

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Identificação de metabólitos secundários
presentes em vesículas extracelulares de
Candida albicans durante estresse
oxidativo.**

Gabriel Ernesto Silva Trentin

RIBEIRÃO PRETO

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**Identificação de metabólitos secundários
presentes em vesículas extracelulares de
Candida albicans durante estresse
oxidativo.**

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aluno: Gabriel Ernesto Silva Trentin

Orientador: Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Trentin, Gabriel Ernesto Silva

Identificação de metabólitos secundários presentes em vesículas extracelulares de *Candida albicans* durante estresse oxidativo. Ribeirão Preto 2022.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Fausto Bruno dos Reis Almeida.

1. *Candida albicans* 2. Vesículas extracelulares. 3. Metabólitos secundários.

TRENTIN, G. E. S. Identificação de metabólitos secundários presentes em vesículas extracelulares de *Candida albicans* durante estresse oxidativo. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado __/__/2022

Banca examinadora

Prof (a) Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha família e amigos,
que sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins e agora
estão ao meu lado neste momento feliz e importante.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a **Deus** e todas as good vibes direcionadas a mim durante esta jornada árdua de formação e aprendizado.

Ao orientador e amigo **Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida** que aceitou um forasteiro como aluno de mestrado e que juntos fomos construindo conhecimento e amizade. Obrigado por todos os ensinamentos e momentos engraçados que passamos juntos, o riso e a sua companhia foram os combustíveis essenciais nessa jornada de perrengues que é a vida do pesquisador.

A família do laboratório, **Msc. André Moreira Pessoni**, por todo os ensinamentos sobre o laboratório e sobre a cidade de Ribeirão Preto. Sempre me refiro a você como a poc amiga que me levou para a minha primeira festa da USP. Serei sempre grato pelos momentos bons e todas as dicas que você me deu durante o nosso mestrado; a **Dra. Verônica Brauer** por todos os ensinamentos e por estar sempre disposta a ajudar no que fosse preciso; a **Dra. Tamires Ap. Bittencourt** pela companhia, caronas, ensinamentos e a todos os momentos bons e ruins que passamos juntos. Todos os momentos serviram de grande aprendizagem e para conhecer o X-costela do Bar do Marcão; a **Bianca Teixeira**, minha sister do mestrado, agradeço por todos as boas risadas, por sempre estar ao meu lado nas disciplinas do cão e sempre solícita; aos **Mscs. Patrick Wellington** e **Mateus Freitas** pela convivência, ensinamentos e zuera no laboratório, tornando os dias mais felizes; ao meu aluno de iniciação científica **Willian Sakuda** por ser sempre solícito, ter aceitado a parceria de trabalho e pela companhia no laboratório e no Valorant; E ao nosso técnico **Beto** pela

companhia, churrascos e ensinamentos que sempre salvam nossos experimentos.

Ao pessoal da UNICAMP, a **Profa. Dra. Taícia Pacheco**, a **Dra. Alana Pereira** e ao **Dr. Jonas Costa** pela colaboração e auxílio na realização dos experimentos de espectrometria de massas, sem eles não seria possível este trabalho.

A santa secretária do programa de Pós-graduação em Bioquímica **Maria Ivone Campos**, que me ajudou muito assim que cheguei a Ribeirão Preto e sempre esteve solícita em ajudar com todo tipo de burocracia da universidade. Além de sempre me receber para bater um papo na secretária antes da peste.

As docentes de minha *Alma mater* UNESP, **Aninha, Bia, Flora e Maria de Lourdes**, que, em um dos momentos difíceis da minha vida, estiveram do meu lado e me incentivaram a ir para Ribeirão Preto fazer o mestrado.

Aos meus pais, **Ronaldo Trentin e Maria Rodrigues da Silva Trentin**, pelo encorajamento e por sempre me ensinar a correr atrás dos meus sonhos. Sem vocês eu tinha desistido da carreira de Químico, obrigado por sempre me incentivarem e estar do meu lado durante as decisões da minha vida. Amo vocês.

A minha vovozinha querida, **Leonor Sapata Lopes Trentin**, que sempre me aturou nos anos que eu morei com ela, cuidando sempre de mim e sempre me incentivando a nunca desistir. Sempre fazendo tudo que eu quisesse comer. Amo você.

Aos grandes amigos que a UNESP me deu, **Tetas, Fabs, Fazenda, Ryca, Yanzinho, Luiz Gui, Fer, Henryzinho, Kakozu, Anjinha, Zaza, Vaitor, Giulia, Miriam, Tiago, Giovanni Roberto, Denner, Vânia Maria, Mateusinho, Mayk,**

Bruno Gois, que me deram total apoio quando decidi iniciar o mestrado. Mesmo com os anos fora, a amizade continua a mesma. Quero levar a amizade de você para o resto da vida. Vocês sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, jamais esquecerei as risadas e todos os momentos juntos. Amos vocês.

Aos amigos da USP, **Maycon Lucas** e **Bianquinha**, que me apresentaram toda a universidade e tivemos almoços maravilhosos no bandeirão. Além de serem excelentes companheiros para as festinhas da filô.

Aos amigos feitos de forma online durante a pandemia, os Yeethelmers, em especial, **Cássio Roberto**, **Cheiroso**, **Miguel gostosão**, **Fadul**, **Zeus**, **Ítalinho**, **Bombinha**, **Santaralho** e **Ícaro**, que fizeram companhia online nesse período difícil de pandemia e mostraram o quão divertido são os jogos online. Pessoas totalmente doidas, mas eu amo apesar de me fazerem jogar lol.

Aos amigos da santíssima Trindade, **China**, **Maiara Regina** e Pequeno Polegar (**Sutti**), que estão sempre dispostos a fazer uma viagem, seja para praia ou viajar na batatinha. Durante o mestrado estavam me fazendo companhia online, ouvindo-me chorar as pitangas da vida de pesquisador e sempre prontos para participar de um webuteco jogando sueca online ou bater perna na Liberdade.

Aos **docentes** e **funcionários** da FMRP pelos ensinamentos e os galhos quebrados durante esses dois anos.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro, essenciais a vida do pesquisador.

Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.

- **Antoine Lavoisier**

RESUMO

Trentin, Gabriel E. S., **Identificação de metabólitos secundários presentes em vesículas extracelulares de *Candida albicans* durante estresse oxidativo**. 2022. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Candida albicans é um fungo comensal em humanos saudáveis, podendo causar infecção em alguns indivíduos por meio da secreção de diversos fatores de virulência. O sucesso do estabelecimento da infecção se deve a estratégias elaboradas para lidar com moléculas defensivas secretadas pelo hospedeiro, incluindo a resposta ao estresse oxidativo. A liberação de vesículas extracelulares (VEs) é considerada uma alternativa ao mecanismo de secreção de biomoléculas que favorece a interação do fungo com o ambiente do hospedeiro e está associada a propriedades imunomoduladoras. Os estudos sobre metabólitos secundários em VEs são escassos. Desta forma, nosso objetivo foi caracterizar metabólitos secundários presentes em VEs de *C. albicans* sob condição de estresse oxidativo em comparação com a cultura controle, que consistiu no crescimento de *C. albicans* em meio de Sabouraud. Em relação à identificação de metabólitos contidos nas VEs, realizamos análises de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS), identificando seis moléculas. Essas moléculas podem estar relacionadas a diversos processos biológicos, como as vias metabólicas de glicerofosfolípidios e esfingolípídeos, que podem atuar em diferentes níveis, sintonizando a produção de compostos de acordo com as necessidades das células que acabam por favorecer uma infinidade de respostas adaptativas. Nossos

resultados demonstram nova compreensão sobre o papel das VEs na biologia fúngica e na interação hospedeiro-patógeno.

Palavras-chave: *Candida albicans*; vesículas extracelulares; fator de virulência; metabolômica; metabólitos secundários

ABSTRACT

Trentin, Gabriel E. S., **Identification of secondary metabolites present in extracellular vesicles of *Candida albicans* during oxidative stress.** 2022. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Candida albicans is a commensal fungus in healthy humans and may cause infection in individuals through the secretion of several virulence factors. The success of infection establishment is due to strategies elaborate to cope with defensive molecules secreted by the host, including the response toward oxidative stress. The release of extracellular vesicles (EVs) is considered an alternative to the biomolecules secretory mechanism that favors the fungus interaction with the host's environment and is also associated with immunomodulatory properties. The studies about secondary metabolites in EVs are scarce. Our work characterized the content of secondary metabolites in *C. albicans* EVs under oxidative stress condition in comparison to control culture, which consisted of *C. albicans* growth in Sabouraud media. Regarding the identification of EV containing metabolites, we performed Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS) analyses, retrieving six molecules. These molecules may be related to several biological processes such as glycerophospholipid and sphingolipids pathways, which may act at different levels by tuning the production of compounds in accordance to cells requirements that ultimately favor a myriad of adaptive responses. Taken together, our results showed new insights into the understanding of EVs roles on fungal biology and host-pathogen interaction.

Keywords: *Candida albicans*; extracellular vesicles; virulence factor; metabolomics; secondary metabolites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vesículas extracelulares de <i>Candida albicans</i> analisadas pela técnica de NTA.....	34
Figura 2 – Gráfico das análises multivariadas realizadas em todas amostras de <i>Candida albicans</i>	35
Figura 3 – Redes moleculares dos compostos identificados.....	36
Figura 4 – Fórmula estrutural do composto 2-linoleoil-1-palmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina.....	38
Figura 5 – Fórmula estrutural do composto 1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol.....	39
Figura 6 – Fórmula estrutural do composto 2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina.....	40
Figura 7 – Fórmula estrutural do composto diidroesfingosina.....	40
Figura 8 – Fórmula estrutural do composto fitoesfingosina.....	41
Figura 9 – Fórmula estrutural do composto 1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina.....	41
Figura 10 – Esquema ilustrativo representando a produção de VEs e compostos induzidos durante o estresse oxidativo em células de <i>C. albicans</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das VEs.....	22
Tabela 2 – Metabólitos secundários identificados em vesículas extracelulares de <i>C. albicans</i> e via metabólica relacionada.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VEs – Vesículas extracelulares

μ M – Micromolar

MS – Metabólitos secundários

MS/MS - Espectrometria de massas

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Rpm – Rotação por minuto

pH – Potencial Hidrogeniônico

h - Horas

MIC – Concentração inibitória mínima

NTA - Rastreamento de nanopartículas

RM – Rede molecular

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

USP – Universidade de São Paulo

m/z – Relação massa/carga

HMDB - Human Metabolome Database

gliA - Gliotoxina via transportador

CFM – Concentração fungicida mínima

kDa – Quilodalton

Da - Dalton

Mm – milímetro

mL - Mililitros

PCA – Análise de componentes principais

PLS-DA - Mínimos Quadrados Parciais (Análise Discriminante)

GNPS – Global Natural Product Social Molecular Networking

DP – Desvio Padrão

Sumário

RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICE	59
ANEXO.....	67

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia

Nas últimas décadas, dados mostram que a incidência de infecções fúngicas tem aumentado no mundo (WEBB; FERRARO; REA; KAUFUSI *et al.*, 2018). Candidíase é o termo geral que se refere ao conjunto de infecções causadas por fungos do gênero *Candida*. Essas infecções podem ser causadas por diversas espécies (*C.albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*) e afetam o tecido cutâneo, bem como as mucosas e órgãos internos (PAPPAS; LIONAKIS; ARENDRUP; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2018).

Questões socioeconômicas, climáticas e geográficas são características comuns associadas a candidíase. Além disso, indivíduos imunocomprometidos e ou que foram submetidos a procedimentos médicos invasivos estão mais suscetíveis a este tipo de infecção (NISHIKAKU; MELO; COLOMBO, 2010).

Análises da carga fúngica ao redor do mundo mostram que, entre 45 países, infecções causadas por este gênero são de extrema gravidade na área de saúde, afetando 39 países (MUZAHEED; ALSHEHRI; RABAAN; EL-MASRY *et al.*, 2021). Especificamente no Brasil, relatos mostram que há índices crescentes de candidíase causada pela espécie *C. albicans* ao longo dos anos, variando de região para região (MEDEIROS; MELO; BENTO; SOUZA *et al.*, 2019; MUZAHEED; ALSHEHRI; RABAAN; EL-MASRY *et al.*, 2021).

2. *Candida albicans*

Na variedade de espécies que compõem o gênero *Candida*, *Candida albicans* é um fungo comensal que pertence a microflora humana. Este fungo exibe aspecto dimórfico, podendo estar na forma de levedura ou na forma filamentosa (hifa ou pseudo hifa). Esta mudança morfológica implica diretamente em sua virulência, sendo a forma filamentosa a causadora da infecção (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; MUZAHEED; ALSHEHRI; RABAAN; EL-MASRY *et al.*, 2021).

Em indivíduos saudáveis, o sistema imune é capaz de conter a proliferação da infecção causada por *C. albicans*. Entretanto, em indivíduos portadores de HIV ou de doenças autoimunes, a defesa está comprometida (TONG; TANG, 2017). O estabelecimento primário da infecção ocorre pela transição das células de levedura para hifa, este evento é promovido por mudanças ambientais (pH, temperatura fisiológica, presença de N-acetilglicosamina e CO₂) que culminam na adesão aos tecidos (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; SUDBERY, 2011).

Durante a adesão nos tecidos, *C. albicans* produz proteínas (adesinas) e carboidratos (biofilme) que facilitam sua ligação as células dos tecidos do hospedeiro. As adesinas são uma família de proteínas que estão presentes na parede celular fúngica, podendo se ligar a célula do hospedeiro através da extremidade N ou C-terminal dependendo da proteína (SALGADO; YAN; TAYLOR; BURCHELL *et al.*, 2011). Já a formação de biofilme ocorre através da produção de uma matriz polimérica de glicanos do tipo β -1,3, conferindo resistência aos antifúngicos, proteção aos ataques de neutrófilos e espécies reativas de oxigênio (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas secretam vários compostos químicos que geram um ambiente estressante para o fungo invasor tentando interromper o sucesso da infecção (NETEA; JOOSTEN; VAN DER MEER; KULLBERG *et al.*, 2015). Entretanto, *C. albicans* secreta várias enzimas proteolíticas que evadem as células de defesa (SCHALLER; BORELLI; KORTING; HUBE, 2005). As células de defesa criam um microambiente oxidativo na qual tentam estimular a morte celular da levedura (ENJALBERT; MACCALLUM; ODDS; BROWN, 2007).

3. Estresse oxidativo durante invasão por *Candida albicans*

Estresse em microrganismos não é usualmente fatal, podendo aumentar sua capacidade de adaptação. Porém pode gerar traumas a célula, causando danos a bicamada lipídica, gerando agregação de proteínas e quebra do DNA (HALLSWORTH, 2018). Durante o processo invasivo, o sistema imune do hospedeiro tenta impedir a invasão de *Candida albicans* através de uma série de

mecanismos de defesa, gerando estresse para a célula invasora (CHAUHAN; LATGE; CALDERONE, 2006).

Como mecanismo de defesa, células fagocíticas utilizam espécies reativas de oxigênio (EROs) como parte de seu arsenal para neutralizar o invasor (FANG, 2004). EROs como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânions hidroxila (-OH) reagem com lipídios, proteínas e DNA, gerando danos a célula (ENJALBERT; MACCALLUM; ODDS; BROWN, 2007). Para sobreviver a estes ataques oxidativos, *Candida albicans* expressa enzimas que catalisam a desintoxicação de EROs. Os genes responsáveis pela codificação destas proteínas são estimulados quando os níveis de ERO se elevam, sendo extremamente importantes para a tolerância ao ambiente oxidativo (ZHANG; DE MICHELI; COLEMAN; SANGLARD *et al.*, 2000). Além disso, como fator de virulência, *C. albicans* realiza, também, o tráfego de biomoléculas através da parede celular via vesículas extracelulares.

4. Vesículas Extracelulares

Vesículas extracelulares (VEs) são estruturas esféricas heterogêneas delimitadas por bicamada lipídico/proteica produzidas por células procarióticas e eucarióticas. VEs transportam através da parede celular carboidratos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos secundários (COSTA JONAS; BAZIOLI JAQUELINE; BARBOSA LUIDY; DOS SANTOS JÚNIOR PEDRO LUIS *et al.*; FREITAS MATEUS; BONATO VÂNIA LUIZA; PESSONI ANDRE; RODRIGUES MARCIO *et al.*, 2019).

VEs é o termo geral que descreve todas estruturas delimitadas por bicamada lipídico/proteica transportadas para o meio extracelular pelas diferentes células (RODRIGUES; NAKAYASU; ALMEIDA; NIMRICHTER, 2014). Entretanto, as VEs são divididas em três categorias de acordo com o seu tamanho (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Classificação das VEs.

Classe	Tamanho (nm)
Exossomos	30 a 100
Microvesículas	100 a 1000
Corpos apoptóticos	1000 a 4000

Fonte: Produção do autor.

Estudos sobre VEs fúngicas tiveram início há mais de uma década, quando estavam tentando elucidar o transporte extracelular de macromoléculas em *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES; NIMRICHTER; OLIVEIRA; NOSANCHUK *et al.*, 2008). Desde então, a importância das VEs durante processos infecciosos têm se intensificado e algumas espécies fúngicas patogênicas são produtoras de VEs, como por exemplo, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Candida auris*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Malassezia sympodialis* e *Trichophyton interdigitale* (ZAMITH-MIRANDA; HEYMAN HEINO; COUVILLION SNEHA; CORDERO RADAMES *et al.*, 2021).

Estudos demonstraram que VEs de *Candida albicans* estimularam a produção de citocinas em macrófagos e células dendríticas *in vitro*, e leva a uma menor sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella*, sugerindo seu envolvimento no papel fisiopatológico durante o estabelecimento da infecção (VARGAS; ROCHA; OLIVEIRA; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015)

Como as VEs participam diretamente da virulência de *C. albicans*, análises composicionais das moléculas secretadas foram feitas, tais como lipidoma, proteoma e transcriptoma (VARGAS; ROCHA; OLIVEIRA; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). As biomoléculas presentes nas VEs podem estar envolvidas na interação com o hospedeiro. O papel biológico e fisiopatológico das VEs tem sido estudado como mecanismo de comunicação celular entre o patógeno e o hospedeiro ou, ainda, entre a própria espécie, através da transferência de DNA

ou proteínas que conferem resistência adaptativa aos antifúngicos e as condições de estresse (DE TOLEDO MARTINS; SZWARC; GOLDENBERG; ALVES, 2019).

5. Metabólitos secundários

Metabólitos secundários (MS) são biomoléculas de baixo peso molecular, derivadas de plantas, fungos e bactérias. Essas moléculas não estão ligadas diretamente com o crescimento e desenvolvimento do organismo, entretanto, são necessárias para funções específicas, como resistência contra estresses ambientais e defesa contra patógenos (RAHMAT; KANG, 2020). Além disso, metabólitos secundários possuem grande interesse para indústria farmacêutica, sendo uma fonte preciosa de medicamentos, como, por exemplo, a penicilina e lovastatina (DEVI; KAUR; GULERIA; RANA *et al.*, 2020).

A biossíntese de MS ocorre pela polimerização enzimática de metabólitos. Derivando do metabolismo central fúngico, muitos MS são provenientes de reações que o Acetil-CoA é o precursor ou de reações advindas do metabolismo de aminoácidos (KELLER, 2019). As enzimas que participam dos processos de síntese variam de acordo com a condição em que o microrganismo está, entretanto, existem famílias de algumas enzimas conhecidas que participam destes processos, sendo elas a policetídeo sintase, não-ribossomal peptídeo sintase, terpeno ciclase, dimetilalil triptofano sintetase e ciclopeptídeo sintase (KRAUSE; KOMINEK; OPULENTE; SHEN *et al.*, 2018).

Durante os processos infecciosos, algumas espécies de fungos patogênicos produzem MS que potencializam a virulência e conferem resistência adaptativa (KELLER, 2019). Essas moléculas protegem os fungos de diversos ataques, por exemplo, a melanina é um pigmento natural derivado do L-DOPA presente em algumas espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, conferindo proteção adicional na parede celular e blindando estas espécies contra o ataque de enzimas hidrolíticas (JACOBSON, 2000). Além disso, como proteção contra microrganismos do ambiente, espécies de *Aspergillus* secretam gliotoxina, conferindo uma proteção extra (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- ❖ Avaliar a produção e a composição de MS das VEs provenientes de cultura sólida de *C. albicans*;

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Isolar e caracterizar VEs de *C. albicans* durante o estresse oxidativo;
- ❖ Isolar e caracterizar VEs de *C. albicans* em condição controle;
- ❖ Avaliar a presença de metabólitos secundários no sobrenadante das culturas de *C. albicans* em ambas as condições;
- ❖ Isolar metabólitos secundários presente nas VEs;
- ❖ Identificar os MS presentes nas VEs e no sobrenadante;
- ❖ Comparar os MS que foram induzidos durante o estresse oxidativo com a condição controle;

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Condições de cultivo de *Candida albicans* - Controle

Linhagens de *C. albicans* (ATCC 64548) foram cultivadas em meio sólido de Sabouraud (4% de dextrose, 1% de peptona e 1,5% de ágar, pH 5,6) por 72h a 30°C. Após a confluência, dez colônias foram coletadas e adicionadas a 10 mL de meio líquido de Sabouraud por 48h a 30°C sob agitação (150 rpm). As células foram contadas e sua concentração final foi ajustada para a concentração de $3,5 \times 10^6$ células/mL, onde foram inoculadas em meio sólido de Sabouraud novamente e incubadas por 24h a 30°C para posterior isolamento das vesículas extracelulares (REIS; BORGES; JOZEFOWICZ; SENA *et al.*, 2019).

2. Teste de susceptibilidade – Concentração inibitória mínima

A suscetibilidade da cepa de *C. albicans* (ATCC 64548) em relação à menadiona foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) para leveduras, conforme preconizado pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008). Microplacas foram incubadas durante 48h a 30°C e a faixa de concentração de menadiona testada foi de 4,8 µM a 2.500 µM.

Para confirmar o resultado, foi realizado um ensaio colorimétrico de viabilidade celular, na qual foi adicionado 35 uL de uma solução 0,001 % de resazurina em cada poço e feita a leitura em espectrofotômetro (VERSAmax) no comprimento de onda de 560 nm. Posteriormente, o MIC₁₀₀ foi determinado como a menor concentração que inibiu o crescimento da cepa de *C. albicans*, correspondendo a 156 uM. Para o isolamento de VEs, foi necessário a

recuperação de biomassa fúngica e, portanto, a concentração de 46,8 μM foi escolhida para ser utilizada durante todos os experimentos, esta concentração corresponde ao MIC_{30} . Este ensaio foi realizado em triplicata biológica.

3. Condições de cultivo de *Candida albicans* – Sob estresse oxidativo

Similarmente a condição controle, a cepa de *C. albicans* (ATCC 64548) foi cultivada em meio de Sabouraud sólido acrescido de 46,8 μM de menadiona, simulando o estresse oxidativo por 24h a 30°C.

4. Coleta do sobrenadante, isolamento, caracterização e quantificação das vesículas extracelulares produzidas por *C. albicans*

Após cultura em ambas as condições, as células fúngicas foram coletadas, adicionadas a 30 mL de PBS (0,1 M em pH 7,4) e centrifugadas a 4.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado por 15 min a 4°C a 15.000 x g para remoção de leveduras e partículas remanescentes. O sobrenadante restante foi coletado e concentrado através de um sistema de ultrafiltração, utilizando o sistema Amicon (membrana de filtração de 100 kDa). Durante o processo de ultrafiltração, o filtrado foi coletado para avaliação da possível presença de metabólitos. Posteriormente, o concentrado foi ultracentrifugado a 100.000 x g, durante 1h a 4°C. O sobrenadante foi coletado, adicionado ao filtrado e o pellet obtido foi lavado duas vezes com água ultrapura.

Para a caracterização do tamanho e concentração das vesículas extracelulares obtidas, foi utilizado o analisador de nanopartículas NanoSight NS300 Malvern Instruments, Malvern, UK, equipado com o software de captura rápida de vídeo e rastreamento de nanopartículas (NTA) (Bitencourt, Rezende et al. 2018). As vesículas extracelulares purificadas de *C. albicans* foram diluídas

em 1 mL de PBS, desagregadas utilizando seringa e agulha (1-mL 29-gauge x ½), e cada amostra foi injetada no sistema NanoSight para análise. Ambos os parâmetros de dispersão e captura de fluorescência (como ajustes de foco, câmera e ganho) foram otimizados para permitir a visibilidade das nanopartículas. As medidas obtidas em triplicata foram analisadas pelo software NanoSight (versão 3.2.16). Os dados referentes ao tamanho das vesículas extracelulares de *C. albicans* foram expressos como as médias calculadas ± DP da distribuição de tamanho.

5. Extração dos metabólitos secundários presentes nas vesículas extracelulares e no sobrenadante de culturas de *C. albicans* através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

As amostras contendo um pool de vesículas extracelulares de *C. albicans* com concentração entre 10^{10} e 10^{11} partículas/mL liofilizadas foram solubilizadas em 400 µL metanol e lisadas através de ultrassonificação por 20 minutos. Já o sobrenadante das extrações de VEs, foi solubilizado em metanol e submetido a ultrassonificação durante 20 minutos para melhor solubilização. Ambas as amostras foram secas sob condições inertes de N₂, filtradas em filtro de 22 µm e injetadas no LC-MS.

As análises foram realizadas em espectrômetro de massa Thermo Scientific QExactive® Hybrid Quadrupole-Orbitrap no modo positivo com razão massa-carga (m/z) de 133-2000 Da, voltagem capilar de 3,4 kV, temperatura capilar de entrada de 280 °C e S-lens a 100 V. Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna Thermo Scientific Accucore C18 2,6 µm (2,1 mm x 100 mm),

onde 5 μL de cada amostra foram injetados. Já para a fase móvel, foi utilizado 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila. A razão molar do eluente (A:B) foi de 95/5 até 2/98 dentro de 10 minutos, repouso por 5 minutos, até 95/5 em 1,2 min e repouso por 8,8 min. O tempo de corrida foi de 25 min para cada corrida e a taxa de fluxo, $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, seguindo procedimentos pré-estabelecidos na literatura (COSTA; WASSANO; ANGOLINI; SCHERLACH *et al.*, 2019). Os dados gerados pelo LC-MS foram processados utilizando o software Xcalibur (versão 3.0.63), desenvolvido por Thermo Fisher Scientific.

6. Redes moleculares e análise metabolômica

Os dados brutos, brancos e controles do meio de cultura foram convertidos em formato .mzML com auxílio do software MSConvert (<http://proteowizard.sourceforge.net>). Uma rede molecular para todos os metabólitos de *C. albicans* identificados em ambas condições foi criada usando *workflow online* (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/networking/>) através do banco de dados Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) utilizando a ferramenta de Rede Molecular Clássica (RMC). Para RMC, os dados foram filtrados, removendo todos os íons de fragmento de MS/MS entre $\pm 17 \text{ Da}$ do precursor m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores na janela de $\pm 50 \text{ Da}$ em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi estabelecida em $0,02 \text{ Da}$ e a tolerância do íon do fragmento MS/MS em $0,02 \text{ Da}$. Os espectros foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros de MS da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências entre espectros selecionadas deveriam ter uma pontuação acima de 0,5 e pelo menos 5 picos combinados (WANG; TOYOTOME;

MURAOSA; WATANABE *et al.*, 2014). Além disso, os limites entre dois nós (compostos químicos) foram mantidos se, e somente se, um dos nós apareceu nos 10 respectivos nós mais semelhantes e separados em famílias (classes químicas). As redes moleculares resultantes podem ser consultadas em <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=92af3c25e2d147c5af0e619b52bb0667>. Os nós provenientes do meio de Sabouraud e do solvente de análise (metanol) foram excluídos da rede molecular original para facilitar a visualização das moléculas obtidas nas condições controle e de estresse oxidativo (OPPONG-DANQUAH; PARROT; BLÜMEL; LABES *et al.*, 2018).

Finalmente, a rede espectral final (.cys) foi inserida no Cytoscape 3.8 para obter uma melhor visualização e edição. Para melhorar a visualização dos dados, o GNPS Dashboard foi usado para o processo de 'localização de recursos' usando o MZMine 2 (OPPONG-DANQUAH; PARROT; BLÜMEL; LABES *et al.*, 2018). Os parâmetros usados foram: Tolerância do precursor: 10 ppm; Nível de ruído: 10^4 ; largura de pico mínimo e máximo: 0,05 - 1,5 min; e uma tolerância de tempo de retenção: 0,3 min. Os dados da tabela de quantificação foram submetidos ao MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) para aprimorar as análises estatísticas uni e multivariadas. Avaliações semiquantitativas foram realizadas com base em Rede Molecular Baseada em Recursos (FBMN), de acordo com o fluxo de trabalho do GNPS (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking/>).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares de *C. albicans*

A avaliação da produção de VEs por *C. albicans* na condição controle e durante o estresse oxidativo foi realizada em culturas de 24 horas. Na condição controle, o tamanho das populações de VEs variou entre 70 e 400 nm (**Figura 1A**), com tamanho médio de 136,4 nm ($\pm 58,2$ nm), moda de 100,3 nm e concentração em torno de 10^{10} vesículas/mL. As VEs isoladas durante o estresse oxidativo apresentaram diferentes distribuições de tamanho de 36 a 294 nm (**Figura 1B**), com tamanho médio de 160,6 nm ($\pm 51,6$ nm), moda de 158,7 nm e concentração em torno de 10^{11} vesículas/mL.

