

NATALIA MARTINS DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA CARREADORA DE  
IMUNÓGENOS HETERÓLOGOS UTILIZANDO VESÍCULAS  
EXTRACELULARES FÚNGICAS



**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

2018

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Leonardo Nimrichter e co-orientação de Alícia Corbellini Piffer.**

RIO DE JANEIRO

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

M586d Martins da Silva, Natalia  
Desenvolvimento de uma plataforma carreadora de imunógenos heterólogos utilizando vesículas extracelulares fúngicas / Natalia Martins da Silva. -- Rio de Janeiro, 2018.  
66 f.

Orientador: Leonardo Nimrichter.  
Coorientador: Alícia Corbellini Piffer.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. vesículas extracelulares. 2. *S. cerevisiae*. 3. ovalbumina. I. Nimrichter, Leonardo, orient. II. Corbellini Piffer, Alícia, 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: **Natália Martins da Silva**

DRE: 115067610

BANCA EXAMINADORA: Prof. André Luis Souza dos Santos (Presidente)  
 MSc. Flávio Lemos Matassoli  
 Dra. Juliana Aparecida Rizzo Balancin  
 Profa. Alessandra D'Almeida Filardy (Suplente)

Título da Monografia: **“Desenvolvimento de uma plataforma carreadora de imunógenos heterólogos utilizando vesículas extracelulares fúngicas”**

Local: **Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **7 de dezembro de 2018 às 10:00h**

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 co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 7 de dezembro de 2018.

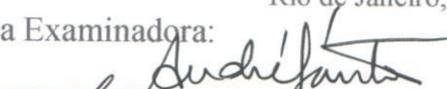
NOTA

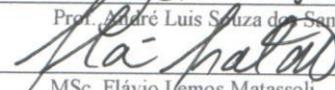
10,0

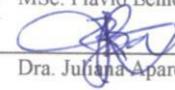
10,0

10,0

Banca Examinadora:

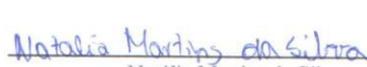
  
 Prof. André Luis Souza dos Santos

  
 MSc. Flávio Lemos Matassoli

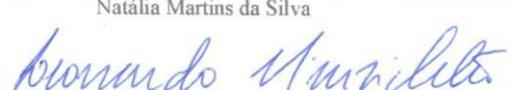
  
 Dra. Juliana Aparecida Rizzo Balancin

Profa. Alessandra D'Almeida Filardy

Aluno:

  
 Natália Martins da Silva

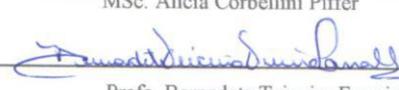
Orientador:

  
 Prof. Leonardo Nimrichter

Coorientador:

MSc. Alicia Corbellini Piffer

Coordenador  
de TCC

  
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## RESUMO

Infecções fúngicas sistêmicas vem emergindo ao longo das últimas décadas, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos. Os fármacos disponíveis atualmente apresentam efeitos colaterais significativos e diversos casos de resistência, além de serem utilizados em protocolos longos, caros e com interações medicamentosas frequentes e perigosas. Por isso, a busca por novas alternativas terapêuticas é urgente. Estudos avaliam a utilização de anticorpos monoclonais e peptídeos antifúngicos. No entanto, esses métodos esbarram, respectivamente, em problemas como baixo espectro de ação e elevado custo. Nesse cenário, a busca por vacinas antifúngicas vem sendo estimulada. Vacinas com “antígeno único” são atualmente utilizadas em testes clínicos; no entanto, problemas de eficácia são observados devido a variabilidade genética e imunológica das diferentes populações, além da própria plasticidade das cepas fúngicas. As propostas atuais sugerem o uso de vacinas multivalentes com forte componente CD8<sup>+</sup> e capazes de promover uma resposta de memória frente a diferentes espécies fúngicas. Resultados do nosso grupo mostram que vesículas extracelulares (VEs) produzidas por *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* são capazes de modular a atividade de fagócitos, levando a produção de óxido nítrico e citocinas pró inflamatórias, além de promover a expressão de moléculas coestimulatórias em células dendríticas. Além disso, dados não publicados do grupo, demonstram que a vacinação de camundongos com VEs de *C. albicans* protegeu os animais de um posterior desafio letal, mesmo na ausência de adjuvantes. Em conjunto, esses resultados sugerem que esses compartimentos ativam a resposta imune inata e pode mediar a resposta adaptativa, suportando o uso das VEs fúngicas como formulações vacinais multiantigênicas. O objetivo deste projeto é desenvolver um modelo de expressão de imunógenos heterólogos carregados por VEs utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo de fácil manipulação genética e cultivo. A cepa S288C de *S. cerevisiae* foi transformada com plasmídeo pRS416 contendo sequências químicas para expressão da proteína Ovalbumina (OVA) sob regulação de um promotor constitutivo do gene *ADHI* de *S. cerevisiae*. Três sequências foram utilizadas: (i) a sequência completa, chamada solúvel (sOVA), (ii) uma sequência truncada que direciona a proteína preferencialmente para o citoplasma (cOVA), (iii) uma sequência também truncada, com uma sequência de ferritina adicionada, que direciona a proteína para a membrana (mOVA). A transformação foi realizada pelo método LiAc (acetato de lítio) e a confirmação da expressão de OVA investigada por Western Blot e Imunofluorescência. A expressão da proteína foi confirmada em leveduras de *S. cerevisiae* sOVA e cOVA, mas somente nas VEs de sOVA. Como já observado para VEs de *C. albicans* e *C. neoformans*, VEs de *S. cerevisiae* foram internalizadas por macrófagos murinos primários. Além disso, VEs de *S. cerevisiae* induziram a produção de óxido nítrico por macrófagos primários murinos e aumentaram a expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas. VEs de sOVA aumentaram significativamente a secreção de IL-6 por macrófagos. Células dendríticas, por outro lado, secretaram IL-6 quando incubadas com VEs de vOVA e sOVA. Nossos resultados confirmam ser possível a manipulação do conteúdo proteico de VEs fúngicas. Inserir antígenos nestes compartimentos pode ser uma alternativa para potencializar suas propriedades imunogênicas e seu uso como plataforma vacinal.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, *S. cerevisiae*, ovalbumina.

## ABSTRACT

Systemic Fungal Infections have emerged over the past decades, mainly affecting immunocompromised individuals. The antifungal drugs currently available have considerable side effects and several resistant strains. In addition, long administration protocols, high costs and frequent and dangerous drug interactions also impact the treatment. Thus, the search for new treatment alternatives is imperative. The current literature points out the use of monoclonal antibodies and antifungal peptides. However, these alternatives are limited, respectively, by the reduced broad-spectrum activity and higher costs. In this scenario, the search for antifungal vaccines has been stimulated. “Single antigen” vaccines are currently in clinical trials; however, efficacy problems are observed due to genetic and immunological variability of different populations and fungal strains plasticity. Current proposals suggest the use of multivalent vaccines, with a strong CD8<sup>+</sup> component and capable of phagocytes modulation, leading to nitric oxide and proinflammatory cytokine production, promoting a memory response to different fungal species. Our recent results demonstrated that extracellular vesicles (EVs) secreted by *C. neoformans* and *C. albicans* stimulate phagocytes activity, leading to nitric oxide and proinflammatory cytokines production. In addition, these EVs promote the expression of costimulatory molecules by dendritic cells. Furthermore, unpublished data from our laboratory demonstrated that mice vaccination with *C. albicans* EVs protected these animals against a subsequent candidiasis infection. Remarkably, the formulation did not require the presence of adjuvant. Together, these results suggest that EVs can activate the innate immune system and potentially mediate an adaptative response, supporting the use of EVs as a multiantigen vaccine platform. The goal of our studies was to develop a platform capable of express heterologous antigens loaded in EVs using *S. cerevisiae*, a fungus of easy manipulation and cultivation. The *S. cerevisiae* S288C strain was transformed with pRS416 plasmid carrying chimeric sequences for Ovalbumin (OVA) protein regulated by *ADHI*, a constitutive promoter. Three sequences were used, including the (i) complete sequence, named soluble (sOVA), (ii) a truncated sequence that directs the protein preferably to cytoplasm (cOVA) and an also truncated sequence with a ferritin sequence added, that address the protein to membrane (mOVA). The transformation was performed by the LiAc (lithium acetate) method and the protein expression investigated by Western Blot and Immunofluorescence. The protein expression was confirmed in sOVA and cOVA yeasts, but only in sOVA EVs. As observed for EVs produced by *C. albicans* and *C. neoformans*, EVs from *S. cerevisiae* were also internalized by primary murine macrophage. Furthermore, *S. cerevisiae* EVs induced nitric oxide production by macrophage and increased expression of the costimulatory molecules CD86 and MHC II by dendritic cells. EVs from the sOVA strain significantly increased IL-6 secretion by macrophages. Dendritic cells, on the other hand, secreted IL-6 when incubated with sOVA and vOVA EVs. Our results confirmed that it is possible to manipulate the protein content of fungal EVs. Loading antigens to these compartments could be an alternative to potentiate their immunogenic properties and their use as a vaccine platform.

Key-words: extracellular vesicles, *S. cerevisiae*, Ovalbumin.

## AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo ao meu orientador, Leonardo Nimrichter, por ter me aceitado em seu laboratório ainda no meu segundo período de graduação. Obrigada pelos pensamentos sempre positivos, mesmo quando parece que tudo vai dar errado, e por sua regra dos 15 minutos para ficar triste pelos experimentos que não deram certo haha. Muito obrigada também por todo o apoio e confiança, por muitas vezes ter acreditado no meu potencial mais do que eu mesma.

O segundo agradecimento vai para a minha família. Meus pais, Claudio e Ozinete, que sempre me deram o suporte para que eu chegasse onde cheguei. Em especial minha mãe, sempre dando puxões de orelha e nunca satisfeita não importava o quanto eu estudasse, sempre me estimulando para jamais ficar na zona de conforto. Ao meu pai que, mesmo com esse seu jeitinho frio, nunca recusou me ajudar sempre que podia. Meu irmão, Gabriel, sempre trazendo lanches, fazendo massagens e cuidando da nossa cadelinha Luna para mim nos momentos de estresse e horas e horas de estudo.

Muito obrigada a todas pessoas que contribuíram no meu processo de formação. Gabi, minha primeira co-orientadora, quem me ensinou muito do que eu sei hoje, sempre me auxiliando, aconselhando e sendo paciente, mesmo quando eu errava coisas muito básicas.

Patty, minha segunda co-orientadora, um amor de pessoa e também sempre muito paciente, com quem iniciei neste projeto. Sempre me ajudou o máximo que podia, mesmo passando por um momento conturbado. Ju, que no início participava deste projeto comigo e com a Patty, por toda a ajuda nos primeiros experimentos e por ser uma pessoa extremamente amiga e divertida, por baixo dessa casca grossa rs.

Alícia, minha atual co-orientadora, quem efetivamente seguiu no projeto comigo. Quem me ensinou e explicou as coisas com toda paciência do mundo quantas vezes fosse preciso. Obrigada por todos os auxílios e correções, por me responder e me ajudar mesmo nessa reta final, que coincidiu com a sua ida para a França. Mas eu não ganhei só mais uma co-orientadora e sim uma amiga, que com seu vocabulário peculiar (capaz!), tornou os dias longos de experimentos muito melhores. Muito obrigada por todos

as conversas, conselhos, por deixar os dias mais divertidos e por sofrer comigo pelos experimentos que não deram certo. Volta logo (ou me leva pra aí rs)!

Ao Honorato, um anjo, que sempre me ajudou em tudo possível, sempre ligando o amicon cedo e aos finais de semana, adiantando muito no processo de isolamento de vesículas. Especialmente na reta final desta monografia, Honorato foi essencial, além dos brownies quase diários para me deixar feliz rs, me ajudou muito com os últimos experimentos. Além disso, foram muitas voltas de 945 me ensinando várias e várias coisas, essas viagens foram muito produtivas! Muito obrigada por tudo! Toda coxinha e café do mundo pra você! Haha.

Ao prof. Allan, por sempre me explicar tudo com toda calma do mundo, me ensinando tudo que eu sei sobre Photoshop, FlowJo e citometria.

A todo o pessoal do grupo LaGE: Alessandro, Yan, Gabriel, João, Geralda, Diego, Jhon, Taiane, Ju Rizzo, Rodrigo e Jow, apesar de ter nos abandonado, além dos já citados. Obrigada por todos os ensinamentos, conversas, bares e churrascos.

Ao professor Francisco e sua aluna Bárbara, por toda colaboração, possibilitando a construção dos mutantes.

Ao Flávio, que apesar de perturbar a paciência e só subir pra beber café, também sempre foi muito solícito.

Aos melhores amigos que fiz durante esses 4 anos: Amanda, Carol, Matheus, Julia e Victória. Obrigada por todos os momentos que passamos, desde as saídas e festas até as gritarias no CA. Por todo o suporte, conselhos e por me aturarem em momentos de surto. Obrigada por terem sido um bom grupo para os trabalhos e transcrições durante a graduação. Sem vocês, a graduação certamente teria sido muito pior. Apesar de as vezes me tirarem do sério, amo muito vocês e espero que nossa amizade continue.

Ao Victor, de quem é até difícil falar, por todo o suporte imensurável durante esses 3 anos. Sempre me colocando pra cima, acreditando em mim e me lembrando do que sou capaz. Quero agradecer por todo o incentivo e apoio nas minhas decisões, além de me auxiliar nas minhas dúvidas. Obrigada por todos os abraços, ombros, por sempre me ajudar no que estava ao seu alcance, por não me deixar desistir e, claro, por me levar para comer nos momentos de tristeza haha. Amo muito você!

Aos meus melhores amigos da vida, Vini e Vadya, ainda do CPIO. São 11 anos de amizade, muitas coisas para agradecer, mas vou me reter nas incontáveis risadas, apoio e por serem as pessoas que eu sei que posso contar sempre. Muitos anos de amizade certamente ainda estão por vir, amo vocês.

A Camila, amiga recente, mas que contribui e me aconselhou bastante nesses últimos meses, e todos os amigos que me ajudaram durante essa trajetória de alguma forma.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho, e a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram durante essa trajetória.

Por fim, às agências de fomento: CNPq, PIBIC e FAPERJ, sem as quais este projeto e outros do laboratório não seriam possíveis.

*“Acima de tudo, não tema os momentos difíceis. O melhor vem deles.”*

**Rita Levi-Montalcini**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação dos antifúngicos.....	4
<b>Figura 2.</b> Reconhecimento de padrões associados a patógenos (PAMPs) por receptores da imunidade inata .....	7
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de defesa antifúngica do hospedeiro .....	9
<b>Figura 4.</b> Produção de vesículas extracelulares por fungos.....	12
<b>Figura 5.</b> Curva de sobrevivência dos camundongos tratados com VEs de <i>C. albicans</i> .....	14
<b>Figura 6.</b> Esquema de construção das sequências de ovalbumina.....	21
<b>Figura 7.</b> Estrutura do plasmídeo pRS416.....	22
<b>Figura 8.</b> Expressão de OVA pelas cepas transformadas de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Visualização de OVA nas cepas transformadas de <i>S. cerevisiae</i> .....	32
<b>Figura 10.</b> Diâmetro das VEs transformadas de <i>S. cerevisiae</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> Direcionamento de OVA para VEs das cepas transformadas de <i>S. cerevisiae</i> .....	34
<b>Figura 12.</b> Internalização de VEs de vOVA e sOVA por macrófagos derivados de medula óssea .....	35
<b>Figura 13.</b> Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos.....	36
<b>Figura 14.</b> VEs de <i>S. cerevisiae</i> não alteram a viabilidade de macrófagos murinos.....	37
<b>Figura 15.</b> Produção de IL-6 por macrófagos e células dendríticas. ....	38
<b>Figura 16.</b> Indução da expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas estimuladas com VEs de <i>S. cerevisiae</i> .....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Incidência de doenças fúngicas.....	2
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos primers forward e reverse utilizados para amplificação das diferentes sequências de OVA (solúvel, citoplasmática e membranar) e do promotor do gene ADH1. ....	20
<b>Tabela 3.</b> Sequências dos primers forward e reverse, utilizados para ligação das diferentes sequências de OVA (solúvel, citoplasmática e membranar) com a sequência do promotor do gene ADH1. ....	21

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula apresentadora de antígenos
CCL3	Ligante de quimiocina 3
CCL4	Ligante de quimiocina 4
CLR	Receptor de lectina do tipo C
CTxb-FITC	Subunidade B da toxina da cólera conjugada a FITC
CXCL8	Precursor de Interleucina 8
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
GAFFI	Fundo de Ação Global das Doenças Fúngicas
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GXM	Glucoronoxilomanana
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-26	Interleucina 26
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
LB	Meio Luria-Bertani
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade II

MVBs	Corpos multivesiculares
NO	Óxido nítrico
Omp22	Proteína de membrana externa 22
OVA	Ovalbumina
PAMPs	Padrões associados a patógenos
PBS/BSA 1%	PBS contendo 1% BSA
PBS/PF 4%	PBS contendo 4% Paraformaldeído
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
rM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos recombinante
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
TBST	TBS contendo 0,1% Tween 20
Tc 1	Linfócito citotóxicos 1
Tc 17	Linfócito citotóxicos 17
Tc 2	Linfócito citotóxicos 2
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$
Th 2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 3
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral $\beta$
T <sub>Reg</sub>	Linfócito T CD4 <sup>+</sup> regulador
-URA	Meio dropout -URA DO Supplement
VE	Vesículas extracelulares
VMEs	Vesículas de membrana externa

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologia das doenças fúngicas .....	1
1.2. Antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas .....	3
1.3. Resposta imunológica contra infecções fúngicas .....	6
1.4. Vesículas extracelulares (VEs) fúngicas .....	10
1.5. Vesículas extracelulares como plataforma de vacinação .....	14
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo geral .....	18
3.2. Objetivos específicos .....	19
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
4.1. Construção das sequências quiméricas de Ovalbumina .....	19
4.1.1. Transformação em <i>Escherichia coli</i> .....	22
4.1.2. Transformação em levedura de <i>S. cerevisiae</i> .....	23
4.2. Confirmação da expressão de Ovalbumina .....	23
4.3. Obtenção das vesículas de <i>S. cerevisiae</i> .....	25
4.4. Análise do diâmetro médio das vesículas.....	25
4.5. Confirmação da presença de OVA nas vesículas .....	26
4.6. Animais e obtenção de células hospedeiras (CEUA: 01200.001568/2013-87).....	26
4.6.1. Avaliação da internalização das VEs das cepas de <i>S. cerevisiae</i> transformadas por macrófagos derivados de medula óssea.....	27
4.6.2. Avaliação da produção de NO por macrófagos.....	28
4.6.3. Avaliação do metabolismo celular dos macrófagos .....	29
4.6.4. Avaliação da produção de citocinas por macrófagos e CDs .....	29
4.6.5. Avaliação da expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas.....	30

<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. Confirmação da expressão de Ovalbumina .....	31
5.2. Avaliação do diâmetro das VEs das cepas transformadas de <i>S. cerevisiae</i> .....	32
5.3. Expressão da Ovalbumina em VEs .....	33
5.4. Avaliação da internalização das VEs das cepas de <i>S. cerevisiae</i> transformadas por macrófagos derivados de medula óssea.....	34
5.5. Produção de NO por macrófagos murinos .....	36
5.6. Avaliação do metabolismo celular de macrófagos .....	37
5.7. Produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas.....	37
5.8. Expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Epidemiologia das doenças fúngicas

Doenças fúngicas em humanos são comumente negligenciadas, conhecidas pela maior parte da população como lesões superficiais e de fácil resolução. Recentemente, o "Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas" (GAFFI) estimou que cerca de um bilhão de pessoas possuem alguma infecção fúngica na pele. Esse tipo de infecção é considerada a terceira doença mais comum do mundo, atrás somente das dores de cabeça e cáries dentárias (GAFFI, 2017). Além disso, GAFFI estima, também, que mais de 300 milhões de pessoas sofrem de infecções fúngicas graves e cerca de 25 milhões se encontram em risco de morte ou quadros de morbidade (GAFFI, 2018). A situação torna-se ainda mais complicada se considerados indivíduos imunossuprimidos, em especial aqueles com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), os mais atingidos por este tipo de infecção. Dados obtidos em 2016 apontam que cerca de 50% dentre todas as causas de óbito entre indivíduos com AIDS são devidas a doenças fúngicas (GAFFI, 2017).

