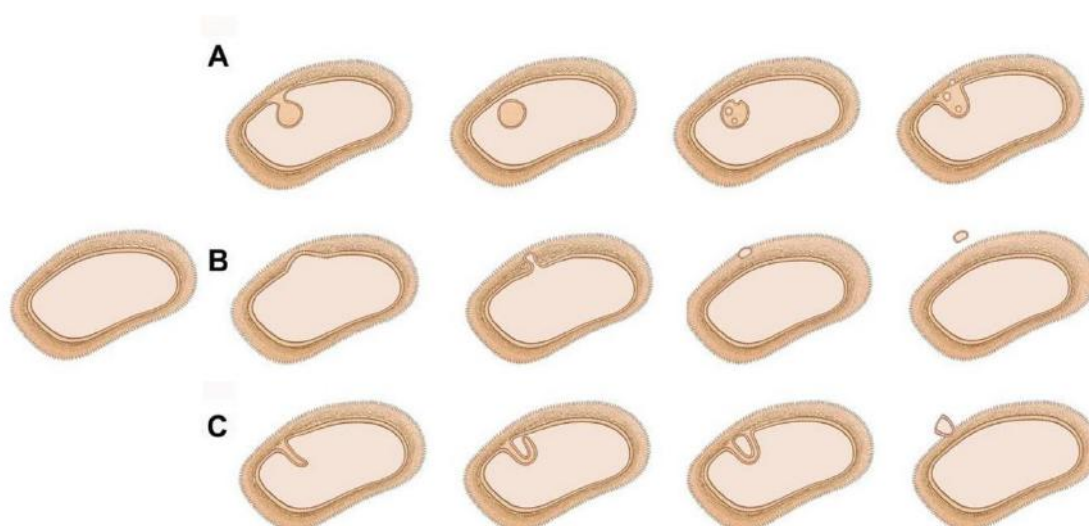


Figura 6. Produção de vesículas extracelulares por fungos. (A) Liberação de exossomos após fusão de corpos multivesiculares (MVBs) com a membrana, (B) brotamento de vesículas na membrana das células fúngicas e (C) mecanismo de subtração citoplasmática. (Adaptado Nimrichter *et al.*, 2018)

Ainda não se sabe exatamente o mecanismo utilizado pelas VEs para atravessar a parede celular fúngica. Porém, hipóteses como: (i) a existência de canais na parede celular, por meio dos quais as VEs seriam guiadas para o meio extracelular; (ii) a hidrólise de componentes estruturais da parede celular através de enzimas presentes nas VEs; e (iii) a passagem das VEs por pressão mecânica, chamada pressão de turgor, com a presença ou não de poros, sem que ocorram mudanças estruturais significativas na parede celular (Rodrigues *et al.*, 2015; Wolf e Casadevall, 2014) vêm sendo discutidas na literatura. Acredita-se que possa acontecer uma combinação entre essas três proposições que permite a passagem desses compartimentos pela densa parede celular fúngica.

Apesar de ser uma área de conhecimento em crescimento, o estudo de VEs ainda é muito direcionado apenas ao seu papel como compartimentos exportadores, carregando fatores de virulência e agindo como imunomoduladores (Rodrigues e Casadevall, 2018), ao passo que pouco se é discutido o processo inverso, ou seja, a internalização de vesículas pelas próprias células fúngicas e como isso impacta aspectos fisiológicos e fenotípicos das mesmas. Nesse contexto, estudos já foram realizados para avaliar a capacidade de lipossomos de atravessarem a parede celular fúngica e permanecerem intactos. Tais estudos trazem evidências de que a parede celular fúngica não é uma estrutura rígida, uma vez que permite que esse trânsito seja realizado (Walker *et al.*, 2018). Efeitos da internalização de vesículas pelas células fúngicas já foram observados, por exemplo, pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da fitopatologia conhecida como mofo branco, ao internalizar vesículas de girassol. Viu-se que as VEs da planta continham proteínas defensivas e sua internalização pelo patógeno induziu mudanças morfológicas drásticas no fungo, bem como permeabilização de sua membrana e uma redução de aproximadamente 80% do crescimento de hifas (Regente *et al.*, 2017), o que, conseqüentemente, impacta na integridade do fungo e no sucesso da infecção.

Em estudos recentes, Honorato e colaboradores (Honorato *et al.*, 2021) apresentaram resultados importantes acerca das VEs de *C. albicans* e diversos efeitos promovidos pela interação das mesmas com as leveduras do fungo, dos quais podemos destacar o aumento do crescimento das leveduras, a inibição da formação de biofilme e a redução da virulência do fungo em modelo animal. Além disso, foi observada a capacidade de inibição da diferenciação do fungo em meio indutor de filamentação, resultado que motivou o presente trabalho. (Honorato *et al.*, 2021)

Diante de todos esses resultados é possível concluir que vesículas extracelulares se encontram numa via de transporte bidirecional, sendo tanto exportadas quanto importadas pelas células fúngicas, informação que nos permite ampliar o espectro de estudo nessa área, avaliando novas funções e possibilidades para as VEs.

2 JUSTIFICATIVA

Vesículas Extracelulares vêm sendo alvos crescentes de estudo, já possuindo diversas funções descritas na literatura, principalmente como compartimentos responsáveis por exportação de compostos para fora das células fúngicas, como o carreamento de componentes celulares como lipídeos (Albuquerque *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2015); polissacarídeos (Peres da Silva *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2007a; Vallejo *et al.*, 2011a); pigmentos (Eisenman *et al.*, 2009) diferentes classes de RNAs (Peres da Silva *et al.*, 2015); realização da comunicação entre células, modulação imunológica, entre outros. Os efeitos dessas vesículas em células hospedeiras vem sendo amplamente estudados e despertaram o uso desses compartimentos para fins diversos, como potenciais formulações vacinais, por exemplo. (Vargas *et al.*, 2020).