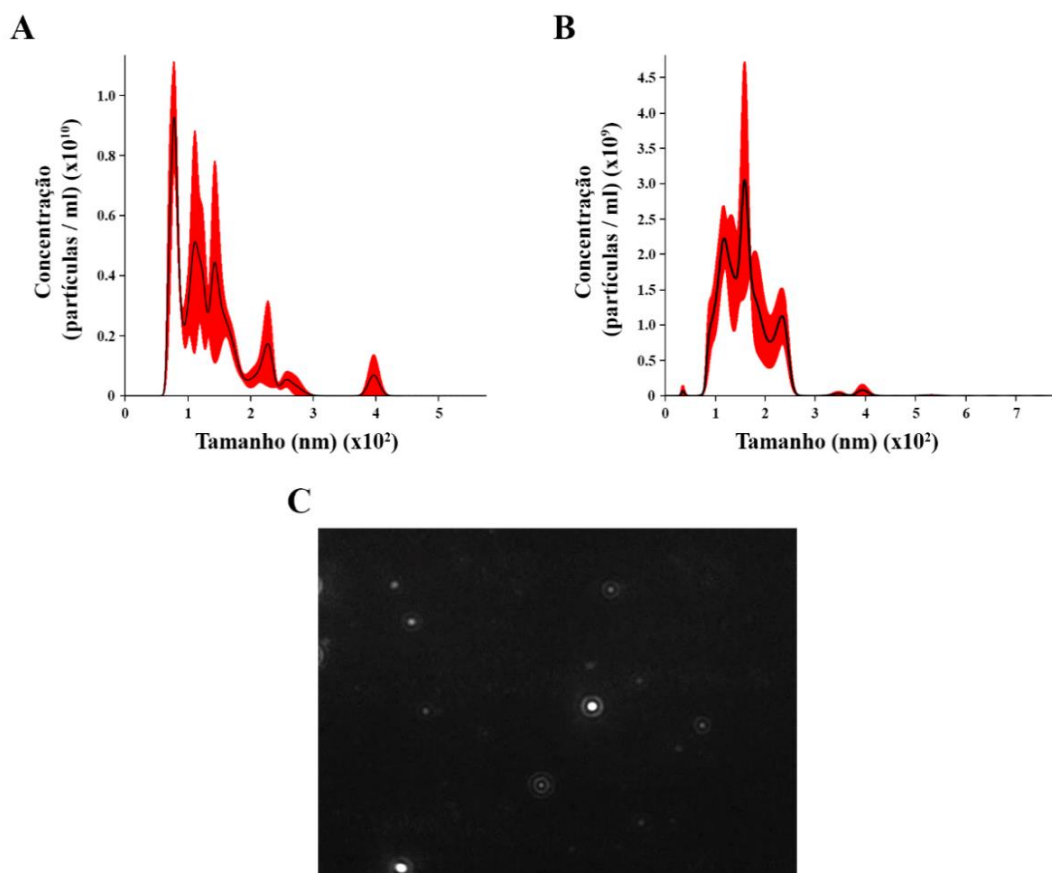


Figura 1 - Vesículas extracelulares de *Candida albicans* analisadas pela técnica de NTA. **(A)** – Histograma mostrando a distribuição dos perfis de VEs de *Candida albicans* [VEs x 10¹⁰/mL versus distribuição de tamanho (nm)] na condição controle. **(B)** - Histograma mostrando a distribuição dos perfis de VEs de *Candida albicans* [VEs x 10¹¹/mL versus distribuição de tamanho (nm)] provenientes da cultura contendo menadiona. **(C)** Captura de tela obtido do vídeo gravado da análise da condição controle. **Fonte:** Produção do autor.

2. Análises estatísticas e Redes Moleculares em vesículas extracelulares de *C. albicans*

Foram realizadas análises multivariadas como, Análise de Componentes Principais (PCA) (**Figura 2A**) e os Mínimos Quadrados Parciais (Análise Discriminante) (PLS-DA) (**Figura 2B**), onde o perfil químico entre as amostras de EVs controle e provenientes de estresse oxidativo foram avaliados e comparados. A PCA foi responsável por 33,7% da variância total dos dados. No entanto, a análise não mostrou uma separação clara entre os principais grupos de controle (sem estresse oxidativo) e as amostras sob estresse oxidativo. Por isso, foi realizada uma análise supervisionada. O PLS-DA apresentou uma clara separação no Componente 2 do grupo condições de controle, no componente 2 positivo, enquanto as amostras sob estresse oxidativo estão no componente negativo 2. As análises discriminantes apresentaram alta validação ($p < 0.01$, $R^2 = 0.99$ and $Q^2 = 0.71$).

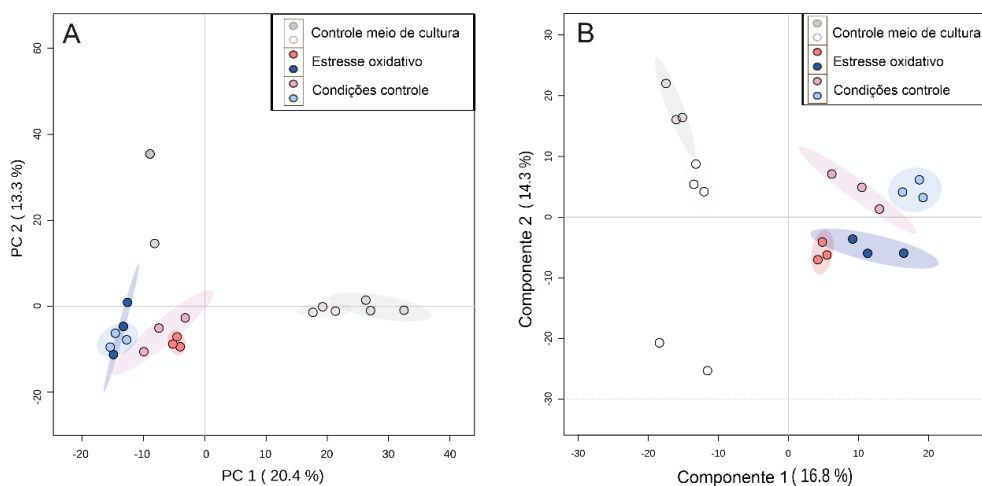


Figura 2 – Gráfico das análises multivariadas realizadas em todas amostras de *Candida albicans*. **(A)** - Análise de Componentes Principais (PCA). **(B)** - Análise Discriminante dos Mínimos Quadrados Parciais. ● Sobrenadante do cultivo submetido ao estresse oxidativo. ● VEs isoladas da condição de estresse oxidativo. ○ Sobrenadante do cultivo na condição controle. ● VEs isoladas da condição controle. ○ Meio de cultura sem menadiona. ● Meio de cultura com menadiona. **Fonte:** Produção do autor.

Para analisar comparativamente a composição química de VEs sob condição de controle e estresse oxidativo, uma Rede Molecular (RM) clássica baseada em dados de MS/MS foi gerada usando a plataforma GNPS (OPPONG-DANQUAH; PARROT; BLÜMEL; LABES *et al.*, 2018) (**Figura 3**). Em ambas as condições a RM consistiu em 2940 nós (compostos químicos), nos quais, cada nó indica um espectro MS/MS. Algumas famílias químicas detectadas incluem esfingolipídios e glicerofosfolipídios que foram anotados pela biblioteca espectral. Outras superclasses químicas também foram anotadas, por exemplo, ácidos graxos, esteroides, benzeno e derivados.

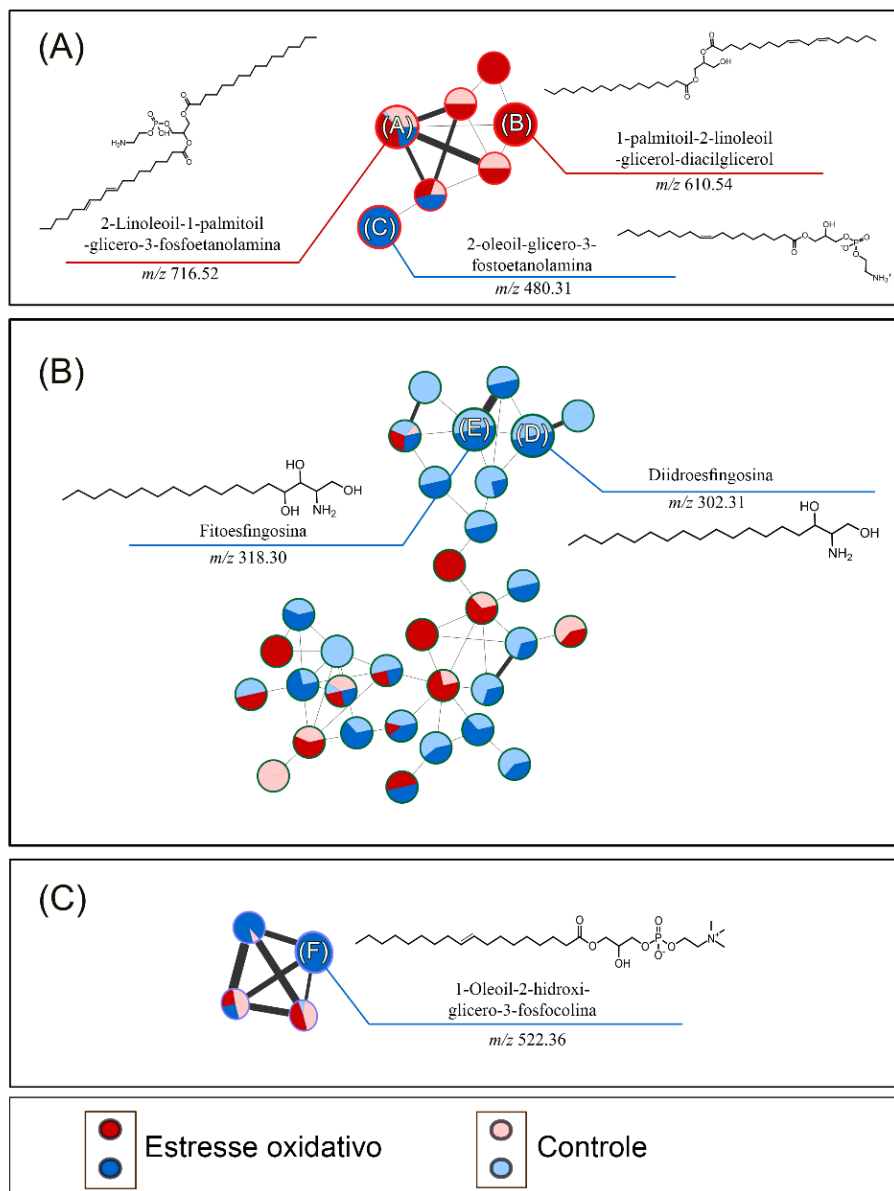


Figura 3 – Redes moleculares dos compostos identificados. Os nós (círculos) representam as moléculas ionizadas e a espessura das linhas que ligam os nós representam a similaridade química entre as moléculas identificadas com base no perfil de fragmentação do MS/MS.

● Sobrenadante do cultivo submetido ao estresse oxidativo. ● VEs isoladas da condição de estresse oxidativo. ○ Sobrenadante do cultivo na condição controle. ● VEs isoladas da condição controle. **Fonte:** Produção do autor.

3. Presença de metabólitos secundários

Durante o processo de isolamento da VEs, suspeitou-se que a secreção de MS pudesse ocorrer através de duas vias: a via canônica (através de transportador) e/ou pela via não canônica (via VEs). Por esta razão, o filtrado do isolamento de VEs foi coletado para investigar a possível presença de MS. Os MS extraídos das VEs e do sobrenadante em ambas as condições analisadas, foram identificados através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Os perfis de fragmentação obtidos (**Apêndice B**) foram comparados e anotados como resultados no banco de dados GNPS (**Apêndice A**). Os seis compostos identificados, foram divididos de acordo com suas funções no metabolismo: metabolismo de glicerofosfolipídios e biossíntese de esfingolipídios (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Metabólitos secundários identificados em vesículas extracelulares de *C. albicans* e via metabólica relacionada.

A	Composto	Ion Fórmula	Experimental m/z	Sobrenadante ou VEs	Controle e/ou estresse oxidativo	Via metabólica relacionada
	2-linoleoil-1-palmitoil- glicero-3- fosfoetanolamina	C ₃₉ H ₇₄ NO ₈ P	716.52	Sobrenadante e VEs	Controle e estresse oxidativo	Metabolismo de glicerofosfolipídios
B	1-palmitoil-2-linoleoil- glicerol	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	610.54	Sobrenadante	Estresse oxidativo	Metabolismo de glicerofosfolipídios
C	2-oleoil-glicero-3- fosfoetanolamina	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	480.31	VEs	Estresse oxidativo	Metabolismo de glicerofosfolipídios
D	Diidroesfingosina	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	302.31	VEs	Controle e estresse oxidativo	Metabolismo de esfingolipídios
E	Fitoesfingosina	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	318.30	VEs	Controle e estresse oxidativo	Metabolismo de esfingolipídios
F	1-oleoil-2-hidroxi- glicero-3-fosfocolina	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	522.36	VEs	Estresse oxidativo	Metabolismo de glicerofosfolipídios

Fonte: Produção do autor.

Os compostos **A** e **B** foram encontrados no sobrenadante do isolamento das VEs. Sendo que **A** estava presente ambas as condições e **B** foi o único composto induzido durante o estresse oxidativo. Os Compostos **A**, **D** e **E** foram identificados nas VEs em ambas as condições e estavam ausentes no sobrenadante. Entretanto, os compostos **C** e **F** foram os únicos compostos que foram induzidos durante o estresse oxidativo e estavam presentes nas VEs. Para descartar qualquer interferência do meio de Sabouraud, os íons presentes no controle foram subtraídos de todas as amostras durante a análise LC-MS.

Em relação aos compostos relacionados ao metabolismo de glicerofosfolípidios, detectamos o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 716,5220, anotado como 2-linoleoil-1-palmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina (**Figura 4**), o MS/MS gerou os principais fragmentos em m/z 575,5100, característico para a perda de fração de fosfoetanolamina, e m/z 95,0860 (**Figura A1**), ambos corresponderam à biblioteca espectral em GNPS (**Figura S1**).

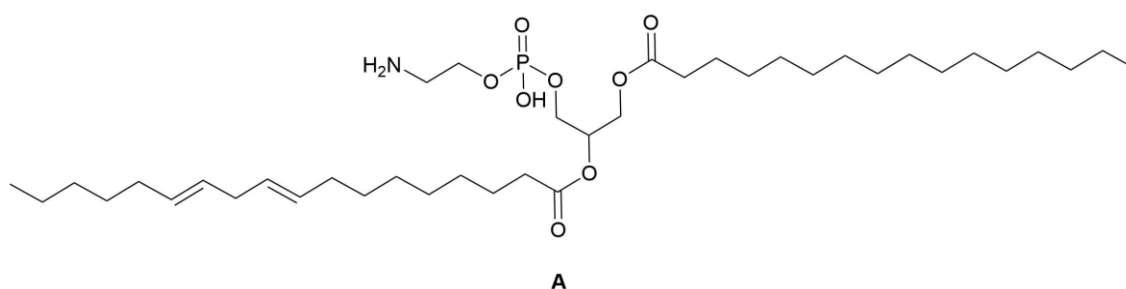


Figura 4 – Fórmula estrutural do composto 2-Linoleoil-1-palmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina.

Fonte: Produção do autor.

O composto 1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol (**Figura 5**) foi anotado com o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 610,5400 (**Figura A2**). A maioria dos principais fragmentos do composto **B** correspondeu ao padrão de fragmentação encontrado no banco de dados GNPS. O m/z 575,5110 foi caracterizado como perda de H_2O devido à hidroxila no final da cadeia. Outro fragmento importante do composto **B** foi relacionado à clivagem entre a porção carboxila e a cadeia alifática, gerando o íon em m/z 313,2750. A outra cadeia alifática (cadeia saturada) também é clivada na porção carboxila originando o íon em m/z 239,1630 (**Figura S2**).

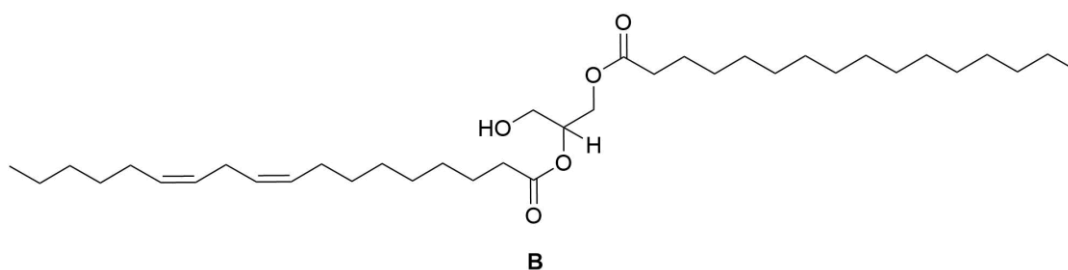


Figura 5 – Fórmula estrutural do composto 1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol.

Fonte: Produção do autor.

Além disso, o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 480,3080 (**Figura A3**) foi anotado com alta similaridade com a biblioteca espectral para o metabólito 2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina (**Figura 6**). A clivagem na porção fosfoetanolamina é esperada, produzindo o íon a m/z 339,2910, característica deste composto e predita pelo banco de dados (Human Metabolome Database - HMDB) (**Figura S3**).

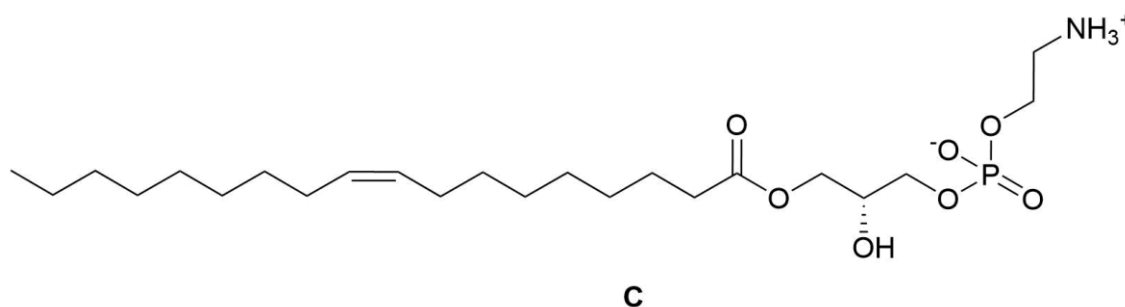


Figura 6 – Fórmula estrutural do composto 2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina.

Fonte: Produção do autor.

Em relação à biossíntese de esfingolipídios, dois intermediários foram anotados. O composto diidroesfingosina (**Figura 7**) com o íon precursor em m/z $[M+H]^+$ 302,3050. O composto **D** mostrou os íons em m/z 254,2850, 95,0860, 81,0710 e 60,0450 como os principais fragmentos (**Figura A4**). A perda da fração $[H_2NCH_2CHOH]^+$ é conhecida para o composto **D** como o íon m/z 60,0450 e o pico de base de acordo com o banco de dados espectral (Human Metabolome Database - HMDB) (**Figura S4**).

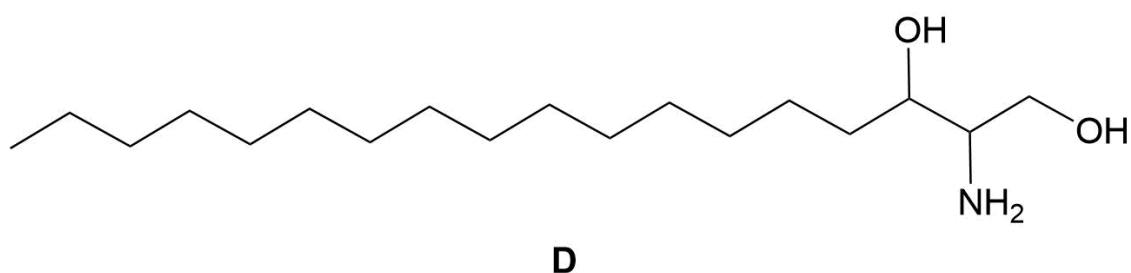


Figura 7 – Fórmula estrutural do composto diidroesfingosina.

Fonte: Produção do autor.

Além disso, o íon $[M+H]^+$ em m/z 318,3000 foi anotado no banco de dados GNPS como fitoesfingosina (**Figura 8**) e o experimento MS/MS rendeu fragmentos principais em m/z 282,2780 e 60,0450 que correspondem (**Figura A5**), respectivamente, a uma desidratação e ao fragmento $[H_2NCHCH_2OH]^+$

(Figura S5), como esperado para o composto E e encontrado experimentalmente no banco de dados (Human Metabolome Database - HMDB) (WARD; PAGE; MCHUGH; POWLES, 2017).

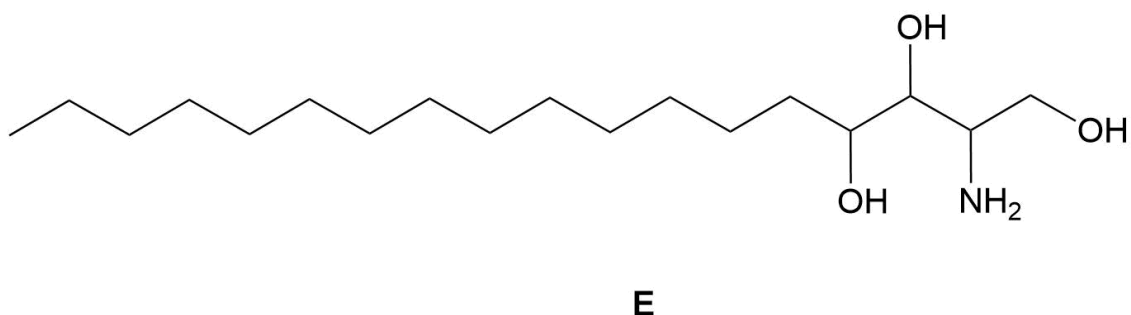


Figura 8 – Fórmula estrutural do composto fitoesfingosina.

Fonte: Produção do autor.

O metabólito 1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina (**Figura 9**) foi anotado com o íon precursor $[M+H]^+$ m/z 522,350 e o MS/MS indicou os principais fragmentos em m/z 184,0730 e m/z 104,1080 (**Figura A6**), relacionado à perda da fração amino-fosfato e a clivagem entre o oxigênio-fósforo ligado (**Figura S6**), respectivamente, como pôde ser visto na biblioteca espectral em GNPS e previsto no banco de dados espectral (Human Metabolome Database - HMDB).

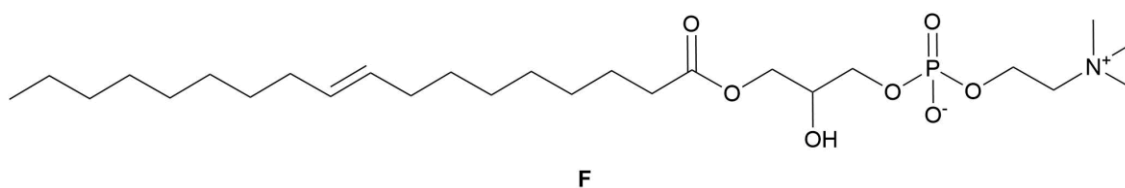


Figura 9 – Fórmula estrutural do composto 1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina.

Fonte: Produção do autor.

DISCUSSÃO

Discussão

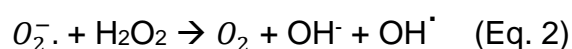
A m/z e os tempos de retenção são característicos de cada MS, sendo a sua “impressão digital” (WORLEY; POWERS, 2013). A coleta destes dados espectrais visou observar a natureza e reprodutibilidade das condições empregadas no estudo. Os dados foram submetidos a análises de ordenação estatística empregando métodos multivariados de análise. Inicialmente, foi realizado o PCA para classificar as amostras e avaliar a similaridade dos dados obtidos. O PCA é um método não supervisionado de análise, que simplifica a complexidade em dados de alta complexidade enquanto leva em consideração tendências e padrões. Dados de alta complexidade são muito comuns na área biológica e surgem quando vários recursos, como a expressão de muitos genes e populações de metabólitos, são medidos para cada amostra (LEVER; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2017). Para as amostras na condição controle e sob estresse oxidativo não foi possível observar a separação clara dos grupos. Amostras com dados agrupados indicam disparidade entre as mesmas (LEVER; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2017).

Como o método não supervisionado não foi eficiente para atribuir grupos aos metabólitos, o método supervisionado de PLS-DA também foi aplicado. O método de PLS-DA consiste na decomposição dos dados realizando predições em relação a classificação das moléculas encontradas com as condições estudadas (WORLEY; POWERS, 2013). Com o intuito de maximizar a separação das amostras e obtenção dos metabólitos significativos nas mesmas, foi possível distinguir visivelmente os compostos que pertencem ao grupo controle e as amostras que foram tratadas com menadiona.

Além de serem utilizados na confecção dos dados estatísticos, os dados gerados pela técnica de MS/MS geraram perfis de fragmentação que auxiliaram na obtenção de características definitivas de cada MS encontrado (WATROUS; ROACH; ALEXANDROV; HEATH *et al.*, 2012). Os padrões observados refletiram a combinação da arquitetura, estabilidade, grupos funcionais e reatividade proporcionados pela técnica e que serviu para prever as semelhanças químicas entre os compostos (WATROUS; ROACH; ALEXANDROV; HEATH *et al.*, 2012). Utilizando as informações citadas, foi possível confeccionar uma rede molecular, formando famílias moleculares dentro de uma rede. A composição destas redes permitiu a observação de moléculas similares, análogas ou famílias de compostos dentro de um conjunto de dados individuais ou múltiplos a partir de diversas fontes (KERSTEN; YANG; XU; CIMERMANCIC *et al.*, 2011; NGUYEN; WU; MOREE; LAMSA *et al.*, 2013). Na rede, cada composto é chamado de nó (círculo) e corresponde a proporções de padrões de fragmentação idênticos de cada molécula em cada condição estudada. As linhas conectam os nós de acordo com a similaridade de fragmentação através de um cálculo feito entre os íons precursores e os íons fragmentos. O número obtido a partir deste cálculo é denominado cosine, onde quanto mais próximo de 1 mais similar o composto será daquele que está ligado na rede (KERSTEN; YANG; XU; CIMERMANCIC *et al.*, 2011; NGUYEN; WU; MOREE; LAMSA *et al.*, 2013). A aplicação das redes permitiu a exploração da diversidade química entre as amostras controle e as amostras que simularam o estresse oxidativo em culturas de *C. albicans*.

A escolha da condição que simulou o estresse oxidativo foi proposital com o intuito de simular um dos fatores que ocorrem durante o estabelecimento da

infecção por *C. albicans*. Todo seu metabolismo foi afetado pela superprodução de EROs, como consequência a produção e VEs e a composição dos MS presentes foi alterada também. Durante o estabelecimento da infecção por *C. albicans*, uma série de mecanismos defensivos é desencadeado, sendo iniciado pela fagocitose gerada por neutrófilos e macrófagos. Estas células produzem citocinas que induzem a produção de compostos químicos altamente reativos, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs), a qual geram nas células invasoras um processo chamado explosão respiratória (DANTAS; DAY; IKEH; KOS *et al.*, 2015). Simultaneamente ao aumento da concentração de citocinas, a espécie superóxido (O_2^-) é produzida pelo complexo NADPH oxidase (Eq. 1) (BABIOR, 2004). O radical superóxido pode sofrer o processo de desmutação e via mecanismo de Haber-Weiss, catalisado pela enzima superóxido desmutase, gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2) outra espécie que compõe as EROs (Eq. 2) (KEHRER, 2000).



As EROs produzidas pelas células de defesa criam um ambiente altamente tóxico que promove o estresse oxidativo em *C. albicans*, podendo culminar em sua apoptose celular (PHILLIPS; SUDBERY; RAMSDALE, 2003). As mudanças ambientais induzem uma série de respostas metabólicas e genéticas em *C. albicans*.