Os patógenos fúngicos causadores de infecções invasivas mais comuns são *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis* spp. (Brown *et al.*, 2012). Além disso, algumas infecções por espécies endêmicas vêm se tornando mais frequentes em pacientes imunocomprometidos, incluindo os patógenos dimórficos *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuk e Gacser, 2008), *Paracoccidioides brasiliensis* (Travassos e Taborda, 2012) e *Blastomyces dermatitidis* (Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2012). Um panorama do número de casos, por ano, relacionados às principais infecções fúngicas pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1.** Incidência de doenças fúngicas. Adaptado de Bongomin *et al.* (2017)

<b>Doença fúngica</b>	<b>Incidência anual</b>	<b>Nº de casos globais</b>	<b>Observações</b>
<b>Superficial</b>			
Pele, cabelo, unha		~1.000.000.000	
Ceratite fúngica		~1.000.000	
<b>Mucosa</b>			
Candidíase oral	~2.000.000		Indivíduos com AIDS, 90% sem receber TARV
Candidíase esofágica	~1.300.000		Indivíduos com AIDS, 20% com contagem de CD4 <200 e 5% destes em TARV
Episódios de candidíase vaginal			70% de afetadas ao longo da vida
Candidíase vaginal recorrente		~134.000.000	Prevalência anual. Aproximadamente 500 milhões de casos.
<b>Alérgica</b>			
Aspergilose broncopulmonar alérgica em asma		~4.800.00	Somente adultos, raro em crianças
Aspergilose broncopulmonar alérgica em fibrose cística		~6.675	Somente adultos, iniciando a partir dos 4 anos
Asma severa com sensibilização a fungos		~6.500.000	Somente adultos, provavelmente incomum em crianças
Rinossinosite fúngica		~12.000.000	
<b>Crônico grave</b>			
Aspergilose pulmonar crônica		~3.000.000	
Micetoma		~9.000	Relatos de 1950-2013, DTN
Cromoblastomicose		>10.000	Dados limitados e incomuns, DTN
Coccidioidomicose		~25.000	
Paracoccidioidomicose		~4.000	
Blastomicose		~3.000	
Infecção por <i>Histoplasma</i>	~500.000	~25.000	Maioria das infecções são assintomáticas baseados em testes de pele
Esporotricose	>40.000		Dados mundiais muito limitados. Muito comum em regiões hiperendêmicas do Peru, Brasil e México
<b>Invasiva aguda</b>			
Candidíase invasiva	~750.000		Incluem de 60.000 a 100.0000 casos de candidíase intrabdominal
Aspergilose invasiva	>300.000		De aproximadamente 10 milhões em risco anualmente
Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> entre indivíduos com e sem AIDS	~500.000		
Criptococose entre indivíduos com AIDS	~223.000		HIV positivos, até mais 10% entre HIV-negativos
Mucormicose	>10.000		Baseado em dados franceses = 4.200 Baseado em dados indianos = 910.000
Histoplasmose disseminada	~100.000		Nenhuma estimativa confiável
Talaromicose*	~8.000		Somente sudeste da Ásia

\*Infecção por *Talaromyces* (antigo *Penicillium*) *marneffeii*.

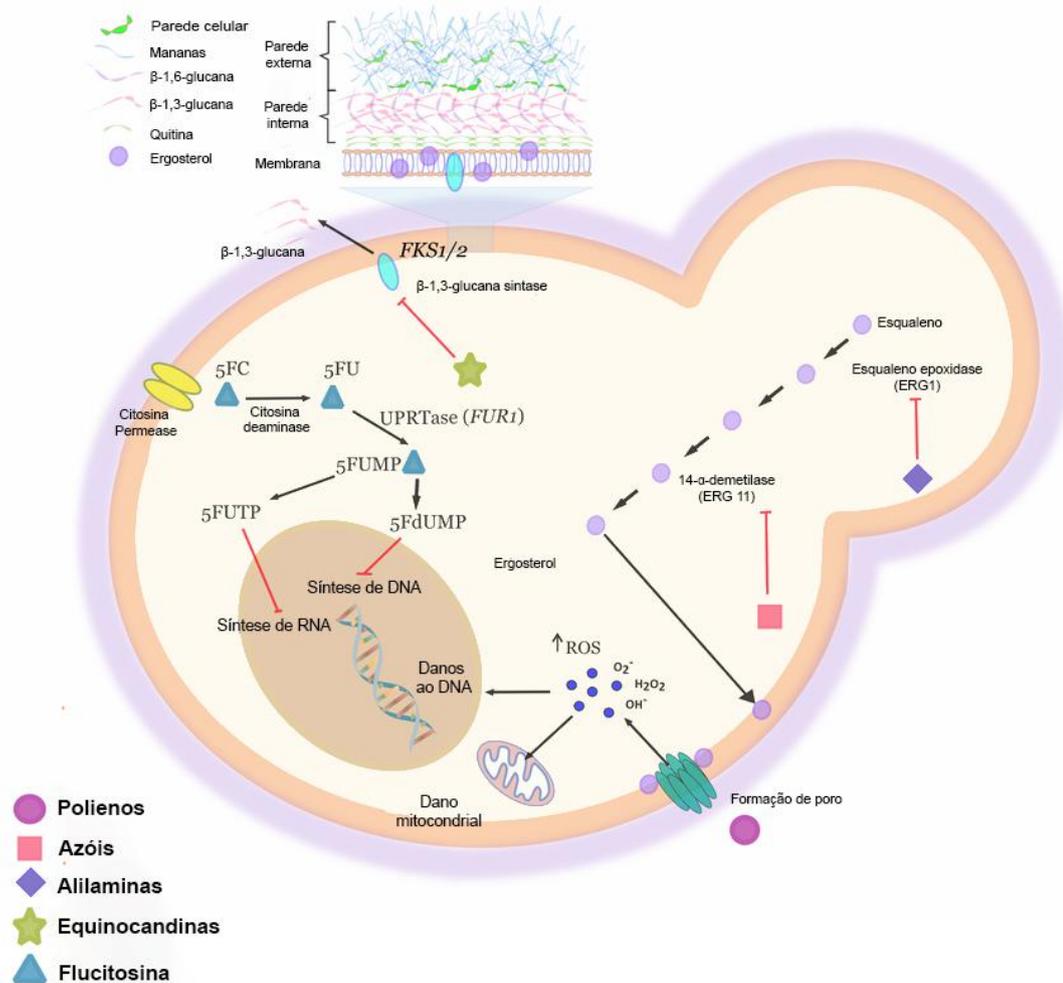
Dados de ("The Fungal Infection Trust," 2011); Brown *et al.* (2012); Vos *et al.* (2012); van de Sande (2013); Armstead, Morris e Denning (2014); Denning (2015); Rajasingham *et al.* (2017).

TARV = Terapia Antirretroviral

DTN = Doenças Tropicais Negligenciadas (Aceitas por WHO – *World Health Organization*).

## 1.2. Antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas

Os fármacos disponíveis atualmente para tratamento de infecções fúngicas invasivas são baseados principalmente em quatro classes: compostos poliênicos, azóis, flucitosinas e equinocandinas. Os mecanismos de ação de cada uma dessas classes estão ilustrados na Figura 1. O primeiro antifúngico licenciado para o combate contra micoses invasivas e até hoje muito utilizado no tratamento da criptococose é um composto poliênico, a anfotericina B. A classe dos poliênicos atua induzindo estresse na célula por meio de interações hidrofóbicas com o ergosterol, principal esterol de membrana plasmática fúngica. Como resultado observa-se uma alteração na permeabilidade da membrana, provocando extravasamento dos componentes intracelulares. Compostos poliênicos são frequentemente associados a efeitos colaterais significativos levando a interrupção do tratamento. Esses efeitos ocorrem pela interação do medicamento também com o colesterol presente na membrana de células mamíferas e apresentam elevada nefrotoxicidade (Odds, Brown e Gow, 2003).



**Figura 1.** Mecanismo de ação dos antifúngicos. Polienos, como anfotericina B, interagem hidrofobicamente com o ergosterol, induzindo estresse celular e extravasamento de componentes intracelulares; Azóis, agem inibindo a lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (codificada pelo gene *ERG11*), enzima que participa do processo de síntese do ergosterol; Alilaminas também agem bloqueando a síntese de ergosterol, mas através da inibição da enzima esqualeno epoxidase (codificada pelo gene *ERG1*); Equinocandinas atuam inibindo a síntese de  $\beta$ -1,3-glucana, molécula amplamente presente na parede celular de diversas espécies fúngicas; Flucitosina é um análogo da pirimidina citosina, convertido em 5-fluorouracil (5FU) ao entrar na célula e interferindo na síntese de DNA e RNA. *FKS1/FKS2* – Genes responsáveis pela codificação da  $\beta$ -1,3-glucana sintase; 5FC – 5-fluorocitosina; UPRTase – uracil fosforibosiltransferase (codificada pelo gene *FUR1*); 5FUMP- 5-Fluorouridine monophosphate; 5FdUMP- 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monofosphate; 5FUTP- 5-fluorouridine triphosphate; ROS – espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Reales-Calderon, J.A. *et al.*, 2016).

Atualmente, a classe dos azóis é a mais utilizada para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (Perfect, 2017). Os derivados azólicos agem inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, que participa de uma das etapas da síntese do ergosterol (Vanden Bossche, Koymans e Moereels, 1995). As primeiras terapias com azóis incluíam a utilização de miconazol intravenoso e cetoconazol oral. Com o desenvolvimento da segunda geração dos azóis, o espectro de ação e segurança foram aprimorados, além do desenvolvimento de medicamentos com formulações tanto oral quanto intravenosa, como

fluconazol e itraconazol. Atualmente, a terceira geração dos azóis é composta por voriconazol, posaconazol e isovuconazol, que apresentam ainda mais progressos quanto ao aumento do espectro de ação e segurança do paciente (Perfect, 2017). Desta forma, os azóis vêm sendo amplamente utilizados na clínica, até mesmo como medida profilática, e têm mostrado uma redução na taxa de mortalidade (Allen *et al.*, 2015).

A flucitosina é um análogo da pirimidina citosina, que ao entrar na célula é convertido no composto tóxico 5-fluoracila, interferindo no metabolismo de RNA e DNA, e, assim, impedindo a replicação do fungo. Esse medicamento é normalmente administrado em conjunto com um composto poliênico no tratamento da meningite criptocócica (Odds, Brown e Gow, 2003).

A última classe de antifúngicos, descrita há pouco mais de uma década e que apresenta um diferente mecanismo de ação, é composta pelas equinocandinas (Perfect, 2017). Esta classe atua bloqueando a síntese de  $\beta$ -1,3-glucana, polissacarídeo amplamente presente na parede celular de diversas espécies fúngicas, como do gênero *Candida* spp.. Entretanto, algumas espécies fúngicas são intrinsicamente resistentes, como por exemplo as espécies do gênero *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp e *Scedosporium* spp. (Odds, Brown e Gow, 2003).

Além dos fármacos descritos acima, existe uma quinta classe que também atua na inibição da síntese de esterol, as alilaminas. No entanto, trata-se de fármacos pouco utilizados no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, sendo seu uso mais comum no tratamento de infecções superficiais, como por exemplo a terbinafina (Jessup, Ryder e Ghannoum, 2000).

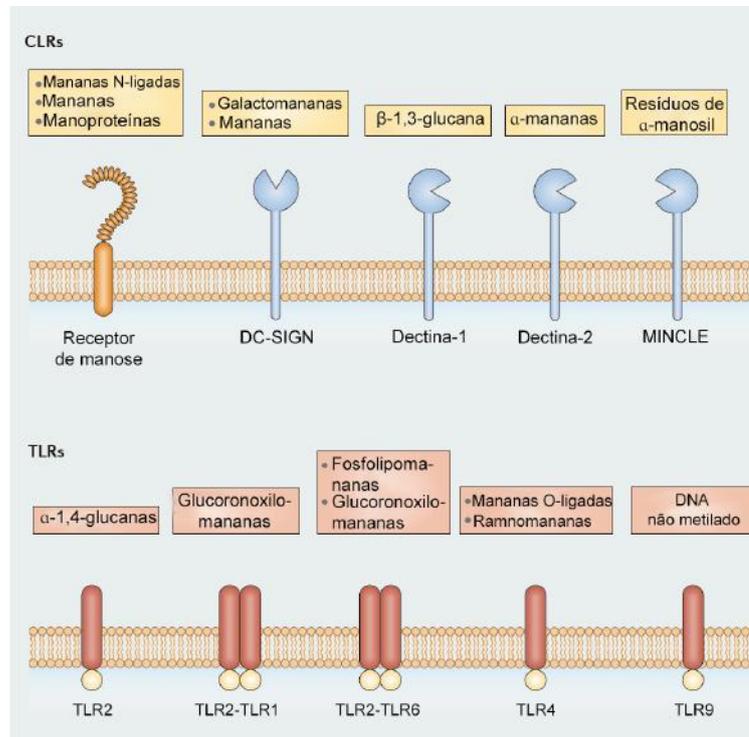
Apesar dos esforços que visam o desenvolvimento de estratégias eficientes para o controle das infecções fúngicas, os tratamentos atuais esbarram em limitações graves que serão brevemente discutidas a seguir. A elevada similaridade estrutural entre as células fúngicas e as células humanas é considerada um fator limitante para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Por essa razão as classes de antifúngicos disponíveis atualmente possuem alta toxicidade. Sendo a classe das equinocandinas a única exceção, uma vez que esses fármacos atuam em estruturas específicas de células fúngicas, isto é, sem similaridade com estruturas das células mamíferas (Odds, Brown e Gow, 2003). No entanto, algumas espécies são intrinsecamente resistentes, conforme mencionado anteriormente. Além da elevada toxicidade, um número cada vez maior de cepas

resistentes a diferentes fármacos vem sendo isoladas de pacientes. Os casos de resistência podem, por exemplo, estar associados a presença de bombas de efluxo, que diminuem a concentração dos fármacos no interior do fungo (Sanglard e Odds, 2002). Além disso, podem ocorrer mutações ou aumento da expressão de genes responsáveis pela produção da molécula alvo ou na sua via biossintética. Mutações que ocorrem no gene *ERG11*, impedindo o bloqueio da lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (Sanglard e Odds, 2002), ou no gene *FKSI*, responsável pela síntese da  $\beta$ -1,3-glucana sintase (Alexander *et al.*, 2013) podem promover a resistência frente a esses fármacos. Outro ponto importante é a duração dos protocolos terapêuticos, que muitas vezes são longos e caros, além das interações medicamentosas serem frequentes e perigosas. Por isso, há uma necessidade em buscar novas alternativas eficazes, com amplo espectro de ação e menor custo possível. O uso de anticorpos monoclonais e peptídeos antifúngicos vem sendo testados como alternativas, porém esbarram, respectivamente, em baixo espectro de ação (Casadevall e Pirofski, 2012) e elevado custo (Hancock e Sahl, 2006). Nesse cenário, a busca por vacinas antifúngicas, priorizando a prevenção no lugar do tratamento, vem sendo estimulada (Garcia-Carnero *et al.*, 2018).

### 1.3. Resposta imunológica contra infecções fúngicas

Quando o hospedeiro se depara com a invasão de um patógeno é acionada uma resposta com o objetivo de reestabelecer o equilíbrio, eliminando os invasores e visando o menor dano possível ao indivíduo infectado. A maioria dos patógenos fúngicos são detectados e eliminados por mecanismos da defesa imune inata, a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em diversas células. Um exemplo clássico de PAMP é a molécula  $\beta$ -1,3-glucana, presente na parede celular de todos os fungos descritos até o momento, reconhecida por um receptor de lectina do tipo C (CLR), chamado Dectina-1, encontrado em células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A partir desse reconhecimento há a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelas células de defesa do hospedeiro (Taylor *et al.*, 2002; Romani, 2011). Outros exemplos de reconhecimento através da identificação de PAMPs encontrados em células fúngicas estão presentes na Figura 2. Sendo assim, o reconhecimento de PAMPs fúngicos pelos PRRs leva a montagem de uma resposta

fungicida direta e induz a diferenciação de células responsáveis pela ativação da imunidade adaptativa.



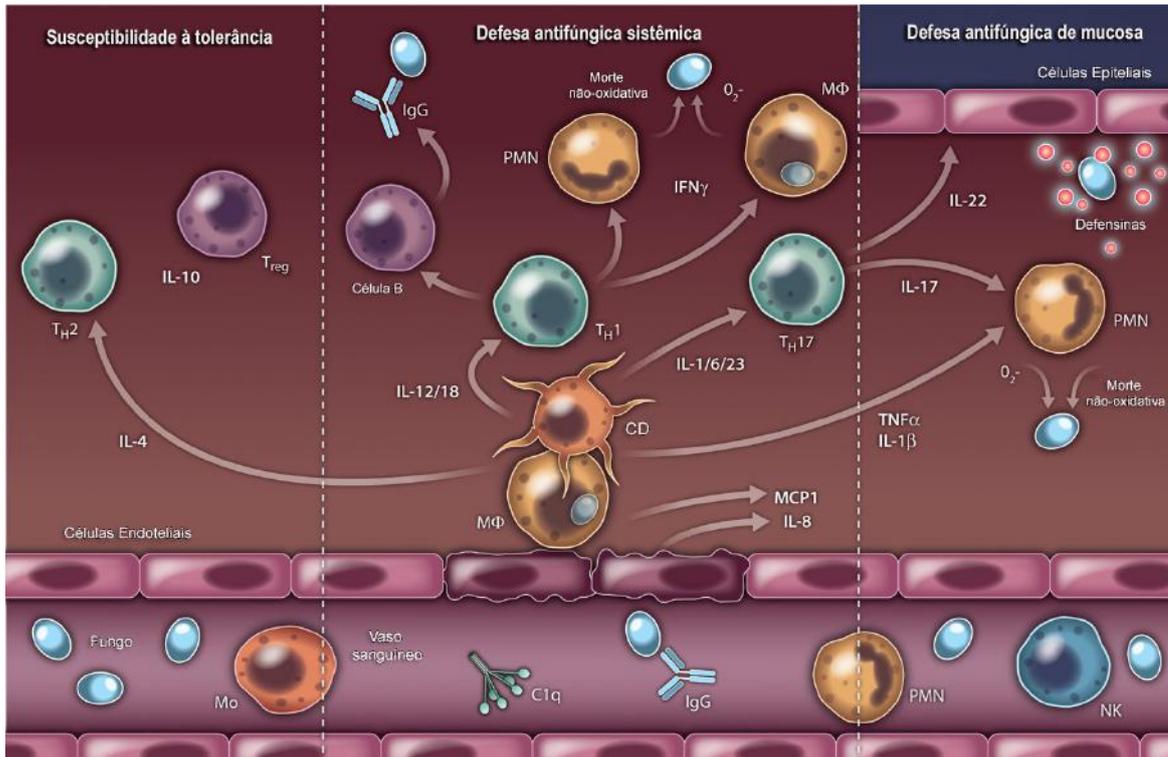
**Figura 2.** Reconhecimento de padrões associados a patógenos (PAMPs) por receptores da imunidade inata. CLR – receptores lectina do tipo C; TLRs – receptores *Toll-like*; DC-SIGN - *dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*; MINCLE – lectina do tipo C induzível por macrófagos (Adaptado de Erwig e Gow, 2016).