Apesar de pouco se saber sobre o efeito direto das vesículas extracelulares sobre a própria célula fúngica, estudos recentes demonstraram que as VEs de *C. albicans* são capazes de modular diversas funções do fungo, dentre elas o processo de transição entre morfologias (Honorato *et al.*, 2021), descoberta que motivou a realização do presente trabalho.

Sendo assim, buscamos ampliar o estudo das interações realizadas entre *C. albicans* e suas vesículas, a partir da análise de componentes da parede celular do fungo após a referida interação, a fim de aprofundar o conhecimento sobre essa relação e sobre o transporte bidirecional das VEs.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar, por diferentes metodologias, o impacto das Vesículas Extracelulares sobre a parede celular de *C. albicans* após a interação, em tempos curtos e longos, entre a cepa ATCC 90028 e suas VEs.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de VEs pela cepa *C. albicans* de forma quantitativa e qualitativa.
- Avaliar, em tempos curtos, os impactos diretos das VEs sobre o remodelamento da parede celular fúngica.
- Avaliar, no tempo de 24h, os impactos gerados na parede celular fúngica pela inibição da diferenciação causada pelas VEs sobre as leveduras de *C. albicans* em meio indutor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de *C. albicans*

A cultura de *C. albicans* (ATCC 902028) foi mantida em Sabouraud (2% de glicose, 1% de peptona de carne, em 1000mL de água MilliQ). Para o cultivo das leveduras o estoque foi descongelado e as leveduras cultivadas em meio Sabouraud líquido (10 mL) sob agitação (150 rpm) a 30 °C por 24h para obtenção do pré-inóculo.

4.2 Isolamento de Vesículas Extracelulares de *C. albicans*

As VEs de *C. albicans* foram obtidas seguindo protocolo adaptado de Reis *et al.*, 2019. A partir do pré-inóculo de *C. albicans*, uma alíquota foi retirada para contagem do número de células em Câmara de Neubauer. O volume de 200 µL de uma suspensão contendo 10⁸ células/mL foi transferido para placas de Petri contendo meio Sabouraud sólido. A suspensão foi distribuída de forma homogênea pela placa com alça bacteriológica e as mesmas foram incubadas a 30 °C por 24h.

A massa celular foi recuperada das placas com auxílio de *cell scraper* e a solubilizada em aproximadamente 20 mL de PBS estéril (filtrado em membrana de 0,22 µm). A suspensão celular foi centrifugada a 4.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante contendo VEs centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos e filtrado em filtro de 0.45 µm a fim de remover debris celulares remanescentes. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 100 000 x g por 1 hora a 4 °C. Por último, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as VEs ressuspendido em PBS estéril. Uma alíquota foi retirada para teste de esterilidade em placa de BHI ágar.

4.3 Dosagem de Proteína Total e Esterol

Para uma melhor elucidação do perfil vesicular, foram realizadas dosagem de proteína nas vesículas isoladas com o auxílio do Kit BCA Protein Assay (Pierce™) e

dosagem de esterois utilizando Kit fluorimétrico *Amplex Red Sterol Assay* (Molecular Probes).

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

A análise de rastreamento de partículas foi realizada com a finalidade de quantificar as vesículas, possibilitar o conhecimento do tamanho das partículas e a homogeneidade da amostra. A ARP das VEs fúngicas foi feita num sistema de análise de nanopartículas ZetaView (NTA; Particle Metrix GmbH). As amostras foram diluídas entre 10.000 e 30.000 x em PBS (filtrado em membrana de 0,22 µm) e medidas dentro do intervalo de diluição ótimo ($9 \times 10^7 - 2,9 \times 10^9$ partículas/mL) para o software (ZetaView Software version 8.02.31, Particle Metrix GmbH). Os dados adquiridos foram analisados usando o software ZetaView 8.02.31 (Particle Metrix GmbH), com parâmetros estabelecidos de temperatura a 23 °C, sensibilidade de 30-85 quadros por segundo (fps), velocidade de obturador de 55 e duração do pulso de laser igual à duração do obturador. Os parâmetros de aquisição foram estabelecidos a um brilho mínimo de 20, um tamanho máximo de 200 pixels e mínimo de 5 pixels. Para calibração do equipamento antes da leitura das amostras foram usadas partículas de Poliestireno (Microtrac GmbH) com tamanho médio de 100 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software ZetaView e o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad, CA).

4.5 Tratamento das leveduras de *C. albicans* com Vesículas Extracelulares

A interação das VEs com as leveduras foi realizada em duas condições. Na primeira, a fim de avaliar o impacto direto das VEs sobre os componentes da parede celular, as células, numa concentração de 10^7 células/poço, interagiram com 300 µg/mL de proteína de VEs, por 2h a 37 °C em PBS. Como controle foi usado um inóculo de leveduras nas mesmas condições, porém sem interação com VEs.

Na segunda condição os fungos foram tratados com as VEs (100 µg/mL) por 24h a 37 °C em indutor de diferenciação (Meio 199, pH 7). Nossos resultados prévios mostram que a incubação com as VEs promove a inibição da filamentação. Como controle foram

utilizadas leveduras crescidas em meio Sabouraud, visto que em meio 199 ocorre a filamentação das mesmas. As mudanças na parede celular foram investigadas e comparadas com a condição controle.