As VEs de *C. albicans* podem apresentar carga de metabólitos diferentes de acordo com as mudanças ambientais (BLEACKLEY; DAWSON; ANDERSON,

2019; ZAMITH-MIRANDA; NIMRICHTER; RODRIGUES; NOSANCHUK, 2018). Essas mudanças foram desencadeadas pela adição de menadiona (**Figura 10**) que induziu a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) visando mimetizar um ambiente altamente oxidante como ocorre a durante a infecção. Então, foi feito o isolamento de VEs na condição oxidativa e na condição de controle (uma condição sem estímulos de estresse).

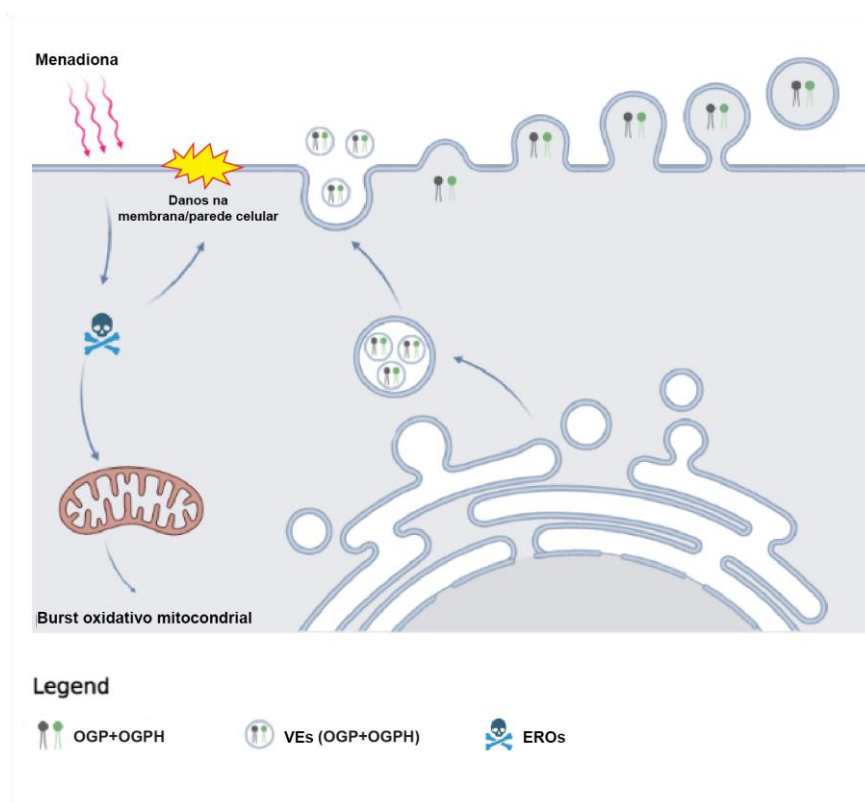


Figura 10 – Esquema ilustrativo representando a produção de VEs e compostos induzidos durante o estresse oxidativo em células de *C. albicans*. Após a adição de menadiona ao meio de cultura, a superprodução EROs induziu a produção dos metabólitos (OGP e OGPH) que foram identificados nas VEs.

OGP - 2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina

OGPH - 1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina

Fonte: Produção do autor.

A partir da determinação de MIC₁₀₀ de menadiona, foi definida a concentração de MIC₃₀ a ser usada para isolamento de VEs, correspondendo a 46,8 µM de menadiona. Durante o processo de isolamento, suspeitou-se que a secreção de MS pudesse ocorrer através de duas vias: a via canônica (através de transportador) e via não canônica (via VEs). Por esta razão, o filtrado do isolamento de VEs foi coletado para investigar a possível presença de metabólitos secundários.

Através da via canônica e em ambas as condições de estudo, o metabólito **A** (2-linoleoil-1-palmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina) foi identificado no sobrenadante. Por outro lado, o metabólito **B** (1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol) foi o único que foi induzido durante o estresse oxidativo e transportado por essa via. Não há, ainda, na literatura nenhuma descrição sobre o composto **B** em metabolismo microbiano. Uma possível explicação para seu aparecimento durante o estresse oxidativo seria que algumas espécies fúngicas podem secretar MS como forma de autoproteção em ambientes não saprofíticos (FOX; HOWLETT, 2008). A espécie patogênica *Aspergillus fumigatus* é produtora de gliotoxina, um MS que possui propriedades imunossupressoras pleiotrópicas induzindo apoptose de macrófagos e fundamental no estabelecimento da aspergilose (WANG; TOYOTOME; MURAOSA; WATANABE *et al.*, 2014). Este metabólito é produzido no meio intracelular e tóxico até para a própria célula fúngica (KWON-CHUNG; SUGUI, 2009). Como mecanismo de autoproteção, *A. fumigatus* secreta gliotoxina via transportador (gliA) diminuindo seu efeito no meio intracelular (GARDINER; JARVIS; HOWLETT, 2005; WANG; TOYOTOME; MURAOSA; WATANABE *et al.*, 2014).

Para se adaptar as mudanças ambientais, os fungos ajustam sua fisiologia para aumentar a sua sobrevivência utilizando vias metabólicas complexas que permitem que o microrganismo responda adequadamente a alterações nos estímulos externos (DURAN; CARY; CALVO, 2010). A superprodução de ROS afetou diretamente o metabolismo e a fisiologia de *C. albicans* e esse fato foi refletido na produção de VEs. *C. albicans* produziu, na condição de estresse oxidativo, populações heterogêneas de VEs com concentração em torno de 10^{11} VEs/mL. Diferentemente do estresse oxidativo, a condição controle foi ideal para o crescimento de *C. albicans* não gerando estresse ambiental. Esta condição também apresentou populações heterogêneas de VEs, entretanto, apresentou dez vezes menos VEs, em torno de 10^{10} VEs/mL. Esperava-se que ocorresse o fenômeno inverso, já que havia menos biomassa fúngica na condição de estresse.

Através da via não canônica de transporte e em ambas as condições de estudo, os metabólitos **D** (diidroesfingosina) e **E** (fitoesfingosina) foram identificados nas VEs. Ambos compostos são intermediários da via de biossíntese da ceramida e seus derivados (DEL POETA; NIMRICHTER; RODRIGUES; LUBERTO, 2014; TAFESSE; RASHIDFARROKHI; SCHMIDT; FREINKMAN *et al.*, 2015). Esses componentes auxiliam na organização estrutural das membranas, bem como na regulação do influxo e efluxo de metabólitos, transporte vesicular e são essenciais na formação de domínios de sinalização da membrana plasmática (MCEVOY; NORMILE; POETA, 2020). Em fungos patogênicos ambientais, como *Cryptococcus spp.* e *Aspergillus spp.*, produtos derivados dos metabólitos **D** e **E** permitem que o fungo se adapte ao novo ambiente com temperatura elevada, promovendo a sua sobrevivência,

crescimento e desenvolvimento da infecção fúngica (MCEVOY; NORMILE; POETA, 2020). Além disso, a função e localização de algumas proteínas que conferem resistência de *C. albicans* a antifúngicos está diretamente atrelada a composição esfingolípídica da membrana (RHOME; DEL POETA, 2010).

Por outro lado, os metabólitos **C** (2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina) e **F** (1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina) foram os únicos que foram identificados na VEs durante o estresse oxidativo. Ambos compostos pertencem ao metabolismo de glicerofosfolípídios e sendo derivados da fosfoetanolamina e fosfatidilcolina. Análises lipidômicas utilizando espectrometria de massas identificaram no total de 33 espécies de fosfolípídios, glicosfingolípídios, ácidos graxos e esteróis em VEs da espécie patogênica *Paracoccidioides brasiliensis*. As moléculas identificadas foram divididas em derivados de fosfoetanolamina, fosfatidilcolina, ácido fosfático, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol. O perfil fosfolípídico de VEs de *Paracoccidioides brasiliensis* revelaram que a proporção composicional de derivados da fosfoetanolamina e fosfatidilserina são diferentes daqueles na composição lipídica da célula integra (VALLEJO; NAKAYASU; LONGO; GANIKO *et al.*, 2012). Ainda neste estudo, dados de espectrometria de massas como a fragmentação e a massa predita de fosfoetanolamina e fosfatidilcolina são similares aos dos compostos **C** e **F** identificados na VEs de *C. albicans* (VALLEJO; NAKAYASU; LONGO; GANIKO *et al.*, 2012) .

Além disso, foi realizado um estudo alterando genes relacionados com a biossíntese de fosfolípídios em *C. albicans* para verificar as mudanças geradas na VEs após a mutação, bem como o possível aumento em sua virulência (WOLF JULIE; ESPADAS; LUQUE-GARCIA; REYNOLDS *et al.*, 2015).

Estruturalmente, os fosfolípidios apresentam características geométricas específicas na qual atribuem a bicamada lipídica seus atributos relacionados a fluidez (JANMEY; KINNUNEN, 2006). Como as VEs são formadas por uma bicamada lipídica, as mutações geradas nos genes citados afetaram diretamente sua morfologia e em seu mecanismo de exocitose (WOLF JULIE; ESPADAS; LUQUE-GARCIA; REYNOLDS *et al.*, 2015).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Em posse das informações presentes, pode-se concluir que como resposta adaptativa e como forma de proteção frente ao ambiente oxidativo, *C. albicans* secreta metabólitos secundários através de vias canônicas e não canônicas. Ainda, as VEs podem auxiliar no sensoriamento ambiental, mostrando alterações na classificação das biomoléculas de acordo com os requisitos celulares, o que foi reforçado por nossos dados, destacando a ocorrência de metabólitos específicos após a exposição à menadiona. Apesar do aumento das investigações sobre VEs de *C. albicans* e outros fungos patogênicos, os levantamentos sobre seu conteúdo de metabolismo secundário são limitados. Dessa forma, elucidar as estruturas provenientes do metabolismo secundário em VEs de *C. albicans* pode ser útil para agregar informações sobre os mecanismos auxiliares que favorecem o processo de infecção fúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, 16, n. 1, p. 42-47, 2004/02/01/2004.

BLEACKLEY, M. R.; DAWSON, C. S.; ANDERSON, M. A. Fungal Extracellular Vesicles with a Focus on Proteomic Analysis. **PROTEOMICS**, 19, n. 8, p. 1800232, 2019/04/01 2019. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800232>.

CHAUHAN, N.; LATGE, J.-P.; CALDERONE, R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Nature Reviews Microbiology**, 4, n. 6, p. 435-444, 2006/06/01 2006.

CLSI. M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. Wayne, PA, USA: CLSI 2008.

COSTA, J. H.; WASSANO, C. I.; ANGOLINI, C. F. F.; SCHERLACH, K. *et al.* Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 18647, 2019/12/09 2019.

COSTA JONAS, H.; BAZIOLI JAQUELINE, M.; BARBOSA LUIDY, D.; DOS SANTOS JÚNIOR PEDRO LUIS, T. *et al.* Phytotoxic Tryptoquialanines Produced In Vivo by *Penicillium digitatum* Are Exported in Extracellular Vesicles. **mBio**, 12, n. 1, p. e03393-03320.

DANTAS, A. D.; DAY, A.; IKEH, M.; KOS, I. *et al.* Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, 5, n. 1, 2015.

DE TOLEDO MARTINS, S.; SZWARC, P.; GOLDENBERG, S.; ALVES, L. R. Extracellular Vesicles in Fungi: Composition and Functions. n. 0070-217X (Print), 2019.

DEL POETA, M.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; LUBERTO, C. Synthesis and Biological Properties of Fungal Glucosylceramide. **PLOS Pathogens**, 10, n. 1, p. e1003832, 2014.

DEVI, R.; KAUR, T.; GULERIA, G.; RANA, K. L. *et al.* Chapter 9 - Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. *In*: RASTEGARI, A. A.; YADAV, A. N., *et al* (Ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**: Elsevier, 2020. p. 147-161.

DURAN, R.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. **Toxins**, 2, n. 4, 2010.

ENJALBERT, B.; MACCALLUM, D. M.; ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Infection and immunity**, 75, n. 5, p. 2143-2151, 2007.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. n. 1740-1526 (Print), 2004.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, 11, n. 6, p. 481-487, 2008/12/01/ 2008.

FREITAS MATEUS, S.; BONATO VÂNIA LUIZA, D.; PESSONI ANDRE, M.; RODRIGUES MARCIO, L. *et al.* Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune Interventions. **mSphere**, 4, n. 6, p. e00747-00719, 2019.

GARDINER, D. M.; JARVIS, R. S.; HOWLETT, B. J. The ABC transporter gene in the sirodesmin biosynthetic gene cluster of *Leptosphaeria maculans* is not essential for sirodesmin production but facilitates self-protection. **Fungal Genetics and Biology**, 42, n. 3, p. 257-263, 2005/03/01/ 2005.

HALLSWORTH, J. E. Stress-free microbes lack vitality. n. 1878-6146 (Print), 2018.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical microbiology reviews**, 13, n. 4, p. 708-717, 2000.

JANMEY, P. A.; KINNUNEN, P. K. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. **Trends in cell biology**, 16, n. 10, p. 538-546, 2006/10// 2006.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, 149, n. 1, p. 43-50, 2000/08/14/ 2000.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, 17, n. 3, p. 167-180, 2019/03/01 2019.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, 3, n. 12, p. 937-947, 2005/12/01 2005.

KERSTEN, R. D.; YANG, Y.-L.; XU, Y.; CIMERMANCIC, P. *et al.* A mass spectrometry–guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. **Nature Chemical Biology**, 7, n. 11, p. 794-802, 2011/11/01 2011.

KRAUSE, D. J.; KOMINEK, J.; OPULENTE, D. A.; SHEN, X.-X. *et al.* Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115, n. 43, p. 11030, 2018.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? **Medical mycology**, 47 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S97-S103, 2009.

LACAZ, C.; PORTO, E.; MARTINS, J. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo - REV INST MED TROP SAO PAULO**, 33, 08/01 1991.

LEVER, J.; KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Principal component analysis. **Nature Methods**, 14, n. 7, p. 641-642, 2017/07/01 2017.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MCEVOY, K.; NORMILE, T. G.; POETA, M. D. Antifungal Drug Development: Targeting the Fungal Sphingolipid Pathway. **Journal of Fungi**, 6, n. 3, 2020.

MEDEIROS, M. A. P. D.; MELO, A. P. V. D.; BENTO, A. D. O.; SOUZA, L. B. F. C. D. *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MUZAHEED; ALSHEHRI, B. A.; RABAAN, A. A.; EL-MASRY, O. S. *et al.* A 20-year retrospective clinical analysis of Candida infections in tertiary centre: Single-center experience. **Journal of Infection and Public Health**, 2021/11/14/ 2021.

NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B.-J. *et al.* Immune defence against Candida fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, 15, n. 10, p. 630-642, 2015/10/01 2015.

NGUYEN, D. D.; WU, C.-H.; MOREE, W. J.; LAMSA, A. *et al.* MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 28, p. E2611, 2013.

NISHIKAKU, A. S.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Geographic Trends in Invasive Candidiasis. **Current Fungal Infection Reports**, 4, n. 4, p. 210-218, 2010/12/01 2010.

OPPONG-DANQUAH, E.; PARROT, D.; BLÜMEL, M.; LABES, A. *et al.* Molecular Networking-Based Metabolome and Bioactivity Analyses of Marine-Adapted Fungi Co-cultivated With Phytopathogens. **Front Microbiol**, 9, p. 2072, 2018.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, 4, n. 1, p. 18026, 2018/05/11 2018.

PHILLIPS, A. J.; SUDBERY, I.; RAMSDALE, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100, n. 24, p. 14327, 2003.

RAHMAT, E.; KANG, Y. Yeast metabolic engineering for the production of pharmaceutically important secondary metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 104, n. 11, p. 4659-4674, 2020/06/01 2020.

REIS, F. C. G.; BORGES, B. S.; JOZEFOWICZ, L. J.; SENA, B. A. G. *et al.* A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. **mSphere**, 4, n. 2, p. e00080-00019, 2019.

RHOME, R.; DEL POETA, M. Sphingolipid signaling in fungal pathogens. **Advances in experimental medicine and biology**, 688, p. 232-237, 2010.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER, L. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **Journal of Proteomics**, 97, p. 177-186, 2014/01/31/ 2014.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; OLIVEIRA, D. L.; NOSANCHUK, J. D. *et al.* Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? **Lipid insights**, 2, p. 27-40, 2008.

SALGADO, P. S.; YAN, R.; TAYLOR, J. D.; BURCHELL, L. *et al.* Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108, n. 38, p. 15775, 2011.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, 48, n. 6, p. 365-377, 2005/11/01 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 10, p. 737-748, 2011/10/01 2011.

TAFESSE, F. G.; RASHIDFARROKHI, A.; SCHMIDT, F. I.; FREINKMAN, E. *et al.* Disruption of Sphingolipid Biosynthesis Blocks Phagocytosis of *Candida albicans*. **PLOS Pathogens**, 11, n. 10, p. e1005188, 2015.

TONG, Y.; TANG, J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological Research**, 198, p. 27-35, 2017/05/01/ 2017.

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E. S.; LONGO, L. V. G.; GANIKO, L. *et al.* Lipidomic Analysis of Extracellular Vesicles from the Pathogenic Phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS ONE**, 7, n. 6, p. e39463, 2012.

VARGAS, G.; ROCHA, J. D. B.; OLIVEIRA, D. L.; ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, 17, n. 3, p. 389-407, 2015/03/01 2015. <https://doi.org/10.1111/cmi.12374>.

WANG, D.-N.; TOYOTOME, T.; MURAOSA, Y.; WATANABE, A. *et al.* GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. **Medical Mycology**, 52, n. 5, p. 506-518, 2014.

WARD, S.; PAGE, M.; MCHUGH, P.; POWLES, N. Sphingosine and dihydrosphingosine as biomarkers for multiple sclerosis identified by metabolomic profiling using coupled UPLC-MS. **Anal. Methods**, 9, 09/25 2017.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S. *et al.* Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109, n. 26, p. E1743, 2012.

WEBB, B. J.; FERRARO, J. P.; REA, S.; KAUFUSI, S. *et al.* Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. **Open forum infectious diseases**, 5, n. 8, p. ofy187-ofy187, 2018.

WOLF JULIE, M.; ESPADAS, J.; LUQUE-GARCIA, J.; REYNOLDS, T. *et al.* Lipid Biosynthetic Genes Affect *Candida albicans* Extracellular Vesicle Morphology, Cargo, and Immunostimulatory Properties. **Eukaryotic Cell**, 14, n. 8, p. 745-754, 2015/08/01 2015.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, 1, n. 1, p. 92-107, 2013.

ZAMITH-MIRANDA, D.; HEYMAN HEINO, M.; COUVILLION SNEHA, P.; CORDERO RADAMES, J. B. *et al.* Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. **mSystems**, 6, n. 4, p. e00822-00821, 2021.

ZAMITH-MIRANDA, D.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes and Infection**, 20, n. 9, p. 501-504, 2018/10/01/ 2018.

ZHANG, X.; DE MICHELI, M.; COLEMAN, S. T.; SANGLARD, D. *et al.* Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. **Molecular Microbiology**, 36, n. 3, p. 618-629, 2000/05/01 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01877.x>.

APÊNDICE

Apêndice A

Imagens: Mirror matches entre os espectros de MS/MS dos MS e espectros do banco de dados GNPS

Top: mzspect:GNPS:TASK-92af3c25e2d147c5af0e619b52bb0667-spectra/specs_ms.mgf:scan:5351

Precursor m/z : 716.5220 Charge: 1

Bottom: mzspect:GNPS:GNPS-LIBRARY:accession:CCMSLIB00003135479

Precursor m/z : 716.5230 Charge: 1

Cosine similarity = 0.8103

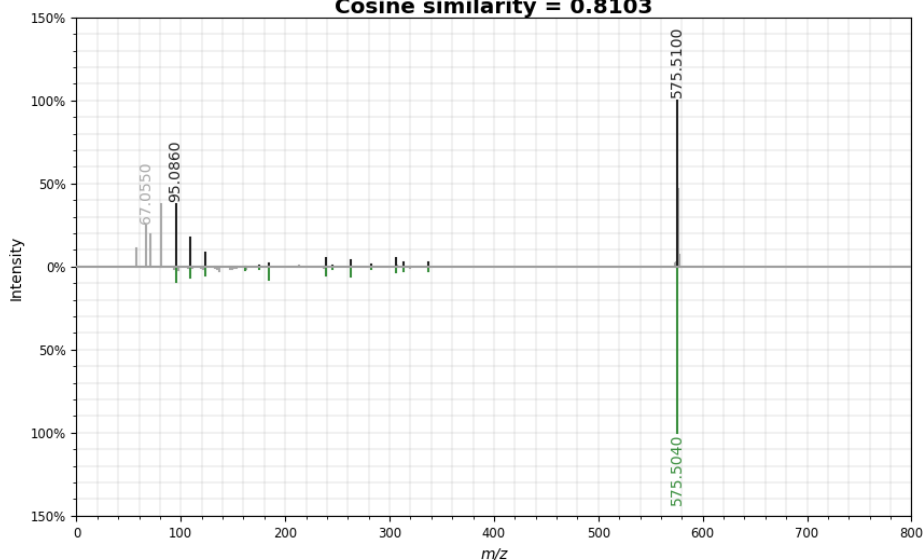


Figura S1 - Correspondência de MS/MS para 2-linoleoil-1-palmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina entre o banco de dados GNPS (verde) e o extrato de VEs de *C. albicans* (preto). **Fonte:** Produção do autor.

Precursor m/z : 610.5400 Charge: 1
Bottom: mzspec:GNPS:GNPS-LIBRARY:accession:CCMSLIB00006678259
Precursor m/z : 610.5400 Charge: 1
Cosine similarity = 0.8649

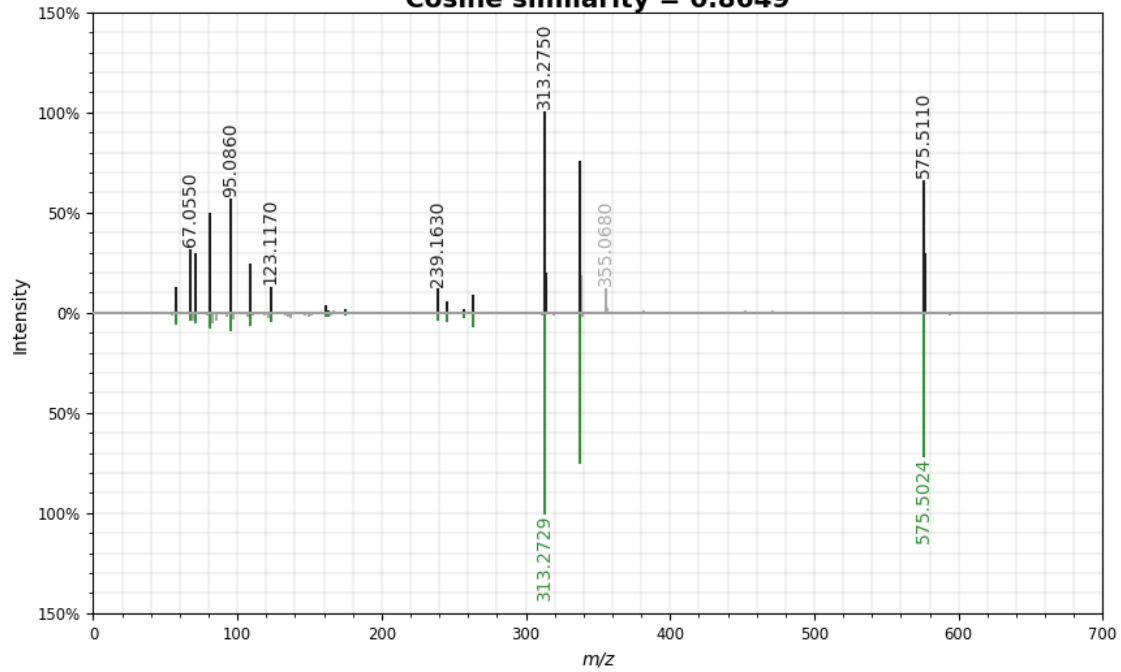


Figura S2 - Correspondência de MS/MS para 1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol entre o banco de dados GNPS (verde) e o extrato de VEs de *C. albicans* (preto). **Fonte:** Produção do autor.

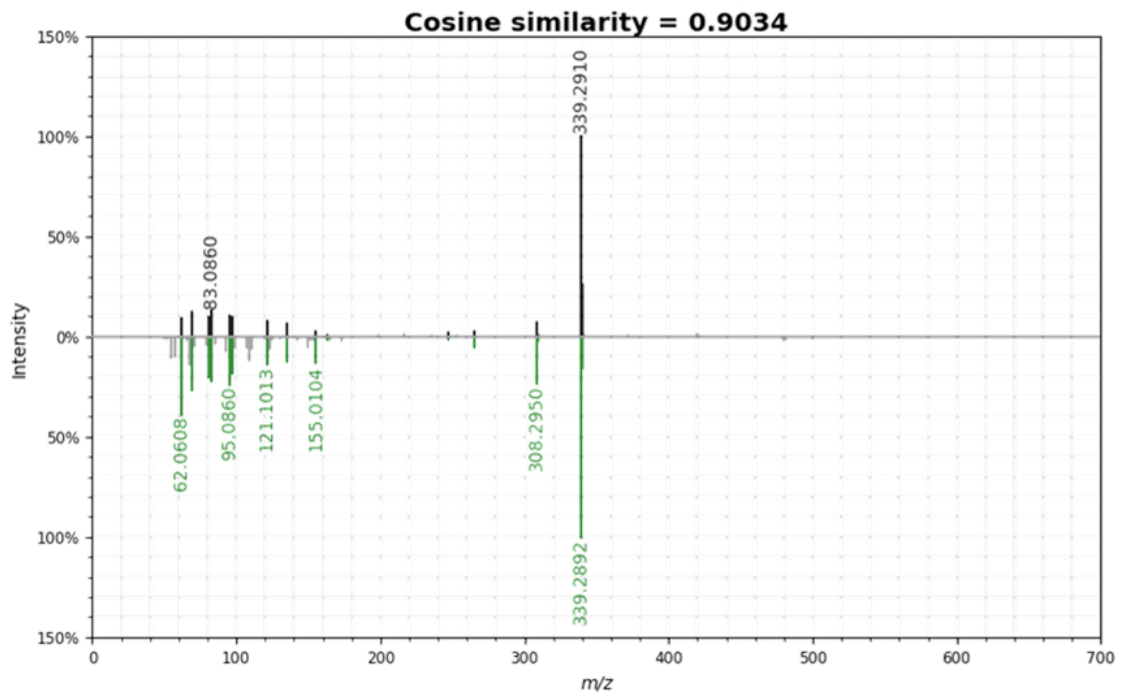


Figura S3 - Correspondência de MS/MS para 2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina entre o banco de dados GNPS (verde) e o extrato de VEs de *C. albicans* (preto).
Fonte: Produção do autor.

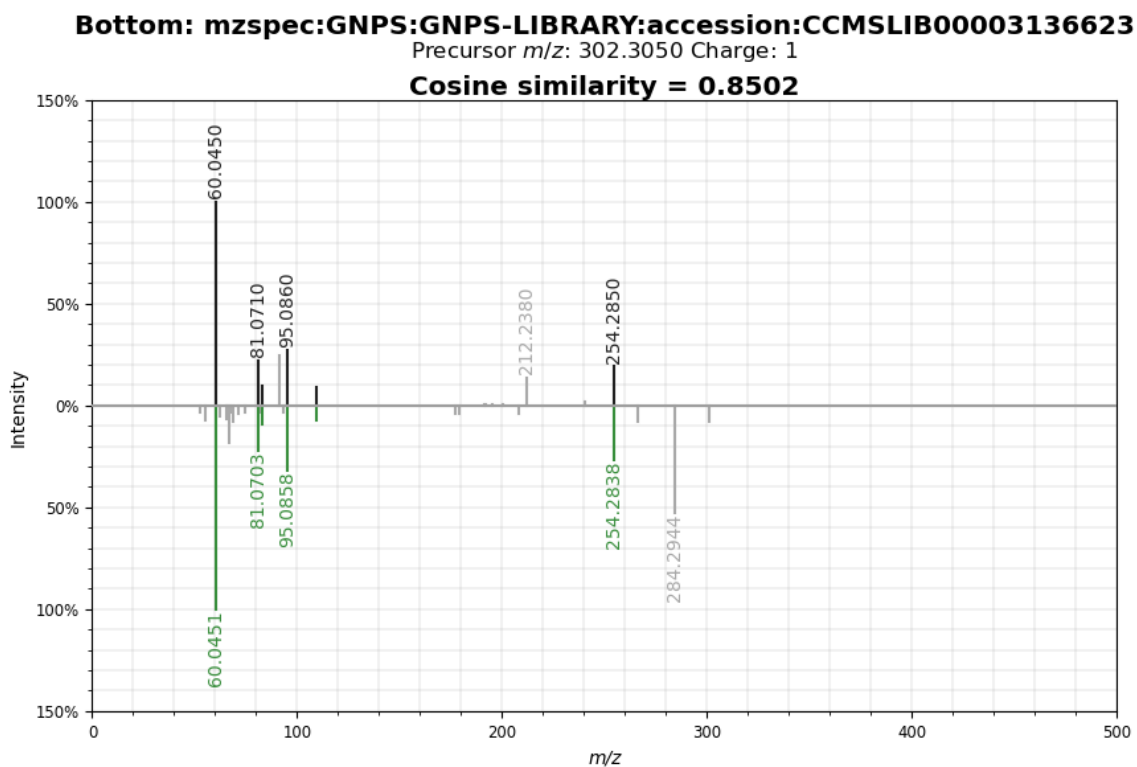


Figura S4 - Correspondência de MS/MS para diidroesfingosina entre o banco de dados GNPS (verde) e o extrato de VEs de *C. albicans* (preto). **Fonte:** Produção do autor.