A resposta imune inata pode também dar início a uma resposta inicialmente mais lenta e denominada adaptativa. Durante a resposta imune adaptativa destaca-se o papel dos linfócitos T CD4+, ativados majoritariamente por células dendríticas, principais células apresentadoras de antígeno. Essas células fagocitam o patógeno no local de infecção, migram para o linfonodo mais próximo, processando e apresentando o antígeno via complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II) para os linfócitos T CD4+ virgens. Estes linfócitos, por sua vez, assumem fenótipos distintos dependendo do estímulo que recebem. Dentre os diversos subtipos celulares que esses linfócitos podem assumir, os descritos como os principais envolvidos na resposta antifúngica são: os linfócitos T helper 1 (Th1), os mais relacionados com uma resposta protetora, induzidos principalmente por interleucina-12 (IL-12) e secretando IL-2, IL-12, IL-18, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); e os linfócitos Th2, induzidos principalmente por IL-4 e secretando IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, citocinas relacionadas com uma resposta mais anti-inflamatória e alérgica, normalmente relacionados com a não

resolução da infecção (Amsen et al., 2004; Romani, 2004), apesar de estudos recentes mostrarem um papel protetor contra o gênero *Pneumocystis* spp. (Eddens et al., 2017).

Recentemente, vem sendo descrito também o papel das células Th17 na resolução de infecções fúngicas. Descritas por Park *et al.* (2005), a diferenciação dessas células é induzida por Fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-21 e IL-23, e secretam IL-17A, IL-21, IL-22, IL-26 e GM-CSF (Gaffen, 2011; Song, Gao e Qian, 2014). Os linfócitos Th17 foram encontrados no repertório de células de memória humanas específicas para fungos (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Chai *et al.*, 2010) e em respostas protetoras mediadas por vacinas em camundongos (Wuthrich *et al.*, 2011). Dentre as habilidades deste subtipo celular, está o recrutamento de neutrófilos, já conhecidos por desempenhar papel fundamental na resposta contra patógenos clássicos, como *C. albicans* (Hernandez-Santos e Gaffen, 2012; Hunniger *et al.*, 2014).

Outro subtipo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> presente nas respostas antifúngicas, são as células reguladoras (T<sub>Reg</sub>). Essas células são responsáveis por balancear a resposta imune, visando o menor dano possível ao hospedeiro, o que muitas vezes acarreta na tolerância ao patógeno, por conta da redução da inflamação no tecido mediada pela secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 que afeta negativamente a produção de IFN- $\gamma$  (Romani e Puccetti, 2006; Wuthrich *et al.*, 2011). A Figura 3 ilustra esquematicamente como ocorre a diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> supracitados, a partir do reconhecimento de diferentes patógenos por células apresentadoras de antígenos (APCs).



**Figura 3.** Mecanismos de defesa antifúngica do hospedeiro. Em humanos, infecções fúngicas são combatidas por respostas tanto humoral (sistema complemento, anticorpos) quanto celular (fagócitos, linfócitos T). Mecanismos protetores são baseados na quimiotaxia e ativação de neutrófilos, monócitos/macrófagos e, no caso de infecções de mucosa, células epiteliais. A ativação das células se dá através de quimiocinas e citocinas pró inflamatórias, liberadas por células como macrófagos, células dendríticas e linfócitos Th1 e Th17. Os linfócitos Th2, por outro lado, liberam citocinas anti-inflamatórias, induzindo mecanismos de tolerância, que promovem um balanço entre a inflamação e os danos ao tecido, mas em certos casos podem aumentar a susceptibilidade à infecção (Adaptado de Brown et al, 2012).

Além dos linfócitos T  $CD4^+$ , é importante a ação dos linfócitos T  $CD8^+$  citotóxicos na eliminação dos patógenos, a partir da liberação de peptídeos antimicrobianos e lise de células infectadas (Levitz, Mathews e Murphy, 1995; Ma *et al.*, 2002). Assim como as células T  $CD4^+$ , as T  $CD8^+$  também são divididas em subtipos. Os descritos até o momento são Tc1, Tc2 e Tc17, que se diferenciam de acordo com o estímulo recebido pelas APCs, que reconhecem PAMPs e realizam a apresentação dos antígenos via MHC-I (Backer *et al.*, 2008). Os principais subtipos de linfócitos T  $CD8^+$  envolvidos em um papel protetor nas infecções fúngicas são Tc1 e Tc17 (Nanjappa *et al.*, 2012a; Nanjappa *et al.*, 2012b). Com o reconhecimento de  $\beta$ -glucana, é estimulada a produção da citocina IL-12, que favorece a diferenciação de células Tc1 (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2008), as quais secretam citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF, contribuindo para ativação de células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos. Além disso, agem matando macrófagos infectados não-responsivos através da secreção de moléculas como perforinas e granzimas (Lin *et al.*, 2005). Linfócitos  $CD8^+$  Tc17, assim como os  $CD4^+$  Th17, secretam a citocina IL-17A, que ativa células epiteliais de mucosa para secretarem produtos

antimicrobianos, como defensinas (Kondo *et al.*, 2009; Kumaresan, da Silva e Kontoyiannis, 2017). Baseado nos receptores expressos na superfície dessas células, linfócitos Tc1 podem ser considerados células efetoras e os Tc17 de memória (Kumaresan, da Silva e Kontoyiannis, 2017).

Sabe-se que os grupos mais atingidos por infecções fúngicas graves são os de indivíduos imunocomprometidos, em especial aqueles com AIDS, que possuem uma deficiência na resposta imunológica mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e, portanto, não conseguem desenvolver a resposta adaptativa clássica contra patógenos fúngicos. A plasticidade das células envolvidas e a redundância na resposta imune adaptativa antifúngica, contudo, aponta para a possibilidade de desenvolvimento de vacinas capazes de conferir proteção também em indivíduos com alguma deficiência em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Modelos experimentais já mostram uma habilidade das células T CD8<sup>+</sup> de compensar a ausência de células T CD4<sup>+</sup>, conferindo proteção e resposta de memória (Wuthrich *et al.*, 2002; Wuthrich *et al.*, 2003; Nanjappa *et al.*, 2012b; Kumaresan, da Silva e Kontoyiannis, 2017). Sendo assim, apesar da resposta antifúngica clássica ser composta principalmente pela ação do sistema imune inato e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sugere-se que, na ausência destes linfócitos, a resposta mediada por células T CD8<sup>+</sup> previamente estimuladas também poderia conferir proteção ao hospedeiro (Wuthrich *et al.*, 2003). Desta forma, propostas atuais sugerem o uso de vacinas multivalentes com forte componente CD8<sup>+</sup> e capazes de promover uma resposta de memória frente a diferentes espécies fúngicas (Cassone, 2013; Nanjappa e Klein, 2014; Nimrichter *et al.*, 2016).

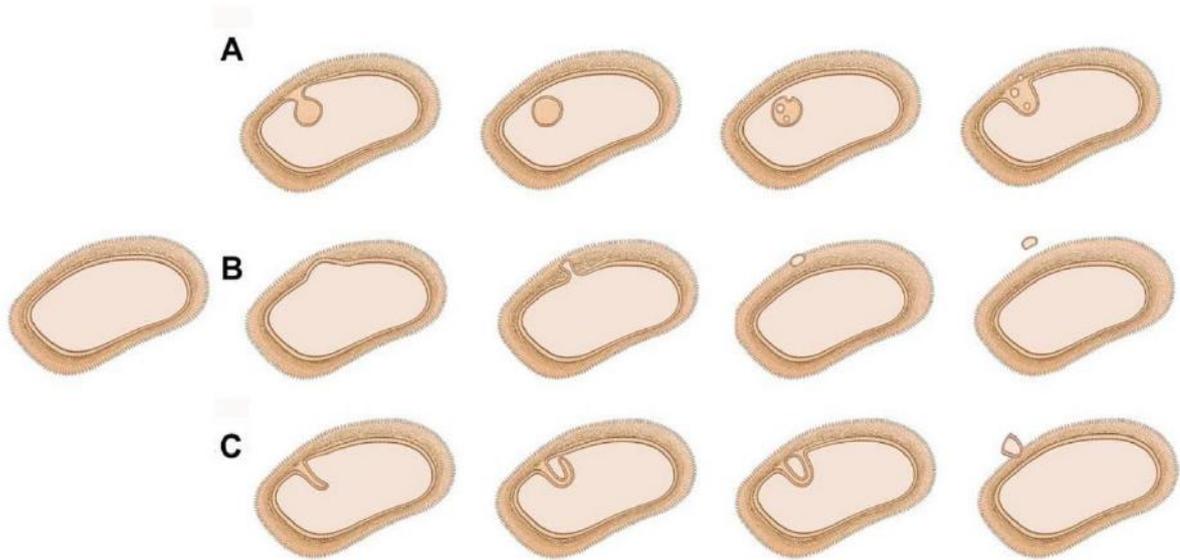
#### 1.4. Vesículas extracelulares (VEs) fúngicas

A produção e liberação de VEs ocorre em todos os tipos celulares investigados até o momento (Joffe *et al.*, 2016). Em células fúngicas, esse mecanismo foi sugerido em meados de 1970 (Takeo *et al.*, 1973b, 1973a). No entanto, o primeiro isolamento de VEs foi publicado em 2007 (Rodrigues *et al.*, 2007). Nesse trabalho, VEs foram isoladas a partir de sobrenadante de cultura do fungo *C. neoformans*. Após 11 anos, VEs foram detectadas no sobrenadante de cultivo de diversas espécies fúngicas, entre elas *H. capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix shenckii*, *C. albicans*, *Candida parapsilosis* (Albuquerque *et al.*, 2008), *P. brasiliensis* (Vallejo *et al.*, 2011), *Malassezia*

*sympodialis* (Gehrmann *et al.*, 2011), *Alternaria infectoria* (Silva *et al.*, 2014), *Rhizopus delemar* (Liu *et al.*, 2018), *Pichia fermentans* (Leone *et al.*, 2018), dentre outros.

As VEs fúngicas possuem uma bicamada lipídica e composição bastante diversificada 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) (Rodrigues *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2014; Vargas *et al.*, 2015), polissacarídeos (glucuronoxilomanana [GXM], epítomos de  $\alpha$ -galactosil e manose e resíduos de N-acetilglucosamina) (Rodrigues *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2011; Peres da Silva *et al.*, 2015a), pigmentos (Eisenman *et al.*, 2009) e diferentes classes de RNA: miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA e mRNA (Peres da Silva *et al.*, 2015b), descritos como fatores e reguladores de virulência em diferentes espécies fúngicas. Peres da Silva e colaboradores, mostraram também a presença de resíduos de manose e N-acetilglucosamina na superfície de VEs de *P. brasiliensis* sendo potencialmente reconhecidos pelo sistema imune inato do hospedeiro (Peres da Silva *et al.*, 2015a). A partir destas descobertas, sugere-se que ao mesmo tempo que as VEs podem atuar no estabelecimento e desenvolvimento da doença, poderiam ser exploradas para estimular o sistema imunológico do hospedeiro e induzir proteção.

Existem ao menos três mecanismos envolvidos com a biogênese de VEs em organismos fúngicos, sendo eles: a liberação de exossomos derivados de corpos multivesiculares (MVBs); o brotamento ou “*shedding*” de microvesículas a partir da membrana plasmática; ou, como demonstrado por estudos recentes do nosso grupo, através de um mecanismo de subtração citoplasmática, no qual a membrana citoplasmática sofre uma invaginação, um remodelamento, seguida pela fusão com a membrana, dando origem a uma vesícula extracelular (Figura 4) (Deatherage e Cookson, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013). Uma vez que diferentes mecanismos de biogênese estão ocorrendo de forma simultânea na célula, vesículas com tamanhos e composições distintas estão sendo formados e secretados e esses, provavelmente, induzem respostas distintas do hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2008a).



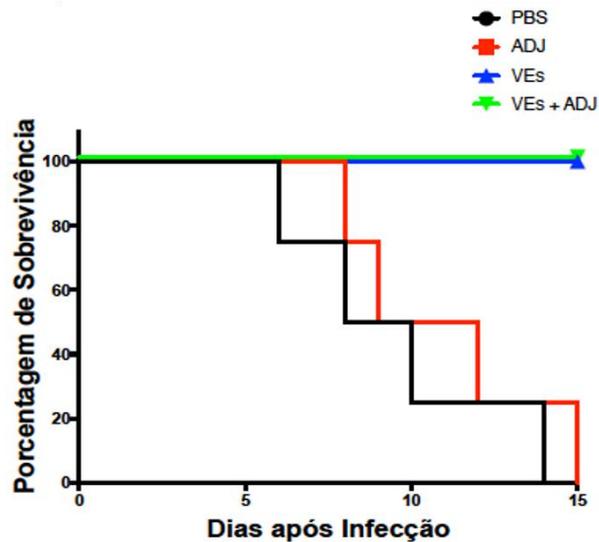
**Figura 4.** Produção de vesículas extracelulares por fungos. (A) Liberação de exossomos após fusão de corpos multivesiculares (MVBs) com a membrana, (B) brotamento de vesículas na membrana das células fúngicas e (C) mecanismo de subtração citoplasmática (Adaptado de Nimrichter *et al.*, 2018).

O exato mecanismo utilizado pelas VEs para atravessar a parede celular fúngica ainda permanece desconhecido. No entanto, algumas hipóteses vêm sendo discutidas na literatura, e incluem (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, com a presença ou não de poros, sem que ocorram mudanças estruturais significativas na parede celular (Wolf e Casadevall, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015). É muito provável que uma combinação desses mecanismos seja responsável pela passagem das VEs e que, em paralelo, uma cooperação entre proteínas e lipídeos que formam as vesículas deem estabilidade para que esses compartimentos atravessem toda a parede celular de forma intacta (Rodrigues *et al.*, 2013).

A diversidade de moléculas transportadas pelas VEs de fungos e a capacidade destes em liberá-las durante a infecção de células hospedeiras (Rodrigues *et al.*, 2007) levou a investigação de se essas vesículas são reconhecidas e/ou modulam o funcionamento de células de defesa do hospedeiro. Inicialmente, nosso grupo demonstrou que VEs de *C. neoformans* são internalizadas por células fagocíticas da linhagem RAW 264.7 e estimulam a produção de óxido nítrico (NO), TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-10 (Oliveira *et al.*, 2010a). O tratamento também foi capaz de aumentar a atividade microbicida e fagocítica dessas células (Oliveira *et al.*, 2010a). A atividade biológica de VEs produzidas

pelo fungo *C. albicans* também vem sendo investigada. Recentemente, demonstramos que esses compartimentos apresentam propriedades que sugerem um papel imunomodulatório de macrófagos e células dendríticas (Vargas, 2013). As VEs de *C. albicans* são internalizadas por macrófagos murinos derivados de medula óssea, levando a produção de NO e citocinas, como IL-12p40, IL-10 e TNF- $\alpha$  (Vargas *et al.*, 2015). Além disso, as VEs de *C. albicans* ativam células dendríticas murinas derivadas de medula óssea, levando a produção de citocinas como IL-12p40, IL-10 e TNF- $\alpha$  e aumento na expressão de CD86 e MHCII, moléculas coestimulatórias associadas à apresentação de antígenos para os linfócitos. Esses resultados sugerem que VEs poderiam atuar no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (Vargas *et al.*, 2015), promovendo, então, a ativação de células T, já conhecidas por desempenhar papel central na defesa antifúngica do hospedeiro (Ersland, Wuthrich e Klein, 2010).

Com base nesses resultados desenvolvemos um protocolo de vacinação em camundongos BALB/c utilizando VEs produzidas por *C. albicans* (10  $\mu$ M de esterol). As VEs foram administradas associadas ou não com adjuvante de Freund, com o objetivo de avaliar o efeito protetor destes compartimentos em um modelo de candidíase murina. Os camundongos foram imunizados quatro vezes com intervalos de uma semana pela via intraperitoneal. Os animais foram então imunossuprimidos com ciclofosfamida (200 mg/kg) e desafiados com uma dose letal de leveduras de *C. albicans*, também via intraperitoneal. As VEs de *C. albicans* apresentaram uma atividade protetora de até 100% na sobrevivência (Figura 5) (Vargas, 2016). Além disso, foi observada uma redução nas Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do rim, fígado e baço (dados não publicados). Ainda, foi observada a produção de IgG e IgM no soro dos animais, e das citocinas TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12p70 e TNF- $\alpha$ . Entre camundongos vacinados VEs na ausência de adjuvante, foi observada a produção de anticorpos IgM e IgG específicos para *C. albicans* e um significativo aumento na produção de TGF- $\beta$  e IL-4 no 3º dia após a infecção, seguido da queda na produção dessas mesmas citocinas no 5º dia. Foram também detectados altos níveis de IL-1, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  no 5º dia após a infecção. Todos estes dados corroboram com a hipótese de que as VEs fúngicas seriam capazes de ativar uma resposta imune protetora em modelo murino, sugerindo uma potencial utilização em formulações vacinais.



**Figura 5.** Curva de sobrevivência dos camundongos tratados com VEs de *C. albicans*. Todos os camundongos tratados previamente com as VEs de *C. albicans*, na presença ou não de adjuvante, sobreviveram ao desafio com uma dose letal do mesmo fungo (Vargas, 2016).

### 1.5. Vesículas extracelulares como plataforma de vacinação

Conforme mencionado anteriormente as VEs são produzidas por todos os tipos celulares estudados até o momento e são relacionadas com a ativação de células do sistema imune e patogênese de diversos microrganismos (Brown *et al.*, 2015; Joffe *et al.*, 2016). A utilização de VEs vem sendo testada em formulações vacinais e tratamentos de diversas doenças (Joffe *et al.*, 2016; Bitto e Kaparakis-Liaskos, 2017; Gerritzen *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Dentre as vantagens que se destacam no uso de formulações contendo VEs, principalmente se comparando com vacinas compostas por microrganismos inativados ou atenuados, estão: (i) possibilitar uma formulação livre de células, não necessitando de agentes inativadores ou atenuadores (ii) a capacidade de circular em fluídos corporais e fazer parte de um dos mecanismos de comunicação entre células, possibilitando boa circulação dos antígenos pelo corpo (Schorey *et al.*, 2015); (iii) a habilidade de interagir de forma satisfatória com células apresentadoras de antígenos, sendo composta por diversas moléculas imunogênicas; e (iv) a promoção de um ambiente estável para componentes proteicos, possibilitando a inserção de determinados antígenos em sua forma nativa (Schorey *et al.*, 2015).

Os primeiros estudos utilizando VEs como formulações vacinais possuíam como objetivo o controle de tumores. Para isso, foram utilizadas VEs de células dendríticas estimuladas *ex vivo* com antígenos tumorais (Zitvogel *et al.*, 1998; Wolfers *et al.*, 2001; Pitt *et al.*, 2016; Menay *et al.*, 2017). O uso destas VEs em detrimento da própria célula possui vantagens como a facilidade técnica, uma vez que estas VEs podem ser armazenadas e congeladas por pelo menos seis meses, e a resolução dos riscos envolvidos quando são utilizadas células viáveis como tratamento, por exemplo a continuação da replicação da mesma mesmo após a resolução da doença, aumentando os riscos de surgimento de novos problemas como câncer e doenças autoimunes (Zhang *et al.*, 2014). Outra importante vantagem é que a resposta antitumoral estimulada por esses exossomos foi observada tanto para VEs autólogas quanto heterólogas (Chaput *et al.*, 2004).