Para as duas condições foi feito um pré-inóculo de Ca 90028 como descrito no item 4.1 e após o período de incubação, ambas as condições tratadas com VEs foram recuperadas, lavadas e contadas para os experimentos posteriores. Para os experimentos em períodos longos de incubação foram utilizados 100 µg/mL de proteína de VEs seguindo o protocolo estabelecido por Honorato e colaboradores (Honorato *et al.*, 2021). Para avaliar o impacto das EVs na parede em tempos curtos de incubação escolhemos uma concentração mais elevada (300 µg/mL).

4.6 Microscopia óptica de fluorescência e Citometria de Fluxo

Aproximadamente 10^7 células de cada uma das duas condições (células controle e tratada) foram fixadas em solução de PBS contendo 4% de paraformaldeído por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, bloqueadas com PBS/BSA 1% por 1h a 37° C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS após cada procedimento.

Foram utilizados os marcadores WGA conjugado à Alexa 594 (WGA-Alexa 594 -10 µg/mL), Concanavalina A conjugada à FITC (ConA-FITC – 10 µg/mL), Uvitex (diluição de 1:500 de uma solução supersaturada) e a quimera Dectina-1-Fc, seguida de marcação secundária com Alexa Fluor 555, que reconhecem, respectivamente, oligômeros de quitina, resíduos de manose, quitina e β-glucana, estruturas conhecidamente presentes na parede celular de *C. albicans*. Para as marcações com WGA-Alexa 594 e ConA-FITC, as células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Para marcação com o Uvitex, a incubação foi feita por 10 minutos, também a 37 °C. A incubação coma quimera Dectina-1-Fc foi feita por 1h a 37 °C e depois foi usado um anticorpo secundário conjugado a AlexaFluor 555 que se liga à quimera por mais 1h a 37 °C. Os pellets foram lavados três vezes com PBS após cada marcação. Para a microscopia de fluorescência as lâminas foram montadas em 50 mM N-propilgalato-PBS e analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Z1 Observer (Zeiss, Oberkochen, Germany). Para citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento BDFortessa utilizando o software FlowJo.

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do Perfil Vesicular

O perfil das VEs foi caracterizado através de Análise de Rastreamento de Partículas (ARP), dosagem de proteína por Kit BCA Protein Assay (Pierce™) e dosagem de esterol utilizando Kit fluorimétrico *Amplex Red Sterol Assay* (Molecular Probes).

Na ARP foi observada uma concentração de $1,25 \times 10^{12}$ VEs/mL, com tamanhos variando entre 20 e 300 nm, mas com populações predominantes em torno de 100nm, tendo diâmetro médio de 99 nm, de acordo com a análise, como pode ser observado na Figura 7.

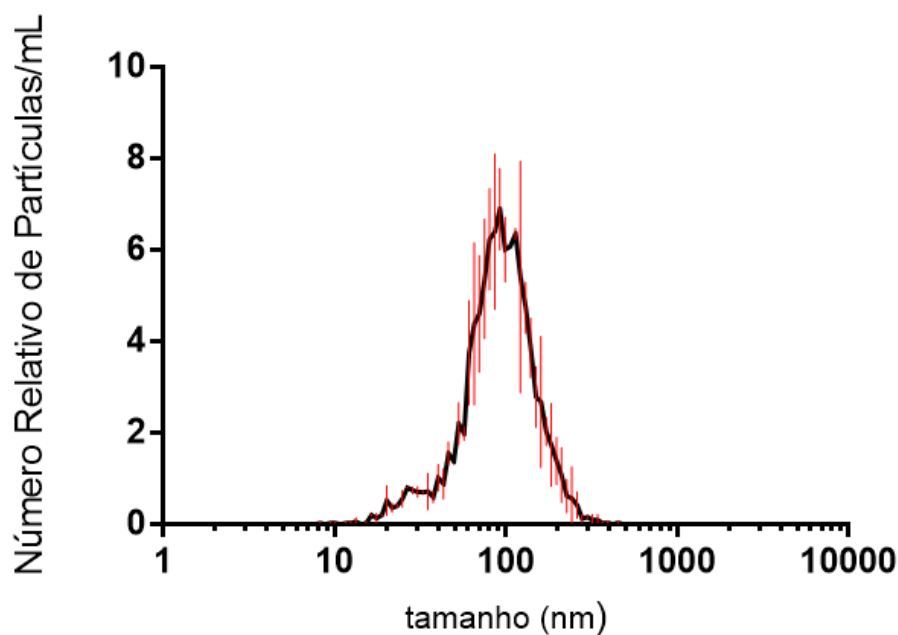


Figura 7. Análise do perfil das VEs de Ca 90028 através de Análise de Rastreamento de Partículas. O tamanho médio observado nas VEs foi de 99 nm em uma concentração de $1,25 \times 10^{12}$ VEs/mL.

Para quantificar as VEs também foram feitas dosagens de esterol e proteína. Essa quantificação nos confere a concentração de VEs em $\mu\text{g/mL}$ para proteína e mM para esterol e, a partir desse resultado, é possível usar a concentração adequada nos experimentos.