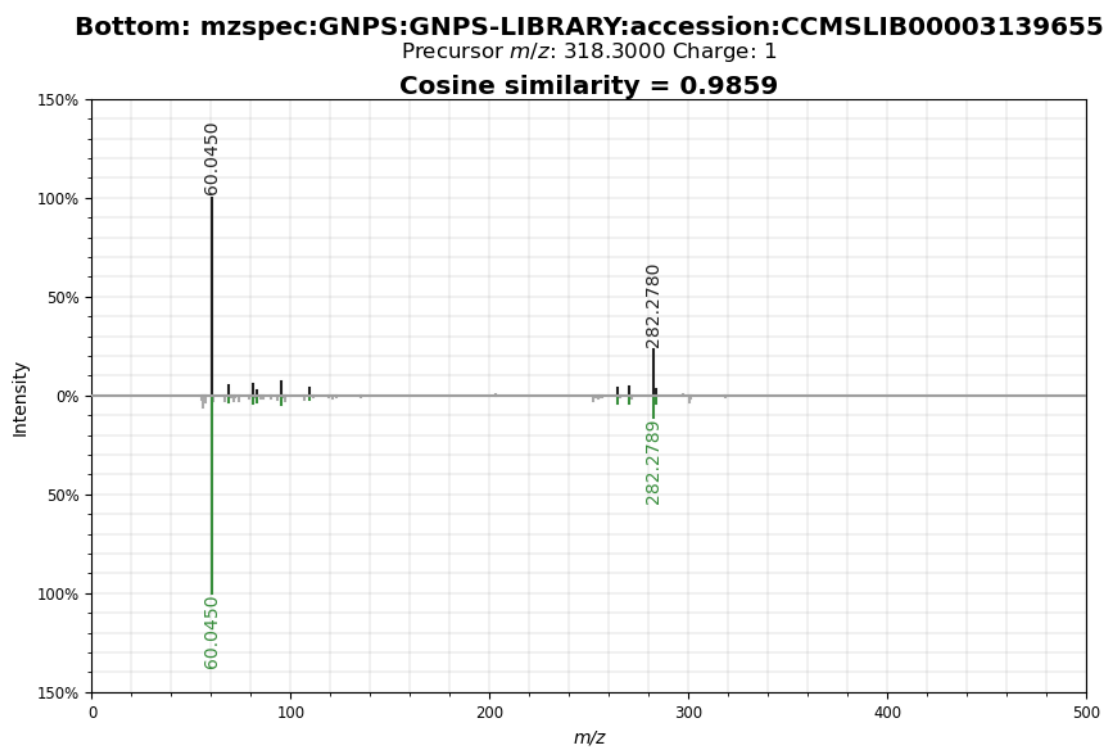


Figura S5 - Correspondência de MS/MS para fitoesfingosina entre o banco de dados GNPS (verde) e o extrato de VEs de *C. albicans* (preto). **Fonte:** Produção do autor.

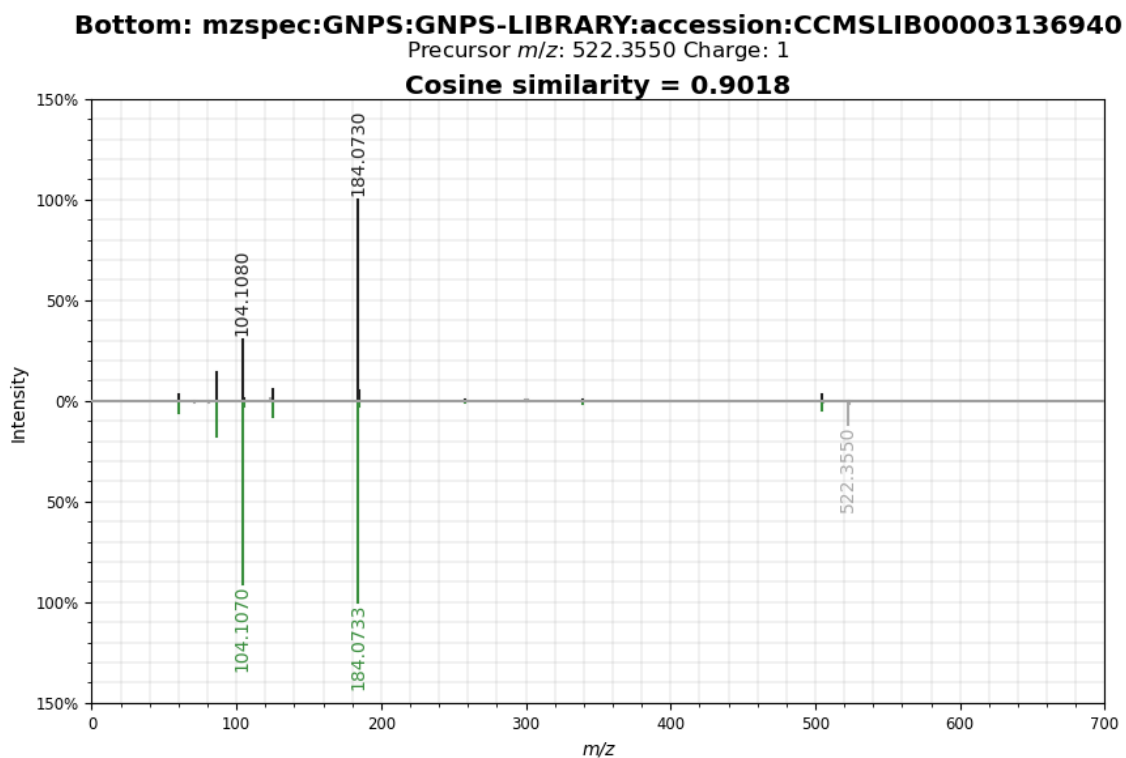


Figura S6 - Correspondência de MS/MS para 1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina entre o banco de dados GNPS (verde) e o extrato de VEs de *C. albicans* (preto). **Fonte:** Produção do autor.

Apêndice B

Imagens: Espectros de fragmentação do MS identificados.

taicia-14072021-VM-1mL-2 #5002 RT: 10.17 AV: 1 NL: 2.59E5
F: FTMS + p ESI d Full ms2 716.5209@hcd30.00 [5]

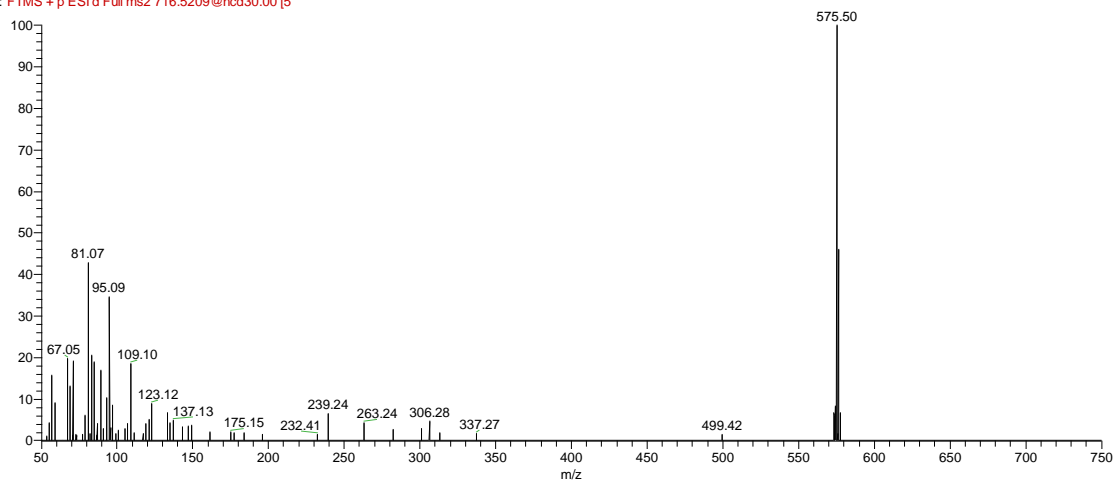


Figura A1 – Perfil de fragmentação para 2-linoleoil-1-palmitoil-glicerol-3-fosfoetanolamina. **Fonte:** Produção do autor.

taicia-14072021-VM-1mL-2 #8428 RT: 17.07 AV: 1 NL: 2.51E5
F: FTMS + p ESI d Full ms2 610.5399@hcd30.00 [5]

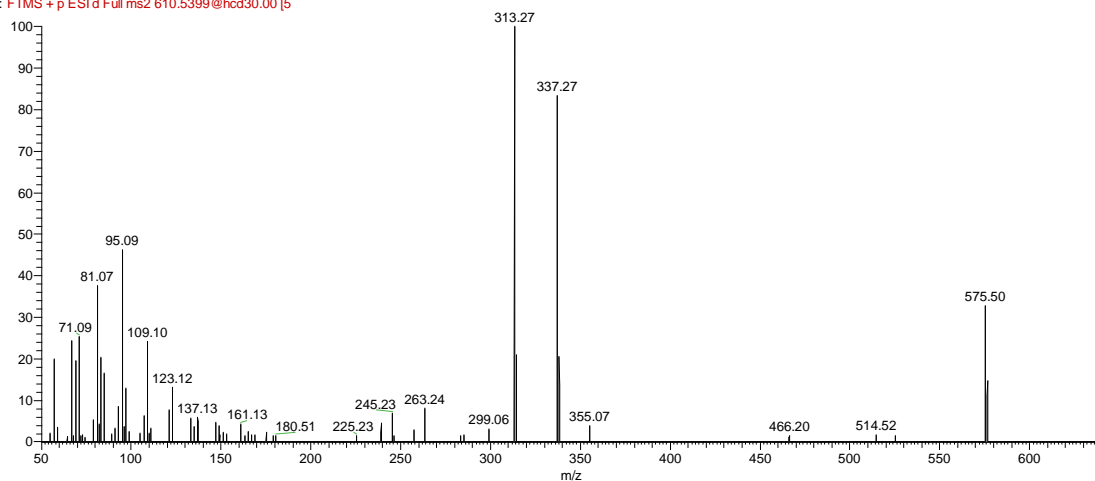


Figura A2 – Perfil de fragmentação para 1-palmitoil-2-linoleoil-glicerol. **Fonte:** Produção do autor.

taicia-14072021-vm-400ul-2 #4767 RT: 9.59 AV: 1 NL: 4.47E5
F: FTMS + p ESI d Full ms2 480.1570@hcd30.00 [5]

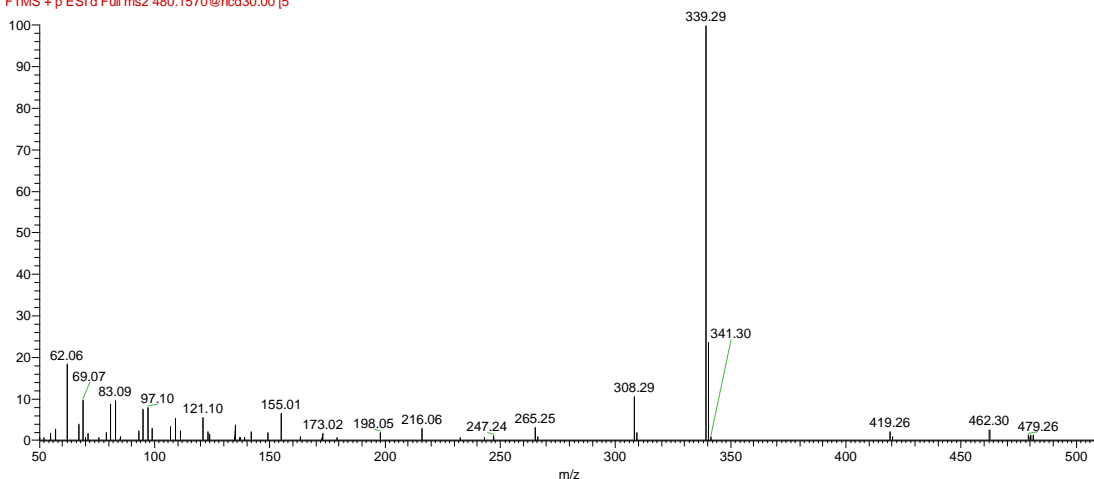


Figura A3 – Perfil de fragmentação para 2-oleoil-glicerol-3-fosfoetanolamina. **Fonte:** Produção do autor.

taicia-14072021-vmc-400ul-1 #3959 RT: 7.93 AV: 1 NL: 2.44E5
F: FTMS + p ESI d Full ms2 302.1442@hcd30.00 [5]

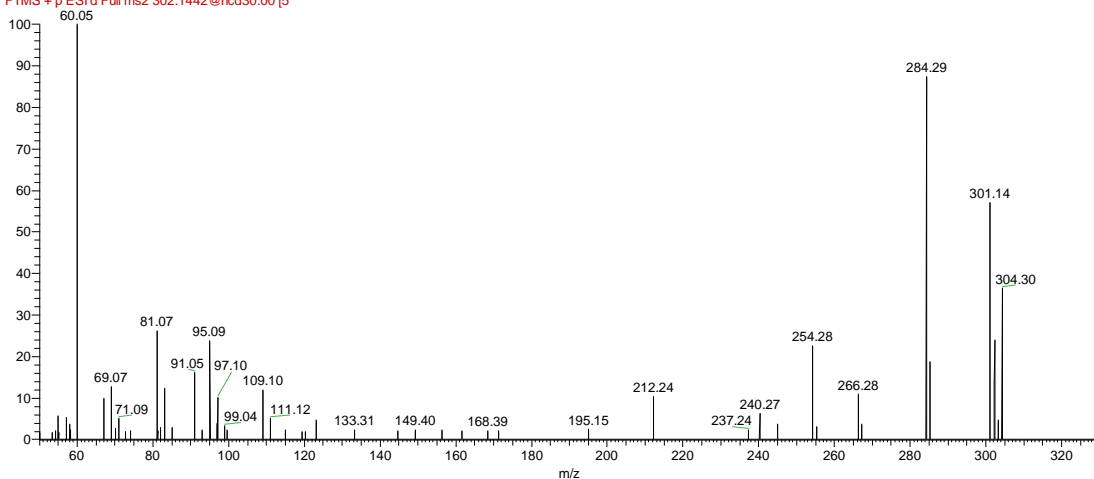


Figura A4 – Perfil de fragmentação para diidroesfingosina. **Fonte:** Produção do autor.

taicia-14072021-vm-400ul-1 #3726 RT: 7.45 AV: 1 NL: 2.68E5
F: FTMS + p ESI d Full ms2 318.3001 @hcd30.00 [5]

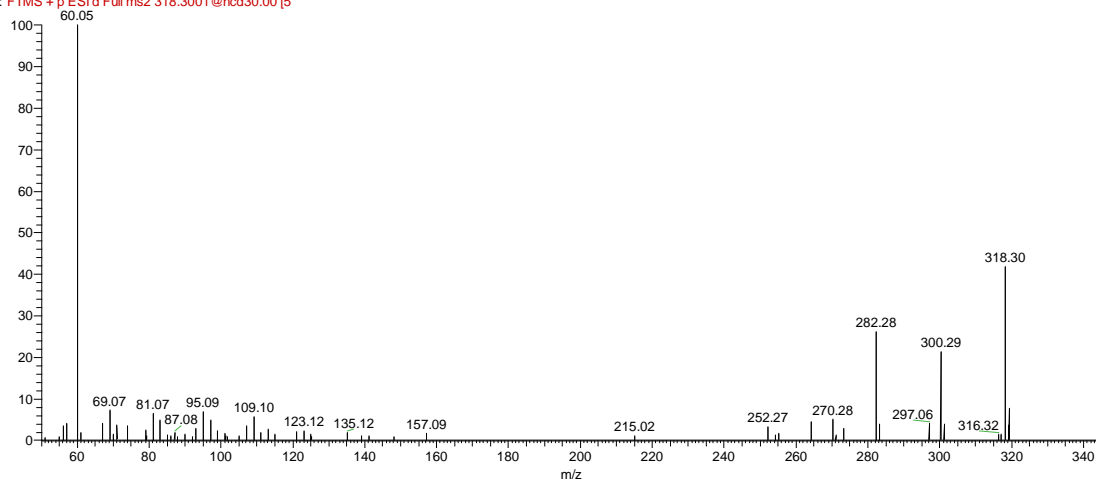


Figura A5 – Perfil de fragmentação para fitoesfingosina. **Fonte:** Produção do autor.

taicia-14072021-vm-400ul-2 #4976 RT: 10.11 AV: 1 NL: 4.87E6
F: FTMS + p ESI d Full ms2 522.3552 @hcd30.00 [5]

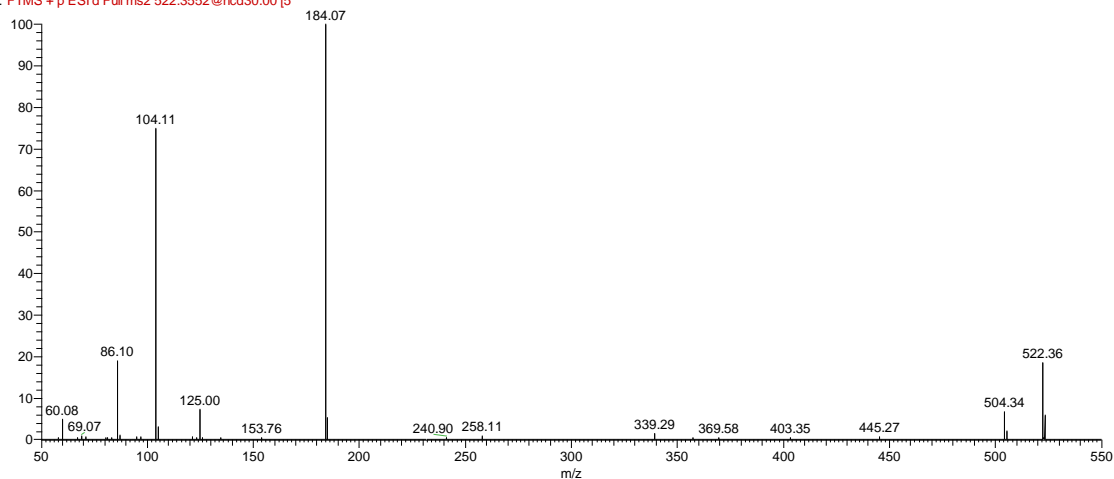


Figura A6 – Perfil de fragmentação para 1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina. **Fonte:** Produção do autor.

ANEXO

Anexo A

Artigos publicados

ALVES, G. S.; TRENTIN, G. E. S.; BIGNARDI, C.; MACHADO, C. D. S.; ANJOS, L. R.; KATATA, V. M.; GOI, B. E.; CARVALHO JÚNIOR, V. P.; **Método dos trezentos: estratégia para minimizar a retenção de estudantes no curso de Química.** Brazilian Journal of Development. v. 5, p. 33037-33046, 2019.

DOS SANTOS, T. A.; TRENTIN, G. E. S.; DE CARVALHO-JÚNIOR, V. P.; GOI, B. E.. **Minicurso de ciência forense e a relação teoria e prática na formação inicial: uma iniciativa do PET Química e Física.** Colloquium Humanarum, v. 17, p. 385-396, 2020.

ZAMITH-MIRANDA, D.; AMATUZZI, R. F.; MUNHOZ DA ROCHA, I. F.; MARTINS, S. T., LUCENA, A. C. R.; VIEIRA, A. Z.; TRENTIN, G.; ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; NOSANCHUK, J. D.; ALVES, L. R.. **Transcriptional and translational landscape of *Candida auris* in response to caspofungin.** Computational and Structural Biotechnology Journal, 19, p. 5264-5277, 2021.

BITENCOURT, T. A.; HATANAKA, O.; PESSONI, A. M.; FREITAS, M. S.; TRENTIN, G.; SANTOS, P.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ALVES, L. R.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L.; ALMEIDA, F.. **Fungal Extracellular Vesicles Are Involved in Intraspecies Intracellular Communication.** mBio, January/February 2022, Volume 13, Issue 1. e03272-21.

Método dos trezentos: estratégia para minimizar a retenção de estudantes no curso de Química**300 Method: strategy to minimize the Chemistry students' retention**

DOI:10.34117/bjdv5n12-358

Recebimento dos originais: 27/11/2019

Aceitação para publicação: 27/12/2019

Gabriela Souza Alves

Graduanda em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: gabrielasouza833@gmail.com

Gabriel Ernesto Silva Trentin

Graduado em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: gabriel.es.trentin12@gmail.com

Camila Bignardi

Graduanda em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: milabignardi@msn.com

Caroline Dantas Simões Machado

Graduanda em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: caah.dsm98@gmail.com

Luana Ribeiro dos Anjos

Graduanda em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: lu.ranjos@hotmail.com

Victoria Midori Katata

Graduanda em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: vickatata@hotmail.com

Beatriz Eleutério Goi

Doutora em Físico-Química pelo Instituto de Química de São Carlos – USP
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP

Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: beatriz.goi@unesp.br

Valdemiro Pereira de Carvalho Júnior

Doutor em Ciências: Química Inorgânica – Instituto de Química de São Carlos - USP.
Instituição: Faculdade de Ciência e Tecnologia - UNESP
Endereço: R. Roberto Símonsens, 305 - Centro Educacional, Pres. Prudente - SP, Brasil
E-mail: valdemiro.carvalho@unesp.br

RESUMO

Diversos fatores são responsáveis pelo baixo índice de concluintes nos cursos de Química. Entre eles pode-se elencar, a falta de conceitos básicos prévios, a pouca relação entre o conteúdo ensinado e a prática no mercado de trabalho, a insistência ineficiente no modelo tradicional de ensino, ansiedade, entre outros. Contudo, um dos aspectos relevantes e pouco explorado estão relacionados a forma de avaliação da aprendizagem e o quanto a mesma influencia no crescimento do estudante. Estratégias para evitar a retenção e a consequente evasão dos cursos da área de exatas foram desenvolvidas, como, por exemplo, o Método dos Trezentos. Neste trabalho, o Método dos Trezentos foi aplicado nas turmas de Química Fundamental I e II do curso de Licenciatura em Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) como ferramenta para minimizar a retenção dos estudantes.

Palavras-chave: Retenção. Colaboração. Método Avaliativo.

ABSTRACT

A several factors are responsible for the low graduation rate in Chemistry courses. Such as the lack of sufficient prior concepts, the poor relationship between what is taught and the job market, the inefficient insistence on the traditional teaching model, anxiety, among others. However, a very important and little explored aspect is related to the evaluation methods of learning used and how much it influences in the student growth. Strategies to avoid the retention and consequent evasion of accurate areas courses has been developed, for example, the Three Hundred Method. This paper deals with a learning method, which was applied in the Fundamental Chemistry I and II classes and analyzed as a tool to minimize the Chemistry students' retention of the Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Keywords: Retention. Collaboration. Evaluation method.

1. INTRODUÇÃO

A competitividade, inerente aos exames vestibulares nos meses finais do Ensino Médio gera conflitos emocionais que conduzem os concluintes ao estresse. A pressão exercida pela responsabilidade da escolha da profissão ocasiona crises de ansiedade (D'AVILLA. *et al*, 2003). A ansiedade pode ser definida como estado emocional que está relacionado em previsões que podem levar o indivíduo a alguma ameaça, seja ela real ou não, podendo

envolver situações futuras (CASTILLO. et al,2000). Este estresse persiste após o ingresso na vida acadêmica e é observado a tempos. (AGOLLA. et al, 2009)

Ao ingressar na universidade, os estudantes se deparam com uma realidade diferente do Ensino Médio. A complexidade do meio acadêmico pode ser difícil, atribuindo cargas extras de responsabilidades e horas a mais de estudos. Tais fatores contribuem para a potencialização da ansiedade. Em decorrência deste evento, o nervosismo pode, também, ser intensificados durante as notórias avaliações semestrais, influenciando significativamente o desempenho do aluno. (LANTYER. et al,2016)

A educação tradicional aborda provas, exames, testes e concursos que se baseiam em métodos avaliativos que têm como objetivo não só verificar os conhecimentos adquiridos, mas também classificar os indivíduos, como melhores e/ou piores dentro de uma turma (MIZUKAMI., 1986). Assim, ao longo dos anos, o estudante na universidade é submetido a situações que o colocam sob pressão psicológica, e, muitas vezes, pode desencadear crises de ansiedade. De acordo com Luckesi a avaliação passa a ser:

[...] um ato de investigar a qualidade daquilo que constitui seu objeto de estudo e, por isso mesmo, retrata a sua qualidade. Desse modo, ela não soluciona nada, mas sim subsidia as decisões sobre atos pedagógicos e administrativos na perspectiva da eficiência dos resultados desejados. (LUCKESI 2011, p. 13)

Em cursos da área de exatas, os elevados índices de retenção são comuns devido à sua complexidade. Entretanto, a falta de educação básica, aliada as crises de ansiedade, conduzem os ingressantes a desempenhos insatisfatórios durante os períodos de avaliação. Tendo em vista as crescentes taxas de reprova nesta área, o docente dos cursos de Engenharia da Universidade de Brasília, Prof. Dr. Ricardo R. Fragelli, desenvolveu uma metodologia de aprendizagem colaborativa chamada Método dos Trezentos.

Baseado no filme norte-americano 300, o Método utiliza o princípio básico da cooperação. Os guerreiros mais velhos e experientes em guerras auxiliavam no ensino dos combatentes iniciantes. Redirecionado para a sala de aula, o Método surgiu para aliviar o estresse, tensão e ansiedade que antecedem as avaliações semestrais, quebrando o individualismo e fomentando a união dos estudantes. Além de melhorar o desempenho acadêmico, o Método dos Trezentos visa contribuir, também, para uma aprendizagem significativa e humanizada, na qual o estudante perceba sua importância como um integrante

ativo do grupo, aprimorando, assim, a autoestima e refletindo sobre o seu próprio percurso na aprendizagem. (FRAGELLI 2015 p.860-872)

Seguindo esse conceito, o Grupo PET Química e Física decidiu aplicar/adaptar o Método dos Trezentos no curso de Licenciatura em Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, especificamente nas disciplinas de Química Fundamental I e II, ministradas durante o primeiro ano do curso. Nesse contexto, os objetivos gerais deste trabalho são de apresentar os dados obtidos após a aplicação do Método, verificar se a utilização de uma metodologia recente, baseada em aprendizagem ativa e colaborativa, é capaz de aumentar o nível de confiança dos estudantes durante as avaliações e frear os índices de evasão e retenção do curso.

2. METODOLOGIA

Após a primeira avaliação, os PETianos separaram os alunos em grupos de acordo com a nota obtida. Aqueles estudantes que obtiveram rendimentos acima da média foram denominados líder/ajudantes e os outros que tiveram rendimento abaixo da média, chamados de ajudados. Os ajudantes tinham a função de auxiliar os demais integrantes do grupo durante as atividades, incentivando-os ao estudo e auxiliando na resolução de exercícios. Como incentivo, os ajudantes melhoram suas notas iniciais de acordo com a melhora do desempenho dos estudantes ajudados e com o nível e qualidade da ajuda oferecida ao grupo. (FRAGELLI et al, 2013)

As atividades foram realizadas da seguinte forma:

- I. Dois encontros semanais com 1 hora de duração foram realizados com os integrantes de cada grupo;
- II. Listas de exercícios, elaboradas pelo Grupo PET Química e Física, foram entregues aos grupos para resolução;
- III. Um questionário de acordo com uma escala de Likert de cinco pontos variando de 1 (ajudou pouco) a 5 (ajudou muito) foi aplicado e, de acordo com nível de ajuda e melhora do ajudado é atribuída a nota do ajudante (Tabela 1);
 - a. Proatividade: O líder apresenta iniciativa?
 - b. Interesse: O líder é dedicado em ajudar?
 - c. Organização: O líder é organizado nas matérias?
 - d. Flexibilidade: O líder e o grupo conseguiram se adaptar ao novo método?
 - e. Sociabilidade: O líder e o grupo tiveram uma boa interação?