Já é conhecido que bactérias, em especial as Gram-negativas, também produzem e liberam vesículas, as chamadas vesículas de membrana externa (VMEs), observadas pela primeira vez em 1966 (Knox, Vesik e Work, 1966) e atuando ao mesmo tempo como um veículo e adjuvante em uma proposta de vacina intranasal contra meningococo em 1998 (Haneberg *et al.*, 1998). Embora apresente uma série de vantagens, conforme descrito acima, uma das limitações consideradas para a utilização de vesículas produzidas por estes microrganismos é a presença de toxinas ou estruturas que podem potencializar o desenvolvimento da infecção (Joffe *et al.*, 2016). No entanto, isso pode ser superado através de modificações genéticas a partir do uso de técnicas moleculares relativamente simples. Além disso, também através de engenharia genética, podemos inserir proteínas heterólogas com o objetivo de potencializar o efeito protetor desses compartimentos. Nesse contexto, as VMEs são consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento e produção de VMEs carreadoras de imunógenos específicos (Bitto e Kaparakis-Liaskos, 2017). Kim e colaboradores (2008), demonstraram ser possível a incorporação de diversas proteínas heterólogas à superfície de VMEs através da fusão com a proteína de superfície citolisina A, como por exemplo da proteína verde fluorescente (GFP). A imunização de camundongos com VMEs carreadoras de citolisina-GFP, produzidas por *Escherichia coli* transformadas, resultou na produção de anticorpos anti-GFP (Chen *et al.*, 2010). Além disso, Huang e colaboradores (2016) fusionaram com sucesso a proteína de VME de *Acinetobacter baumannii*, Omp22, à citolisina A da cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Camundongos infectados com *A. baumannii* produziram anticorpos anti-Omp22, mesmo na ausência de adjuvantes, e foram capazes de sobreviver quando submetidos a uma dose letal da bactéria (Huang *et al.*, 2016).

Atualmente, existem quatro vacinas licenciadas que utilizam VMEs (Sierra *et al.*, 1991; Holst *et al.*, 2009; Bai, Findlow e Borrow, 2011), todas produzidas pela bactéria gram-negativa *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (Frasch e Robbins, 1978; Sierra *et al.*, 1991; Holst *et al.*, 2009). VMEs desta bactéria foram observadas estimulando neutrófilos e levando a produção de citocinas, TNF- $\beta$  e IL-1 $\beta$ , e quimiocinas, CXCL8, CCL3 e CCL4 (Lapinet *et al.*, 2000). A mais recente das vacinas meningocócicas do grupo B (Bexsero™, GSK) é composta por VMEs de uma cepa do sorogrupo B contendo três proteínas recombinantes importantes em sua patogênese (NadA, GNA2091-fHBP e NHBA-GNA1030) (Giuliani *et al.*, 2006; Serruto *et al.*, 2012; Vernikos e Medini, 2014). A combinação de múltiplos antígenos, cada um com diferentes funções na patogênese da bactéria, confere a esta vacina um espectro de ação maior em relação às anteriores, permitindo a ação em diversos mecanismos e reduzindo as chances de escape e mutações do microrganismo (Bai, Findlow e Borrow, 2011; Mubaiwa *et al.*, 2018).

Muralinath e colaboradores (2011), demonstraram que vesículas de *Salmonella enterica*, expressando o antígeno PspA de *Streptococcus pneumoniae* acoplado a uma sequência de sinal periplasmático em seu lúmen, foram capazes de conferir proteção contra *S. pneumoniae* em camundongos. Mais recentemente, o antígeno PspA foi incorporado à membrana de vesículas de *S. enterica*, de forma direcionada para a superfície das VMEs (Kuipers *et al.*, 2015). Esta última abordagem seria mais apropriada, uma vez que estudos mostram antígenos secretados ou expostos na superfície associados com respostas celulares fortes devido à disposição física da molécula, facilitando o reconhecimento (Hess *et al.*, 1996; Kaufmann e Hess, 1999; Alaniz *et al.*, 2007; Embry *et al.*, 2011; Amuguni e Tzipori, 2012). Essa formulação se mostrou capaz de conferir proteção, induzindo a produção local da citocina IL-17A e de anticorpos, tanto sistêmica quanto local (Kuipers *et al.*, 2015).

A bioengenharia de VMEs não vem sendo investigada apenas para o desenvolvimento de vacinas antibacterianas. A inserção de antígenos virais vem sendo testados. O peptídeo M2e, um domínio altamente conservado da proteína de matriz do gênero influenza A, foi fusionado com a proteína citolisina A de *E. coli* por Rappazzo e colaboradores (2016). As vesículas recombinantes expressando M2e foram capazes de induzir títulos elevados de IgG em camundongos, sem a necessidade de administrar adjuvantes, além de promover proteção contra infecção com dose letal da cepa PR8 de influenza (Rappazzo *et al.*, 2016). Posteriormente, foi observado que estas vesículas

também eram capazes de conferir proteção cruzada contra as cepas H1N1 e H3N2 de influenza (Watkins *et al.*, 2017).

No entanto, alguns problemas são apontados na utilização de VEs como vacinas, dentre eles a estabilidade dessas partículas quando administradas *in vivo* e sua heterogeneidade, uma vez que são observadas populações de diferentes tamanhos e não se sabe ao certo como são secretadas e como as moléculas são endereçadas para este compartimento. Além disso, há ainda dificuldade na consistência de produção e isolamento, por depender de condições de crescimento do microrganismo e as técnicas de isolamento atuais dificultarem uma produção em larga escala (Wang, Gao e Wang, 2018).

Uma vez demonstrada a capacidade protetora de VEs e a possibilidade de atuarem como carreadoras de antígenos heterólogos, levantou-se a hipótese de utilizar, também, VEs fúngicas como uma estratégia de vacinação, utilizando-as como uma plataforma carreadora de proteínas ou peptídeos relacionados à patogênese de fungos emergentes.

## 2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, não existem vacinas licenciadas capazes de controlar infecções fúngicas invasivas. Uma vacina contra a candidíase vaginal recorrente, patologia que afeta milhares de mulheres ao redor do mundo, se encontra em fase II de testes clínicos, mas sua aplicação em indivíduos imunossuprimidos se mostra um desafio (Sui, Yan e Jiang, 2017; Edwards *et al.*, 2018). Entretanto, avanços na compreensão da imunidade fúngica levantaram a hipótese de que seria possível desenvolver vacinas capazes de provocar imunidade duradoura contra fungos, mesmo em indivíduos imunocomprometidos, investindo em mecanismos redundantes e compensatórios do sistema imune, como a recém descoberta habilidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de conferir proteção na ausência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Kumaresan, da Silva e Kontoyiannis, 2017).

Tendo em vista que a população de imunocomprometidos é a mais atingida por infecções fúngicas, é importante o desenvolvimento de uma formulação vacinal que não utilize microrganismos atenuados, abrindo espaço para formulações de subunidade ou com microrganismo inativado. No entanto, vacinas de subunidade têm como desvantagem a redução do espectro de ação por conta da perda de diversos antígenos existentes na célula completa, e quanto as vacinas com microrganismos inativados, é comum a necessidade de

várias doses de reforço uma vez que o microrganismo inativado não induz uma resposta protetora tão eficiente quanto o atenuado (CDC, 2018; Wang, Gao e Wang, 2018).

Desta forma, na busca de novas alternativas que conferissem uma resposta segura, duradoura e de amplo espectro, levantou-se a possibilidade da utilização de VEs produzidas por microrganismos, uma vez que estas contêm um conjunto de moléculas imunomodulatórias e poderiam atuar como um veículo de transporte de antígenos importantes no desenvolvimento de uma resposta protetora, sem a necessidade de adjuvantes. Atualmente, já existe licenciada uma vacina baseada na bioengenharia de VEs, utilizando VMEs recombinantes da bactéria *N. meningitidis* sorogrupo B, comprovando então ser possível a utilização de vesículas como estratégia vacinal (Bai, Findlow e Borrow, 2011).

Quanto aos fungos, diversos estudos apontam também a presença de vários imunógenos em VEs (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008b; Eisenman *et al.*, 2009; Vallejo *et al.*, 2011; Vallejo *et al.*, 2012; Peres da Silva *et al.*, 2015a; Peres da Silva *et al.*, 2015b; Vargas *et al.*, 2015). Além disso, nosso grupo demonstrou que VEs fúngicas modulam a atividade do sistema imunológico (Vargas *et al.*, 2015) e são capazes de conferir proteção a camundongos previamente imunizados e posteriormente submetidos a desafio letal por *C. albicans* (dados não publicados).

Desta forma, acreditamos ser possível desenvolver uma vacina eficaz e segura utilizando VEs da espécie fúngica *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo de fácil manipulação genética e cultivo, de forma que essas VEs contenham antígenos clássicos dos principais patógenos fúngicos conhecidos, como *C. albicans*, *C. neoformans* e *H. capsulatum*, desencadeando respostas protetoras.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo do projeto é direcionar antígenos heterólogos para VEs produzidas pelo fungo *S. cerevisiae* e testar a atividade biológica desses compartimentos.

### 3.2. Objetivos específicos

- Construir plasmídeos contendo a sequência da Ovalbumina (OVA) sob controle do promotor *ADHI*.
- Gerar cepas de *S. cerevisiae* capazes de expressar o antígeno heterólogo clássico OVA e determinar a presença dessa proteína nas VEs produzidas por esse fungo.
- Avaliar se as VEs de *S. cerevisiae* contendo OVA são internalizadas por macrófagos derivados de medula óssea murina.
- Avaliar a modulação de macrófagos e células dendríticas murinos derivados de medula óssea frente as VEs de *S. cerevisiae* contendo OVA.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Construção das sequências quiméricas de Ovalbumina

Foram construídas três sequências quiméricas da proteína OVA: solúvel (sOVA), sequência completa da proteína, citoplasmática (cOVA), sem a sequência que direciona a proteína para secreção ou membranar (mOVA), sequência citoplasmática contendo uma porção da sequência de ferritina que direciona a proteína para a membrana plasmática, sendo cada uma das sequências fusionada com o promotor do gene *ADHI* (álcool desidrogenase) de *S. cerevisiae*.

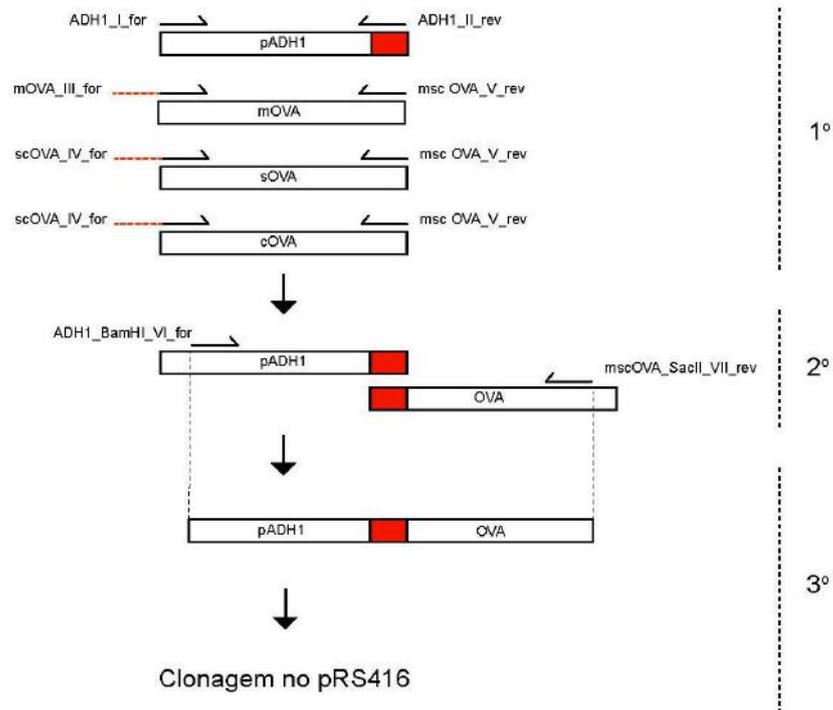
As sequências sOVA, cOVA, mOVA e promotor do gene *ADHI*, foram amplificadas em 35 ciclos de PCR, com as etapas de desnaturação, anelamento e amplificação ocorrendo à 95, 60 e 72 °C, respectivamente. As sequências dos primers utilizados estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequências dos primers forward e reverse utilizados para amplificação das diferentes sequências de OVA (solúvel, citoplasmática e membranar) e do promotor do gene ADH1.

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
<i>ADH1</i>	TACAATATGGAAGGGAACCTTACACTTC	TGTATATGAGATAGTTGATTGTATGCTT GG
<i>mOVA</i>	CATACAATCAACTATCTCATATACAATG GATCAAGCCAGATCAGC	GCATTAACCCTCACTAAAGGGAAGCGG
<i>cOVA e sOVA</i>	CATACAATCAACTATCTCATATACAATG GGCTCCATCGGC	GCATTAACCCTCACTAAAGGGAAGCGG

Em seguida, as sequências foram purificadas com o kit QUIAEX II Gel *Extraction* (QIAGEN - 20021) e quantificadas em Nanodrop. A fusão da sequência do promotor com as sequências dos diferentes direcionamentos da proteína OVA foi realizada por meio da técnica de “*Stich PCR*” (Figura 6). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar as diferentes construções de OVA contêm uma pequena cauda complementar a sequência do promotor *ADH1*, sendo o anelamento dessas no *Stich PCR* importante para que ocorra a fusão das duas sequências. Os *primers* utilizados no *Stich PCR* contêm, em sua sequência, os sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição BamHI e SacII, necessários para a clonagem no vetor (Tabela 3). Após fusionadas, as sequências foram novamente purificadas e quantificadas em Nanodrop.

## Estratégia para fusionar promotor ADH1 + OVAs por “Stich PCR”



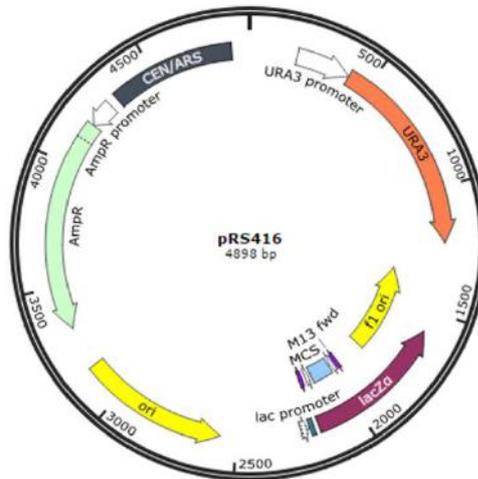
**Figura 6.** Esquema de construção das sequências de ovalbumina. O promotor de ADH1 foi fusionado às sequências de “OVAs” através da técnica de “Stich PCR”.

**Tabela 3.** Sequências dos *primers forward e reverse*, utilizados para ligação das diferentes sequências de OVA (solúvel, citoplasmática e membranar) com a sequência do promotor do gene ADH1.

Gene	Primer
<i>ADH1_BamHI (forward)</i>	CGGGATCCATATTAATTAAGTCCAATGCTAGTAGAGAAGG
<i>mOVA, cOVA e sOVA_SacII (reverse)</i>	TCCCCGCGGTTAAGGGGAAACACATCTGCC

Os sítios de reconhecimento das enzimas BamHI e SacII se encontram sinalizados em vermelho.

Os fragmentos finais das sequências de sOVA, mOVA e cOVA e o plasmídeo pRS416 (Stratagene) (Figura 7) foram clivados com as enzimas BamHI e SacII, novamente purificados, e a ligação dos fragmentos ao plasmídeo foi realizada utilizando a enzima T4 ligase (NEB - M0202S). O plasmídeo escolhido permite a seleção dos transformantes em bactérias e em leveduras por conter, para seleção em bactéria, o gene de resistência a ampicilina e, para seleção em leveduras, o gene *Ura3*, que permite o crescimento de organismos auxotróficos na ausência de uracila.



**Figura 7.** Estrutura do plasmídeo pRS416. O plasmídeo contém como marcas de seleção conferir resistência ao antibiótico ampicilina (região AmpR) e conferir ao microrganismo a habilidade de produção de Uracila (região URA3).

#### 4.1.1. Transformação em *Escherichia coli*

Células competentes, isto é, aptas a receber material genético exógeno, da cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* foram transformadas com os diferentes plasmídeos (contendo cOVA, mOVA e sOVA) a fim de se obter grande quantidade de material plasmidial. A metodologia utilizada foi o choque térmico, onde as células e os plasmídeos são incubadas em gelo por 30 min e em seguida à 42 °C por 30 segundos, permeabilizando a membrana e permitindo, assim, a entrada dos plasmídeos nas células. As bactérias transformadas foram selecionadas, através de cultivo em meio Luria-Bertani (LB) ágar acrescido de 100  $\mu$ g/mL de antibiótico ampicilina, por crescimento *overnight*, a 37 °C. Após o tempo de incubação, algumas colônias isoladas foram submetidas a técnica de PCR de genotipagem, para seleção de células que efetivamente possuíssem o plasmídeo com o inserto. Confirmada a transformação, as colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB líquido, acrescido de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, *overnight* a 37 °C, e os plasmídeos transformados obtidos por extração através do kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (QIAGEN).

A correta construção e inserção no plasmídeo foi confirmada, através do sequenciamento dos três plasmídeos finais obtidos, pela Unidade Multidisciplinar de Genômica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF/UFRJ). Os resultados foram analisados e os *contigs* montados utilizando o *software* SeqMan, que é parte integrante do pacote DNASTAR.

#### 4.1.2. Transformação em levedura de *S. cerevisiae*

A cepa S288C de *S. cerevisiae* foi transformada com os plasmídeos pRS416 contendo as sequências dos diferentes direcionamentos da proteína OVA (cOVA, mOVA e sOVA), sob regulação do promotor constitutivo do gene *ADHI*. Como controle negativo a cepa S288C de *S. cerevisiae* também foi transformada com vetor vazio (vOVA). A transformação das leveduras foi realizada pelo método LiAc (Gietz e Woods, 2002) e a seleção das leveduras transformadas através de cultivo em ágar dropout -URA DO Supplemnt (-URA - Clontech - 630416), um meio de cultura sem uracila.

#### 4.2. Confirmação da expressão de Ovalbumina

Foram utilizadas as técnicas de Western Blot e imunofluorescência a fim de confirmar a expressão das diferentes formas de OVA em cada cepa transformada. Os diferentes transformantes de *S. cerevisiae* foram crescidos por 24 horas em 10 mL de meio -URA, na ausência da pirimidina uracila, e, após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 3.650 x g e o meio de cultura foi descartado. O extrato proteico foi obtido através da adição de pérolas de vidro e tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2 % de Tergitol NP-40, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA) acrescido de inibidor de proteases ao pellet celular das leveduras, seguido por etapas de agitação intensa. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 16.200 x g e o sobrenadante, contendo o extrato proteico, recolhido. A quantificação foi realizada através do kit Pierce™ BCA Protein Assay.

**Western Blot.** Para a metodologia de Western Blot uma eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Às amostras foi adicionado tampão de amostra 4 vezes concentrado (0,2 M Tris pH 6,8, 0,4 M DTT, 8% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 40% glicerol) e estas desnaturadas a 100 °C por 5 minutos em termobloco. Aos géis, foram aplicados 10 µg de proteína de cada amostra e a eletroforese processada a 200 V por 1 hora. O gel de SDS-PAGE foi submetido à transferência para membrana de PVDF, previamente ativada com metanol, utilizando tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% de metanol, e uma voltagem fixa de

100V, a 4 °C por 2 horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween (TBST) (1,4 M NaCl, 30 mM KCl, 250 mM Tris Base e 0,1 % Tween 20) por 30 minutos sob agitação, para evitar que ocorram ligações inespecíficas. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário  $\alpha$ -OVA isolado de fluido ascítico na diluição 1:2000 (Sigma Aldrich – SAB5300165) à solução de bloqueio e incubado a 4 °C, *overnight*. Após o tempo de incubação, a membrana foi lavada com solução de TBST e o adicionado o anticorpo secundário  $\alpha$ -mouse IgG conjugado à HRP 200 ng/mL (Promega – W4021) em tampão de bloqueio, agitando por aproximadamente 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada com solução TBST por 30 minutos e foram, então, adicionados 500  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio e 500  $\mu$ L de luminol (ThermoFisher – 34580) a um recipiente contendo a membrana. As bandas visualizadas foram analisadas e fotografadas no ImageQuantX.