5.2 Avaliação da interação Fungo x VEs

Leveduras de cepa 90028 de *C. albicans* foram incubadas com as VEs da mesma cepa em duas condições distintas visando observar, de forma independente, os efeitos que essa interação tem sobre os componentes da parede celular do fungo. Essa avaliação foi feita utilizando as metodologias de Citometria de Fluxo e Microscopia Ótica de Fluorescência. A análise estatística dos dados de citometria foi realizada através de um teste tipo T pareado em um intervalo de 95% de confiança.

5.2.1 Interação em tempos curtos

Para avaliar o impacto direto das VEs sobre a parede celular de *C. albicans*, foi realizada a interação de $300 \mu\text{g/mL}$ de VEs com 10^7 células do fungo em PBS por 2h a 37°C . Como controle, foi usada a mesma quantidade de células tratadas apenas com PBS. Depois de 2h, as células de ambas as condições, tratada e controle, foram recuperadas, fixadas e bloqueadas para evitar interações inespecíficas. Foram feitas, então, as marcações dos componentes de interesse da parede celular fúngica nas duas condições e os resultados foram observados por Citometria de Fluxo e Microscopia Ótica de Fluorescência.

Na figura 8 estão representadas as intensidades médias de fluorescência (IMF) das marcações observadas na Citometria de Fluxo. Nota-se que não houve diferença significativa entre as condições Controle e Tratada para as marcações com ConA (Fig.8A), Uvitex (Fig.8B), WGA (Fig.8C) e Dectina-1-Fc (Fig.8D).

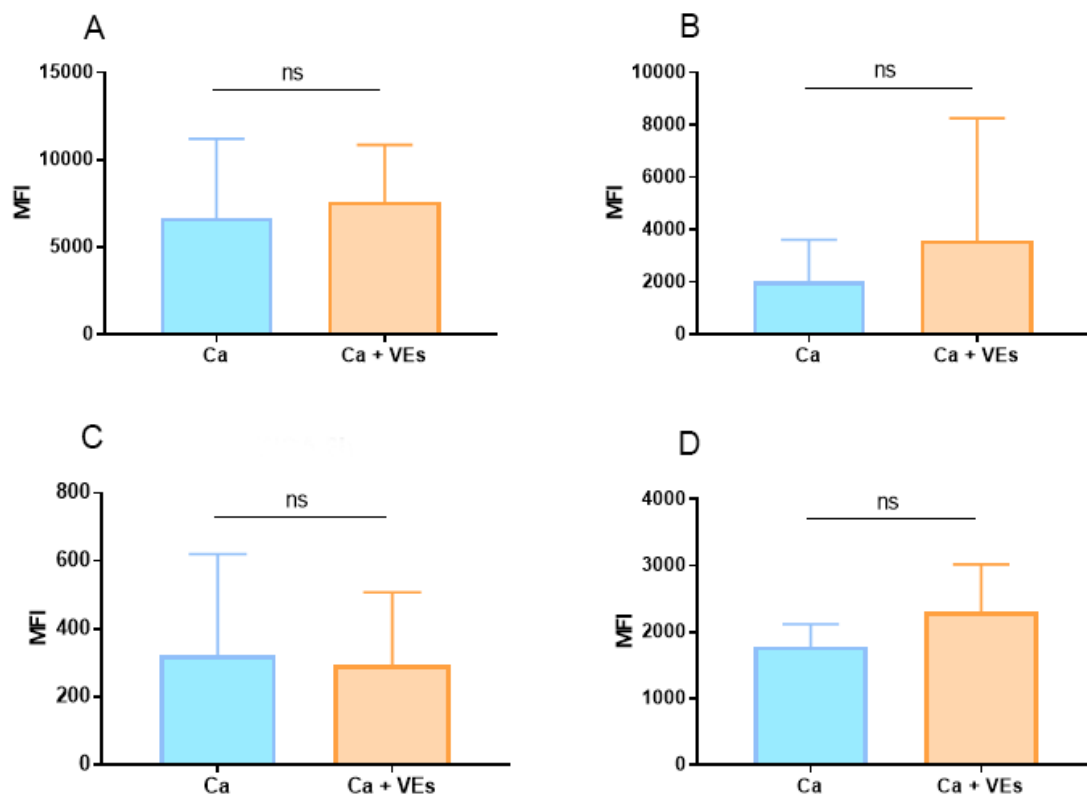


Figura 8. Representação gráfica da MFIs medidas por Citometria de Fluxo. Análise das marcações com ConA (A), Uvitex (B), WGA – Alexa 594 (C) e Dec-1-Fc + Alexa 555 (D), demonstrando que não houve diferenças significativas de MFI entre as condições Tratada e Controle após a interação de 2h das células de *C. albicans* e suas VEs. A análise estatística foi realizada através de um teste tipo T pareado em um intervalo de 95% de confiança.

Na figura 9 podem ser observadas as microscopias ópticas de fluorescência do tempo de 2h. Não foi possível notar diferenças significativas nas intensidades das marcações entre as condições tratado e controle.