- f. Liderança: O líder foi capaz de ajudar?
- g. Disponibilidade: O líder estava disposto a ajudar quando precisasse?
- h. Eficiência: O líder apresentou bons resultados em grupo?
- i. Trabalho em equipe: O líder soube trabalhar em grupo?
- j. Decisões: O líder soube lidar com dificuldades e questões em grupo?

IV. No questionário também foi inserida a seguinte questão: Conte um pouco sobre como esse projeto ajudou ou não no seu desenvolvimento acadêmico.

V. Cada PETiano ficou responsável por um grupo, como tutor, para auxiliar nas possíveis dúvidas que o ajudante não soubesse resolver.

Tabela 1. Aumento da nota do aluno ajudante segundo o nível de ajuda oferecido e a melhora no rendimento do aluno ajudado.

	Melhora do estudante ajudado/Nível de ajuda				
	1	2	3	4	5
Melhora de 0 a 1	0,00	0,25	0,25	0,50	0,50
Melhora maior que 1 para uma nota final inferior a 4	0,00	0,25	0,25	0,50	0,50
Melhora maior que 1 para uma nota final inferior a 4	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Melhora para uma nota final igual ou superior a 5	0,00	0,25	0,50	1,00	1,50

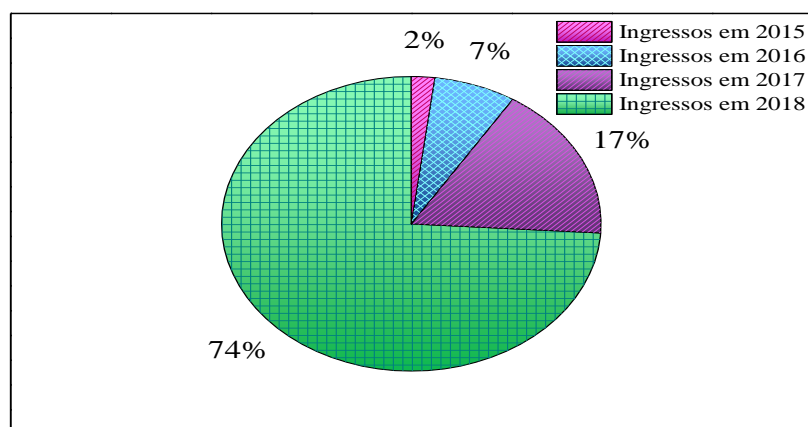
Fonte: Adaptado. (FRAGELLI 2013)

Foram realizadas duas provas na turma de Química Fundamental I. Após as notas da primeira prova, foram selecionados os ajudantes e divididos os grupos, na qual seriam distribuídos para um ou dois PETianos. Em Química Fundamental II foram realizadas quatro provas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia foi aplicada para uma turma de 44 alunos, no qual era composta de ingressantes dos anos de 2015 a 2018, onde 26% dos alunos eram de turmas anteriores, enquanto a composição majoritária (74%) era de alunos ingressantes (Figura 1).

Figura 1: Perfil da turma de Química Fundamental I no primeiro semestre do ano de 2018.



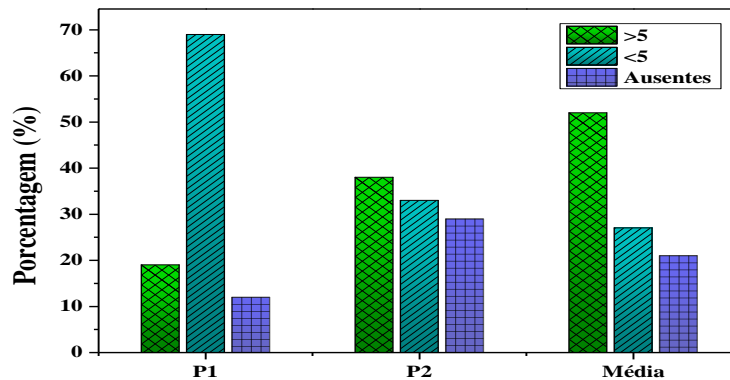
Fonte: Autoria própria (2019)

Após a formação dos grupos, as reuniões entre os alunos foram lideradas pelo líder/ajudante e mediadas pelo PETiano. Nestas reuniões ocorreram discussões a respeito dos conteúdos envolvidos e ministrados em sala de aula, bem como a resolução das listas de exercícios. Durante as reuniões notou-se uma interação/troca de informações entre os alunos. Cabe ressaltar que o papel de esclarecer dúvidas não se restringiu somente aos ajudantes, os membros do grupo que demonstravam domínio do conteúdo abordado também ajudavam uns aos outros.

Analisando os dados apresentados na Figura 2, pode-se observar que antes da aplicação Método dos Trezentos, pós primeira prova (P1), houve baixo índice de notas $\geq 5,0$, correspondendo a apenas 19%, enquanto que as notas $< 5,0$ corresponderam a 69%. A partir desses dados, sete grupos com uma média de 4 alunos foram criados de acordo com a metodologia proposta. É válido ressaltar que a média na universidade para ser aprovado na disciplina é 5. Após a aplicação do Método, foi observado que os alunos com nota $\geq 5,0$ dobraram, aumentando de 19% para 38% na turma, enquanto que o número de alunos com rendimento insatisfatório, abaixo da média da universidade, diminuiu de 69% para 33% com um aumento de ausentes nesta avaliação.

Ao analisarmos os rendimentos dos alunos na disciplina de Química Fundamental I, foi observado que o método contribuiu para a diminuição do índice de retenção da turma. Tendo em vista os coeficientes de rendimento anterior e posterior à aplicação do método os resultados indicaram uma aprovação final de 52% da turma

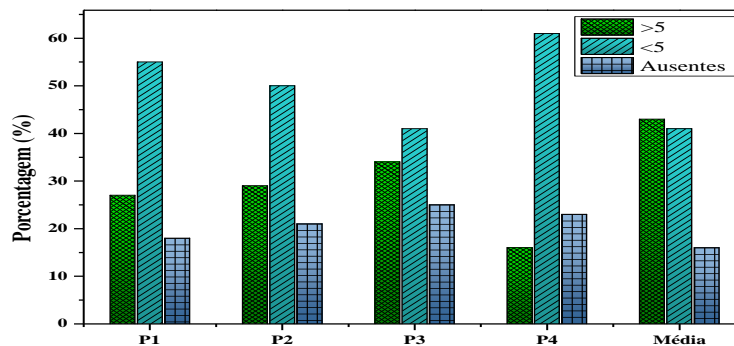
Figura 2: Dados das avaliações antes e depois da aplicação do método dos trezentos.



Fonte: Autoria própria (2019)

No segundo semestre de 2018, o Método dos Trezentos foi novamente aplicado em uma turma de 44 alunos da disciplina de Química Fundamental II. Neste caso, quatro avaliações foram realizadas, e 10 grupos foram formados. Na primeira avaliação, a porcentagem de alunos que obtiveram nota $< 5,0$ foi de 55% (Figura 3), contrastando com 27% dos alunos que alcançaram notas $\geq 5,0$. Já na segunda avaliação, os dados mostram melhora discreta após a aplicação do Método. Após a terceira avaliação, a taxa de rendimento da turma continuou a crescer, aumentando de 27% para 34% em relação a primeira avaliação. No entanto, a porcentagem das notas $\geq 5,0$ diminuiu na quarta avaliação, apresentando comportamento atípico. Com base nas médias finais, podemos observar que a taxa de aprovação da turma estava em 43%.

Figura 3: Dados das avaliações antes e depois da aplicação do método dos trezentos.



Fonte: Autoria própria (2019)

Com isso, faz-se necessário avaliar a efetividade do Método em auxiliar o desenvolvimento dos estudantes durante as disciplinas. Com o auxílio de um questionário, conforme descrito na metodologia, perguntou-se por meio de uma questão aberta a opinião destes sobre o Método. Apresentando abaixo alguns depoimentos:

De acordo com alguns alunos o projeto foi satisfatório, auxiliando-os nos momentos de dificuldades em relação ao conteúdo e aos exercícios, promovendo uma maior interação entre eles, bem como uma maior liberdade para fazer perguntas e tirar as dúvidas o que contribui para aumentar sua autoestima.

“O projeto foi muito eficiente, retirar as dúvidas e poder falar que não entendeu algo ou não conseguiu fazer com alguém mais próximo é melhor. As listas foram um bom método, acredito que o projeto ajudará bastante.”

“O projeto me ajudou a entender melhor alguns assuntos e me dar mais animo em relação ao curso. A distribuição dos horários ainda é algo discutível, mas a iniciativa é ótima.”

“O método traz um aspecto de grupo de estudos muito bom para um caráter de socialização, trabalhar com outras pessoas e veteranos ajuda e incentiva no curso, ter alguém disponível para dúvidas no período de tempo que o projeto acontece também é vantajoso para os estudos, é um bom meio de integração a faculdade.”

Além disso, como o método dos trezentos tem por objetivo diminuir a individualidade e despertar um olhar de empatia para o outro, com isso o líder (ajudante) pode provocar o interesse do colega que está tendo dificuldades de aprendizagem a respeito do conteúdo durante a disciplina.

“Como líder do grupo consegui ter uma noção e experiência em como será ajudar alunos com dúvidas, para quando estiver exercendo a atividade de docente. ”

A avaliação sobre o Método aplicado foi satisfatória pois além de auxiliar os alunos nos estudos da disciplina, proporcionou novas experiências para os estudantes e para os PETianos. E não pode-se deixar de elencar a participação dos docentes responsáveis pelas disciplinas a Profa. Dra. Ana Maria Pires e o Prof. Dr. Sérgio Antônio Marques de Lima, que se mostraram empenhados em auxiliar na aplicação do Método.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, os resultados indicaram que o Método dos Trezentos contribuiu para a diminuição dos índices de retenção das turmas de Química Fundamental I e II, quando faz-se a comparação dos rendimentos dos alunos antes e depois do Método ser aplicado, se tornando uma ferramenta importante de auxílio ao ensino. O método destaca-se como um meio de interação, ajudando os alunos a construir suas relações interpessoais com os colegas de turma, levando-os a ampliar o seu olhar para com as dificuldades dos outros. Observando, que desta forma, o graduando não precisa de muito para conseguir auxiliar seus colegas a superarem os desafios apresentados pela graduação como um todo.

REFERÊNCIAS

- D'ÁVILA, G.T.; Vestibulares: Fatores Geradores de Ansiedade na "Cena da Prova". Revista Brasileira de Orientação Profissional, 2003, 4 (1/2), pp. 105-116.
- CASTILLO, A.R.G.L. *et al*; Transtornos de ansiedade. Revista Brasileira de Psiquiatria, 2000;22(Supl II):20-3.
- AGOLLA, J.E. *et al*; An assessment of academic stress among undergraduate students: The case of University of Botswana. Educational Research and Review, Vol. 4 (2), pp. 063-070, February 2009.
- LANTYER, A. da S. *et al*; Ansiedade e Qualidade de Vida entre Estudantes Universitários Ingressantes: Avaliação e Intervenção. Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva, Volume XVIII no 2, 4-19.
- MIZUKAMI, M.G.N. Ensino: as abordagens do processo. São Paulo: EPU, 1986.
- FRAGELLI, R. R.; Trezentos: Aprendizagem ativa e colaborativa como uma alternativa ao problema da ansiedade em provas. Revista Eletrônica Gestão & Saúde, Brasília, v. 6, p.860-872, abr. 2015.
- FRAGELLI, R.R.; SANTOS, L.S.F.; NUNES, A.P.C.P.; DINIZ, A.C. Avaliação Humanizada: Estudo sobre Ansiedade em Estudantes do Primeiro ano de Engenharia em Avaliações Escritas. In: Fifth International Symposium on Project Approaches in Engineering Education PAEE 2013, 2013, Eindhoven. Proceedings of the Fifth International Symposium on Project Approaches in Engineering Education PAEE 2013. Guimarães: Universidade do Minho, 2013. v. 1. p. ID93.1-ID93.8, 2013.

KARINO, C.A. Avaliação do Efeito da Ansiedade no Desempenho em Provas. 2010. xvii, 156 f., il. Dissertação (Mestrado em Psicologia Social, do Trabalho e das Organizações)- Universidade de Brasília, Brasília, 2010

BZUNECK, J.A.B., & Silva, R. O problema da ansiedade nas provas: perspectivas contemporâneas. *Semina*, v. 10, 1989.

AUSUBEL, D.P. *Educational psychology: a cognitive view*. Nova York: Holt, Rinehart and Winston, 1968.

COSTA, K. M. V. et al. Ansiedade em Universitários na área da saúde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE, 2., 2017, Campina Grande. Campina Grande: Conbracis, 2017. p. 1 - 10.

LUCKESI, C. C. *Avaliação da aprendizagem: componente do ato pedagógico*. São Paulo: Cortez, 2011.

KARINO, C. A.; LAROS, J. A. Ansiedade em situações de prova: evidências de validade de duas escalas. *Psico-USF*, Itatiba, v. 19, n. 1, p. 23-36, Apr. 2014.



MINICURSO DE CIÊNCIA FORENSE E A RELAÇÃO TEORIA E PRÁTICA NA FORMAÇÃO INICIAL: UMA INICIATIVA DO PET QUÍMICA E FÍSICA

Taís Andrade dos Santos¹, Gabriel Ernesto Silva Trentin², Valdemiro Pereira de Carvalho-Júnior³, Beatriz Eleutério Goi⁴

¹Doutoranda no Programa de Pós- Graduação em Educação para a Ciência pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Bauru, São Paulo. Colaboradora do Grupo PET Química e Física. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-0128-0713>. E-mail: tais.andrade@unesp.br

²Mestrando no Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. E-mail: gabriel.trentin@usp.br

³Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo - USP. Docente da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Presidente Prudente, São Paulo. Tutor do Programa de Educação Tutorial – Grupo PET Química e Física ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8843-2841>. E-mail: valdemiro.carvalho@unesp.br

⁴Doutora em Ciências pela Universidade de São Paulo - USP. Docente da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Presidente Prudente, São Paulo. ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4369-7824>. E-mail: beatriz.goi@unesp.br

RESUMO

O trabalho estuda o ambiente formativo intrínseco a experiência de um laboratório didático itinerante com a temática forense para licenciandos em Química e Física pertencentes ao Grupo PET Química e Física. O minicurso de ciência forense propicia aos licenciandos a experiência da docência em ambiente escolar além dos estágios supervisionados obrigatórios da graduação. De modo qualitativo, por meio de pesquisa documental e a luz de Contreras (2002) e Pimenta (1995), os resultados foram obtidos por meio da reflexão sobre as atividades que compõem a prática do minicurso e que interferem diretamente na construção do perfil formativo docente devido a sua estreita ligação teoria e prática. Essa atividade trabalha o potencial reflexivo dos discentes e contribui para que o futuro professor compreenda múltiplas situações educacionais.

Palavras-chave: Formação de professores. Laboratório Didático Itinerante. Ensino-Pesquisa-Extensão.

FORENSIC SCIENCE MINI-COURSE AND THE THEORY-PRACTICE RELATIONSHIP IN INITIAL TEACHER TRAINING: A PET CHEMICAL AND PHYSICAL INITIATIVE

ABSTRACT

This paper aims to detail in the intrinsic formative environment the experience of an itinerant educational laboratory with the forensic theme for undergraduate students in Chemistry and Physics belonging to the Grupo PET Química e Física. The short course aims to provide Licensee with teaching experience in a school environment in addition to the mandatory supervised undergraduate internships. Qualitatively, through documentary research Contreras (2002) and Pimenta (1995), the results were obtained from a reflection on the activities that integrate the practice of the short course and that directly interfere in the construction of the teacher training profile due to its close connection theory and practice. This activity was structured works on the students' reflective potential and contributes to the future teacher understanding the multiple educational situations.

Keywords: Teacher training. Teaching Laboratory. Teaching Research and Extension.

MINICURSO DE LAS CIENCIAS FORENSES Y LA RELACIÓN DE TEORÍA-PRÁCTICA EN LA CAPACITACIÓN INICIAL: UNA INICIATIVA PET QUÍMICA Y FÍSICA

RESUMEN

Este trabalho tem como objetivo detalhar o entorno formativo intrínseco da experiência de um laboratório didático itinerante com a temática forense para estudantes de graduação em Química e Física pertencentes ao Grupo PET Química e Física. O curso curto tem como objetivo proporcionar ao licenciado a experiência de ensinar em um entorno escolar além das pasantias supervisionadas obrigatórias de graduação. Qualitativamente, a partir da investigação documental e Luz de Contreras (2002) e Pimenta (1995), os resultados foram obtidos através da reflexão sobre as atividades que compõem a prática do curso curto e que interferem diretamente na construção do perfil de formação docente por sua estreita vinculação teórica e prática. Esta atividade trabalha com o potencial reflexivo dos estudantes e contribui para que o futuro docente compreenda múltiplas situações educacionais.

Palavras chave: Formação docente. Laboratório docente. Investigação e extensão docente.

INTRODUÇÃO

Formar o professor para que exerça sua atividade profissional com autonomia é algo complexo. E se de um lado, o profissional professor não termina a sua formação na licenciatura, por outro é necessário discutir os espaços de formação extracurriculares dentro da formação inicial, visto que esses espaços oportunizam uma vivência diversificada.

Dentro da universidade, essas atividades extracurriculares podem ser enquadradas como atividades de ensino, pesquisa e extensão. Posto que, atividades extensionistas são um dos caminhos para se desenvolver uma formação acadêmica completa, que integre teoria e prática em uma comunicação com a sociedade e possibilite uma troca de saberes entre ambos. Através dessa ação, a socialização e a construção de novos conhecimentos ocorrem de maneira sinérgica (MACHUR; SURIANI; CUNHA, 2013, p. 334).

As práticas didáticas, ainda na formação do professor, exercem o papel de integração do conteúdo específico, teorias pedagógicas e práticas reflexivas, ao ponto de ser necessário compreender que o espaço de formação deve ser uma “[...] ação educativa intencional e sistemática objetiva dotar o sujeito de um conjunto de recursos teóricos e práticos requeridos pela sua condição humana, conforme dada sociedade concreta” (SILVA, 2017, p. 133).

Comumente as atividades reflexivas e de inserção dos licenciandos na escola básica ficam por conta do estágio supervisionado, onde “[...] são vivenciadas experiências docentes de forma integrada e participativa, nas quais o estudante assume responsabilidade pela turma, desenvolvendo atividades de docência adquiridas

durante o curso” (ROSA; WEIGERT; SOUZA, 2012, p. 683).

O movimento reflexivo de junção entre a teoria e a prática na constituição do profissional se torna imprescindível para que esse sujeito tenha uma noção global da profissão e não relacione a atividade docente apenas a sua execução, pois concorda-se com Valério (2017, p. 327) que “[...] docência não permite segregar “elaboração e aplicação”, “teoria e prática”, mas obriga reuni-las e revelá-las diretamente no contexto humano e social em que o fenômeno educativo acontece.”

Partindo deste pressuposto, o grupo do Programa de Educação Tutorial (PET) Química e Física, através de suas atribuições, realiza um minicurso de Ciência Forense itinerante em escolas do sistema público e privado. O minicurso possui duplo objetivo: de fornecer aos alunos do ensino médio uma prática didática diversificada da tradicional com uma experimentação investigativa e, aos licenciandos bolsistas do grupo PET, um espaço formativo além do estágio supervisionado obrigatório, trazendo ao licenciando contato com as mais diversas realidades. Além disso, essa atividade também é ofertada aos alunos ingressantes dos cursos de Química e de Física. O grupo PET Química e Física é formado por 12 bolsistas licenciandos dos cursos de Química e de Física, sob supervisão de um tutor.

Realizado desde 2015, o minicurso abrange a tríade Ensino, Pesquisa e Extensão, através da pesquisa em educação. Com a criação do minicurso, os alunos dos cursos de licenciatura em Química e em Física vivenciariam uma formação diferenciada, participando de pesquisa e total imersão em estudos sobre dificuldades e

referenciais para a preparação dos futuros professores de forma a ser imprescindível que:

Por meio da vivência da realidade do ensino de Ciências, o licenciando pode compreender as concepções que orientam as práticas pedagógicas, identificar suas mazelas e pensar em alternativas capazes de proporcionar uma melhoria da qualidade do ensino de Ciências quando ele estiver praticando a docência. Para isso, também é preciso que o licenciando realize uma reflexão sobre o que ele vivência durante seu processo de formação; seus anseios, angústias e incertezas (GÜLLICH; HERMEL, 2013, p. 26).

O minicurso foi elaborado para ser aplicado para turmas do segundo e terceiro ano do Ensino Médio, e para se adequar à realidade das escolas que receberiam o projeto, possibilitando a aplicação da prática experimental sem a necessidade da estrutura física do laboratório.

Na aprendizagem da disciplina de Ciências, as atividades experimentais devem ser garantidas de maneira a evitar que a relação teoria – prática seja transformada numa dicotomia. As experiências despertam em geral um grande interesse nos alunos, além de propiciar uma situação de investigação. Quando planejadas levando em conta estes fatores, elas constituem momentos particularmente ricos no processo de ensino aprendizagem. (SOUZA, 2013, p. 12).

Com a temática forense, o grupo pretende chamar a atenção dos alunos para a aplicabilidade, inserção e importância da ciência na vida cotidiana, além de trazer aspectos ligados a natureza e os conteúdos dessas ciências. “Por

se caracterizar como uma área com temas transversais, a ciência forense pode propiciar a oportunidade de desenvolver atividades interdisciplinares no processo de ensino-aprendizagem” (CRUZ; RIBEIRO; LONGHINOTTI; MAZZETO, 2016, p. 167), no caso do projeto delineado aqui, essa intersecção é feita entre as disciplinas de Química e de Física.

Considerando que “[...] as reações químicas constituem importantes ferramentas utilizadas no campo das ciências” (OLIVEIRA, 2006, p. 19), os licenciandos ministram aulas expositivas utilizando um laboratório itinerante, dentro da temática forense. Tendo como eixo de interligação entre a aula e as atividades de laboratório, a solução de um crime através de análises feitas na própria sala de aula.

Dentro desse exposto, é importante questionar o quanto a expansão desse tempo em atividade de extensão facilita a criação das condições inegavelmente apropriadas para uma prática reflexiva, posto que projetos acadêmicos são uma forma de obtenção do engajamento, os quais integralizam ações de ensino, pesquisa e extensão (VEIGA, 2004). Essa prática auxilia os licenciandos em relações reflexivas, no qual se torna importante socializar e discutir práticas extracurriculares com potencial para o engajamento social (LÜBECK; SOUZA; BEZERRA, 2015). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é detalhar o ambiente formativo intrínseco a experiência de um laboratório didático itinerante com a temática forense para licenciandos em Química e Física pertencentes ao Grupo PET Química e Física.

DELINEAMENTO METODOLÓGICO

Essa pesquisa foi realizada de modo a analisar os processos de formação inicial de alunos da licenciatura em Química e Física na preparação e execução do minicurso de ciência forense, por meio da análise teórica das atividades realizadas. O minicurso é uma iniciativa do grupo PET Química e Física e foi elaborado pelos bolsistas do grupo, licenciandos em Química e Física, de forma que fosse possível a atividade ser levada às escolas e universidades independente da existência de um laboratório didático de ciências e também da distância desses ambientes educativos da universidade na qual o grupo pertence. De 2015 a 2019 o minicurso foi realizado com aproximadamente 2030 alunos de Ensino Médio, Técnico e Ensino Superior sendo aplicado anualmente em

aproximadamente 10 salas de aula distribuídas de forma heterogênea entre Educação Básica, Ensino Técnico e Superior.

Devido a essa pesquisa ter por objetivo detalhar o ambiente formativo intrínseco a experiência realizada por licenciandos participantes do grupo PET, tem-se como natureza da pesquisa uma análise qualitativa, pois a mesma “[...] dirige-se à análise de dados de casos concretos em suas peculiaridades locais e temporais partindo das expressões e atividades das pessoas em seus contextos sociais” (FLICK, 2009, p. 37).

O projeto aqui analisado abrange a tríade ensino, pesquisa e extensão, de modo que por meio da pesquisa em educação e a criação do minicurso, os bolsistas estudam sobre dificuldades e referenciais para a preparação das aulas. O pilar ensino é vivenciado na prática durante a aplicação do minicurso e nos processos reflexivos, pois os PETianos têm a oportunidade de lecionar dentro da sala de aula, além do estágio supervisionado. A extensão está em levar parte do conteúdo aprendido na graduação à sociedade.

Dessa forma, os dados analisados foram retirados dos relatórios anuais (PET-QUÍMICA E FÍSICA, 2016, 2017, 2018, 2019) nos anos de vigência do projeto, pois “[...] os documentos não são somente uma simples representação dos fatos ou da realidade. Alguém (ou uma instituição) os produz visando algum objetivo (prático) e a algum tipo de uso” (FLICK, 2009, p. 96). Em decorrência disso, foram analisados a configuração com que a prática didática foi estabelecida e os processos que os alunos precisam realizar para execução do minicurso.

Vale ressaltar que essa pesquisa foi dispensada o processo de avaliação do sistema CEP/CONEP explanado pela Resolução nº510, de 07 de abril de 2016 (BRASIL, 2016) parágrafo VII, por se tratar de uma pesquisa que “[...] objetiva o aprofundamento teórico de situações que emergem espontânea e contingencialmente na prática profissional, desde que não revelem dados que possam identificar o sujeito”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concorda-se com Contreras (2000) que, para compreender as qualidades e características do ato de ensinar, sendo esse o foco da prática da profissão professor, é necessário delimitar o que se espera sobre e desse profissional, de forma que a relação teoria e prática dentro do

espectro de processos formativos se torna poderosa na construção da identidade de ser professor, propiciando a interligação entre o que é ser professor e o que se espera dele como profissional. Ainda de acordo com o autor, as qualidades de ser professor ficam relativas as funções oriundas da execução de sua profissão, sendo essas dimensões ligadas “[...] à forma de conceber e viver o trabalho de professor, ao mesmo tempo em que se inscreve a forma de dotar a realização do ensino de conteúdo concreto” (CONTRERAS, 2002, p. 74).

De maneira complementar, Marchan (2017, p. 22) descreve que no caso da formação do professor as competências da profissão se manifestam como a “[...] capacidade de realizar uma ação concreta, mas ela em si é abstrata. Não pode ser definida em termos objetivos, pois envolve um conjunto de saberes e ações que desempenham papéis em conjunto que resultam em ações pessoais, que não esgotam as suas definições”. A contextualização e a prática realizadas no minicurso, com o professor como indutor da situação problema, também se tornam importantes no processo, por estimular o desenvolvimento cognitivo e afetivo. A aprendizagem por meio da contextualização da prática da execução experimental facilita o desenvolvimento das competências e habilidades, permitindo ao aluno desenvolver capacidades como interpretar e analisar dados, argumentar, tirar conclusões, avaliar e tomar decisões uma vez que essa prática trabalha com a resolução de um caso criminal de forma criativa e com a experimentação realizada pelos alunos em grupo.

Esse processo de atrelar a prática experimental com uma temática pertencente a um contexto popular se torna importante posto que o processo de aprendizagem significativa está intimamente relacionado aos “[...] significados dos materiais potencialmente significativos (ou seja, suficientemente não arbitrários e relacionáveis de maneira não-arbitrária e substantiva a sua estrutura cognitiva). É também nesta interação, que o conhecimento prévio se modifica pela aquisição de novos significados. (MOREIRA, 2011, p. 26).

O minicurso foi elaborado pelos PETianos com supervisão do Tutor do grupo de forma a ser aplicado não apenas em laboratório, mas também na sala de aula envolvendo práticas de baixo custo. O minicurso é apresentado aos

alunos em duas etapas com uma duração total de duas horas e meia.

Neste aspecto é necessário compreender a inserção desse tipo de atividade formativa em relação a atividades experimentais, pois:

[...] além da questão de infraestrutura das escolas para que um trabalho investigativo possa ser implementado, há também a questão de aperfeiçoamento docente que deve ser levada em consideração, por isso questões teóricas devem ser mais trabalhadas e articuladas nos contextos da formação inicial e continuada de professores. Os professores têm uma carência teórica que os cursos de formação inicial não conseguem superar, isso pelo fato de os professores não terem tempo hábil para trabalhar a parte pedagógica, psicológica, epistemológica e específica de sua formação no tempo da graduação. (GOI; ELLENSOHN; HUNSHE, 2019, p. 395).

Na primeira etapa, os alunos assistem a uma aula expositiva utilizando projetor para que o conteúdo possa ser transmitido de forma lúdica e dinâmica. Ministrada pelos PETianos, a sequência didática apresentada inicia-se pelas indagações sobre a profissão de Perito Criminal. Ao serem apresentados ao dia-a-dia do profissional e sua estrutura de trabalho, como reação espontânea, muitos alunos comentam suas concepções prévias da profissão a partir de séries de televisão e filmes assistidos.