**Imunofluorescência.** Para os experimentos de imunofluorescência, as cepas transformadas de *S. cerevisiae* foram crescidas 24 horas em 10 mL de meio -URA e submetidas a tratamento enzimático com liticase para geração de protoplastos, conforme descrito por Carrillo e colaboradores (2015). Para isso, as células foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos, ressuspensas em 3 mL do tampão de incubação (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2 ajustado com KOH e 40 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) e incubadas em agitação por 15 min, à temperatura ambiente. As células foram convertidas em protoplastos através da adição de 3 mL de tampão contendo liticase (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4 M sorbitol pH 7,2 ajustado com KOH, 40 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 150 mg BSA e 0,5 mg de liticase), a suspensão foi homogeneizada em vortex e incubada à temperatura ambiente, por 45 minutos. Os protoplastos foram lavados 4 vezes em PBS contendo 0,6M de KCl, centrifugando a 500 x g, por 5 minutos, e fixados com PBS contendo 4% paraformaldeído (PBS/PF 4%), por 30 minutos, a 37 °C. Após fixados, os protoplastos foram lavados 3 vezes em PBS filtrado e ligações inespecíficas ao anticorpo bloqueadas com solução de PBS contendo 1% BSA (PBS/BSA 1%) por 1 hora, a 37 °C. Então, o anticorpo primário  $\alpha$ -OVA foi adicionado na diluição 1:500, em solução PBS/BSA 1%, e incubado *overnight*, a 4 °C. Após o período de incubação, os protoplastos foram lavados novamente 3 vezes com PBS e o anticorpo secundário,  $\alpha$ -mouse IgG Alexa Fluor® 568 conjugate (ThermoFisher – A-11004), foi adicionado na diluição 1:500, também em PBS/BSA 1%, e incubado *overnight*, a 4°C. Passado o período de incubação, os protoplastos foram lavados 3 vezes com PBS e foi adicionado o composto fluorescente Calcofluor na diluição 1 mg/mL, em

PBS, por 1 hora, à temperatura ambiente, para marcação da parede celular fúngica, uma vez que este composto se liga à quitina, polissacarídeo presente nesta estrutura. Os protoplastos foram lavados 3 vezes com PBS, as lâminas montadas em 50 mM N-propilgalato-PBS e analisadas em microscópio de fluorescência AxioVision 4:8 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### 4.3. Obtenção das vesículas de *S. cerevisiae*

As cepas transformadas foram pré-inoculadas em 10 mL de meio -URA, sob agitação (150 rpm) a 30°C. Após 48 h, os pré-inóculos foram transferidos para 100 mL de meio -URA e mantidos sob a mesma agitação, temperatura e tempo de incubação. A seguir, uma alíquota de cada inóculo foi retirada para contagem em Câmara de Neubauer, e transferidas 10<sup>9</sup> células para 2000 mL de meio -URA, mantidos novamente sob mesma agitação, temperatura e tempo de incubação.

As leveduras foram separadas do sobrenadante de cultura de acordo com o protocolo previamente descrito por nosso grupo (Rodrigues *et al.*, 2007). Desta forma, o cultivo foi centrifugado a 4.000 x g por 20 minutos, a 4 °C, e os pellets descartados. Para garantir a remoção de células e debris, o sobrenadante resultante foi filtrado em membrana de 0,8 µm e, posteriormente, concentrado cerca de 25 vezes usando um sistema de ultrafiltração Amicon (membrana de 100 kDa - Millipore). O sobrenadante concentrado foi centrifugado a 100.000 x g, por 1 hora, a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados uma vez e ressuspensos em PBS (pH 7,2, filtrado em membrana de 0,22 µm) contendo 1% penicilina-estreptomicina. A quantificação das VEs foi realizada através do kit fluorimétrico *Amplex Red Sterol Assay* (Molecular Probes), baseado na presença de esterol nas membranas das vesículas.

#### 4.4. Análise do diâmetro médio das vesículas

Vesículas extracelulares possuem um movimento browniano e este pode ser medido pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS - *Dynamic Light Scattering*), possibilitando o conhecimento sobre tamanho e heterogeneidade da amostra (Eisenman, *et al.*, 2009). As vesículas de *S. cerevisiae* das diferentes cepas foram medidas por DLS em

90Plus/BIMAS Multi-Ângulo analisador de tamanho de partículas (Instrumentos Brookhaven).

#### 4.5. Confirmação da presença de OVA nas vesículas

A metodologia de Western Blot foi realizada da mesma forma que para o extrato total das leveduras. Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Às amostras foi adicionado tampão de amostra 4 vezes concentrado (0,2 M Tris pH 6,8, 0,4 M DTT, 8% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 40% glicerol) e estas desnaturadas a 100 °C por 5 minutos em termobloco. Aos géis, foram aplicados 10 µg de proteína de cada amostra, quantificadas através do kit Pierce™ BCA *Protein Assay*, e a eletroforese processada a 200 V por 1 hora. O gel de SDS-PAGE foi submetido à transferência para membrana de PVDF, previamente ativada com metanol, utilizando tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% de metanol, e uma voltagem fixa de 100V, a 4 °C por 2 horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween (TBST) (1,4 M NaCl, 30 mM KCl, 250 mM Tris Base e 0,1 % Tween 20) por 30 minutos sob agitação, para evitar que ocorram ligações inespecíficas. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário  $\alpha$ -OVA isolado de fluido ascítico na diluição 1:2000 (Sigma Aldrich – SAB5300165) à solução de bloqueio e incubado a 4 °C, *overnight*. Após o tempo de incubação, a membrana foi lavada com solução de TBST e o adicionado o anticorpo secundário  $\alpha$ -mouse IgG conjugado à HRP 200 ng/mL (Promega – W4021) em tampão de bloqueio, agitando por aproximadamente 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada com solução TBST por 30 minutos e foram, então, adicionados 500 µL de peróxido de hidrogênio e 500 µL de luminol (ThermoFisher – 34580) a um recipiente contendo a membrana. As bandas visualizadas foram analisadas e fotografadas no ImageQuantX.

#### 4.6. Animais e obtenção de células hospedeiras (CEUA: 01200.001568/2013-87)

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J, de 4 a 12 semanas de idade, cedidos pelo Prof. Fabianno Dutra do Laboratório de Imunologia e Inflamação, Departamento de Imunologia, IMPG, UFRJ. Os macrófagos e as células

dendríticas foram obtidos a partir de células progenitoras da medula óssea dos animais, segundo a metodologia descrita por Zhang, Goncalves e Mosser (2008) e Lutz *et al.* (2000), respectivamente. Os camundongos foram eutanasiados e seus dois fêmures e duas tíbias das patas traseiras retirados. As epífises dos ossos removidas e as células progenitoras obtidas através de lavagem das medulas, realizada com meio RPMI e o auxílio de uma seringa com agulha.

Para a obtenção dos macrófagos, o lavado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e as células obtidas cultivadas em placa de petri contendo 10 mL meio de meio de diferenciação, composto por RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina e 20% de sobrenadante de L929, o qual contém fator rM-CSF (fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos), a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. No terceiro dia de cultura, foram adicionados mais 10 mL do meio de diferenciação. As células foram recuperadas para experimento após sete dias de cultura.

Para a obtenção das células dendríticas, o lavado obtido foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e as células cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina, 10% de SFB e 20 ng/mL de rGM-CSF, a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. No terceiro dia, a cultura foi ressuspensa em mais 10 mL de meio suplementado contendo rGM-CSF. No sétimo dia de cultura, as células foram recuperadas para experimento.

#### 4.6.1. Avaliação da internalização das VEs das cepas de *S. cerevisiae* transformadas por macrófagos derivados de medula óssea

Os macrófagos foram cultivados em placa de 8 poços (Lab-Tek II Chamber Slide - Thermo Fisher Scientific - 154941), na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço e incubados *overnight* em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina. VEs dos diferentes mutantes de *S. cerevisiae* foram marcadas com 3 μM do composto fluorescente DiIC<sub>18</sub> (1,1'-dioctadecil-3,3,3,3'-perclorato de tetrametilindocarbocianina - Invitrogen), que se intercala nos lipídios da membrana vesicular (Oliveira *et al.*, 2010a), e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Como controle negativo, o DiIC<sub>18</sub> foi incubado em uma solução estéril de PBS. Após o período de incubação, as suspensões vesiculares foram lavadas três vezes, através de ultracentrifugação, com 20 mL de PBS (pH 7,2 três vezes filtrado em membrana de 0,22

$\mu\text{m}$ ), a 100.000 x g por 1 hora à 4 °C e ressuspendidas também em mesmo PBS, de forma que a concentração de esterol por Eppendorf seja de 2  $\mu\text{M}$ . Os macrófagos foram, então, incubados com a suspensão vesicular contendo VEs marcadas com DiIC<sub>18</sub>, na concentração final de 1  $\mu\text{M}$  de esterol/poço, em dois tempos: 15 minutos e 1 hora em meio RPMI 1640 puro. Após os tempos de incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e fixadas com PBS/PF 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com PBS e bloqueadas com PBS/BSA 1% por 1 hora, também a temperatura ambiente, para evitar ligações inespecíficas. O glicosfingolípídeo de membrana GM1 foi marcado com a subunidade B da toxina da cólera conjugada com FITC (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (CTxb-FITC – SigmaAldrich) e incubando por 1 hora, a 4 °C. Após o término da incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e o núcleo marcado com DAPI (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – SigmaAldrich), incubando por 20 min, a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com PBS ao término da incubação. A lâmina foi então montada, em 50 mM N-propilgalato-PBS, e analisada em microscópio de fluorescência AxioVision 4.8 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### 4.6.2. Avaliação da produção de NO por macrófagos

Macrófagos obtidos da medula óssea dos camundongos foram plaqueados em placas de 96 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço e mantidos *overnight* em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina, à 37 °C, e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram incubadas com VEs das diferentes cepas transformadas de *S. cerevisiae*, nas concentrações 0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  de esterol, em meio RPMI suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina por 1 hora à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle positivo foi utilizado LPS (100 ng/mL) e como controle negativo as células em meio RPMI suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina (sem VEs). Após esse tempo, o meio foi suplementado com 10% de SFB e as células incubadas *overnight* nas mesmas condições. A adição de SFB após 1h de incubação é devido a capacidade descrita da albumina presente de romper VEs fúngicas e bacterianas (Wolf, Rivera e Casadevall, 2012). Após o período de incubação, o sobrenadante foi recolhido e a produção de NO mensurada pela metodologia de Griess (Green *et al.*, 1982). Para isso, em placa de 96 poços, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de macrófagos e 100  $\mu\text{L}$  da solução reveladora composta por 0,1% de diidrocloreto de naftiletlenodiamina, e 1% de

sulfonamida em 5% de ácido fosfórico, incubados por 10 minutos no escuro, a temperatura ambiente, e analisados em leitor de placa a 540 nm de absorbância. Uma curva de  $\text{NaNO}_2$  foi realizada para correlacionar a quantidade de nitrito presente nas amostras.

#### 4.6.3. Avaliação do metabolismo celular dos macrófagos

O metabolismo celular de macrófagos foram avaliados através da metodologia de MTT (Morgan, 1998), com o objetivo de confirmar se as VEs das diferentes cepas transformadas de *S. cerevisiae* seriam tóxicas para as células mamíferas. Para isso, as células foram plaqueadas, com concentração  $2 \times 10^5$  células/poço, em placas de 96 poços e incubados *overnight* em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina. Macrófagos e células dendríticas foram incubados com VEs das diferentes cepas transformadas de *S. cerevisiae*, em diferentes concentrações (0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  de esterol/poço), por 1 hora em meio RPMI e 1% de penicilina-estreptomicina (37° C, 5%  $\text{CO}_2$ ), tempo suficiente para internalização das VEs produzidas por *C. neoformans* e *C. albicans* (Oliveira *et al.*, 2010a; Vargas *et al.*, 2015). Após esse tempo, foi adicionado aos poços meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram incubadas *overnight* nas mesmas condições e, ao final, retirado o meio e adicionada solução de MTT (0,5 mg/mL). Como controle negativo foi utilizado Triton X-100. As células foram incubadas por mais 4 horas a 37 °C. A solução de MTT foi retirada e os cristais solubilizados em 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

#### 4.6.4. Avaliação da produção de citocinas por macrófagos e CDs

Macrófagos e células dendríticas obtidos da medula óssea dos camundongos foram plaqueados em placas de 96 e 24 poços, na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço e  $1 \times 10^6$  células/poço, respectivamente. As células foram mantidas *overnight* em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina, à 37 °C, e 5%  $\text{CO}_2$ .

Os macrófagos e células dendríticas foram incubados com VEs das diferentes cepas transformadas de *S. cerevisiae*, nas concentrações 0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  de esterol, em

meio RPMI suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina por 1 hora à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle positivo foi utilizado LPS (100 ng/mL) e como controle negativo as células em meio RPMI suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina (sem VEs). Após esse tempo, o meio foi suplementado com 10% de SFB e as células incubadas *overnight* nas mesmas condições. Passado o período de incubação, o sobrenadante foi recolhido e a produção da citocinas IL-6 mensurada, de acordo com protocolo descrito nos kits de ELISA BD OptEIA™ (BD Biosciences – 550950).

#### 4.6.5. Avaliação da expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas

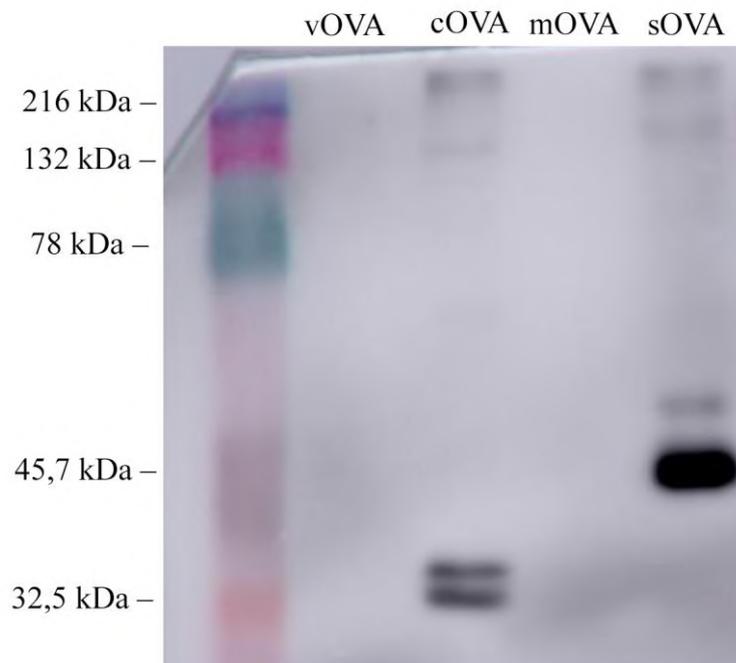
Células dendríticas obtidas da medula óssea dos camundongos foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço. As células foram mantidas *overnight* em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina, à 37 °C, e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram incubadas com as VEs das diferentes cepas transformadas de *S. cerevisiae*, nas concentrações 0,1, 0,5 e 1 µM de esterol, em meio RPMI suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina por 1 hora à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle positivo foi utilizado LPS (100 ng/mL) e como controle negativo as células em meio RPMI suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina (sem VEs). Após esse tempo, o meio foi suplementado com 10% de SFB e as células incubadas *overnight* horas nas mesmas condições.

Para avaliação da expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II, as células foram recolhidas, centrifugadas a 400 x g por 2 minutos e lavadas com PBS. As CDs foram então transferidas para placa de 96 poços com fundo em U e bloqueadas PBS contendo 2% de SFB e 2% de soro normal de camundongo por 30 min, à 4 °C. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com solução PBS e incubadas com os anticorpos α-CD11c-APC (0,2 mg/mL) (eBioscience 17-0114-82), α-MHC II-PE (0,1 mg/mL) (eBioscience - 25-5321-82) α-CD86-FITC (0,5 mg/mL) (eBioscience - 11-0862-82) por 30 min, à 4 °C. Terminado o tempo de incubação, as células foram lavadas com solução de PBS para remoção de anticorpos não ligados e ressuspensas em PBS para análise em BD FACSCalibur™. Um total de 10 mil eventos foram adquiridos e analisados no *Software* FlowJo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Confirmação da expressão de Ovalbumina

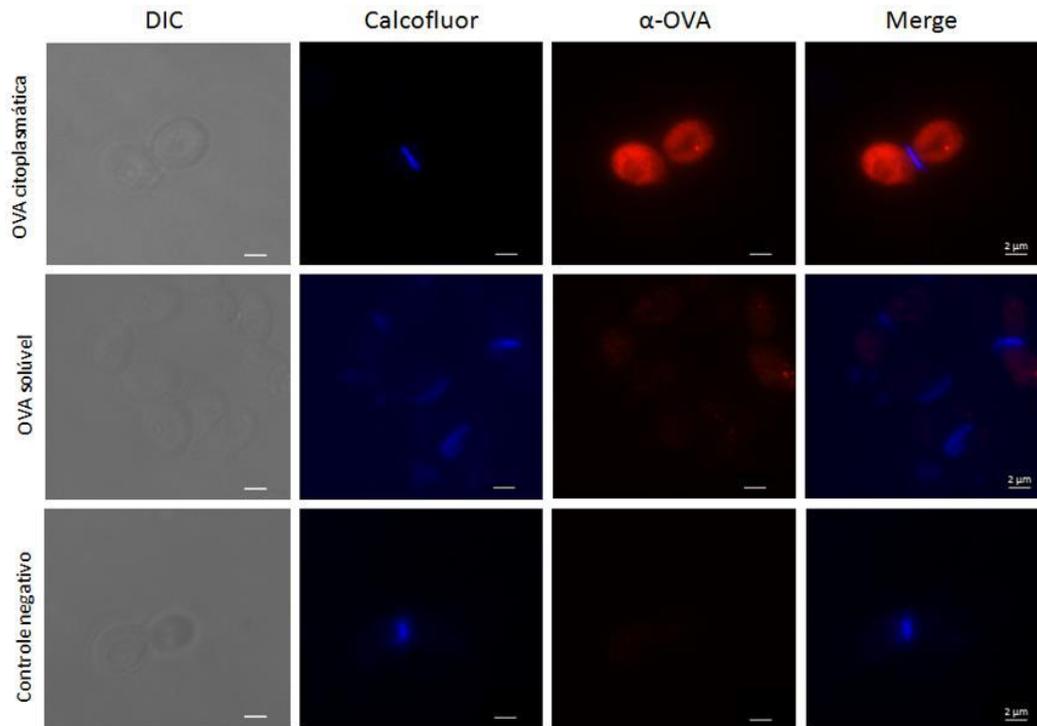
A expressão da proteína OVA foi confirmada por meio de Western Blot e imunofluorescência nas leveduras transformadas de *S. cerevisiae*. Como esperado, foi possível observar, que as construções apresentam um tamanho proteico distinto, sendo a sOVA no tamanho da proteína nativa (~43 kDa), a cOVA apresenta um tamanho menor (~29 kDa), devido a retirada do epítipo de secreção. A expressão da proteína por leveduras transformadas com a construção mOVA, no entanto, não foi confirmada (Figura 8). Também foi possível observar a presença de uma segunda banda, de tamanho ligeiramente maior, nos transformantes sOVA (~47 kDa) e cOVA (~33 kDa).



**Figura 8.** Expressão de OVA pelas cepas transformadas de *S. cerevisiae*. Western Blot, de extrato proteico total da cepa de vetor vazio, vOVA e das transformadas sOVA, cOVA e mOVA de *S. cerevisiae* confirmando a expressão da proteína OVA pelos transformantes sOVA e cOVA.