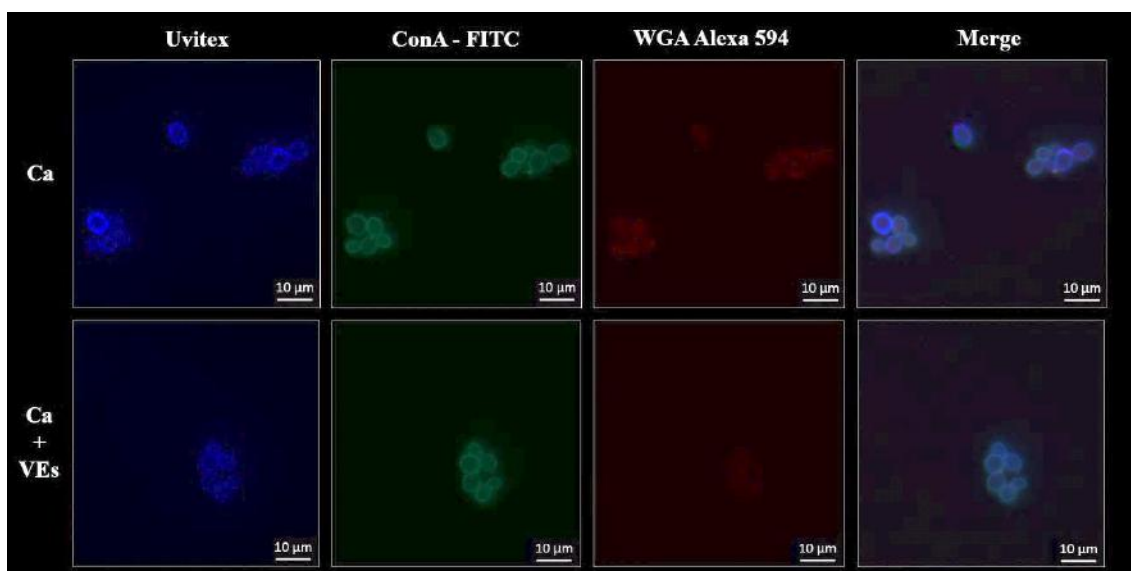


Figura 9. Microscopia Óptica de Fluorescência da interação em tempo curto. Análise dos componentes da parede celular de *C. albicans* através de Microscopia Óptica de Fluorescência das leveduras nas condições controle e tratada com VEs.

5.2.2 Interação de tempo longo

Na condição de tempo longo, as leveduras foram incubadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de VEs por 24h em meio 199 pH 7. Esse meio induz a filamentação de *C. albicans*, porém, estudos do nosso grupo demonstraram que, na presença das VEs, o processo de diferenciação é inibido (Honorato *et al.*, 2021). A fim de observar, então, os possíveis efeitos que as VEs estariam causando sobre a parede celular fúngica nesse processo, as células tratadas e as células controle, foram recuperadas, fixadas, bloqueadas e marcadas com de forma específica para cada um dos componentes de interesse da parede celular e os resultados foram analisados por Citometria de Fluxo e Microscopia Óptica de Fluorescência.

A análise de IMF indicou que, para as marcações com Uvitex (Fig 10B) e WGA Alexa 594 (Fig 10C), não houve diferença significativa entre as condições tratada e controle. A marcação de ConA (Fig 10A), por outro lado, apresentou um aumento de aproximadamente 300% de IMF, evidenciando um aumento bastante grande na exposição de manose. Somado a isso, pode ser observado um aumento discreto, porém também significativo, na exposição de β -glucana, tendo sido observado o aumento na IMF da quimera Dectina-1-Fc (Fig 10D).