Após serem apresentados à profissão de perito de campo e de laboratório, as principais técnicas que auxiliam o profissional da área a desvendar o ocorrido na cena de um crime são apresentadas. A partir dessas técnicas é possível abordar conteúdos pertinentes a série escolar frequentada pelo público-alvo que foram ensinados em anos anteriores. Sendo assim, o minicurso, além de partir de uma temática

conhecida pelos alunos devido a divulgação de filmes, séries e mídia da temática forense, revisa conteúdos de Química e de Física pertinentes ao primeiro, segundo e terceiro anos do Ensino Médio.

Atualmente o Ensino de Ciências no Brasil tem apresentado um quadro histórico de estudantes que chegam ao Ensino Médio e, até mesmo no Ensino Superior de posse de um empobrecimento na fundamentação teórica da sua Educação Científica. Na sociedade em que vivem, esses estudantes trazem consigo uma dificuldade para explicar e relacionar-se com determinados fenômenos da natureza. (PAULA, 2016, p. 19).

Em sala de aula, os conteúdos são ensinados e revisados a partir de cada método de análise exposto anteriormente. Iniciando com Análise Balística, utilizamos o exemplo de disparos com arma de fogo para lembrar os conceitos pertinentes como as três Leis de Newton. As três leis de Newton podem ser revisadas facilmente na simulação de um tiro por arma de fogo. A primeira Lei de Newton, denominada inércia, e a terceira, denominada ação e reação, estão ligadas ao movimento do corpo para trás ao receber um disparo. Já a segunda Lei que relata a proporcionalidade entre a força e a aceleração pode ser feita em um pequeno exercício para calcular o impacto de uma bala ao ser disparada.

No assunto Análise Pericial, as formas de identificação de um projétil deflagrado em relação a sua respectiva arma de fogo são apresentadas. Também é explicado como ocorre a disseminação de resquícios de pólvora no corpo de uma pessoa que efetuou um disparo de arma de fogo. Considerando a abordagem Química, a composição da substância pólvora e sua decomposição ao ser deflagrada podem ser estudadas. Devido à curiosidade e pelo fato do tema fazer parte do cotidiano dos alunos, quando este assunto é abordado, uma das perguntas mais realizadas aos PETianos durante a aula é se realmente a utilização de luvas durante o disparo evita que a pessoa que efetuou o disparo seja

identificada em testes de resquírios de pólvora e como os técnicos localizam estes resquírios na mão e nas vestes do suspeito.

Como segunda técnica de análise aborda-se a identificação de digitais. Durante esse procedimento, os alunos são apresentados ao processo de formação das digitais no feto, suas características e seus componentes. Ao ser explicada a formação das digitais no ser humano ainda na barriga da mãe e a singularidade de cada digital, os alunos esboçam normalmente reações de surpresa ao perceberem que todas as suas digitais são diferentes.

Como método de revelação de digitais não aparentes, duas técnicas são apresentadas: revelações com iodo sólido e revelações que utilizam um pó para digitais ocultas. A técnica utilizando pó é realizada com o auxílio de um pincel para espalhar o produto em uma superfície lisa e revelar a digital, uma técnica consideravelmente refinada para a reprodução em sala de aula devido aos cuidados a serem tomados durante o procedimento. O pó utilizado pode ser Óxido de Ferro ou Carbonato de Chumbo.

A técnica de revelação de digitais por iodo pode ser também considerada, o que propicia o aprendizado de estados da matéria e suas transições. O iodo sólido é de fácil sublimação (pode passar do estado sólido para o gasoso sem passar pelo estado líquido) a temperatura ambiente. Na revelação de digitais, ao sublimar, as moléculas de iodo adsorvem, ou seja, depositam uma fina camada da substância na gordura deixada pelo dedo ao tocar um objeto e então o iodo “revela” o desenho da digital escondida. Por esses motivos, essa técnica é utilizada durante a parte experimental da aula.

Outra técnica pericial muito utilizada não somente em filmes e novelas, mas também na realidade, é a análise de toxina. No estudo de toxicologia forense, peritos de laboratório detectam drogas, veneno e outras substâncias químicas. Neste caso, tem por interesse a detecção de veneno como cianeto, Brodifacoum (conhecido como veneno de rato) e Hidróxido de sódio (soda cáustica) que, a partir de um simples teste de pH, podem ser detectados em meio à solução aquosa por apresentarem pH básico. Com essa análise pode-se mostrar para o aluno o quanto testes como o de pH aprendidos na escola podem ser úteis no dia a dia.

As análises utilizando sangue são as que despertam maior interesse e curiosidade dos

alunos. Ao apresentar a sorologia (área de estudo do soro sanguíneo) em sala de aula, os alunos se familiarizam com sua composição e como testes de tipo sanguíneo como os de DNA são realizados.

Com ênfase nas técnicas ligadas à Ciência Forense, os alunos conhecem um pouco sobre como são identificadas as ações ocorridas na cena do crime a partir de rastros de sangue. Para abordar a parte Química da análise Forense utilizando sangue, técnicas de identificação de manchas de sangue não visíveis em uma cena de crime, bem como a confirmação de resquírio de sangue são propostas. Para isso, três técnicas utilizando reagentes diferentes (Kastle-Meyer, Luminol ou Benzidina) são apresentadas:

O reagente mais conhecido pelos alunos devido à alta utilização em seriados e filmes é o Luminol. O fato de que o Luminol revela a presença de sangue mesmo após a limpeza do local do crime e mesmo sem nenhuma gota de sangue aparente é apresentado como curiosidade. A partir dessas técnicas, os alunos tem contato com os mecanismos de reação entre os reagentes e a molécula de sangue, utilizando assim, conceitos presentes no conteúdo escolar como reações orgânicas e as alterações de cor em uma reação química.

Dessa forma, cabe destacar que “A experimentação se enquadra em tendências teórico-metodológicas e tem um papel relevante na aprendizagem escolar, ela instiga o aluno a pensar, a criar e a testar hipóteses, como também faz o educando se sentir atuante em sua aprendizagem” (GOI; ELLENSOHN; HUNSHE, 2019, 384)

A segunda parte do minicurso é dedicada à parte prática para que os alunos possam relacionar a prática aos conceitos ensinados pelos Petianos. Os alunos são apresentados a um caso fictício a ser desvendado. Aqui é trabalhado a resolução de problemas e a tomada de decisão. O caso criado pelos PETianos foi delineado a fim de possibilitar análises de digitais, sangue, pólvora e veneno durante a prática. No decorrer dessa parte do minicurso, os alunos são divididos em grupos de cinco a seis pessoas, com o objetivo de não apenas colocar em prática o ensinado em aula, mas também estimular a criatividade e o trabalho em grupo.

A proposta do laboratório foi desenvolvida para que os alunos realizem uma simulação do trabalho de um perito criminal, recebendo as provas retiradas da cena do crime

para serem analisadas. Para que eles possam trabalhar em conjunto em busca de desvendar o suposto crime, os alunos recebem um kit contendo reagentes, vidrarias, provas a serem analisadas, luvas, uma apostila contendo o roteiro do experimento e uma relação de suspeitos e sua relação com a vítima.

Para a prática se tornar possível, a montagem prévia dos kits e das provas da cena do crime foi necessária. O grupo desenvolveu três histórias diferentes e, cada conjunto de provas colocado no kit, continha elementos que levavam ao caminho da solução do crime.

Um exemplo dos casos criados por esse projeto é o suposto assassinato do senhor X, um artista plástico famoso que foi encontrado morto, deitado de bruços no chão de seu ateliê com marcas de perfuração provavelmente da faca encontrada ao lado do corpo. Na cena desse crime foram encontradas marcas de tiro na parede, uma arma de fogo, uma faca ao lado do corpo e um copo caído com um líquido que aparentava ser refrigerante.

Os alunos conheciam as relações problemáticas da vítima com as pessoas à sua volta. Como solução desse caso, o seguinte enredo foi criado: A irmã da vítima tenta envenená-lo com um copo contendo refrigerante e um veneno desconhecido. A vítima, por ser diabética, desconfia do líquido e então, em um momento de fúria, tenta disparar com a arma de fogo contra sua irmã. Nesse momento, o marido de sua irmã entra no ateliê, se depara com a cena e, para defender sua esposa, golpeia as costas de seu cunhado com a faca, levando a vítima à óbito e fazendo com que ele erre os tiros.

Portanto, para que os alunos possam interpretar as provas encontradas de forma a coincidir com a história fictícia criada, torna-se necessário que o kit dos alunos contenha as seguintes provas para este caso: um frasco contendo refrigerante para o teste positivo para veneno, digitais da vítima recolhidas no revólver, de sua irmã encontradas no copo com veneno e de seu esposo encontradas na faca, um pó recolhido da mão da vítima para teste comprovando pólvora e um frasco contendo sangue (no caso dos minicursos realizados foi utilizado sangue animal adquirido em açougues e frigoríficos) para simular o líquido vermelho encontrado ao lado do corpo.

Algumas dessas provas necessitavam de preparação prévia. Para que os alunos realizassem os testes de digital foi necessário

criar um gabarito com a digital de todos os suspeitos - foram utilizadas as digitais dos próprios PETianos, colocadas no gabarito com o auxílio de uma almofada para carimbo. Além disso, para as digitais encontradas na cena do crime, pedaços de cartolina foram preparados e depositadas as respectivas digitais necessárias.

Para preparar o pó compatível com pólvora para a realização do teste de chama foi necessário utilizar Nitrato de Bário ($\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$) com adição de carvão. A fim de demonstrar a tentativa de envenenamento, foi necessário que o kit apresentasse um frasco contendo refrigerante misturado a Hidróxido de Sódio (NaOH) para simular a bebida envenenada, lembrando que o pH de um veneno é básico assim como do NaOH . Para o teste do sangue encontrado na faca, na noite anterior ao experimento, hastes flexíveis embebidas em sangue de animal (neste caso o sangue foi recolhido de um açougue, proveniente de um animal já abatido) foram preparadas.

Cada grupo de alunos recebeu um roteiro com os experimentos a serem realizados. Esse material contém os conceitos químicos presentes em cada experimento, o roteiro do próprio experimento e a explicação das reações químicas dos fenômenos que aconteceram durante o experimento. Todo o roteiro foi pensado para que a Química ficasse mais lúdica; porém, com todo cuidado para que o rigor da Química envolvida fosse preservado.

Seguindo a ordem do roteiro de análise utilizado em sala de aula, os alunos começaram o trabalho de análise a partir da revelação das digitais encontradas na cena. Para isso, os alunos encontram dentro da caixa um envelope com papéis em branco (previamente preparados) para a revelação das digitais, luvas, fita adesiva, tesoura, pinça e o gabarito de digitais para a comparação. Os testes foram realizados com o auxílio de fita adesiva e pinça. Com a ajuda de um dos PETianos, as digitais são colocadas dentro de um frasco com vedação adequada contendo iodo sólido. Após alguns segundos, o iodo depositado na superfície do papel revela as respectivas digitais. Para maior fixação da digital, ela é envolta em fita adesiva.

No procedimento realizado para a identificação de sangue utilizou-se reagente de Kastle-Meyer. O reagente previamente preparado em laboratório foi gotejado na haste flexível (embebida em sangue de animal) até obter-se a coloração alterada do vermelho do

sangue para a cor rosa (no caso do teste dar positivo para sangue). Se não houver necessidade de resultado positivo para sangue, qualquer líquido pode ser usado na amostra da haste flexível.

Para o teste referente à bebida encontrada na cena do crime, os alunos receberam um frasco com refrigerante já preparado e com o pH desconhecido e um frasco contendo Fenolftaleína (1% em solução alcoólica). Os alunos prosseguiram com o teste de pH normalmente, obtendo a cor Pink para o pH básico. Como sabemos, o pH de alguns venenos citados anteriormente é básico, logo nesse caso o pH indicaria uma substância que possivelmente poderia ser veneno.

Para suposto resquício de pólvora encontrado na mão da vítima foi necessária a realização de dois testes, o primeiro para identificar Bário (Ba^{2+}) e o segundo para identificar Chumbo (Pb^{2+}), pois são duas substâncias presentes na pólvora após um disparo.

Para o teste com o Bário é necessária uma fonte de calor proveniente de um Bico de Bunsen, em caso de um laboratório, ou maçarico de pequeno porte, no caso da sala de aula. Esse teste foi realizado de forma demonstrativa para que os alunos não tenham contato com a chama. Com uma espátula foi coletado um pouco do pó previamente preparado e realizado o teste de chama. No caso de resultado positivo para pólvora, deve-se obter um chama esverdeada.

Neste aspecto deve ser destacado o papel da experimentação por demonstração, pois “[...] torna-se claro o papel do professor nesse contexto, configurando-se como o grande incentivador deste processo, assim como motivador para que a proposta do uso das demonstrações por meio de atividades de experimentação seja materializada em sala” (PAULA, 2016, p.23)

O próximo teste para a substância que compõe a pólvora é o teste para chumbo. Algumas gotas de solução amostral contendo nitrato de chumbo ($Pb(NO_3)_2$) são adicionadas em um tubo de ensaio, em seguida, algumas gotas da solução reagente de iodeto de potássio (KI) são adicionadas e procede-se com uma agitação leve. Observa-se a formação de precipitado e sua coloração (obtem-se uma coloração amarela intensa devido a formação do PbI_2). A partir dos resultados obtidos nesses dois experimentos, obtém-se a evidência de substâncias que

compõem a pólvora, o que comprova o resultado positivo.

Junto com a realização dos procedimentos, os alunos responderam a um roteiro para ajudá-los a analisar os dados obtidos na cena do crime, ou seja, quais testes eram positivos e quais eram negativos. Essa foi uma das etapas em que os alunos mais se envolveram e mostraram mais empenho. Ao fim de suas análises, os alunos escreveram um pequeno texto com o enredo que o grupo decidiu, apontando o suposto assassino, a arma e a causa da morte a partir dos dados amostrais obtidos. A criatividade na descrição da história criada pelos alunos é feita de forma impressionante, onde muitos alunos vão além da descrição fornecida dos suspeitos criando muitas vezes outros motivos além dos descritos.

Desta maneira, o ensino se comporta como “[...] um jogo de “práticas alinhadas”, onde fatores históricos, culturais, sociais, institucionais e trabalhistas tomam parte, junto com os individuais” (CONTRERAS, 2002, p. 75). Neste aspecto é essencial que a formação inicial não ocorra apenas com os conteúdos acadêmicos, mas que esse professor tenha um processo de formação humanizado envolvendo a obrigação moral, compromisso com a comunidade além da competência profissional de forma integrada.

Sendo assim, há de se pensar nesse espectro de habilidades próprias do ser professor e o papel da prática em sua constituição ainda dentro da licenciatura. De acordo com Pimenta (1995, p.61) “[...] a essência da atividade (prática) do professor é o ensino-aprendizagem”, ainda segundo a supracitada, é nessa prática, que de forma sistêmica e científica, a atividade docente se torna objetiva e intencional. Diante disso, a autora citada indica que a relação-teórico-prática se faz através da *práxis*, ou seja, onde a “[...] atividade humana se caracteriza como produto de consciência, a qual configura as finalidades da ação (atividade teórica)” (PIMENTA, 1995, p. 61). Portanto, a atividade docente se dá por meio de uma relação teórico-prática e didática, acarretando que a didática seja entendida como uma teoria de perspectiva histórico-social que delimita, mas não se resume ao ato de ensinar, influenciando “[...] desde a organização, análise e decisão de políticas de ensino e seus consequentes resultados do processo de educação” (PIMENTA, 1995, p. 63).

Por conseguinte, a autora relata que no ambiente de formação docente “é necessário

ampliar e tonar a realidade do exercício profissional como prática social [...] o que implica ir para essa realidade municiado teoricamente da realidade que se quer instaurar (que ensino é necessário e por quê; que professor é necessário e quais conhecimentos e habilidades)” (PIMENTA, 1995, p. 72).

Diante disso, ainda cabe destacar que “Um tipo de abordagem muito comum e bastante disseminada é a experimentação do tipo demonstrativa. Esta pode assumir diferentes características de acordo com os objetivos propostos pelo professor. [...]” de forma que o futuro professor precisa apreender a abordá-la. (SILVA, 2016, p. 28).

Por outro lado, Assis e Bonifácio (2011, p.46) pontuam que dentro do ambiente do ensino, pesquisa e extensão se faz necessário um espaço de reflexão sobre a prática, visto que “[...] valorizam a articulação teoria e prática na formação do professor, reconhecem a importância dos saberes da experiência, da reflexão crítica, e atribuem ao professor um papel ativo no próprio desenvolvimento profissional”.

Sendo assim, o processo formativo proposto nos currículos das licenciaturas atrelado a relação teoria e prática oriundos do ensino em projetos de extensão auxilia no rompimento com os currículos tecnicistas que apresentam a teoria dissociada a prática, acabando assim com os processos formativos que de acordo com Contreras (2002) tem como base hierarquia de subordinação do aprendizado prático ao teórico.

De mesmo modo, autores como Kochhann (2017), Kochhann, Silva e Amorim (2018) e Santos, *et al.* (2008) enfatizam que o espaço proporcionado pela extensão na formação de professores se torna benéfico, uma vez que se trata de um espaço importante de prática. Isso é possível contanto que “O ensinar envolve um arcabouço de saberes que influenciam na própria ação docente. Isso remete à compreensão de que o trabalho docente se concretiza por meio da práxis, na relação teoria e prática referendada na reflexividade (ação-reflexão-ação)” (ARANTES; GEBRAN, 2012, p. 79).

Como posto por Rhoden e Rhoden (2014, p. 118) é necessário dentro da formação que “[...] se adotem medidas para sua inovação, incorporando-se espaços de reflexão que contemplem a subjetividade desse profissional, principalmente em tudo que se relacione as suas questões afetivas”.

A quem do anteriormente exposto, salienta-se que o ensino por meio da extensão se torna um espaço de formação de qualidade na prática formativa, uma vez que se trata de um momento de reflexão sobre a teoria, no qual ao:

Considerar as influências culturais, históricas e sociais a que o professor se submete, como ele se percebe e como ocorrem as suas transformações nesse movimento, afinal, no decorrer de sua trajetória, o professor vai construindo conhecimentos, concepções elaboradas nos diferentes espaços educativos, na educação formal, na atividade profissional, nos grupos de estudos, nas vivências do ensino, nas relações com os colegas, enfim, nas tantas relações sociais estabelecidas. (RHODEN; RODEN, 2014, p. 120)

Voltando os olhos para as práticas realizadas pelos licenciandos ao longo dos projetos que interligam o ensino à extensão, quando o momento vivenciado pelos mesmos é enquadrado como a-didático por Brosseau (1997), no qual o discente sozinho deve encarar a situação problema, o discente precisa relacionar seus conhecimentos para a resolução atrelando seu conhecimento acadêmico a prática. Por conseguinte, esses licenciandos encaram um processo de reflexão na ação de reflexão-ação-reflexão de modo a interligar a teoria à prática. De acordo com o mesmo autor, tratando-se tanto dos conhecimentos privados quanto dos públicos, os mesmos ficam atrelados aos fluxos de lembranças do cotidiano do sujeito quando aprendido. Neste ponto, ainda na situação discutida pelo autor é necessário que esses conhecimentos sejam incluídos no repertório de cultura e sociedade do aprendiz. Dessa forma, as situações de ação propiciadas na resolução do problema podem acelerar a aprendizagem fornecendo a construção dos saberes.

Sendo assim, cada situação a-didática diversa dos alunos, nesse caso dos discentes, é necessário que “[...] se na situação de **ação** a manifestação se dá pelas ações, na **formulação** e na validação, se dá pelo uso de alguma forma de

linguagem na enunciação do conhecimento adquirido e na argumentação que usa para mostrar a validade de suas construções” (AZEVEDO, 2008, p. 43).

Ademais, a de se destacar que para a construção de um profissional autônomo é inerente que o mesmo não se isole dentro de sua própria profissão, uma vez que a mesma depende do docente encarar a sua profissão de modo a respeitar “[...] as relações entre professores e sociedade sobre outras bases (as de constituição comunitária), de forma que os vínculos não sejam de natureza burocrática nem mercadológica, mas política e social” (CONTRERAS, 2002, p. 269)

E neste aspecto, o supracitado ainda enquadra que quando se busca uma escola “eficaz” academicamente abandona-se os nortes tecnicistas compreendendo que as competências docentes “[...] vão desde o tipo de liderança até a cultura profissional dos professores, passando pelas competências técnicas ou pelo ambiente comunicativo na escola” (CONTRERAS, 2002, p. 263)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude do exposto, compreende-se que a contínua exposição dos PETianos com esse minicurso auxilia em um estreitamento entre a teoria e a prática, de modo que os discentes têm contato com as mais diferentes estruturas escolares, alunos e público-alvo. Dessa forma, o minicurso tem potencial para impactar diretamente as concepções sociais sobre o papel da docência.

Todavia, o estudo limita-se por suas implicações de forma teórica, sendo necessário que esses tipos de investigação sejam extrapolados para outras situações de ampliação do licenciando na escola nos mais diversos contextos e nas mais diversas licenciaturas. Além disso, cabe a ressalva da importância dos aspectos teóricos para que a reflexão e a práxis realmente aconteça dentro das atividades de extensão. Sendo assim, é importante ressaltar que os grupos de pesquisa não devem apenas fomentar o espaço de prática, mas também a formação teórica de forma independente da grade curricular.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Ministério da Educação (MEC) pelo financiamento.

REFERÊNCIAS

ARANTES, A. P. P.; GEBRAN. R. A. Ensino superior: trajetórias e saberes docentes. **Colloquium Humanarum**, Presidente Prudente, v. 9, n. 2, p. 79-91, 2012. Disponível em: <https://revistas.unoeste.br/index.php/ch/article/view/645/840>. Acesso em: 04 jun. 2020. DOI: [10.5747/ch.2012.v09.n2.h128](https://doi.org/10.5747/ch.2012.v09.n2.h128)

ASSIS, R. M.; BONIFÁCIO, N. A. A formação docente na universidade: Ensino, Pesquisa e Extensão. **Educação e Fronteiras Online**, Dourados, n. 3, p. 36-50, 2011. Disponível em: <http://ojs.ufgd.edu.br/index.php/educacao/articloe/view/1515/905>. Acesso em 07 jun.2020.

AZEVEDO, M. C. P. S. **Situações de ensino-aprendizagem**: análise de uma sequência didática de física a partir da teoria das Situações de Brousseau. 2008. 284f. Dissertação (Mestrado em Educação) - Faculdade de educação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde . **Resolução nº 510, de 07 de abril de 2016**. Esta Resolução dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisa em Ciências Humanas e Sociais. Brasília, 2016. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2016/Reso510.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2020

BROUSSEAU, G. **La théorie des situations didactiques**. In: CONFÉRENCE DE MONTREAL, 1997, Montreal. **Anais [...]**. Montréal: l' Université de Montréal, 1997. p. 1-57 Disponível em: http://math.unipa.it/~grim/brousseau_montreal_03.pdf. Acesso em: 5 jun. 2020

CONTRERAS, J. **A autonomia de professores**. São Paulo: Cortez Editora, 2002.

CRUZ, A. A. *et. al.* A Ciência Forense no Ensino de Química por meio da experimentação investigativa. **Quím. Nova esc.**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 167-172, mai. 2016. Disponível em: http://qnesc.sbgq.org.br/online/qnesc38_2/11-RSA-53-14.pdf. Acesso em: 4 jun. 2020. DOI: [10.5935/0104-8899.20160022](https://doi.org/10.5935/0104-8899.20160022)

FLICK, U. **Introdução à pesquisa Qualitativa**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 405p.

GOI, M. E. J.; ELLENSOHN, R. M.; HUNSHE, S. **Formação de professores: Aprofundamento**

Teórico-metodológico de experimentos investigativos. **Pesquisa e debate em educação**, Juiz de Fora, v. 8, n. 2, p. 381-398, 2018.

GÜILLICH, R. I. C.; HERMEL, E. E. S. Experimentação e formação inicial de professores: constituição e docência em ciências. **Ensino de ciências e Tecnologia em Revista**, Santo Ângelo-RS, v. 3, n. 2, p. 25-36, jul./dez. 2013.

KOCHHANN, A. Formação de professores na extensão universitária: Uma análise das perspectivas. **Teias**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 51, p. 273-294, 2017. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistateias/article/view/29206>. Acesso em 04 jun. 2020. DOI: [10.12957/teias.2017.29206](https://doi.org/10.12957/teias.2017.29206)

KOCHHANN, A.; SILVA, M. E.; AMORIM, M. C. S. Extensão universitária acadêmica processual e orgânica: um projeto de formação de professores. **R. UFG**, v. 18, n. 22, p. 61-89, 2018. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/revistaufg/article/view/51563>. Acesso em 05 jun. 2020. DOI: [10.5216/revufg.v18i22.51563](https://doi.org/10.5216/revufg.v18i22.51563)

LÜBECK, K. R. M.; SOUZA, J. R.; BEZERRA, R. C. A importância dos projetos de extensão da formação do professor de matemática. **Revista do Centro de Educação. Letras e Saúde da Unioeste**, Foz do Iguaçu, v. 17, n. 2, p. 28-44, 2015.

MANCHUR, J.; SURIANI, A. L. A.; CINHA, M. C. A contribuição de projetos de extensão na formação profissional de graduandos de Licenciaturas. **Unicentro**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 334-341, jul./dez. 2013.

MARCHAN, G. S. **Discursos presentes nas políticas curriculares no processo de formação docente**: a configuração do perfil pedagógico. 2017. 245f. Tese (Doutorado em Educação) - Faculdade de Educação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

MOREIRA, M. A. Aprendizagem significativa: um conceito subjacente. **Aprendizagem Significativa**, Porto Alegre, v. 1, n. 3, p. 25-46, 2011.

OLIVEIRA, M. F. Química Forense: A Utilização da Química na Pesquisa de Vestígios de Crime.

Química Forense, São Paulo, n. 24, p. 17-19, 2016.

PAULA, M. S. Atividades experimentais de demonstração no ensino de ciências dos anos iniciais: contribuições para uma formação crítica na educação em ciências. **R. Labore Ens. Ci.**, Campo Grande, v. 1, n. esp., p. 17-28, 2016.

PET QUÍMICA E FÍSICA. **Relatório anual de atividades-2016**: PET Química e Física. Presidente Prudente, 2017.

PET QUÍMICA E FÍSICA. **Relatório anual de atividades-2017**: PET Química e Física. Presidente Prudente, 2018.

PET QUÍMICA E FÍSICA. **Relatório anual de atividades-2018**: PET Química e Física. Presidente Prudente, 2019.

PET QUÍMICA E FÍSICA. **Relatório anual de atividades-2019**: PET Química e Física. Presidente Prudente, 2020.

PIMENTA, S. G. O estágio na formação de professores: unidade entre teoria e prática. **Cad. Pesq.**, São Paulo, n. 94, p. 58-73, 1995. Disponível em: <http://www.fcc.org.br/pesquisa/publicacoes/cp/arquivos/612.pdf>. Acesso: 06 jun. 2020.

RHODEN, J. L. M.; RHODEN, V. Formação de professores: um espaço que possibilita trabalhar a educação emocional e compreender o estresse do professor. **Rev. Ciênc. Ext.**, v. 10, n. 2, p. 118-135, 2014. Disponível em: https://ojs.unesp.br/index.php/revista_proex/article/view/754/984. Acesso: 04 jun. 2020.

ROSA, J. K. L. R.; WEIGERT, C; SOUZA, A. C. G. A. Formação docente: reflexões sobre o estágio curricular. **Ciência & Educação**, Bauru, v. 18, n. 3, p. 675-688, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-73132012000300012>

SANTOS, *et al.* Formação de professores: uma proposta de pesquisa a partir da reflexão sobre a prática docente. **Rev. Ensaio – Pesquisa em Educação em Ciências**, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 69-82, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/epec/v8n1/1983-2117-epec-8-01-00069.pdf>. Acesso em 26 jun. 2020. DOI: [10.1590/1983-21172006080105](https://doi.org/10.1590/1983-21172006080105)

SILVA, K. C. P.C. Epistemologia da práxis na formação de professores: perspectiva crítico-emancipatória. **Rer. Ciências Humanas**, Frederico Westphalen, v. 18, n. 2, p. 121-135, set./dez. 2017.

SILVA, V.G. **A importância da experimentação no ensino de Química e Ciências**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016.

SOUZA, A. C. **A Experimentação no ensino de ciências**: importância das aulas práticas no processo de ensino aprendizagem. 2013.

Monografia (Especialização em educação: métodos e técnicas de ensino) - Diretoria de pesquisa e pós-graduação, Universidade Tecnológica do Paraná, Medianeira, 2013.

VALÉRIO, M. Resenha: Autonomia de professores. In. CONTRERAS, José. **Educar em revista**, Curitiba, n.66, p. 372-332, out./dez. 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-40602017000400327&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 4 jun. 2020. DOI: [10.1590/0104-4060.52325](https://doi.org/10.1590/0104-4060.52325)

VEIGA, I. P. A. **Educação Superior**: Projeto Político-Pedagógico. 5. ed. São Paulo: Papirus, 2004.