Na imunofluorescência podemos observar a partir da marcação com calcofluor, que uma grande porção da parede celular fúngica foi, de fato, removida. Quanto a

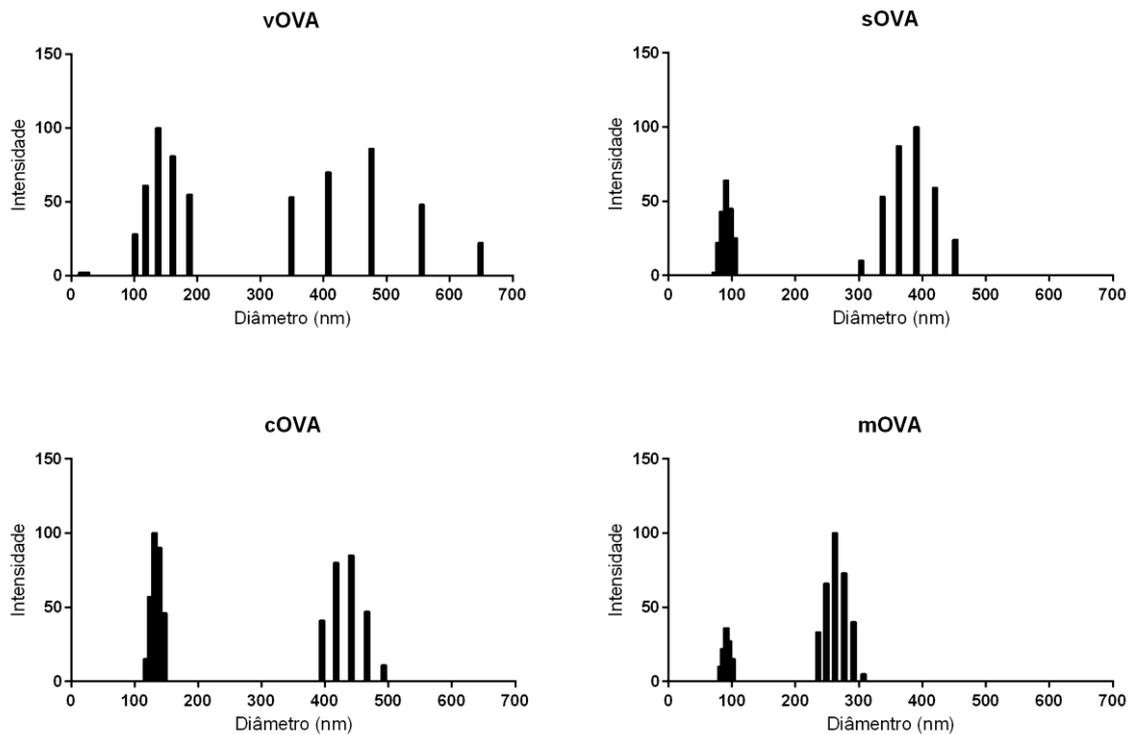
marcação de OVA, é possível notar uma maior concentração no citoplasma das leveduras transformadas com a proteína heteróloga cOVA, confirmando a sua localização intracelular e uma menor marcação nas leveduras transformadas com sOVA, indicando que a proteína que está sendo expressa está sendo secretada da célula (Figura 9).



**Figura 9.** Visualização de OVA nas cepas transformadas de *S. cerevisiae*. Microscopia óptica de fluorescência das cepas vOVA e transformantes sOVA e cOVA de *S. cerevisiae* confirmando a presença de OVA em ambos os transformantes.

## 5.2. Avaliação do diâmetro das VEs das cepas transformadas de *S. cerevisiae*

Com o objetivo de avaliar se a inserção de uma proteína heteróloga influenciaria no padrão de tamanho das VEs, uma alíquota de cada uma das cepas transformadas (vOVA, sOVA, cOVA e mOVA) foi submetida a análise em DLS. Foi possível observar que as diferentes cepas apresentaram uma população de tamanho similar, entre 75 e 200 nm, e uma segunda população de diâmetros bem distinto, medindo em torno de 250 a 650 nm (Figura 10).

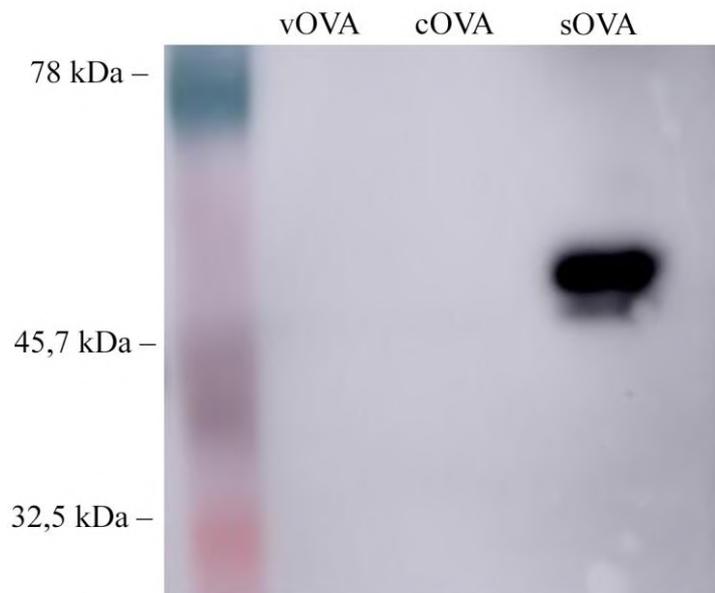


**Figura 10.** Diâmetro das VEs transformadas de *S. cerevisiae*. Análise do espalhamento de luz dinâmico (DLS) das VEs produzidas pelas diferentes cepas transformadas de *S. cerevisiae*: vOVA, cOVA, sOVA.e mOVA.

### 5.3. Expressão da Ovalbumina em VEs

A expressão de OVA em VEs foi avaliada também por Western Blot, confirmando a presença da proteína apenas na cepa de *S. cerevisiae* com a construção sOVA (Figura 11). Na porção vesicular, foi possível observar uma banda de maior peso molecular (~47 kDa), também presente no extrato proteico total das leveduras, em maior quantidade. Esse resultado sugere a ocorrência de alguma modificação pós-translacional na proteína direcionada para VEs.

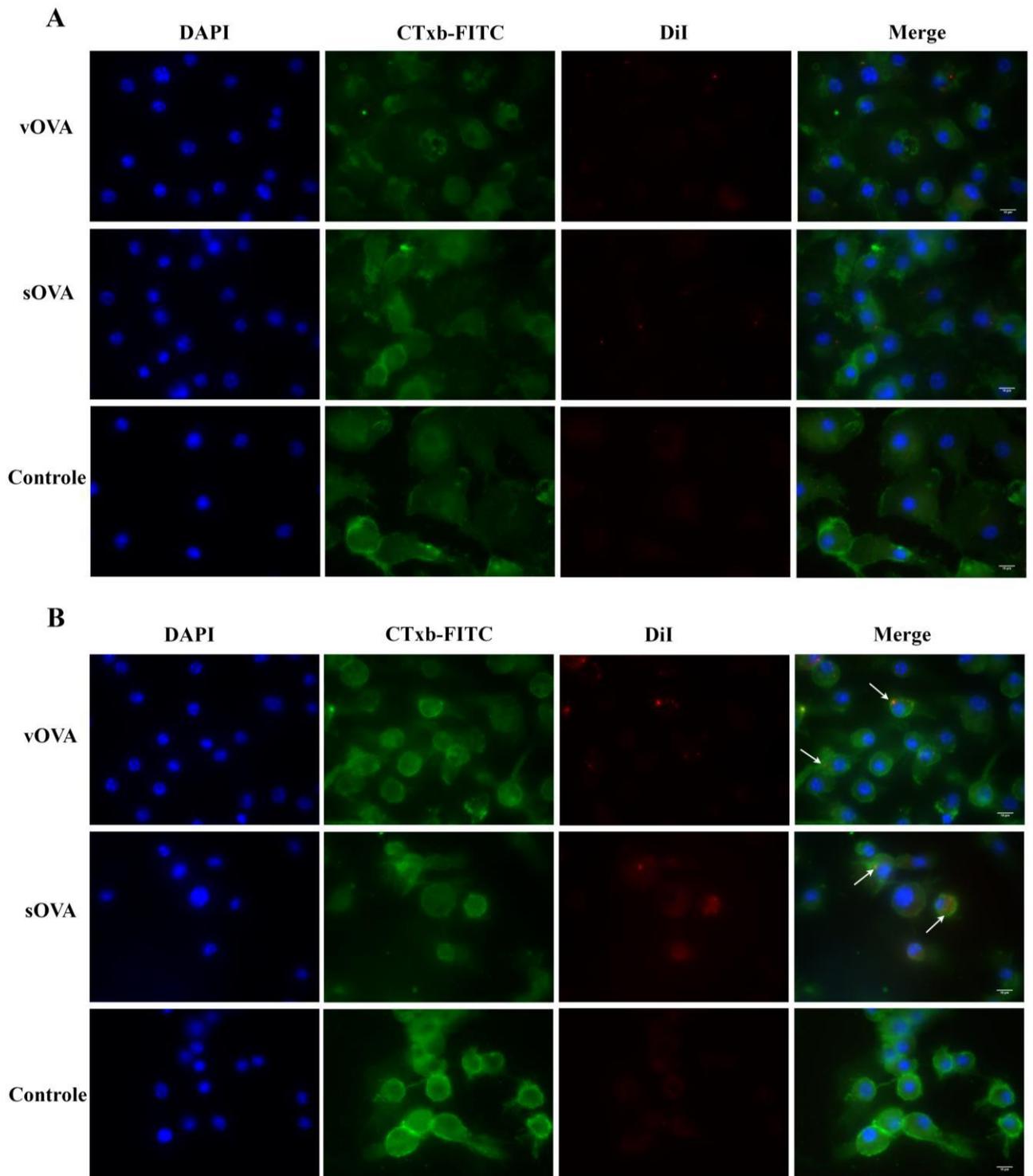
A ausência de OVA nas VEs da cepa com a construção cOVA sugere que, mesmo que exista uma grande quantidade de proteína no citoplasma das células, é necessário um sinal para que a proteína se dirija ao compartimento vesicular. Uma vez que a cepa cOVA não apresenta a proteína no seu conteúdo vesicular, seguimos os experimentos apenas com as vesículas obtidas da cepa sOVA.



**Figura 11.** Direcionamento de OVA para VEs das cepas transformadas de *S. cerevisiae*. Western Blot das vesículas extracelulares de *S.cerevisiae* confirmando a presença de Ovalbumina no mutante sOVA. Padrão BIO-RAD Kaleidoscope Protein Standards 161-0324.

#### 5.4. Avaliação da internalização das VEs das cepas de *S. cerevisiae* transformadas por macrófagos derivados de medula óssea

A partir da co-localização entre as marcações de CTxb-FITC e DiIC<sub>18</sub>, marcando, respectivamente, o GM1 presente na membrana de macrófagos e os lipídios da membrana das vesículas, sugere-se a internalização das VEs, tanto de vOVA quanto de sOVA, somente com 1 hora de interação entre as VEs e macrófagos (Figura 12).

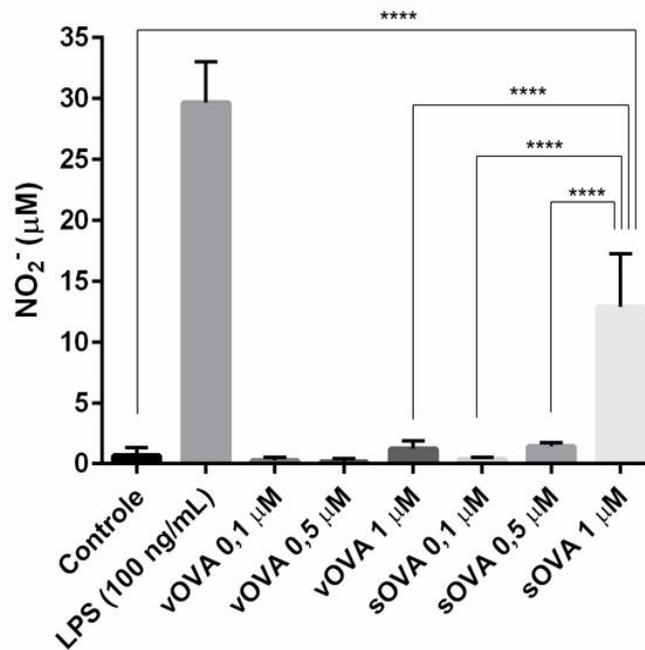


**Figura 12.** Internalização de VEs de vOVA e sOVA por macrófagos derivados de medula óssea. As células tiveram seu núcleo marcado com DAPI (azul) e o glicosíngolípídeo de membrana GM1 com CTxb-FITC (verde). As vesículas de vOVA e sOVA foram marcadas com DiI<sub>18</sub> (vermelho). As fotos representam incubações nos tempos de (A) 15 min e (B) 1 hora. Como controle negativo foi marcada solução de PBS com DiI<sub>18</sub>.

### 5.5. Produção de NO por macrófagos murinos

A fim de avaliar se as VEs de vOVA e sOVA induzem a modulação de macrófagos murinos derivados de medula óssea, as células foram estimuladas com as VEs em três concentrações diferentes de esterol (0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ), por 24h. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido para dosagem de produção de NO, utilizando a metodologia de Griess e 100 ng/mL de LPS como controle positivo.

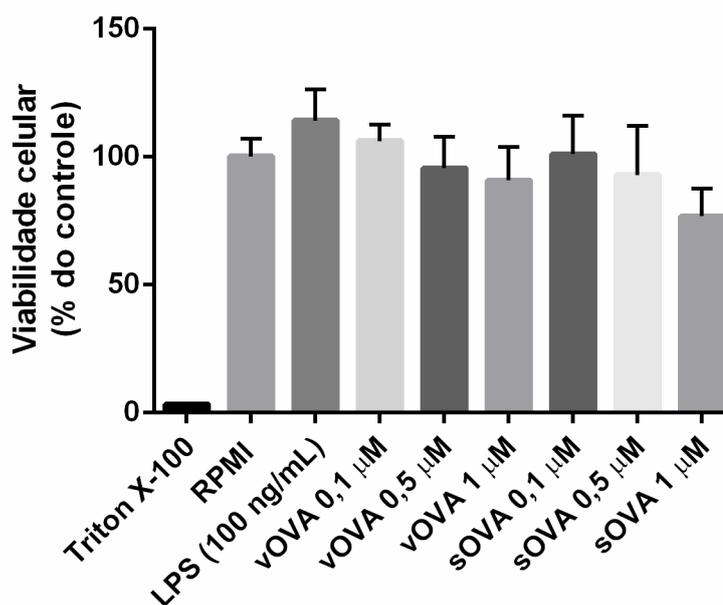
Pode-se observar que apenas as VEs de sOVA na concentração 1  $\mu\text{M}$  induziram uma produção significativa de NO, quando comparadas ao controle de células não estimuladas, às diferentes concentrações de sOVA (0,1 e 0,5  $\mu\text{M}$ ) e às VEs de vOVA na mesma concentração (Figura 13).



**Figura 13.** Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos. Macrófagos derivados de medula óssea murina foram estimulados, por 24h, com VEs de vOVA e sOVA, em três concentrações distintas de esterol: 0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ . Como controle positivo, as células foram estimuladas com 100 ng/mL de LPS e, como controle negativo, células não estimuladas. VEs de sOVA 1  $\mu\text{M}$  induziram produção significativa de NO em relação ao controle (macrófagos não estimulados), à vOVA na mesma concentração e à sOVA com 0,1 e 0,5  $\mu\text{M}$  de esterol. A análise estatística empregada foi teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey.

## 5.6. Avaliação do metabolismo celular de macrófagos

Para avaliar se as VEs de sOVA e vOVA, em diferentes concentrações de esterol (0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ), afetam a viabilidade celular, a atividade metabólica das células foi avaliada pelo teste do MTT (Figura 14). Foram utilizados como controles negativo macrófagos não estimulados e como controle positivo macrófagos tratados com Triton X-100. Quando comparadas com o controle de células não estimuladas, as VEs de vOVA e sOVA não se mostraram citotóxicas para os macrófagos em nenhuma das concentrações.



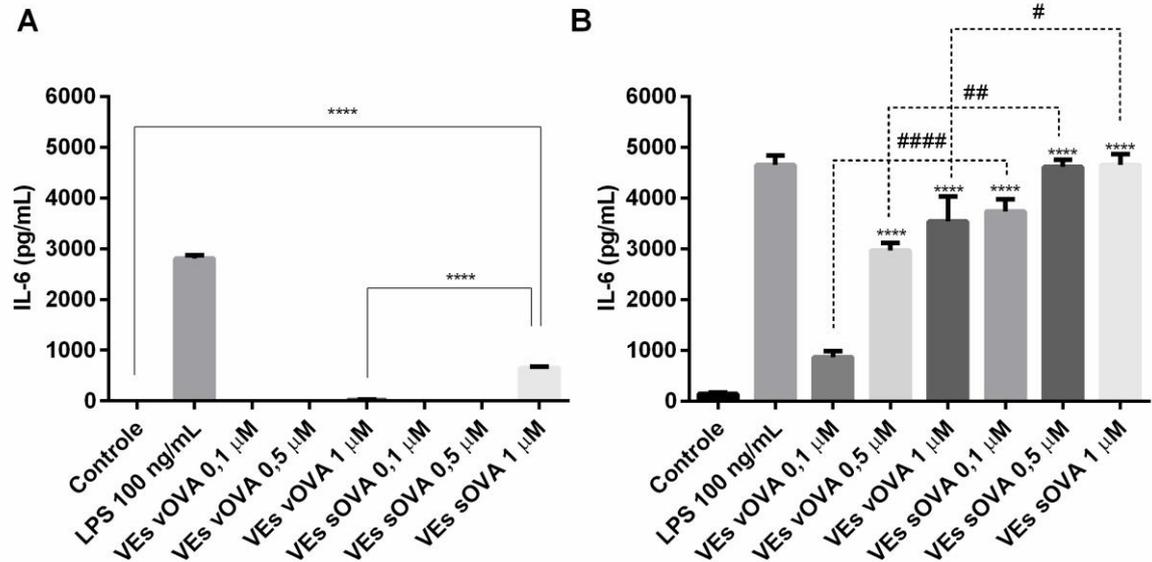
**Figura 14.** VEs de *S. cerevisiae* não alteram a viabilidade de macrófagos murinos. Macrófagos derivados de medula óssea murina foram estimulados, por 24h, com VEs de vOVA e sOVA, em três concentrações distintas de esterol: 0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  e não demonstraram perfil citotóxico. A análise estatística empregada foi teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey.

## 5.7. Produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas

Macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea murina foram incubadas com VEs de vOVA e sOVA nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  de esterol, após as interações o sobrenadante foi recolhido para dosagem de citocinas por ELISA.

Macrófagos secretaram a citocina IL-6 quando incubados com 1  $\mu\text{M}$  de VEs de sOVA (Figura 15A). Já as células dendríticas secretaram IL-6 na presença de VEs de vOVA e de sOVA (Figura 15B) em todas as concentrações de esterol, exceto quando

estimuladas com 0,1  $\mu\text{M}$  de vOVA. Foi possível observar, também, uma maior secreção de IL-6 por células dendríticas estimuladas com VEs de sOVA, quando comparadas às mesmas concentrações de vOVA.