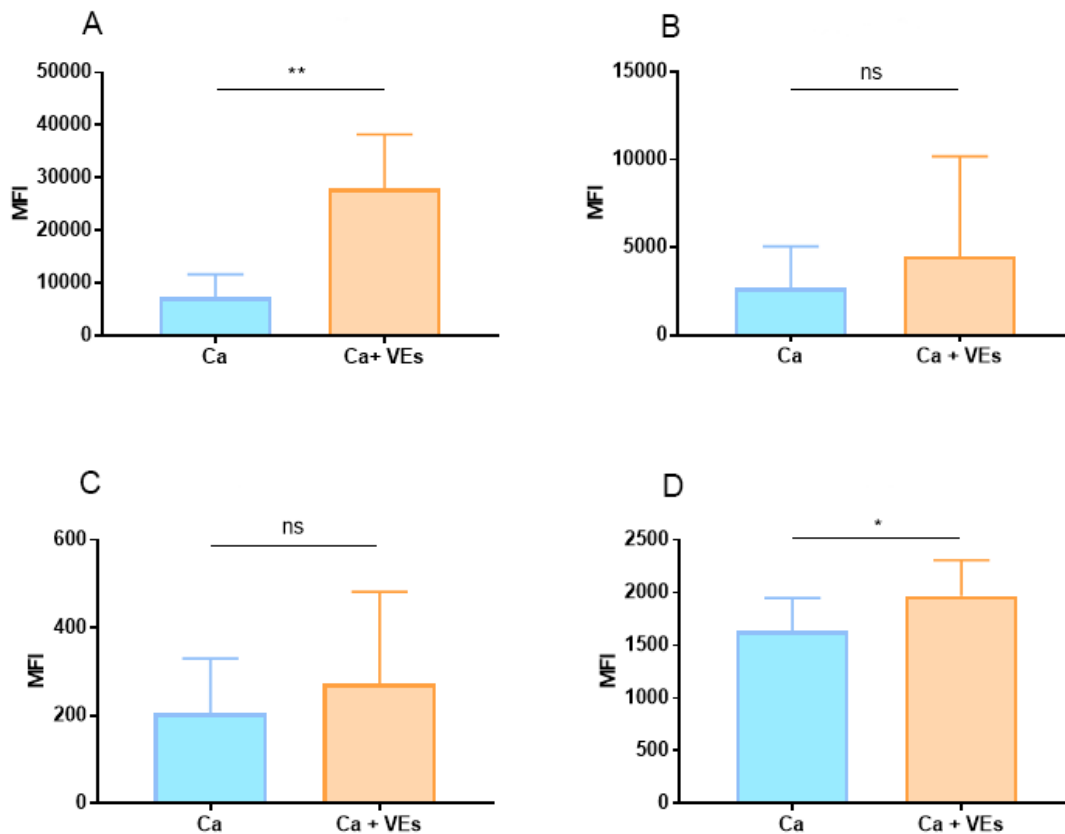


Figura 10. Representação gráfica da MFIs medidas por Citometria de Fluxo. Os gráficos B e C mostram não haver diferença significativa entre as MFI das condições tratado e controle, marcadas com Uvitex e WGA-Alexa 594, respectivamente. As marcações com ConA (A) e Dec-1-Fc (D), por outro lado, apresentaram aumentos significativos de MFI entre as células tratadas e as células controle após 24h de interação. A análise estatística foi realizada através de um teste tipo T pareado em um intervalo de 95% de confiança. Dados representativos de experimentos feitos em triplicatas biológicas. * $p < 0.05$, ns = valores sem diferença estatística.

Na figura 11 estão as microscopias ópticas de fluorescência do tempo de 24h. Ainda que de forma bastante sutil, é possível notar um leve aumento na intensidade de fluorescência da marcação com ConA, corroborando o aumento observado na citometria de fluxo.

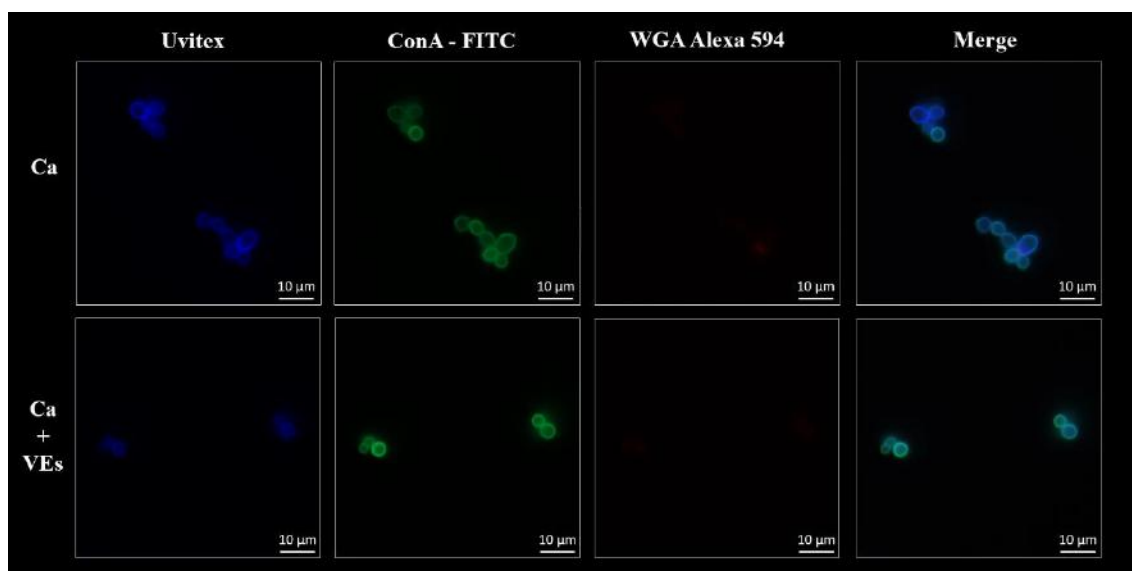


Figura 11. Microscopia Óptica de Fluorescência da interação em tempo longo. Análise dos componentes da parede celular de *C. albicans* através de Microscopia Óptica de Fluorescência das leveduras nas condições controle e tratada com VEs.

6 DISCUSSÃO

Apesar do crescente interesse no estudo de VEs fúngicas, muito pouco é conhecido no que diz respeito à interação das mesmas com o fungo e os efeitos estruturais e metabólicos gerados por ela. Investigações com esse objetivo podem ajudar a elucidar questionamentos sobre os efeitos da relação fungo-vesícula em diversos cenários, a partir do entendimento do impacto causado no fungo por essa interação. Dados recentes da literatura revelam que as VEs fúngicas podem estar envolvidas com a comunicação entre esses organismos. Em estudos realizado por Voelz e colaboradores, foi observado, a partir da co-infecção *in vitro* de diferentes espécies de um mesmo gênero, um aumento da sobrevivência da cepa menos virulenta dentro de macrófagos, promovida pela cepa mais patogênica (Voelz *et al.*, 2014) e que as VEs da cepa mais virulenta eram responsáveis por essa transferência (Bielska *et al.*, 2018). A relação entre fungo e vesículas foi também avaliada durante a formação de biofilme por *C. albicans*, onde foi visto que as VEs derivadas do biofilme apresentavam perfil de proteínas e polissacarídeos similar ao da própria matriz e que, além disso, estariam também desempenhando papel catalítico na síntese de macromoléculas, especialmente dos polissacarídeos. Essas descobertas sugerem que as VEs estariam desempenhando papel importante no fornecimento de material e na catálise da formação de componentes estruturais importantes para a formação da matriz do biofilme (Zarnowski *et al.*, 2018). Estudos como esses demonstram que o papel das VEs não se restringe somente à sinalização célula-célula, mas também estão relacionados com funções essenciais no compartilhamento de recursos e informações que beneficiam de forma comunitária as células presentes daquele microambiente.