Transcriptional and translational landscape of *Candida auris* in response to caspofungin



Daniel Zamith-Miranda^{a,b,1}, Rafaela F. AmatuZZi^{c,1}, Isadora F. Munhoz da Rocha^c, Sharon T. Martins^c, Aline C.R. Lucena^d, Alexandre Z. Vieira^d, Gabriel Trentin^e, Fausto Almeida^e, Marcio L. Rodrigues^{c,f}, Ernesto S. Nakayasu^g, Joshua D. Nosanchuk^{a,b,*}, Lysangela R. Alves^{c,*}

^a Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

^b Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

^c Gene Expression Regulation Laboratory, Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ PR, Curitiba, Brazil

^d Laboratory for Applied Sciences and Technology in Health, Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ PR, Curitiba, Brazil

^e Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^f Microbiology Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

^g Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2021

Received in revised form 30 August 2021

Accepted 9 September 2021

Available online 14 September 2021

Keywords:

Candida auris
Transcriptomics
Proteomics
Drug resistance
Stress response

ABSTRACT

Candida auris has emerged as a serious worldwide threat by causing opportunistic infections that are frequently resistant to one or more conventional antifungal medications resulting in high mortality rates. Against this backdrop, health warnings around the world have focused efforts on understanding *C. auris* fungal biology and effective prevention and treatment approaches to combat this fungus. To date, there is little information about the differentially expressed genes when this fungus is treated with conventional antifungals, and caspofungin is a standard echinocandin deployed in the therapy against *C. auris*. In this work, we treated two distinct strains of *C. auris* for 24 h with caspofungin, and the cellular responses were evaluated at the morphological, translational and transcriptional levels. We first observed that the echinocandin caused morphological alterations, aggregation of yeast cells, and modifications in the cell wall composition of *C. auris*. Transcriptomic analysis revealed an upregulation of genes related to the synthesis of the cell wall, ribosome, and cell cycle after exposure to caspofungin. Supporting these findings, the integrated proteomic analysis showed that caspofungin-treated cells were enriched in ribosome-related proteins and cell wall, especially mannoproteins. Altogether, these results provide further insights into the biology of *C. auris* and expands our understanding regarding the antifungal activity of caspofungin and reveal cellular targets, as the mannose metabolism, that can be further explored for the development of novel antifungals.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Invasive fungal infections are responsible for over 1.5 million deaths per year [1]. Among these diverse fungal diseases, bloodstream infections caused by *Candida* species are the most common cause of invasive disease [2]. Although *C. albicans* is frequently the most associated species with invasive candidiasis [3], infections by non-*albicans* species have increased. The non-*albicans* species

commonly display multidrug resistance, representing a major problem of public health globally, particularly in immunocompromised, hospitalized patients [4,5].

The emerging multidrug resistant fungal pathogen *C. auris* was responsible for numerous nosocomial outbreaks in healthcare settings [6,7]. *C. auris* was first reported in 2009 as the etiological agent of an ear infection in Japan [8,9], and it remains understudied. The difficulty in identifying the fungus by classic phenotyping and our gaps in understanding its propagation mechanisms in healthcare settings worldwide has impeded our capacity to control its spread [10]. Due to these issues and its remarkable drug resistance, *C. auris* was the only fungal pathogen classified as a global public health threat [8]. This fungus can be transmitted rapidly and persist on

* Corresponding authors at: Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA (J.D. Nosanchuk).

E-mail addresses: josh.nosanchuk@einsteinmed.org (J.D. Nosanchuk), lysangela.alves@fiocruz.br (L.R. Alves).

¹ The authors contributed equally to the work.

hospital surfaces and medical devices [11,12], and has a high mortality, particularly among patients who have undergone multiple medical interventions [10,13–15].

C. auris has an extremely high frequency of multidrug resistance to polyenes, echinocandins, and azoles, especially fluconazole [16]. Resistant phenotypes to fluconazole and echinocandin are linked to polymorphisms in the *erg11* and *fkp1* genes, respectively [16,17], but other regulators of resistance are poorly known. Another feature that may contribute to the resistance of *C. auris* to a variety of antimicrobial agents is biofilm formation [18–20]. Even though it is not as thick or adherent to medical devices substrates compared to *C. albicans* biofilms [18,21], *C. auris* biofilms confer drug resistance to fluconazole [18,22] and caspofungin [18]. This factor may be associated with an increased activity in efflux pumps [22]. *C. auris* biofilm transcriptome analysis has revealed that genes coding efflux pumps such as ATP-binding cassette (ABC) and major facilitator superfamily (MFS) transporters are upregulated in the presence of antifungal agents, especially at 24 h post-exposure [22].

The echinocandins are the drugs of choice for the initial treatment of *C. auris*, as recommended by the CDC (<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-treatment.html>). On the basis of this recommendation, we analyzed the global cellular response of two isolates of *C. auris* to caspofungin. Our data showed that caspofungin not only affected cell morphology, but also led to a transcriptional response with upregulation of cell wall associated processes and silencing of pathways that are associated with cellular responses to stress. Our study contributes with new information on *C. auris* that highlights genetic responses to a standard antifungal.

2. Material and methods

2.1. Fungal growth conditions

C. auris strains MMC1 (isolated in Montefiore Medical Center, Bronx NY) and B11244 (Venezuela Clade) were maintained at -80°C . B11244 was obtained from the CDC (also known as CDC 385). After thawing in Sabouraud broth, suspensions were incubated at 30°C for 24 h. Yeast cell suspensions were then plated onto Sabouraud agar plates and incubated at 30°C for 48 h. The plates were then stored at 4°C (for no longer than 4 weeks) and used in experiments. Yeast cell viability prior to experimental use and during culturing was monitored by propidium iodide (PI) staining and analysis by flow cytometry.

Based on MICs, growth curves of *C. auris* in the presence of caspofungin were performed and subinhibitory concentrations were determined: 12.5 ng/mL and 10 ng/mL for MMC1 and B11244, respectively. The assays were performed in technical and biological triplicates in a 96-well flat bottom translucent plate to a final volume of 200 μL per well and 5×10^5 cells/mL. The cells were incubated in a microplate reader (Synergy Biotek) for 72 h at 30°C , with optical density (OD) readings taken every 1 h with a wavelength of 540 nm, with prior shaking of the plate for 30 s before each reading. A non-linear model, Gompertz curve, was used to analyze the growth curves, and the significance was calculated by ANOVA, comparing control versus treatment. The results represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. The curves and analyses was performed using the GraphPad Prism 8.0 program.

2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

The cells were collected by centrifugation at 5,000 rpm for three minutes and were washed 3 times with PBS buffer and then was

fixed with 1 mL of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h at room temperature and subsequently they were washed 3 times with post-fixation solution (0.1 M cacodylate buffer, 0.2 M sucrose and 2 mM MgCl_2). After the fixation step, the cells were adhered in round coverslips with poly-L-lysine for 30 min. The excess was quickly removed, and the samples were gradually dehydrated, by adding sequentially adding ethanol 30%, ethanol 50%, and ethanol 70% for 5 min each and 95% ethanol followed by 100% ethanol, twice, for 10 min each. After dehydration, 100% ethanol was replaced with carbon dioxide (CO_2) with a 10 times cycle. At the end of the process, the coverslips were metalized with gold and visualized in a scanning electron microscope (Jeol JSM-6010 Plus-LA) at 5 kV.

2.3. Cell wall staining

Yeast cells, in Sabouraud broth, were incubated with or without caspofungin at a concentration of 12.5 ng/mL (MMC1 – MIC = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 10 ng/mL (B11244 – MIC = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h at 37°C . Cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde 4% for 30 min at room temperature (RT). After washing again, cells were blocked with BSA 1% in PBS for 1 h at RT and then incubated with concanavalin A conjugated with Alexa 488 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), wheat-germ agglutinin conjugated with NHS-rhodamine (WGA – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and uvitex 1% for 30 min at RT. After washing with PBS, samples were analyzed under an Observer Z1 (Zeiss) microscope. In parallel, cells that were only stained with concanavalin A were analyzed in a flow cytometer (FacScalibur) for quantification of mannoproteins. First, cells were analyzed by size and intracellular complexity (FSC and SSC) to exclude doublets. The selected population of single yeast cells were then analyzed in FL1 channel to measure the intensity of Alexa 488 fluorescence (relative to the amount of exposed mannoproteins).

2.4. RNA isolation and sequencing

Total RNA was isolated from 1×10^7 *C. auris* cells using the miRCURY RNA isolation kit (Exiqon – Qiagen) with minor adaptations. A 1:1 vol of glass beads was added to the lysis buffer along with the yeast cells, and the mixture was subjected to 10 rounds of 1 min at 4°C of vortex agitation in order to disrupt the fungal cell wall. After centrifugation, total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. The DNA cleanup step was performed with all samples using the RNase-free DNase protocol (Qiagen). For RNA quantification and integrity analysis we used a Qubit fluorometer (Thermo Fisher) and an Agilent 2100 Bioanalyzer; RNA 6000 pico and RNA small kits (Agilent Technologies).

The sequencing library was constructed with the TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina) prepared according to the manufacturer's instructions and all the samples were prepared in three independent replicates. RNAseq was performed on a HiSeq 2500 (Illumina, single-end 50-bp SR mid output run) at the Life Sciences Core Facility (LaCTAD), a part of the University of Campinas (UNICAMP).

2.5. Transcriptomic data analysis

The sequences in fastq format were analyzed by CLC Genomics Workbench[®] v 20.0 (Qiagen), using the corresponding *C. auris* genome for strain B8441 (GCA_002759435.2V2). The parameters used for the alignments were: mismatch cost (2), insertion cost (3), deletion cost (3), length fraction (0.8), and similarity fraction (0.8). Only uniquely mapped reads were considered in the analysis. The statistical test applied was the DGE (Differential Gene Expression) using the RNA-seq package with CLC Genomics Workbench[®] v 20.0 (Qiagen). The parameters for the RNA-seq analysis were:

strand setting - both, library type setting - bulk, Calculate expression for genes without transcript - Yes. The library size was normalized using the TMM (trimmed mean of M values) method [23]. After TMM normalization calculation for each sample, TMM-adjusted log CPM counts was estimated, similar to the EdgeR tool [23]. For the mapping settings, the software applied the EM (expectation–maximization algorithm) estimation algorithm. The differential expression applied by CLC Genomics Workbench uses multi-factorial statistics based on a negative binomial Generalized Linear Model (GLM). This statistic test considers that the read counts follow a Negative Binomial distribution. The same test is used by other RNA-seq tools, including edgeR and DESeq [24]. The false discovery rate (FDR) adjusted p-value is a multiple-testing correction and follows the same approach as the software DESeq2 [25]. The expression values for the transcripts were registered in TPM (Transcripts per Million), and TMM (trimmed mean of M values) was used as a normalization method. The parameters to select the differentially expressed transcripts were 3-fold change (>3 FC) and False discovery rate (FDR) below or equal to 0.05. For the Heat map clustering the parameters were: Distance measure = Euclidean distance, Linkage criteria = Average linkage, Filter settings = Filter by statistics, Statistical comparison = Caspofungin vs. Control, Minimum absolute fold change = 8.0, Correction = FDR p-value Threshold = 0.001.

The differentially expressed transcripts sequences from MMC1 and B11244 cells were compared with orthologous genes from *C. albicans* genome strain SC5314 (assembly ASM18296v3) by Reciprocal Best Hit (RBH). For the Reciprocal best hit analysis we used BLASTp and performed protein sequence comparisons between *C. albicans* strain SC5314 (assembly ASM18296v3) and *C. auris* strain B8441 (assembly GCA_002759435.2). The options for NCBI BLAST different to the defaults were: a maximum *E*-value threshold of $1e-6$, Number of threads of 4, Mask low complexity regions – yes, word size of 3, match of 2, mismatch of –3, gap cost existence of 5, and gap cost extension of 2. The default scoring matrix for blastp used was BLOSUM62 [26]. The genes that presented >40% of identity were considered for the analysis.

For all the gene ontology enrichment analysis, we used the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery version 6.8 program (DAVID) [27]. In the Functional Annotation tool, the analysis uses a modified Fisher Exact (EASE), to calculate the gene-enrichment in annotation terms, that all the tables are expressed as FDR (false discovery rate). The *C. albicans* orthologs Uniprot accession IDs were used to search for the functional annotation with the following parameters: Count –2 and EASE score 0.1. The functional annotation uses a Kappa statistic score to estimate the co-occurrence of any given gene pairs [28]. We applied the Fisher's exact test and considered only the terms with $p \leq 0.05$ and we then compared terms for the up- and down-regulated genes to a background of all terms to obtain an overall insight into the effect of caspofungin on *C. auris* compared to the absence of the antifungal.

The RNA-seq data have been deposited at the Sequence Read Archive (SRA) database under the accession number (SRA: SRP295539 BioProject: PRJNA682185). We had biological triplicates for both strains and conditions tested, except for the third replicate for B11244 with caspofungin, due to sequencing technical problems we obtained biological duplicates. In our RNA seq analysis, we obtained on average 7.3 million reads per sample that mapped >95% of the reference genome (GCA_002759435.2), with a 30x coverage (Table S1).

2.6. Quantitative RT-PCR

For the quantitative real time PCR the experimental design was performed according to the Minimum Information for Publication

of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines [29]. Total RNA was isolated in duplicate from 1×10^7 *C. auris* cells using the miRCURY RNA isolation kit (Exiqon - Qiagen) with adaptations. A 1:1 vol of glass beads was added to the lysis buffer along with the yeast cells, and the mixture was subjected to 10 rounds of 1 min at 4°C of vortex agitation in order to disrupt the fungal cell wall. After centrifugation, total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions and quantified using Qubit™ fluorometer RNA HS kit (Thermo Fisher) and the RNA integrity was assessed with Bioanalyzer RNA PICO 6000 (Agilent). After isolation, 1 µg (for cellular RNA) was treated with 1 U of DNase I RNase-free (#EN0521 PROMEGA) according to manufacturer instructions. After that, the cDNA was synthesized from 1 µg of cellular RNA as template. For the reverse transcriptase reactions 0.3 µM random primer (Invitrogen) and 1 µL of reverse transcriptase (Superscript II, Thermo Scientific), according to the manufacturers' instructions. PCR was performed with 40 ng of cDNA for the cell and 1.6 ng of cDNA as the template and GoTaq™ master mix according to manufacturer instructions (Promega). The oligonucleotides were designed with PRIMER-Blast using the following parameters: PCR product size maximum of 250 nt. Tm varying from 57 to 63 °C, RefSeq mRNA as a database and *Candida auris* as the organism. The primer sets used for PCR are described below. The qPCR was performed in four technical replicates for each sample. The following program was used in the Lightcycler 480 (Roche) equipment: initial denaturation at 95 °C for 15 min and 45 cycles of 95 °C for 15 s, 62 or 64 °C for 20 s and 72 °C for 45 s. The reference gene used was C5 sterol desaturase and the target genes and the primers used are listed in Table 1.

2.7. Protein extraction and digestion

Proteins were extracted from 10^9 cells washed with 1x PBS by suspending the cells in lysis buffer (20 mM HEPES, 50 mM citrate, 10 mM CaCl₂, 10% glycerol, 1% Triton, 15 mM MgCl₂, 100 mM DTT) with glass beads, and vortexing for 15 cycles of 1 min followed by 1 min on ice. Lysates were cleaned by centrifuging twice, first at 8,000 xg for 5 min at 4 °C, and then at 10,000 xg for 10 min at 4 °C. Protein concentration was determined using the tryptophan fluorescence method [30]. After quantification, 50 µg samples were separated by electrophoresis in SDS-PAGE 10% (v/v) gels and stained with Coomassie R250 0.1%. Each lane was destained and dehydrated with ethanol, reduced with 10 mM DTT, alkylated with 50 mM iodoacetamide and digested overnight with 12.5 ng/µL trypsin solution in 50 mM ammonium bicarbonate at 37 °C. The peptides were extracted twice with 30% acetonitrile (ACN), 3% trifluoroacetic acid (TFA) and twice with ACN alone, and then dried in a vacuum centrifuge and desalted with C18 Stage Tips prior to nanoLC-ESI-MS/MS.

2.8. NanoLC-ESI-MS/MS acquisition

Peptides of each sample were separated by online reversed-phase nanoscale capillary liquid chromatography and analyzed by electrospray mass spectrometry in tandem (ESI-MS/MS). The experiments were performed in the mass spectrometry facility RPT02H of Carlos Chagas Institute (Fiocruz, Parana) with a nanoLC-1D plus (Eksigent) coupled to LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) mass spectrometer. Chromatographic separation of the peptide mixtures was carried out on an analytical silica column of 15 cm, 75-µm ID and with a 3 µm diameter C18 particles (Dr. Maisch), flow rate of 250 nL/min of mobile phase (ACN, 0.1% formic acid, 5% DMSO) with a linear gradient from 5 to 40% ACN in 180 min. Peptides were ionized by nano-electrospray (voltage 2.7 kV) and injected into the MS. Full-scan MS spectra (at 300.0–1800.0 *m/z* range) were acquired on an Orbitrap analyzer with a

Table 1
Primers used in this study.

Gene ID	Direction	Sequence	Start	Stop	Tm	GC%	Product length
B9J08_002761	Forward	GGGCCAAAACCTCTACGGAA	96	115	60.0	55.0	248
	Reverse	AGCCGTAAGATCCTGAAGCG	343	324	59.9	55.0	
B9J08_003359	Forward	GCAGAGATCGAGGAAGACGG	154	173	60.0	60.0	150
	Reverse	ACGAGACTCGGCCTTAAGT	303	284	60.0	55.0	
B9J08_001469	Forward	TAGAGCCCATCAGGCTTCCT	239	258	60.0	55.0	166
	Reverse	GCGTCTAGCTCGTTCTCCTC	404	385	60.0	60.0	
B9J08_005424	Forward	GTCGAGCGGGGAGTATCAAG	198	217	60.0	60.0	245
	Reverse	AACACGCCAGTCGAAGAAA	442	423	60.2	50.0	
B9J08_002817	Forward	TGGTCTTCTTCCCATTTGGC	45	64	60.0	55.0	171
	Reverse	GTCAAAAACGTCCAGGTGCC	215	196	60.0	55.0	
B9J08_002202	Forward	CCCCTCCATCATTTGGTCT	344	363	60.0	55.0	172
	Reverse	AAGACACCGAACTGGCGAT	515	496	60.0	50.0	
B9J08_004504	Forward	GGGCAGCTTGTTCATTGACG	750	769	60.1	55.0	168
	Reverse	GTTGCCATATCGGTCAACCG	917	898	60.0	55.0	
B9J08_003737	Forward	ATCTGGCGTGCTACTACTGC	427	446	59.9	55.0	216
	Reverse	CTTGACACCGAAGGCCAGT	642	623	60.0	55.0	

resolution of R = 60,000. The 10 most intense peaks were fragmented by CID and analyzed in the ion trap. A dynamic exclusion list of 90 sec was applied and the “lock mass” option was enabled ($m/z = 401.922718$). The MS data was deposited into the Mendeley Data repository with the dataset identifier <http://dx.doi.org/10.17632/4pbttmb3kx.1>.

2.9. Proteomic data analysis

The LC-MS/MS data were matched against the *C. auris* strain B8441 database from UniProt Knowledgebase (downloaded on November 11, 2020, containing 5,409 sequences) using MaxQuant software version 1.6.17.0 [31]. Among the search parameters were specified a tolerance of 0.5 Da for MS/MS, and 20 ppm for MS first search and 4.5 ppm for MS main search. Quantification was done by the LFQ method. Cysteine carbamidomethylation were set as fixed modification, methionine oxidation and N-terminal acetylation were set as variable modification. The tables generated by Max Quant were analyzed with Perseus software version 1.6.14.0 [32]. A false discovery rate (FDR) of 1% was applied for both peptide and protein identification. The contaminants and reverse sequences were removed. The LFQ intensity was converted to $\log_2(x)$ scale and ANOVA multiple-sample test was performed to determine differentially expressed proteins using p-Value ≤ 0.05 and Fold Change > 2 as cut off.

3. Results

3.1. Caspofungin induces drastic alterations in *C. auris*

We selected for our study two clinical isolates of *C. auris* with distinct morphological properties and similar caspofungin susceptibility profiles. In standard conditions, *C. auris* strain B11244 form cellular aggregates, and the MMC1 strain grows homogeneously. We asked if these characteristics would correlate with the morphological alterations in response to a long exposure (24 h) to caspofungin. The caspofungin concentration used was 10 ng/mL for B11244 and 12.5 ng/mL for MMC1, and was set to be high enough to induce a stress response, but also to allow fungal growth (Fig. 1A, B). In untreated MMC1 cells, well-defined, elliptical-shaped yeast morphology, as well as budding cells with typical bud scars, were observed. B11244 cells showed the typical aggregated growth profile (Fig. 1C). In contrast, caspofungin-treated cells exhibited a severely distorted yeast cell topography, with cells fused together and enlarged yeasts forming clumps mixed with cells with normal morphology (Fig. 1C).

The cell wall of *Candida* spp. in general consists of an inner layer of chitin, b-1,6-glucan and b-1,3-glucan. The cell wall proteins are in the outer layer and are linked to the b-glucan by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors [33]. The cell wall is a plastic structure that can dynamically alter the composition to respond to stress conditions, to allow cell survival [34].

As caspofungin is a drug that interferes with cell wall dynamics, we addressed whether there were alterations of important constituents of the cell wall after the treatment with the antifungal. Indeed, treatment with caspofungin induced cell wall modifications of both strains of *C. auris*. Yeast cells treated with caspofungin had a thickened mannoprotein layer (Fig. 2). Other cell wall components such as chitin and chitin oligomers were addressed by fluorescence microscopy, however only the levels of mannoproteins were promising and were therefore submitted to validation by flow cytometry. The validation by flow cytometry showed that caspofungin modified the cell wall properties of *C. auris* by inducing an increase on the exposure of mannoproteins.

3.2. Caspofungin treatment induces dynamic changes of gene expression related to the cell wall and other cellular processes

We investigated *C. auris* gene expression changes in response to caspofungin treatment using RNA seq. In three independent experiments, *C. auris* strains B11244 and MMC1 were cultivated for 24 h in the absence or presence of sub-inhibitory concentrations of caspofungin. We used principal-component analysis (PCA) and a heat map for the hierarchical clustering to analyze the similarities between the replicates and the differences among the treated and untreated samples. The samples clustered together, indicating a high level of correlation, whereas the treated and untreated samples clustered separately, consistent with a specific and global transcriptome response (Fig. S1).

To assess whether the transcripts were differentially expressed, we set the statistical significance of false-discovery rate (FDR) smaller than 5% and a fold change of at least 2x as requirements for differentially expressed transcripts. We found that 1088 transcripts were differentially expressed in the B11244 strain and 1589 in the MMC1 strain (Table S2). When we compared the transcripts common to both strains, we observed 657 mRNAs, which corresponds to 60% and 41% of the differentially expressed transcripts in B11244 and MMC1 strains, respectively (Table S2). The tables 2 and 3 present the most expressed transcripts identified in both strains and also those exclusive to B11244 and MMC1.

To evaluate the impact of caspofungin treatment in the gene expression of *C. auris*, we performed a functional enrichment analysis of the differentially expressed transcripts regulated in the

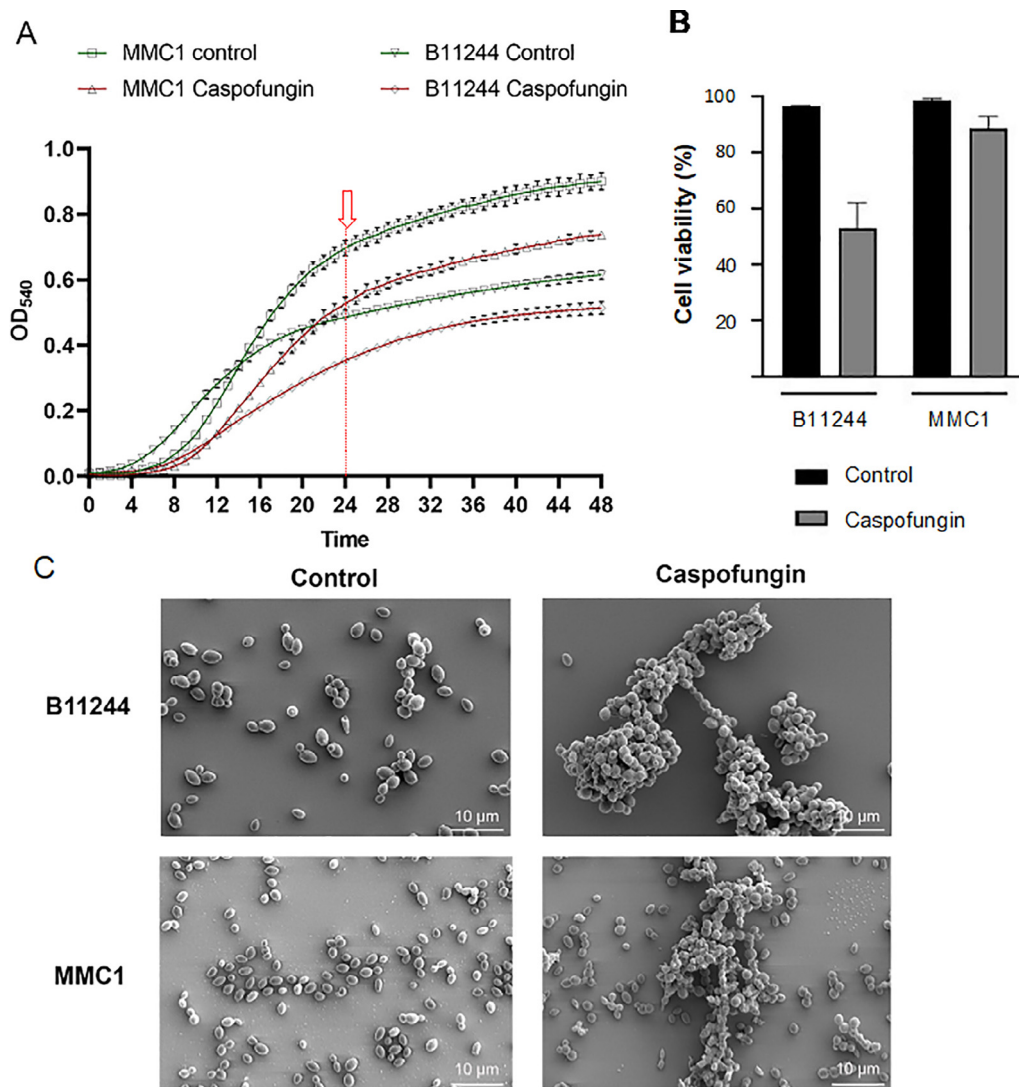


Fig. 1. Caspofungin treatment led to morphological alterations in *C. auris*. (A) Growth curve of *C. auris* in the presence or absence of caspofungin. The growth was analyzed, and the assay was performed in a technical and biological triplicate. The significance was calculated by ANOVA, the red arrow and the red dotted line indicate the time that the cells were collected for the study. (B) Effect of sub-optimal concentration of caspofungin on viability of *C. auris*. Cultures of *C. auris* were cultivated with or without caspofungin for 24 h and cell viability was addressed by propidium iodide staining and analysis by flow cytometry. Graphs represent average and standard deviation for 4 independent experiments. (C) Scanning electron microscopy images of *C. auris* at 1400x magnification. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

presence of caspofungin in both MMC1 and B11244 strains. Firstly, we explored the 356 transcripts upregulated in the presence of the antifungal. Caspofungin induced changes in many important pathways such as cell cycle, glycolysis/gluconeogenesis (fold change 4.56, FDR 0%), cell wall formation (fold change 4.16, FDR 0%) and various types of N-glycan biosynthesis (fold change 4.71, FDR 3%), which are also linked to the synthesis of the cell wall (Fig. 3). The most expressed transcripts in response to the antifungal were histones and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in both MMC1 and B11244 strains (Table 2, Fig. 3 and Fig. 4). Among the 301 downregulated transcripts, we identified ribosome biogenesis in eukaryotes (fold change 9.93, FDR 0%) as the more prevalent pathway (Table 3 Fig. 3 and Fig. 4).

We then analyzed the transcripts exclusively changed in the MMC1 strain. With these parameters, 483 transcripts were upregulated in the presence of caspofungin. The enriched pathways associated with these mRNAs were related to the functionality of ribosome (fold change 2.91, FDR 5%), mitochondrial (fold change 2.74, FDR 3%) and DNA replication (fold change 4.0, FDR 2%)

(Fig. 3 and Table S3). The 449 downregulated transcripts upon caspofungin treatment in the MMC1 strain included numerous mRNAs coding for transcription factors (fold change 3.36, FDR 5%), nuclear functionality (fold change 1.67, FDR 3%), and autophagy pathways (fold change 6.45, FDR 2%) (Table S3).