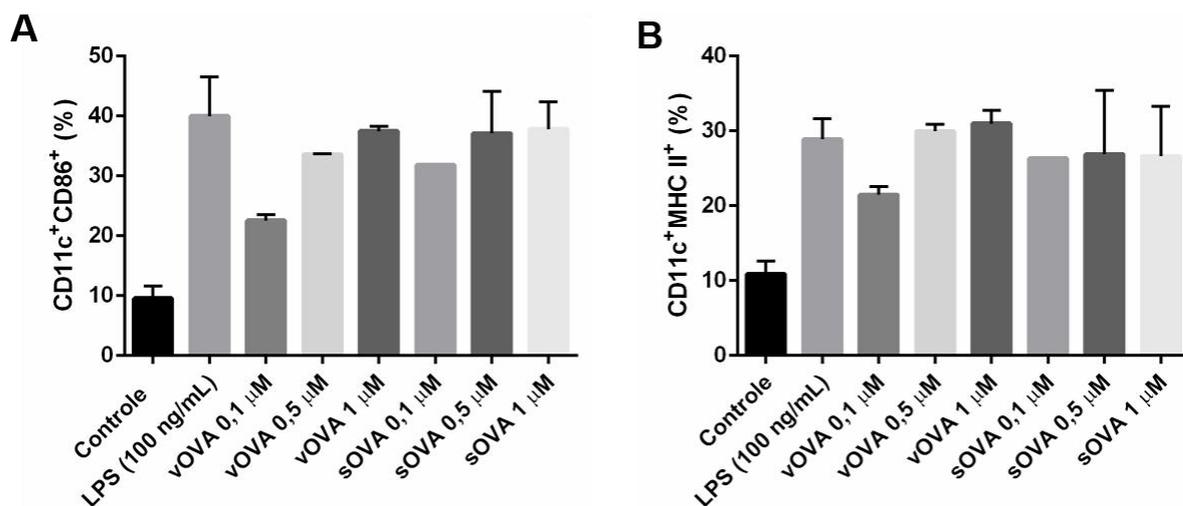


**Figura 15.** Produção de IL-6 por macrófagos e células dendríticas. Macrófagos e células dendríticas derivados de medula óssea murina forma incubados com 0,1, 0,5 ou 1  $\mu\text{M}$  de esterol das VEs de vOVA e sOVA. LPS (100 ng/mL) e células sem nenhum estímulo foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. (A) Macrófagos secretaram concentrações significativas de IL-6 quando estimulados com 1  $\mu\text{M}$  de VEs de sOVA. (B) Células dendríticas secretaram IL-6 quando estimuladas com VEs de vOVA e sOVA em todas as concentrações, exceto vOVA 0,1  $\mu\text{M}$ . A análise estatística empregada foi teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey.

### 5.8. Expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas

Para avaliar se as VEs de vOVA e do transformante sOVA são capazes de modular a expressão de receptores associados ao desenvolvimento de uma resposta adaptativa por células dendríticas, as células foram incubadas com as VEs nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente para a dosagem de IL-6 (0,1, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ). Os controles utilizando células não estimuladas ou estimuladas com LPS foram mantidos. Ao final do tempo de incubação, as células dendríticas foram marcadas com os anticorpos  $\alpha\text{-CD86-FITC}$ ,  $\alpha\text{-MHCII-PE}$  e  $\alpha\text{-CD11c-APC}$ . A análise das amostras foi realizada em BD FACSCalibur™, considerando 10 mil eventos, que foram analisados no *software* FlowJo.

Dentro das células  $\text{CD11c}^+$ , a porcentagem de células expressando as moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II pode ser vista na Figura 16.



**Figura 16.** Indução da expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II por células dendríticas estimuladas com VEs de *S. cerevisiae*. VEs de vOVA e do transformante sOVA, em diferentes concentrações de esteroide (0,1, 0,5 e 1 μM), foram incubadas *overnight* com células dendríticas derivadas de medula óssea murina e estimularam um aumento na expressão de CD86 e MHC II por estas células.

Foi possível observar um aumento na expressão das moléculas CD86 e MHC II pelas VEs de vOVA e sOVA, em todas as concentrações de esteroide analisadas (0,1, 0,5 e 1 μM), evidenciando um papel imunomodulatório das VEs de *S. cerevisiae*.

## 6. DISCUSSÃO

Devido ao elevado número de indivíduos acometidos por infecções fúngicas sistêmicas e as limitações terapêuticas, o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento e prevenção de infecções fúngicas se faz cada vez mais necessário. Em relação às metodologias de prevenção, ainda não há vacinas licenciadas e é importante o desenvolvimento de formulações eficazes e seguras também para administração em indivíduos imunossuprimidos, população mais atingida por infecções sistêmicas graves (Infectios, 2018). Na busca de uma plataforma livre de células, estudos recentes apostam na utilização de VEs como uma alternativa vacinal (Mayordomo *et al.*, 1995; Chaput *et al.*, 2004; Giuliani *et al.*, 2006; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2008; Gehrman *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2016; Bitto e Kaparakis-Liaskos, 2017; Gerritzen *et al.*, 2017), uma vez que estes compartimentos carregam moléculas imunogênicas (Joffe *et al.*, 2016) e podem ser modificadas geneticamente para que carreguem antígenos-chave na montagem de uma resposta imune protetora (Kim *et al.*, 2008; Muralinath *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2016; Rappazzo *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostram ser possível, inserir um antígeno heterólogo em VEs fúngicas com a inserção confirmada da proteína OVA em sua construção nativa (sOVA), assim como já demonstrado para VEs bacterianas para outros antígenos (Kim *et al.*, 2008; Muralinath *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2016). Entretanto, sugere-se a necessidade de um sinal, ainda desconhecido, para que uma proteína expressa pelo fungo seja direcionada para as VEs, como foi possível observar no mutante cOVA, capaz de expressar a proteína, mas não de endereça-la para VEs, provavelmente devido a perda do epítipo de secreção. O mutante mOVA, no entanto, não foi capaz de expressar a proteína OVA sem uma explicação aparente, uma vez que todos os vetores contendo inserto foram confirmados através de sequenciamento após as transformações, sendo necessária uma maior investigação do porquê *S. cerevisiae* não conseguiu expressar a construção mOVA. Como primeira alternativa, poderemos avaliar se a construção está sendo transcrita, através de RT-PCR. Uma vez que a transcrição esteja acontecendo de forma correta, provavelmente a proteína está sendo degradada após a tradução, o que pode ser avaliado de diferentes maneiras, como por inibição do proteassoma.

Ao confirmar a expressão de OVA pelas leveduras e vesículas de *S. cerevisiae* por Western Blot, notou-se a presença de duas bandas nas amostras de cOVA (~29 e ~33 kDa) e sOVA (~43 e 47 ~kDa). Em relação a sOVA, a banda de maior peso molecular se mostrou em maior quantidade na porção vesicular. Estes resultados sugerem algum processamento pós-translacional da proteína OVA, como por exemplo glicosilações, que poderiam estar relacionados com o endereçamento da proteína para VEs. As leveduras que foram transformadas com cOVA, apesar de também apresentarem bandas reativas com o anticorpo  $\alpha$ -OVA, não se mostraram capazes de direcionar a proteína para as VEs, sugerindo a necessidade de alguma modificação estrutural que seja capaz de direcionar essa proteína para as VEs. As diferenças observadas no tamanho das proteínas reativas ao anticorpo  $\alpha$ -OVA podem estar relacionadas com a incorporação de diferentes cadeias de glicanas. Futuramente serão realizados tratamentos enzimáticos com endoglicosidases, capazes de remover essas cadeias, e a comparação do tamanho dessas proteínas. Caso as proteínas apresentem o mesmo tamanho, poderemos confirmar a presença de glicofomas associadas com o direcionamento de proteínas para VEs. Alternativamente, podemos realizar a análise da proteína por espectrometria de massas.

As VEs dos diferentes mutantes tiveram seu diâmetro médio analisado e foram observados tamanhos variados, entre 75 e 650 nm, distribuídos em duas populações principais. Além disso, a presença de OVA não parece alterar significativamente o

diâmetro médio das VEs. Essa diversidade morfológica corrobora com dados encontrados em estudos anteriores (Rodrigues *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008a; Oliveira *et al.*, 2010b; Vallejo *et al.*, 2011) e sugerem mecanismos distintos na biogênese de vesículas (Rodrigues *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010b).

Em seguida, foi avaliada a internalização das VEs de vOVA e sOVA por macrófagos derivados de medula óssea murina. Os resultados sugerem uma completa internalização em até 1 hora de interação entre as VEs e os fagócitos. Embora esses resultados confirmem que as VEs de *S. cerevisiae* sejam também internalizadas por fagócitos, a cinética foi diferente quando comparada com as VEs produzidas por *C. albicans*, onde apenas 15 minutos foram suficientes para a internalização completa das VEs (Vargas *et al.*, 2015). O mecanismo de internalização parece envolver domínios lipídicos, uma vez que é possível observar uma co-localização das VEs e da marcação de GM1 da célula hospedeira, um glicosíngolípido predominantemente encontrado em domínios lipídicos (Chinnapen *et al.*, 2007). Esses resultados estão de acordo com o que demonstramos anteriormente para VEs produzidas por *C. neoformans* e *C. albicans*. A ausência de fluorescência na membrana plasmática dos macrófagos sugere um mecanismo de internalização dependente de receptores (Oliveira *et al.*, 2010a; Vargas *et al.*, 2015). Resultados similares já foram observados para VEs produzidas por fungos e por VMEs de *Pseudomonas aeruginosa* (Bomberger *et al.*, 2009) e *Helicobacter pilory* (Kaparakis *et al.*, 2010). Em conjunto, esses dados sugerem que assim como observado para outras VEs, os compartimentos produzidos por *S. cerevisiae* são internalizados por fagócitos, o que poderia levar a ativação dessas células.

Nossos dados mostram que as VEs de sOVA são capazes de induzir a produção de NO por macrófagos, sugerindo a indução de um processo inflamatório por esses compartimentos. De forma contrastante, VEs de vOVA não estimularam a produção de NO por macrófagos. Uma análise mais refinada deve ser realizada para que esse resultado seja investigado, uma vez que as VEs carregam uma gama de estruturas que poderiam ativar esses fagócitos (Oliveira *et al.*, 2010a; Vargas *et al.*, 2015).

Células dendríticas estimuladas com VEs de *S. cerevisiae* aumentaram a expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e MHC II, moléculas relacionadas com o mecanismo de apresentação de antígenos para linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens e montagem da resposta imune adaptativa. Ao contrário do observado na ativação dos macrófagos, foi possível observar o aumento da expressão das moléculas quando as células foram estimuladas com VEs de vOVA e sOVA. Esses dados enfatizam as propriedades imunomodulatórias de VEs

fúngicas, já observadas em trabalhos anteriores do grupo (Oliveira *et al.*, 2010a; Vargas *et al.*, 2015).

Quanto a produção de citocinas pelas células hospedeiras, macrófagos secretaram IL-6 quando estimulados por sOVA. Já as células dendríticas, secretaram a mesma citocina tanto na presença de vOVA, quanto de sOVA. A secreção da citocina pró-inflamatória IL-6 está intimamente relacionada a indução da diferenciação de linfócitos Th17 e Tc17 (Song, Gao e Qian, 2014). Th17 desempenha papel importante na resposta contra infecções fúngicas, como por exemplo o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção e induzindo a expressão de defensinas por células epiteliais (Hernandez-Santos e Gaffen, 2012). O papel de Tc17 vem sendo estudado e dados da literatura apontam um papel na manutenção da proteção do hospedeiro, ou seja, uma resposta de memória (Kumaresan, da Silva e Kontoyiannis, 2017).

Os resultados obtidos confirmam que é possível a inserção de uma proteína heteróloga em VEs fúngicas e as mesmas possuem papel imunomodulador, induzindo um aumento na expressão de CD86 e MHC II por células dendríticas, produção de NO por macrófagos, IL-6 por ambas as células. Contudo, ainda são necessários estudos para entender qual o mecanismo envolvido no direcionamento de proteínas para VEs fúngicas.

Além disso, é importante avaliar a produção de outras citocinas, como as pró-inflamatória IL-12 e IL1 $\beta$ , e anti-inflamatória IL-4. Desta forma, será possível sugerir quais subtipos de linfócitos T e quais outros mecanismos de defesa estariam sendo induzidos por VEs de *S. cerevisiae*, baseando-se em dados da resposta imune antifúngica descritos até o momento. Apesar da necessidade de novos estudos, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a hipótese da utilização de VEs fúngicas transformadas como plataforma de vacinação, uma vez que as VEs transformadas foram capazes de estimular o sistema imune sem afetar significativamente a viabilidade celular.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- É possível direcionar antígenos heterólogos para VEs produzidas por *S. cerevisiae*;
- Leveduras de *S. cerevisiae* produzem VEs capazes de estimular a resposta de fagócitos, induzindo uma resposta imune inata e estimulando a montagem de uma resposta adaptativa;
- As características imunogênicas de VEs produzidas por *S. cerevisiae* parecem ser potencializadas através da inserção de antígenos heterólogos.

## 8. REFERÊNCIAS

- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. e Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 8, 639-646.
- Alaniz, R.C., Deatherage, B.L., Lara, J.C. e Cookson, B.T. (2007). Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J Immunol*, 179, 7692-7701.
- Albuquerque, P.C., Nakayasu, E.S., Rodrigues, M.L., Frases, S., Casadevall, A., Zancoppe-Oliveira, R.M., Almeida, I.C. e Nosanchuk, J.D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*, 10, 1695-1710.
- Alexander, B.D., Johnson, M.D., Pfeiffer, C.D., Jimenez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Castanheira, M., Messer, S.A., Perlin, D.S. e Pfaller, M.A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*, 56, 1724-1732.
- Allen, D., Wilson, D., Drew, R. e Perfect, J. (2015). Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13, 787-798.
- Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T. e Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*, 117, 515-526.
- Amuguni, H. e Tzipori, S. (2012). *Bacillus subtilis*: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. *Hum Vaccin Immunother*, 8, 979-986.
- Armstead, J., Morris, J. e Denning, D.W. (2014). Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. *PLoS One*, 9, e98502.
- Backer, R., van Leeuwen, F., Kraal, G. e den Haan, J.M. (2008). CD8- dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens. *Eur J Immunol*, 38, 370-380.
- Bai, X., Findlow, J. e Borrow, R. (2011). Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles. *Expert Opin Biol Ther*, 11, 969-985.
- Bitto, N.J. e Kaparakis-Liaskos, M. (2017). The Therapeutic Benefit of Bacterial Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci*, 18.
- Bomberger, J.M., Maceachran, D.P., Coutermarsh, B.A., Ye, S., O'Toole, G.A. e Stanton, B.A. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog*, 5, e1000382.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R.O. e Denning, D.W. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*, 3.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G. e White, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4, 165rv113.

- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R. e Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 13, 620-630.
- Carrillo, L., Cucu, B., Bandmann, V., Homann, U., Hertel, B., Hillmer, S., Thiel, G. e Bertl, A. (2015). High-resolution membrane capacitance measurements for studying endocytosis and exocytosis in yeast. *Traffic*, 16, 760-772.
- Casadevall, A. e Pirofski, L.A. (2012). Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe*, 11, 447-456.
- Cassone, A. (2013). Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nat Rev Microbiol*, 11, 884-891.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Understanding How Vaccines Work. Disponível em <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/conversations/downloads/vacsafe-understand-color-office.pdf>.
- Chai, L.Y., van de Veerdonk, F., Marijnissen, R.J., Cheng, S.C., Khoo, A.L., Hectors, M., Lagrou, K., Vonk, A.G., Maertens, J., Joosten, L.A., Kullberg, B.J. e Netea, M.G. (2010). Anti-*Aspergillus* human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology*, 130, 46-54.
- Chaput, N., Scharz, N.E., Andre, F., Taieb, J., Novault, S., Bonnaventure, P., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Merad, M., Adema, G., Adams, M., Ferrantini, M., Carpentier, A.F., Escudier, B., Tursz, T., Angevin, E. e Zitvogel, L. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol*, 172, 2137-2146.
- Chen, D.J., Osterrieder, N., Metzger, S.M., Buckles, E., Doody, A.M., DeLisa, M.P. e Putnam, D. (2010). Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3099-3104.
- Chinnapen, D.J., Chinnapen, H., Saslowsky, D. e Lencer, W.I. (2007). Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett*, 266, 129-137.
- Deatherage, B.L. e Cookson, B.T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*, 80, 1948-1957.
- Denning, D.W. (2015). The ambitious '95-95 by 2025' roadmap for the diagnosis and management of fungal diseases. *Thorax*, 70, 613-614.
- Eddens, T., Elsegeiny, W., Garcia-Hernandez, M.L., Castillo, P., Trevejo-Nunez, G., Serody, K., Campfield, B.T., Khader, S.A., Chen, K., Rangel-Moreno, J. e Kolls, J.K. (2017). *Pneumocystis*-Driven Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation Requires Th2 and Th17 Immunity. *Cell Rep*, 18, 3078-3090.
- Edwards, J.E., Jr., Schwartz, M.M., Schmidt, C.S., Sobel, J.D., Nyirjesy, P., Schodel, F., Marchus, E., Lizakowski, M., DeMontigny, E.A., Hoeg, J., Holmberg, T., Cooke, M.T., Hoover, K., Edwards, L., Jacobs, M., Sussman, S., Augenbraun, M., Drusano, M., Yeaman, M.R., Ibrahim, A.S., Filler, S.G. e Hennessey, J.P., Jr. (2018). A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Infect Dis*.
- Eisenman, H.C., Frases, S., Nicola, A.M., Rodrigues, M.L. e Casadevall, A. (2009). Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 155, 3860-3867.
- Embry, A., Meng, X., Cantwell, A., Dube, P.H. e Xiang, Y. (2011). Enhancement of immune response to an antigen delivered by vaccinia virus by displaying the antigen on the surface of intracellular mature virion. *Vaccine*, 29, 5331-5339.
- Ersland, K., Wuthrich, M. e Klein, B.S. (2010). Dynamic interplay among monocyte-derived, dermal, and resident lymph node dendritic cells during the generation. *Cell Host Microbe*, 7, 474-487.
- Erwig, L.P. e Gow, N.A. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*, 14, 163-176.
- Frasch, C.E. e Robbins, J.D. (1978). Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. *J Exp Med*, 147, 629-644.
- The Fungal Infection Trust. How common are fungal diseases?(2011). Disponível em: <https://www.fungalinfectiontrust.org/wp-content/uploads/2015/12/How-Common-are-Fungal-Diseases-v12.2.pdf> Acesso em: Maio, 2018
- Gaffen, S.L. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol*, 23, 613-619.
- GAFFI. Global Action Fund for Fungal Infectios. (2017). Hidden crisis. Disponível em <https://www.gaffi.org/wp-content/uploads/GAFFI-Final-Brochure-Aug-2017-pages.pdf>
- GAFFI. Global Action Fund for Fungal Infectios. (2018). Fungal Disease Frequency. Disponível em: <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/> Acesso em: 15 de abril, 2018
- Garcia-Carnero, L.C., Perez-Garcia, L.A., Martinez-Alvarez, J.A., Reyes-Martinez, J.E. e Mora-Montes, H.M. (2018). Current trends to control fungal pathogens: exploiting our knowledge in the host-pathogen interaction. *Infect Drug Resist*, 11, 903-913.
- Gehrmann, U., Qazi, K.R., Johansson, C., Hulthenby, K., Karlsson, M., Lundeberg, L., Gabriellson, S. e Scheynius, A. (2011). Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses--novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One*, 6, e21480.