Em nossos estudos as VEs obtidas da cepa ATCC 90028 de *C. albicans* apresentaram populações com tamanhos variando entre 20 e 300 nm, resultado que condiz com os dados que se tem na literatura para VEs desse fungo. Vargas e colaboradores (Vargas *et al.*, 2015) demonstraram a presença de populações distintas com diâmetros entre 50 e 850 nm, mas com populações predominantes apresentando diâmetros em torno de 100 nm, onde encontramos o tamanho majoritário para as VEs isoladas nesse trabalho (Dawson *et al.*, 2020; Honorato *et al.*, 2021; Vargas *et al.*, 2015). A variação do tamanho das VEs fúngicas é esperada e pode ocorrer por diferentes fatores, que incluem os meios de cultura utilizados e suas respectivas complexidades nutricionais (Marina *et al.*, 2020)

e a utilização de diferentes protocolos de isolamento de VEs (Théry *et al.*, 2018). Além disso, os diferentes mecanismos de biogênese vesicular também podem impactar o tamanho das mesmas (Deatherage e Cookson, 2012; Rodrigues *et al.*, 2008, 2013).

Tendo como base os resultados observados por Honorato e colaboradores (Honorato *et al.*, 2021) demonstrando que as VEs produzidas por leveduras de *C. albicans* são capazes de inibir a filamentação desse fungo e reduzir sua virulência, decidimos avaliar os efeitos desses compartimentos sobre o remodelamento da parede celular, investigando seus principais componentes. Inicialmente, avaliamos um efeito em tempos reduzidos. Numa interação de curto prazo, com duração de duas horas, o efeito sobre a parede celular estaria relacionado a uma simples transferência de material ou a presença de atividade enzimática. Porém, não foi possível observar alterações significativas nos componentes em questão (quitina, oligômeros de quitina, manose e β -glucana) avaliados pelas metodologias de citometria de fluxo e microscopia óptica de fluorescência. Dessa forma, as mudanças mediadas pelo tratamento com as VE podem estar envolvidas com regulações que dependem de períodos mais longos de incubação.

Os resultados da interação de tempo longo evidenciaram aumentos significativos nos conteúdos de manose e β -glucana na parede celular dos fungos tratados com as VEs. As análises de citometria mostraram de forma bastante clara esse aumento de exposição, bem como a microscopia de fluorescência que, mesmo de forma mais discreta, também foi capaz de evidenciá-lo. Um aumento tão expressivo (~300%) abre espaço para diferentes hipóteses que justifiquem esse acréscimo, como a presença de enzimas nas VEs que poderiam degradar componentes da parede fazendo com que as unidades de manoses se tornem mais expostas. Uma outra alternativa seria o carreamento de unidades de manose pelas VEs e sua posterior deposição sobre o exterior da parede celular, o que justificaria também o aumento do conteúdo de manose observado. No entanto, esse resultado seria também observado em experimentos realizados durante períodos curtos, o que não foi demonstrado. Considerando que o meio de cultura utilizado em nossos experimentos promove a filamentação e as alterações observadas se mostram estruturalmente ainda mais distantes das hifas, nossos resultados sugerem que as leveduras obtidas após tratamento com as VEs apresentam uma parede celular diferente tanto das leveduras controle quanto das hifas de *C. albicans*. Trata-se, potencialmente, de uma levedura com composição pouco conhecida e que requer maiores investigações.

Esses dados confirmam uma atividade regulatória das VEs, que levam a uma re-estruturação da parede celular fúngica.

Para dar seguimento a esse trabalho iremos investigar a ação enzimática repetindo os experimentos utilizando as VEs tratadas com calor, para que as enzimas sejam desnaturadas e possamos verificar se se trata de um efeito enzimático ou não. Além disso, deverá ser feita a compartimentalização do experimento em novos intervalos de tempo, a fim de observarmos as etapas da interação de forma mais refinada, pois, apesar de termos conseguido resultados promissores até aqui, é de suma importância que sejam definidos os próximos passos a fim de elucidar todos os questionamentos gerados pelos resultados obtidos até o momento.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, concluímos que:

- Vesículas Extracelulares não parecem impactar a composição da parede celular fúngica de forma significativa em interações curtas.
- A interação de tempo longo entre VEs e leveduras de *C. albicans* em meio indutor de filamentação, além de inibir a diferenciação morfológica, promove aumento no conteúdo de manose e β -glucana de sua parede celular.

8 REFERÊNCIAS

- AGUSTINHO, D. P. *et al.* Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e180040, 2018.
- ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1695–1710, ago. 2008.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S445–S451, 15 ago. 2017.
- 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.
- BITENCOURT, T. A. *et al.* Extracellular Vesicles From the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2343, 2018.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 28, n. 8, p. 799–808, ago. 2006.
- BRAUN, P. C.; CALDERONE, R. A. Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1472–1477, mar. 1978.
- BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 471–479, abr. 2005.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, ago. 2006.
- _____. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489–1498, out. 2014.
- CORONADO, J. E. *et al.* Conserved processes and lineage-specific proteins in fungal cell wall evolution. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 12, p. 2269–2277, dez. 2007.
- DAWSON, C. S. *et al.* Protein markers for *Candida albicans* EVs include claudin-like Sur7 family proteins. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 9, n. 1, p. 1750810, 2020.
- DEATHERAGE, B. L.; COOKSON, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 1948–1957, jun. 2012.
- DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.
- EISENMAN, H. C. *et al.* Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 155, n. Pt 12, p. 3860–3867, dez. 2009.
- FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.

- FLOWERS, S. A. *et al.* Gain-of-Function Mutations in UPC2 Are a Frequent Cause of ERG11 Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, 24 ago. 2012.
- GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2993, 2019.
- GEHRMANN, U. *et al.* Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses--novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. e21480, 2011.
- GOW, N. A. R. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, fev. 2012.
- GOW, N. A. R.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 406–412, ago. 2012.
- GOW, N. A. R.; LATGE, J.-P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, maio 2017.
- HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J. *et al.* Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, p. E51, 23 set. 2017.
- HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 54, n. 3, p. 149–169, mar. 2016.
- HONORATO, L. *et al.* **Extracellular vesicles regulate yeast growth, biofilm formation, and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.21.427696v1>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- JACOBSEN, I. D. *et al.* *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 85–93, jan. 2012.
- JOFFE, L. S. *et al.* Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. **mSphere**, v. 1, n. 4, p. e00099-16, ago. 2016.
- KLIS, F. M.; GROOT, P. DE; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 39 Suppl 1, p. 1–8, 2001.
- LENARDON, M. D. *et al.* Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. **The Cell Surface**, v. 6, p. 100047, 1 dez. 2020.
- LEONE, F. *et al.* Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2759–2767, abr. 2018.
- LIU, M. *et al.* Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen *Rhizopus delemar*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5243, 27 mar. 2018.
- LÖFFLER, J. *et al.* Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, n. 2, p. 263–268, 1 jun. 1997.
- MARINA, C. L. *et al.* Nutritional Conditions Modulate *C. neoformans* Extracellular Vesicles' Capacity to Elicit Host Immune Response. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1815, nov. 2020.
- MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 21, p. 166–178, jan. 2014.

- NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96–108, fev. 2017.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, jun. 2003.
- OLIVEIRA, C. S. DE *et al.* Clinical and epidemiological aspects of Candidemia in eight medical centers in the state of Parana, Brazil: Parana Candidemia Network. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 101041, 1 jan. 2021.
- PANDE, K.; CHEN, C.; NOBLE, S. M. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. **Nature Genetics**, v. 45, n. 9, p. 1088–1091, set. 2013.
- PAULA, R. G. DE *et al.* Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, p. 146, 2019.
- PERES DA SILVA, R. *et al.* Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. **Scientific Reports**, v. 5, p. 7763, 14 jan. 2015.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, dez. 2017.
- 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. Supplement_1, p. S79–S94, 15 mar. 2019.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007.
- POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. Chapter Three - *Candida* Survival Strategies. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 91p. 139–235.
- PONTÓN, J. [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin]. **Revista Iberoamericana De Micología**, v. 25, n. 2, p. 78–82, jun. 2008.
- QUINDÓS, G. *et al.* The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 107–119, set. 2018a.
- _____. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. **International Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 107–119, 1 set. 2018b.
- RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1366–1370, 23 jan. 2007.
- REGENTE, M. *et al.* Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 20, p. 5485–5495, 28 nov. 2017.
- 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.
- 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, 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. 2007a.
- _____. 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. 2007b.
- _____. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, jan. 2008.
- _____. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 414–420, ago. 2013.
- _____. Traveling into Outer Space: Unanswered Questions about Fungal Extracellular Vesicles. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 12, p. e1005240, dez. 2015.
- RODRIGUES, M. L.; CASADEVALL, A. A two-way road: novel roles for fungal extracellular vesicles. **Molecular Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 11–15, out. 2018.
- RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 2, p. e0007964, 2020.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, jun. 2015.
- SHIBATA, N. *et al.* Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 3, p. 365–372, 15 jun. 2007.
- SILVA, B. M. A. *et al.* Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. **Medical Mycology**, v. 52, n. 2, p. 202–210, fev. 2014.
- SILVA, R. P. DA *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14213, 21 set. 2015.
- TAKEO, K. *et al.* Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vitro as observed by freeze-etching. **Journal of Bacteriology**, v. 113, n. 3, p. 1442–1448, mar. 1973.
- THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 1 dez. 2018.
- TODA, M. *et al.* Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia — Four Sites, United States, 2012–2016. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 68, n. 8, p. 1–15, 27 set. 2019.
- TOLEDO MARTINS, S. DE *et al.* Extracellular Vesicles in Fungi: Composition and Functions. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 422, p. 45–59, 2019.
- TORTORANO, A. M. *et al.* <p>Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches</p>. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5543–5553, 19 dez. 2021.
- VALLEJO, M. C. *et al.* The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 343–351, mar. 2011a.
- _____. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 343–351, mar. 2011b.

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.

_____. Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis.

Cellular Microbiology, v. 22, n. 10, p. e13238, out. 2020.

VAZQUEZ, J. A. *et al.* Stable Phenotypic Resistance of *Candida* Species to Amphotericin B Conferred by Preexposure to Subinhibitory Levels of Azoles. **Journal of Clinical Microbiology**, 1 set. 1998.

VOELZ, K. *et al.* ‘Division of labour’ in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5194, 17 out. 2014.

WALKER, L. *et al.* The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles. **mBio**, v. 9, n. 1, p. e02383-17, 6 fev. 2018.

WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities.

International Journal of Antimicrobial Agents, v. 43, n. 1, p. 78–81, jan. 2014.

WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Challenges posed by extracellular vesicles from eukaryotic microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 22, p. 73–78, dez. 2014.

ZARNOWSKI, R. *et al.* *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS biology**, v. 16, n. 10, p. e2006872, out. 2018.

ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells.

Cellular Microbiology, v. 12, n. 3, p. 273–282, mar. 2010.