- Gerritzen, M.J.H., Martens, D.E., Wijffels, R.H., van der Pol, L. e Stork, M. (2017). Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnol Adv*, 35, 565-574.
- Gietz, R.D. e Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 350, 87-96.
- Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Comanducci, M., Arico, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecci, B., Cartocci, E., Ciocchi, L., Di Marcello, F., Ferlicca, F., Galli, B., Luzzi, E., Masignani, V., Serruto, D., Veggi, D., Contorni, M., Morandi, M., Bartalesi, A., Cinotti, V., Mannucci, D., Titta, F., Ovidi, E., Welsch, J.A., Granoff, D., Rappuoli, R. e Pizza, M. (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10834-10839.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126, 131-138.
- Hancock, R.E. e Sahl, H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24, 1551-1557.
- Haneberg, B., Dalseg, R., Oftung, F., Wedege, E., Hoiby, E.A., Haugen, I.L., Holst, J., Andersen, S.R., Aase, A., Meyer Naess, L., Michaelsen, T.E., Namork, E. e Haaheim, L.R. (1998). Towards a nasal vaccine against meningococcal disease, and prospects for its use as a mucosal adjuvant. *Dev Biol Stand*, 92, 127-133.
- Hernandez-Santos, N. e Gaffen, S.L. (2012). Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*, 11, 425-435.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W. e Kaufmann, S.H. (1996). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1458-1463.
- Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C.C., Oster, P., O'Hallahan, J. e Rosenqvist, E. (2009). Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 27 Suppl 2, B3-12.
- Huang, W., Wang, S., Yao, Y., Xia, Y., Yang, X., Li, K., Sun, P., Liu, C., Sun, W., Bai, H., Chu, X., Li, Y. e Ma, Y. (2016). Employing *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infection. *Sci Rep*, 6, 37242.
- Hunniger, K., Lehnert, T., Bieber, K., Martin, R., Figge, M.T. e Kurzai, O. (2014). A virtual infection model quantifies innate effector mechanisms and *Candida albicans* immune escape in human blood. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003479.
- Infectios, G.A.F.f.F.(2018). Fungal Disease Frequency. Disponível em: <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/> Acesso em: 24 de junho, 2018
- Jessup, C.J., Ryder, N.S. e Ghannoum, M.A. (2000). An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. *Med Mycol*, 38, 155-159.
- Joffe, L.S., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L. e Del Poeta, M. (2016). Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *mSphere*, 1, e00099-00016.
- Kaparakis, M., Turnbull, L., Carneiro, L., Firth, S., Coleman, H.A., Parkington, H.C., Le Bourhis, L., Karrar, A., Viala, J., Mak, J., Hutton, M.L., Davies, J.K., Crack, P.J., Hertzog, P.J., Philpott, D.J., Girardin, S.E., Whitchurch, C.B. e Ferrero, R.L. (2010). Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol*, 12, 372-385.
- Kaufmann, S.H. e Hess, J. (1999). Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol Lett*, 65, 81-84.
- Kim, J.Y., Doody, A.M., Chen, D.J., Cremona, G.H., Shuler, M.L., Putnam, D. e DeLisa, M.P. (2008). Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J Mol Biol*, 380, 51-66.
- Knox, K.W., Vesk, M. e Work, E. (1966). Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 92, 1206-1217.
- Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F. e Takiguchi, M. (2009). Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol*, 182, 1794-1798.
- Kuipers, K., Daleke-Schermerhorn, M.H., Jong, W.S., ten Hagen-Jongman, C.M., van Opzeeland, F., Simonetti, E., Luirink, J. e de Jonge, M.I. (2015). *Salmonella* outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. *Vaccine*, 33, 2022-2029.
- Kumaresan, P.R., da Silva, T.A. e Kontoyiannis, D.P. (2017). Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8(+) T Cells. *Front Immunol*, 8, 1939.
- Lapinet, J.A., Scapini, P., Calzetti, F., Perez, O. e Cassatella, M.A. (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun*, 68, 6917-6923.
- Leibundgut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G.D. e Reis e Sousa, C. (2008). Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood*, 112, 4971-4980.

- Leone, F., Bellani, L., Muccifora, S., Giorgetti, L., Bongioanni, P., Simili, M., Maserti, B. e Del Carratore, R. (2018). Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *J Cell Physiol*, 233, 2759-2767.
- Levitz, S.M., Mathews, H.L. e Murphy, J.W. (1995). Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today*, 16, 387-391.
- Lin, J.S., Yang, C.W., Wang, D.W. e Wu-Hsieh, B.A. (2005). Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol*, 174, 6282-6291.
- Liu, M., Bruni, G.O., Taylor, C.M., Zhang, Z. e Wang, P. (2018). Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen *Rhizopus delemar*. *Sci Rep*, 8, 5243.
- Lopez-Martinez, R. e Mendez-Tovar, L.J. (2012). Blastomycosis. *Clin Dermatol*, 30, 565-572.
- Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rossner, S., Schuler, G. e Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*, 30, 1813-1822.
- Ma, L.L., Spurrell, J.C., Wang, J.F., Neely, G.G., Epelman, S., Krensky, A.M. e Mody, C.H. (2002). CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol*, 169, 5787-5795.
- Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., Deleo, A.B. e et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med*, 1, 1297-1302.
- Menay, F., Herschlik, L., De Toro, J., Cocozza, F., Tscalian, R., Gravisaco, M.J., Di Sciullo, M.P., Vendrell, A., Waldner, C.I. e Mongini, C. (2017). Exosomes Isolated from Ascites of T-Cell Lymphoma-Bearing Mice Expressing Surface CD24 and HSP-90 Induce a Tumor-Specific Immune Response. *Front Immunol*, 8, 286.
- Morgan, D.M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol*, 79, 179-183.
- Mubaiwa, T.D., Hartley-Tassell, L.E., Semchenko, E.A., Day, C.J., Jennings, M.P. e Seib, K.L. (2018). The Bexsero *Neisseria meningitidis* serogroup B vaccine antigen NHBA is a high-affinity chondroitin sulfate binding protein. *Sci Rep*, 8, 6512.
- Muralinath, M., Kuehn, M.J., Roland, K.L. e Curtiss, R., 3rd. (2011). Immunization with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 79, 887-894.
- Nanjappa, S.G., Heninger, E., Wuthrich, M., Gasper, D.J. e Klein, B.S. (2012a). Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4+ T cells. *PLoS Pathog*, 8, e1002771.
- Nanjappa, S.G., Heninger, E., Wuthrich, M., Sullivan, T. e Klein, B. (2012b). Protective antifungal memory CD8(+) T cells are maintained in the absence of CD4(+) T cell help and cognate antigen in mice. *J Clin Invest*, 122, 987-999.
- Nanjappa, S.G. e Klein, B.S. (2014). Vaccine immunity against fungal infections. *Curr Opin Immunol*, 28, 27-33.
- Nimrichter, L., de Souza, M.M., Del Poeta, M., Nosanchuk, J.D., Joffe, L., Tavares Pde, M. e Rodrigues, M.L. (2016). Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. *Front Microbiol*, 7, 1034.
- Nosanchuk, J.D. e Gacser, A. (2008). *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *Microbes Infect*, 10, 973-977.
- Odds, F.C., Brown, A.J. e Gow, N.A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, 11, 272-279.
- Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Rodrigues, M.L. e Nimrichter, L. (2010a). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*, 78, 1601-1609.
- Oliveira, D.L., Nakayasu, E.S., Joffe, L.S., Guimarães, A.J., Sobreira, T.J.P., Nosanchuk, J.D., Cordero, R.J.B., Frases, S., Casadevall, A., Almeida, I.C., Nimrichter, L. e Rodrigues, M.L. (2010b). Characterization of Yeast Extracellular Vesicles: Evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One*, 5, e111113.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. e Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6, 1133-1141.
- Peres da Silva, R., Heiss, C., Black, I., Azadi, P., Gerlach, J.Q., Travassos, L.R., Joshi, L., Kilcoyne, M. e Puccia, R. (2015a). Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. *Sci Rep*, 5, 14213.

- Peres da Silva, R., Puccia, R., Rodrigues, M.L., Oliveira, D.L., Joffe, L.S., Cesar, G.V., Nimrichter, L., Goldenberg, S. e Alves, L.R. (2015b). Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci Rep*, 5, 7763.
- Perfect, J.R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 603-616.
- Pitt, J.M., Andre, F., Amigorena, S., Soria, J.C., Eggermont, A., Kroemer, G. e Zitvogel, L. (2016). Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest*, 126, 1224-1232.
- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., Denning, D.W., Loyse, A. e Boulware, D.R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*, 17, 873-881.
- Rappazzo, C.G., Watkins, H.C., Guarino, C.M., Chau, A., Lopez, J.L., DeLisa, M.P., Leifer, C.A., Whittaker, G.R. e Putnam, D. (2016). Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in BALB/c mice. *Vaccine*, 34, 1252-1258.
- Rodrigues, M.L., Franzen, A.J., Nimrichter, L. e Miranda, K. (2013). Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. *Curr Opin Microbiol*, 16, 414-420.
- Rodrigues, M.L., Godinho, R.M., Zamith-Miranda, D. e Nimrichter, L. (2015). Traveling into Outer Space: Unanswered Questions about Fungal Extracellular Vesicles. *PLoS Pathog*, 11, e1005240.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Almeida, I.C. e Nimrichter, L. (2014). The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *J Proteomics*, 97, 177-186.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C. e Casadevall, A. (2008a). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*, 7, 58-67.
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M. e Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell*, 6, 48-59.
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Nosanchuk, J.D. e Casadevall, A. (2008b). Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? *Lipid Insights*, 2, 27-40.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 4, 1-23.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 11, 275-288.
- Romani, L. e Puccetti, P. (2006). Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol*, 14, 183-189.
- Sanglard, D. e Odds, F.C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*, 2, 73-85.
- Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P. e Smith, V.L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep*, 16, 24-43.
- Serruto, D., Bottomley, M.J., Ram, S., Giuliani, M.M. e Rappuoli, R. (2012). The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, 30 Suppl 2, B87-97.
- Sierra, G.V., Campa, H.C., Varcacel, N.M., Garcia, I.L., Izquierdo, P.L., Sotolongo, P.F., Casanueva, G.V., Rico, C.O., Rodriguez, C.R. e Terry, M.H. (1991). Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*, 14, 195-207; discussion 208-110.
- Silva, B.M., Prados-Rosales, R., Espadas-Moreno, J., Wolf, J.M., Luque-Garcia, J.L., Goncalves, T. e Casadevall, A. (2014). Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med Mycol*, 52, 202-210.
- Song, X., Gao, H. e Qian, Y. (2014). Th17 differentiation and their pro-inflammation function. *Adv Exp Med Biol*, 841, 99-151.
- Sui, X., Yan, L. e Jiang, Y.Y. (2017). The vaccines and antibodies associated with Als3p for treatment of *Candida albicans* infections. *Vaccine*, 35, 5786-5793.
- Takeo, K., Uesaka, I., Uehira, K. e Nishiura, M. (1973a). Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vitro as observed by freeze-etching. *J Bacteriol*, 113, 1442-1448.
- Takeo, K., Uesaka, I., Uehira, K. e Nishiura, M. (1973b). Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vivo as observed by freeze-etching. *J Bacteriol*, 113, 1449-1454.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Reid, D.M., Willment, J.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. e Wong, S.Y. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol*, 169, 3876-3882.
- Travassos, L.R. e Taborda, C.P. (2012). Paracoccidioidomycosis vaccine. *Hum Vaccin Immunother*, 8, 1450-1453.
- Vallejo, M.C., Matsuo, A.L., Ganiko, L., Medeiros, L.C., Miranda, K., Silva, L.S., Freymüller-Haapalainen, E., Sinigaglia-Coimbra, R., Almeida, I.C. e Puccia, R. (2011). The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic  $\alpha$ -Galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell*, 10, 343-351.

- Vallejo, M.C., Nakayasu, E.S., Matsuo, A.L., Sobreira, T.J., Longo, L.V., Ganiko, L., Almeida, I.C. e Puccia, R. (2012). Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res*, 11, 1676-1685.
- van de Sande, W.W. (2013). Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2550.
- Vanden Bossche, H., Koymans, L. e Moereels, H. (1995). P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. *Pharmacol Ther*, 67, 79-100.
- Vargas, G. (2013). Transporte vesicular de moléculas imunoativas de *Candida albicans*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 113f
- Vargas, G. (2016). Vesículas extracelulares de *Candida* spp.: compartimentos multifuncionais. Doutorado (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro 187f
- Vargas, G., Rocha, J.D., Oliveira, D.L., Albuquerque, P.C., Frases, S., Santos, S.S., Nosanchuk, J.D., Gomes, A.M., Medeiros, L.C., Miranda, K., Sobreira, T.J., Nakayasu, E.S., Arigi, E.A., Casadevall, A., Guimaraes, A.J., Rodrigues, M.L., Freire-de-Lima, C.G., Almeida, I.C. e Nimrichter, L. (2015). Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*, 17, 389-407.
- Vernikos, G. e Medini, D. (2014). Bexsero(R) chronicle. *Pathog Glob Health*, 108, 305-316.
- Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., Aboyans, V., Abraham, J., Ackerman, I., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., Ali, M.K., Alvarado, M., Anderson, H.R., Anderson, L.M., Andrews, K.G., Atkinson, C., Baddour, L.M., Bahalim, A.N., Barker-Collo, S., Barrero, L.H., Bartels, D.H., Basanez, M.G., Baxter, A., Bell, M.L., Benjamin, E.J., Bennett, D., Bernabe, E., Bhalla, K., Bhandari, B., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Black, J.A., Blencowe, H., Blore, J.D., Blyth, F., Bolliger, I., Bonaventure, A., Boufous, S., Bourne, R., Boussinesq, M., Braithwaite, T., Brayne, C., Bridgett, L., Brooker, S., Brooks, P., Brugha, T.S., Bryan-Hancock, C., Bucello, C., Buchbinder, R., Buckle, G., Budke, C.M., Burch, M., Burney, P., Burstein, R., Calabria, B., Campbell, B., Canter, C.E., Carabin, H., Carapetis, J., Carmona, L., Cella, C., Charlson, F., Chen, H., Cheng, A.T., Chou, D., Chugh, S.S., Coffeng, L.E., Colan, S.D., Colquhoun, S., Colson, K.E., Condon, J., Connor, M.D., Cooper, L.T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K.C., Couser, W., Cowie, B.C., Criqui, M.H., Cross, M., Dabhadkar, K.C., Dahiya, M., Dahodwala, N., Damsere-Derry, J., Danaei, G., Davis, A., De Leo, D., Degenhardt, L., Dellavalle, R., Delossantos, A., Denenberg, J., Derrett, S., Des Jarlais, D.C., Dharmaratne, S.D., Dherani, M., Diaz-Torne, C., Dolk, H., Dorsey, E.R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Edmond, K., Elbaz, A., Ali, S.E., Erskine, H., Erwin, P.J., Espindola, P., Ewoigbokhan, S.E., Farzadfar, F., Feigin, V., Felson, D.T., Ferrari, A., Ferri, C.P., Fevre, E.M., Finucane, M.M., Flaxman, S., Flood, L., Foreman, K., Forouzanfar, M.H., Fowkes, F.G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M.K., Gabbe, B.J., Gabriel, S.E., Gakidou, E., Ganatra, H.A., Garcia, B., Gaspari, F., Gillum, R.F., Gmel, G., Gosselin, R., Grainger, R., Groeger, J., Guillemin, F., Gunnell, D., Gupta, R., Haagsma, J., Hagan, H., Halasa, Y.A., Hall, W., Haring, D., Haro, J.M., Harrison, J.E., Havmoeller, R., Hay, R.J., Higashi, H., Hill, C., Hoen, B., Hoffman, H., Hotez, P.J., Hoy, D., Huang, J.J., Ibeanusi, S.E., Jacobsen, K.H., James, S.L., Jarvis, D., Jassrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Jonas, J.B., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Kawakami, N., Keren, A., Khoo, J.P., King, C.H., Knowlton, L.M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Laloo, R., Laslett, L.L., Lathlean, T., Leasher, J.L., Lee, Y.Y., Leigh, J., Lim, S.S., Limb, E., Lin, J.K., Lipnick, M., Lipshultz, S.E., Liu, W., Loane, M., Ohno, S.L., Lyons, R., Ma, J., Mabweijano, J., MacIntyre, M.F., Malekzadeh, R., Mallinger, L., Manivannan, S., Marcenes, W., March, L., Margolis, D.J., Marks, G.B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B.M., McAnulty, J.H., McDermott, M.M., McGill, N., McGrath, J., Medina-Mora, M.E., Meltzer, M., Mensah, G.A., Merriman, T.R., Meyer, A.C., Miglioli, V., Miller, M., Miller, T.R., Mitchell, P.B., Mocumbi, A.O., Moffitt, T.E., Mokdad, A.A., Monasta, L., Montico, M., Moradi-Lakeh, M., Moran, A., Morawska, L., Mori, R., Murdoch, M.E., Mwaniki, M.K., Naidoo, K., Nair, M.N., Naldi, L., Narayan, K.M., Nelson, P.K., Nelson, R.G., Nevitt, M.C., Newton, C.R., Nolte, S., Norman, P., Norman, R., O'Donnell, M., O'Hanlon, S., Olives, C., Omer, S.B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Page, A., Pahari, B., Pandian, J.D., Rivero, A.P., Patten, S.B., Pearce, N., Padilla, R.P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Pesudovs, K., Phillips, D., Phillips, M.R., Pierce, K., Pion, S., Polanczyk, G.V., Polinder, S., Pope, C.A., 3rd, Popova, S., Porrini, E., Pourmalek, F., Prince, M., Pullan, R.L., Ramaiah, K.D., Ranganathan, D., Razavi, H., Regan, M., Rehm, J.T., Rein, D.B., Remuzzi, G., Richardson, K., Rivara, F.P., Roberts, T., Robinson, C., De Leon, F.R., Ronfani, L., Room, R., Rosenfeld, L.C., Rushton, L., Sacco, R.L., Saha, S., Sampson, U., Sanchez-Riera, L., Sanman, E., Schwebel, D.C., Scott, J.G., Segui-Gomez, M., Shahraz, S., Shepard, D.S., Shin, H., Shivakoti, R., Singh, D., Singh, G.M., Singh, J.A., Singleton, J., Sleet, D.A., Sliwa, K., Smith, E., Smith, J.L., Stapelberg, N.J., Steer, A., Steiner, T., Stolk, W.A., Stovner, L.J., Sudfeld, C., Syed, S., Tamburlini, G., Tavakkoli, M., Taylor, H.R., Taylor, J.A., Taylor, W.J., Thomas, B., Thomson, W.M., Thurston, G.D., Tleyjeh, I.M., Tonelli, M., Towbin, J.A., Truelsen, T., Tsilimbaris, M.K., Ubada, C., Undurraga, E.A., van der Werf, M.J., van Os, J., Vavilala, M.S., Venketasubramanian, N., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weatherall, D.J., Weinstock, M.A., Weintraub, R., Weisskopf, M.G., Weissman, M.M., White, R.A., Whiteford, H., Wiersma, S.T., Wilkinson, J.D., Williams, H.C., Williams, S.R., Witt, E.,

- Wolfe, F., Woolf, A.D., Wulf, S., Yeh, P.H., Zaidi, A.K., Zheng, Z.J., Zonies, D., Lopez, A.D., Murray, C.J., AlMazroa, M.A. e Memish, Z.A. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2163-2196.
- Wang, S., Gao, J. e Wang, Z. (2018). Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, e1523.
- Wang, X., Thompson, C.D., Weidenmaier, C. e Lee, J.C. (2018). Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun*, 9, 1379.
- Watkins, H.C., Rappazzo, C.G., Higgins, J.S., Sun, X., Brock, N., Chau, A., Misra, A., Cannizzo, J.P.B., King, M.R., Maines, T.R., Leifer, C.A., Whittaker, G.R., DeLisa, M.P. e Putnam, D. (2017). Safe Recombinant Outer Membrane Vesicles that Display M2e Elicit Heterologous Influenza Protection. *Mol Ther*, 25, 989-1002.
- Wolf, J.M. e Casadevall, A. (2014). Challenges posed by extracellular vesicles from eukaryotic microbes. *Curr Opin Microbiol*, 22, 73-78.
- Wolf, J.M., Rivera, J. e Casadevall, A. (2012). Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles. *Cell Microbiol*, 14, 762-773.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., They, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. e Zitvogel, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, 7, 297-303.
- Wuthrich, M., Filutowicz, H.I., Warner, T., Deepe, G.S., Jr. e Klein, B.S. (2003). Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. *J Exp Med*, 197, 1405-1416.
- Wuthrich, M., Filutowicz, H.I., Warner, T. e Klein, B.S. (2002). Requisite elements in vaccine immunity to *Blastomyces dermatitidis*: plasticity uncovers vaccine potential in immune-deficient hosts. *J Immunol*, 169, 6969-6976.
- Wuthrich, M., Gern, B., Hung, C.Y., Ersland, K., Rocco, N., Pick-Jacobs, J., Galles, K., Filutowicz, H., Warner, T., Evans, M., Cole, G. e Klein, B. (2011). Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J Clin Invest*, 121, 554-568.
- Zhang, B., Yin, Y., Lai, R.C. e Lim, S.K. (2014). Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol*, 5, 518.
- Zhang, X., Goncalves, R. e Mosser, D.M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14 11.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. e Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*, 4, 594-600.