A similar analysis with the B11244 strain revealed 176 transcripts that were upregulated during caspofungin treatment. The enriched terms reflected changes in protein export (fold change 6.71, FDR 1%), endoplasmic reticulum functionality (fold change 5.39, FDR 2%), and spindle body formation (fold change 22.31, FDR 4%) (Fig. 3 and Table S3). As for downregulated mRNAs ($n = 255$), the associated pathways were ribosome biogenesis (fold change 5.61, FDR 0%), spliceosome functionality (fold change 4.71, FDR 1%), and rRNA processing (fold change 6.51, FDR 0%) (Fig. 3 and Table S3).

To validate the consistency of our analysis of the response to caspofungin in *C. auris*, we performed qPCR (Fig. S2). We selected transcripts with distinct levels of expression in order to validate the RNA seq data (Fig. S2). As a reference for the relative expression

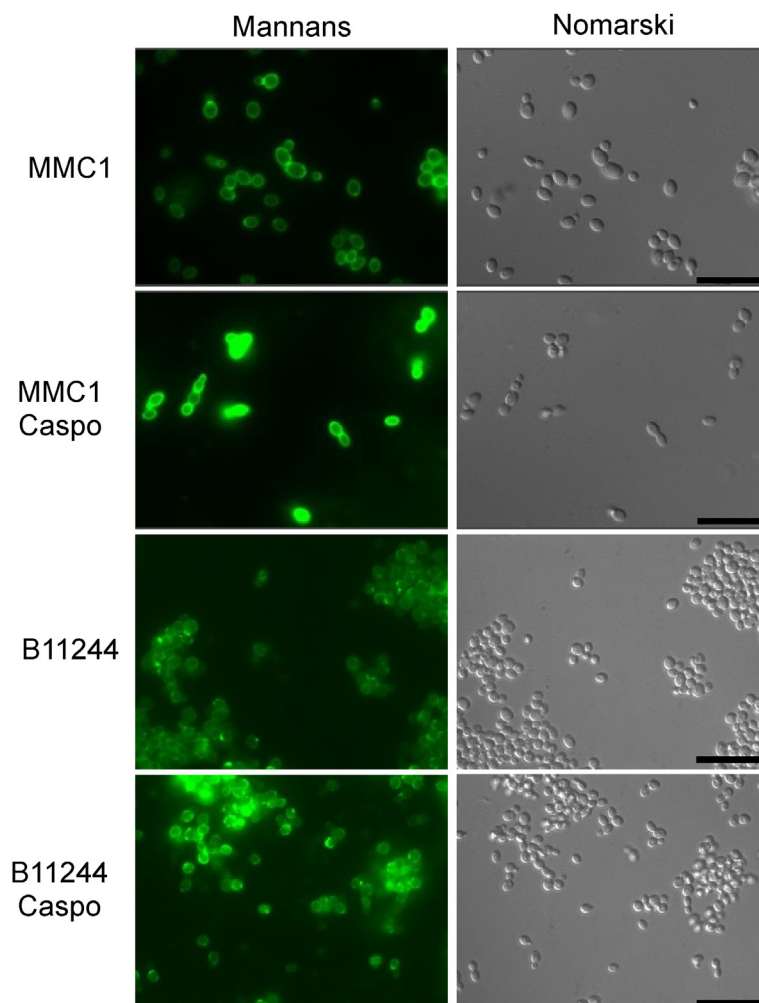


Fig. 2. Effect of caspofungin on *C. auris* yeast cells. Yeast cells were treated with sub-lethal concentrations of caspofungin for 24 h until the evaluation of cell wall components by microscopy. Bars = 20 μ m. CAS – caspofungin.

analysis, we selected the C5 sterol desaturase because this transcript expression level did not vary comparing the control and treatment conditions. Indeed, the relative quantification of the transcripts were in accordance with the expression levels detected by the RNA-seq comparing the experimental conditions (Fig. S2).

3.3. Correlation between transcriptome and cellular metabolism

We asked whether the transcriptomic responses correlated with cellular alterations. For example, there were modifications in the cell wall of *C. auris* upon caspofungin treatment (Fig. 2), in addition to a high number of upregulated mRNAs related to cell wall biogenesis and organization, including mannan metabolism. Mannosylation levels of the cell surface were measured by flow cytometry and, indeed, mannosyl detection was greater when the cells were submitted to the caspofungin treatment (Fig. 5).

3.4. Proteomic analysis in response to caspofungin

Proteomic analyses of *C. auris* B11244 and MMC1 strains were performed in biological triplicates and technical duplicates. In total, 2004 proteins from the control and caspofungin groups were identified. The data was filtered based only in peptides identified in at least 2 replicates, and a minimum value of log fold change of 2 was established. Next, the proteins were filtered based on the value of $p \leq 0.05$, in the ANOVA tests with multiple samples, total-

ing 632 proteins for the B11244 strain and 628 for the MMC1 strain that presented a fold change of at least 2 when control conditions and caspofungin treatment was considered (Table 4). The values of zero were kept in the matrices, without choosing to substitute the value of the normal distribution or the value of a constant. The control and treatment groups shared 328 proteins in common, but also have an expressive number of exclusive proteins for the studied strains.

Using a fold change cutoff for protein detection equal to or >2 , between the control group and caspofungin-treated cells, 63 proteins were positively regulated and 85 negatively regulated in strain B11244 after antifungal treatment. In strain MMC1, 40 proteins were positively regulated, while 44 proteins were down regulated (Table S4).

The biological processes predicted by the ontology confirms the stress state of the cell. It was also possible to establish a relationship between the observed response and the previously identified antifungal mechanisms of caspofungin. There were a number of proteins enriched in caspofungin-treated cells related to cell wall synthesis/integrity and ribosomes, which were common to both strains (Fig. 6). Caspofungin treatment also induced a common enrichment of proteins related to the cell-wall organization (FDR 0.35%), in addition to translation (FDR 4.90%) and enzymes related to β -glucan metabolism (FDR 1.20%) (Table 4). Among the most differentially expressed proteins, we highlight the observation that Mkc1 and Phr2 have been previously implicated in stress response,

Table 2
The top upregulated transcripts upon caspofungin treatment. Max group mean – the average TPM values.

	Name	Max group mean	Log ₂ fold change	FDR	Description
B11244 and MIMC1	B9J08_002753	4761.47	6.67	0.00%	hydroxyproline-rich glycoprotein
	B9J08_002073	3997.04	6.55	0.00%	Histone H4
	B9J08_001366	3461.93	6.46	0.00%	Predicted GPI-anchored protein 6
	B9J08_002072	3930.54	6.39	0.00%	Histone H3.1/H3.2
	B9J08_005359	2559.45	5.20	0.00%	Secreted beta-glucosidase SUN41
	B9J08_004410	2279.71	5.09	0.01%	Extracellular glycosidase CRH11
	B9J08_000384	3022.22	4.92	0.00%	1,3-beta-glucanosyltransferase
	B9J08_004476	3484.02	4.82	0.00%	uncharacterized cell wall protein
	B9J08_005144	4062.12	4.78	0.00%	Histone H2A.1
B9J08_002493	2636.68	4.64	0.00%	Pga59 adhesin-like protein	
B11244	B9J08_002142	2805.77	1.64	0.08%	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
	B9J08_000486	2312.44	1.15	3.16%	Actin
	B9J08_003127	2097.70	1.23	3.46%	Ribosomal 60S subunit protein L17B
	B9J08_005387	2055.72	1.32	1.38%	Eukaryotic translation initiation factor 5A
	B9J08_002691	1821.48	1.49	0.64%	Flavoheomprotein
	B9J08_003919	1814.79	1.54	0.73%	60S Ribosomal protein L27
	B9J08_000091	1347.60	1.32	2.72%	Ribosomal 40S subunit protein S19A
	B9J08_001974	1330.98	1.33	2.65%	Ribosomal 40S subunit protein S3
	B9J08_001940	7985.33	1.60	0.00%	Small Heat shock protein 12
MIMC1	B9J08_001161	1605.02	1.52	0.00%	Coproporphyrinogen oxidase
	B9J08_004918	909.20	1.92	0.00%	Heat shock protein 90 homolog
	B9J08_004172	772.22	2.12	0.00%	Lip1p
	B9J08_001090	687.44	2.09	0.00%	Thioredoxin reductase
	B9J08_004965	672.70	3.04	0.00%	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit
	B9J08_002819	613.04	1.84	0.00%	Hsp70 family ATPase
	B9J08_000645	603.55	1.73	0.00%	peroxiredoxin TSA1

Table 3
The top upregulated transcripts under control conditions. Max group mean – the average TPM values.

	Name	Max group mean	Log ₂ fold change	FDR	Description
B11244 and MIMC1	B9J08_003627	6238.65	-2.13	0.01%	Small heat shock protein 21
	B9J08_003998	3381.62	-2.76	0.01%	Acetyl-coenzyme A synthetase
	B9J08_001464	3022.49	-2.77	0.01%	phosphate transporter
	B9J08_001591	2774.89	-1.94	0.01%	Glutamate decarboxylase
	B9J08_002108	2650.98	-1.96	0.01%	High-affinity iron permease
	B9J08_002216	2566.73	-1.94	0.01%	Cyclin protein
	B9J08_003595	2511.34	-2.01	0.01%	Moh1p
	B9J08_002220	2503.36	-1.57	0.01%	Clg1p
	B9J08_002813	2499.27	-1.70	0.01%	Elongation factor 3
B9J08_000928	2440.98	-3.18	0.01%	Aqy1p	
B11244	B9J08_003099	10596.26	-1.92	0.12%	Thiamine thiazole synthase
	B9J08_004450	4067.92	-2.06	1.59%	Pyrimidine biynthesis enzyme THI5
	B9J08_000483	910.56	-1.88	0.12%	Heat shock protein SSA1
	B9J08_004930	895.01	-2.58	0.00%	Phenylpyruvate decarboxylase
	B9J08_004170	813.08	-1.20	2.65%	ATP-dependent RNA helicase DBP2
	B9J08_001064	630.27	-1.22	1.92%	phosphatidylglycerol phospholipase
	B9J08_002886	612.88	-2.24	0.00%	Glycerophosphocholine permease GIT4
	B9J08_000969	597.47	-2.05	0.00%	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type
	B9J08_003088	7436.73	-3.84	0.00%	Aldehyde dehydrogenase (NAD(P)(+))
MIMC1	B9J08_003614	6869.99	-6.44	0.00%	alcohol dehydrogenase 2
	B9J08_000938	2880.22	-1.90	0.00%	glucose-inactivated glycerol proton symporter
	B9J08_000460	2460.05	-1.78	0.00%	Aspartate aminotransferase
	B9J08_003454	1930.57	-1.74	0.00%	Adaec protein
	B9J08_001679	1035.95	-1.74	0.00%	Transcription factor CPH2
	B9J08_005453	996.47	-2.21	0.00%	Serine C-palmitoyltransferase
	B9J08_002840	847.06	-2.75	0.00%	Stress-responsive transcriptional activator

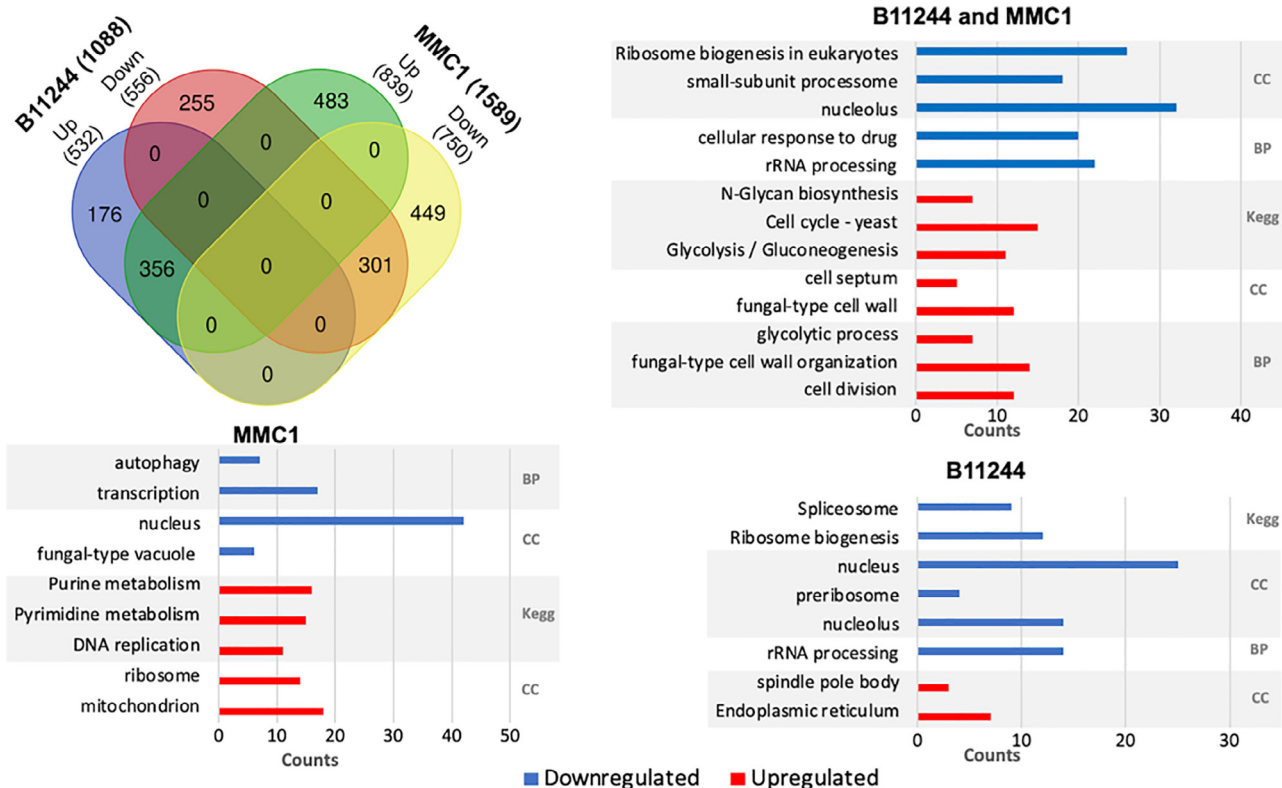


Fig. 3. Venn diagram of the mRNAs identified in the B11244 (n = 1088) and MMC1 (n = 1588) strains after the statistical filters were applied. The transcripts equally expressed in both strains are the intersection of the diagram (n = 657). The bar charts represent the enriched functional categorization of the transcripts based on gene ontology (GO) annotations, in blue the terms associated to the downregulated and in red the upregulated transcripts. The x-axis represents the counts for each term and for the GO analysis the terms were statistically filtered by FDR ≤ 5%. BP – biological process, CC – cellular component, Kegg – Kyoto encyclopedia of genes and genomes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cell wall biogenesis, and virulence (Fig. 4) [35]. In strain B11244, a response associated with protein processing in endoplasmic reticulum (FDR 4%) was exclusively observed. More specifically, mitochondrial heat shock protein 60, pleiotropic ABC efflux transporter of multiple drugs CDR1, hsp70 family ATPase, and mitochondrial heat shock protein 78 were upregulated (Fig. S3 and Table S4). Hog1, which interacts with Mkc1 and plays a role in the integrity of the cell wall in addition to presenting different responses to stress, was also enriched in caspofungin-treated cells. In the MMC1 strain, the most abundant proteins in caspofungin-treated cells were ribosomal (FDR 0.21%, 50% of the total proteins identified as exclusive to MMC1), and cell wall-related (FDR 4.7%) (Fig. S4 and Table S4). As for the proteins identified in the control condition, the most observed terms were amino acid metabolism and secondary metabolites in both strains (FDR 0.15%) (Table 4).

4. Comparison between transcriptomic and proteomic responses in response to caspofungin.

The combined results of RNA and protein analyses indicated an integrated response of the cells after exposure to caspofungin. Specifically, cell wall proteins, ribosomes and those involved with the protein processing in the endoplasmic reticulum were identified as participants of the response of *C. auris* to caspofungin (Fig. 7), as concluded from the increased detection of these classes after drug exposure in both RNA and protein analyses. Proteins associated with virulence were upregulated in both mRNA and protein analyses, including Hog1, Phr2, in addition to those related to cell wall synthesis (mannose-6-phosphate isomerase, mannose-

1-phosphate guanylyltransferase, mannan endo-1,6-alpha-mannosidase DFG5, glucan 1,3-beta-glucosidase BGL2, glucan 1,3-beta-glucosidase, and 1,3-beta-glucanosyltransferase PGA4).

5. Discussion

C. auris is a major threat to public health, as extensively discussed in this study and many others [6,36–41]. To understand how *C. auris* responds to major antifungals is essential for the design of therapeutic strategies, and for the identification of cellular targets for novel antifungals. The mechanism of antifungal activity of caspofungin, the first-line treatment against *C. auris*, is already known. However, how the inhibition of cell wall synthesis is orchestrated with other cellular responses remains unknown. The caspofungin antifungal drug acts by inhibiting the β-1,3-glucan synthase. It targets the catalytic glucan synthase FKS subunits, therefore suppressing the synthesis of b-1,3-glucan in the fungal cell wall [42–44].

We identified multiple pathways that were significantly modified by the treatment of *C. auris* with caspofungin. Molecules involved in N-glycan biosynthesis were enriched in *C. auris* treated with caspofungin, which is consistent with cell wall rearrangement. In *C. neoformans*, N-linked glycosylation is an important modulator of host cell death, and therefore has a critical role in pathogenicity [45]. Cryptococcal mutants harboring truncated N-glycans were not pathogenic in mice, despite being able to attach to lung epithelial cells and enter them through phagocytosis. Also, *C. neoformans* capacity for cell wall remodeling was maintained, but they induced less cell death in macrophages, a mechanism used for pulmonary escape and dissemination *in vivo* [45]. These

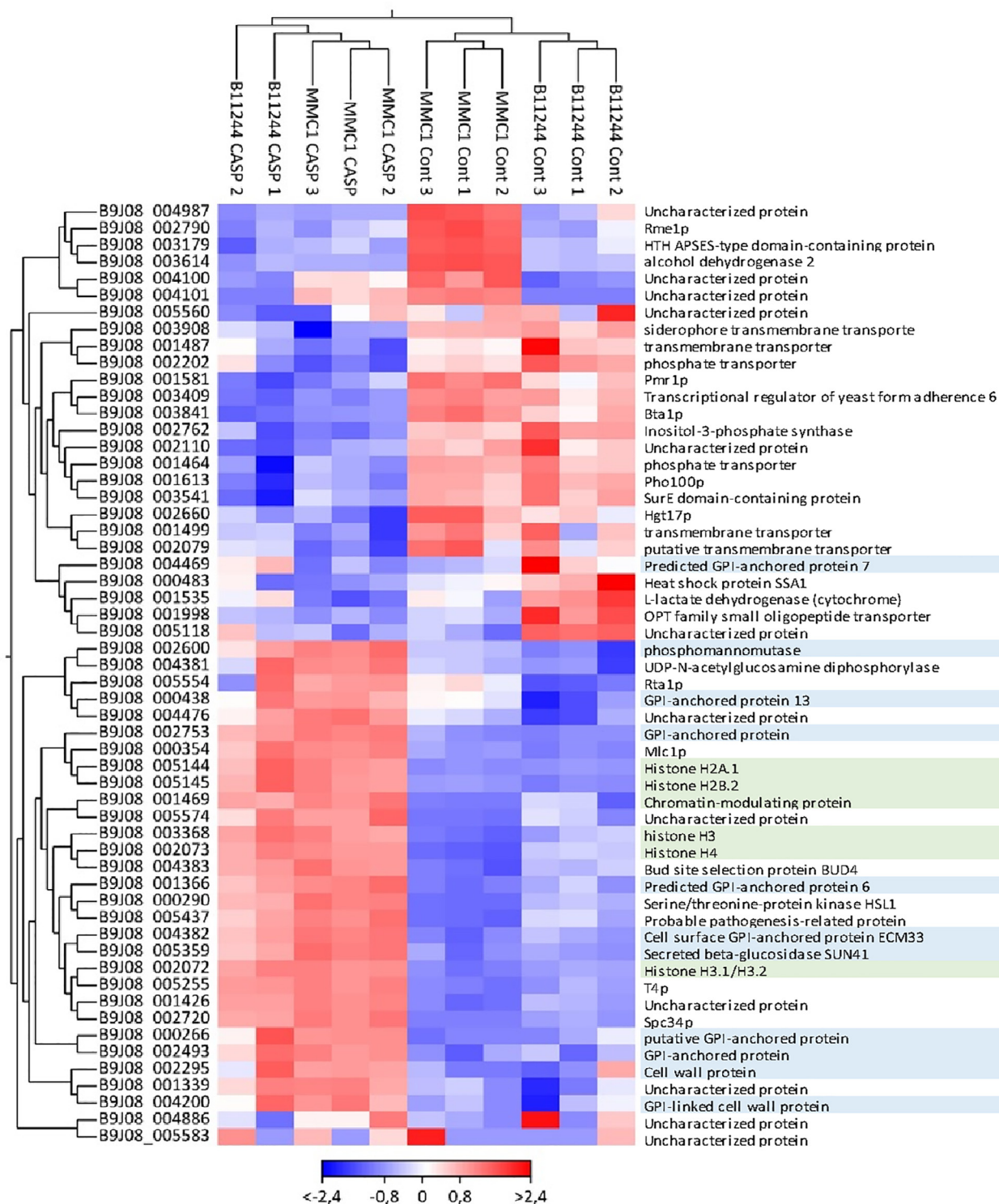


Fig. 4. Heat map of the top most differentially expressed transcripts common to both B11244 and MMC1 strains (n = 11). The color scheme refers to log₂ of the Fold change. Each column refers to one of the experimental replicates. The genes names were colored: In blue represent the transcripts related to cell wall and in green with nucleosome. The parameters for this analysis were: FDR < 0.01 and absolute fold change > 8. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

results indicate that, if a similar process occurs in *C. auris*, caspofungin treatment could impact fungal virulence.

Cell wall related transcripts, such as GPI-anchored associated genes, were the most expressed genes in the presence of caspofungin for both strains in our study. Interestingly, cell wall genes were previously shown to be upregulated during the initial hours

of biofilm formation in *C. auris* [22]. This high expression levels of cell wall related transcripts could be a compensatory mechanism to circumvent the absence of glucans with other components, such as chitin and mannans, which may reduce *C. auris* susceptibility to antifungal drugs. In fact, our results support such compensatory mechanisms, as evidenced by altered levels of the

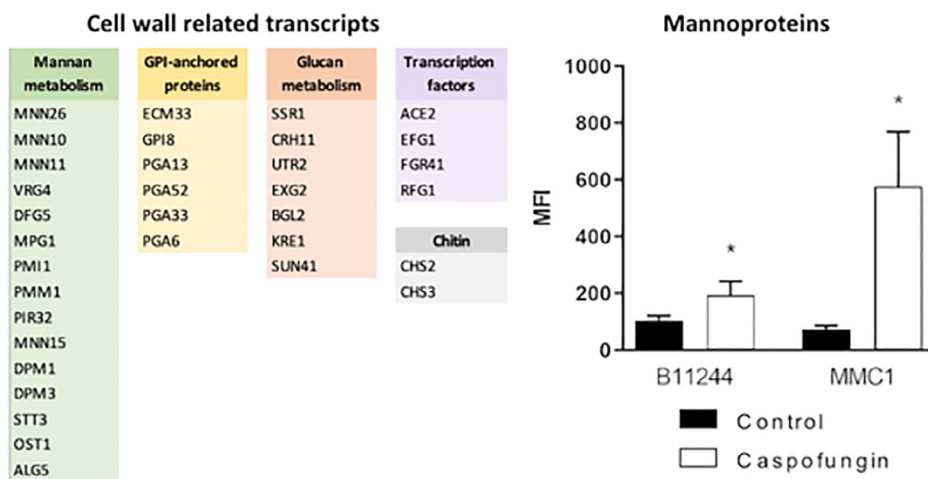


Fig. 5. Cell wall alterations and correlation with the transcriptomic data. The transcripts associated to cell wall and mannoproteins measurement by flow cytometry. * indicates $p < 0.05$ by one-way Anova followed by Bonferroni’s multicomparisons test for four independent experiments. MMC1: Control vs caspo p-value = 0.0459. B11244: Control vs caspo p-value = 0.0253.

Table 4

Enriched pathways or gene ontology terms associated to the proteomic data in response to caspofungin treatment and the control conditions.

		Category	Term	P-Value	Fold Enrichment	Fisher Exact
B11244 MMC1	Caspofungin	GOTERM_BP	Fungal-type cell wall organization	1.10E-03	16.7	6.30E-05
		GOTERM_MF	1,3-beta-glucanosyltransferase activity	1.30E-02	138.3	8.30E-05
		GOTERM_BP	Translation	3.10E-02	9.6	3.10E-03
		GOTERM_CC	Yeast-form cell wall	8.70E-02	19.9	4.30E-03
		KEGG_PATHWAY	Ribosome	5.00E-02	7.2	6.80E-03
	Control	KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of secondary metabolites	8.40E-05	4.9	1.70E-05
		KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of amino acids	1.20E-04	9	1.30E-05
		KEGG_PATHWAY	Histidine metabolism	1.60E-03	43.2	3.40E-05
		GOTERM_CC	Yeast-form cell wall	3.50E-04	14.2	2.30E-05
		GOTERM_BP	thiamine biosynthetic process	3.50E-02	54.1	5.60E-04
B11244	Caspofungin	KEGG_PATHWAY	Protein processing in endoplasmic reticulum	7.60E-03	4.6	1.60E-03
		GOTERM_BP	GDP-mannose biosynthetic process	2.50E-02	75.7	2.70E-04
		GOTERM_BP	thiamine biosynthetic process	3.50E-02	54.1	5.60E-04
		KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of secondary metabolites	6.20E-09	3.3	1.80E-09
		KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of amino acids	1.90E-08	5.3	3.30E-09
	Control	KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of antibiotics	7.00E-05	2.9	2.30E-05
		KEGG_PATHWAY	2-Oxocarboxylic acid metabolism	2.50E-04	7.5	2.90E-05
		KEGG_PATHWAY	Histidine metabolism	2.50E-04	15	1.40E-05
		KEGG_PATHWAY	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.90E-03	13.3	1.80E-04
		GOTERM_MF	structural constituent of ribosome	2.00E-03	13.6	1.40E-04
MMC1	Caspofungin	KEGG_PATHWAY	Ribosome	3.00E-03	10.7	2.70E-04
		GOTERM_BP	Translation	4.10E-03	10.9	3.60E-04
		KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of amino acids	7.20E-07	6.9	9.90E-08
	Control	KEGG_PATHWAY	Histidine metabolism	4.70E-04	24	1.70E-05
		KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of secondary metabolites	2.00E-03	2.8	6.90E-04
		KEGG_PATHWAY	2-Oxocarboxylic acid metabolism	9.50E-03	8.5	1.00E-03
		KEGG_PATHWAY	Lysine biosynthesis	1.40E-02	15.8	8.00E-04
		KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of antibiotics	1.60E-02	2.7	5.60E-03

transcripts, as well as the altered detection of mannans and chitin at the cell wall. This outcome has been described for several *Candida* species that rapidly responded to caspofungin by increasing the cell wall chitin content [46,47]. In addition, a similar result was observed in *Aspergillus fumigatus* where caspofungin treatment led to an increased chitin content, which reduced susceptibility to the antifungal, and altered cell morphology [48]. As for the mannan synthesis, the mRNA coding the GPI-anchored protein ECM33 was one of the most upregulated transcripts in both *C. auris* strains under caspofungin treatment. ECM33 helps the assembling of the mannoprotein outer layer of the cell wall [49]. Supporting our mRNA data, *C. auris* yeast cells from both strains presented a dramatic increase in their mannoprotein layer under caspofungin treatment.

Our results demonstrated a high expression of mRNAs coding for histones. In *C. albicans*, the availability of specific chromatin

modifiers can affect drug resistance [50]. The transcription factor Cas5 has been implicated in stress responses, drug resistance and cell cycle regulation in *C. albicans* (52).

We also observed a higher expression of mRNAs coding for ribosomal proteins in *C. auris* treated with caspofungin, which was more evident in the MMC1 strain. These results are in agreement with a previous study characterizing the *C. auris* transcriptome during amphotericin B and voriconazole treatment [39]. Upon amphotericin B treatment, the upregulated genes were related to translation and ribosomal proteins [39]. Compared to our data, we found 78 common transcripts also upregulated in the presence of caspofungin. Most of the mRNAs responding to amphotericin B treatment (46) were also identified in our study (Table S5). We also found 30 transcripts upregulated during both caspofungin (this study) and voriconazole treatments [39]. In these common transcripts, the majority of the mRNAs code for ribosomal proteins

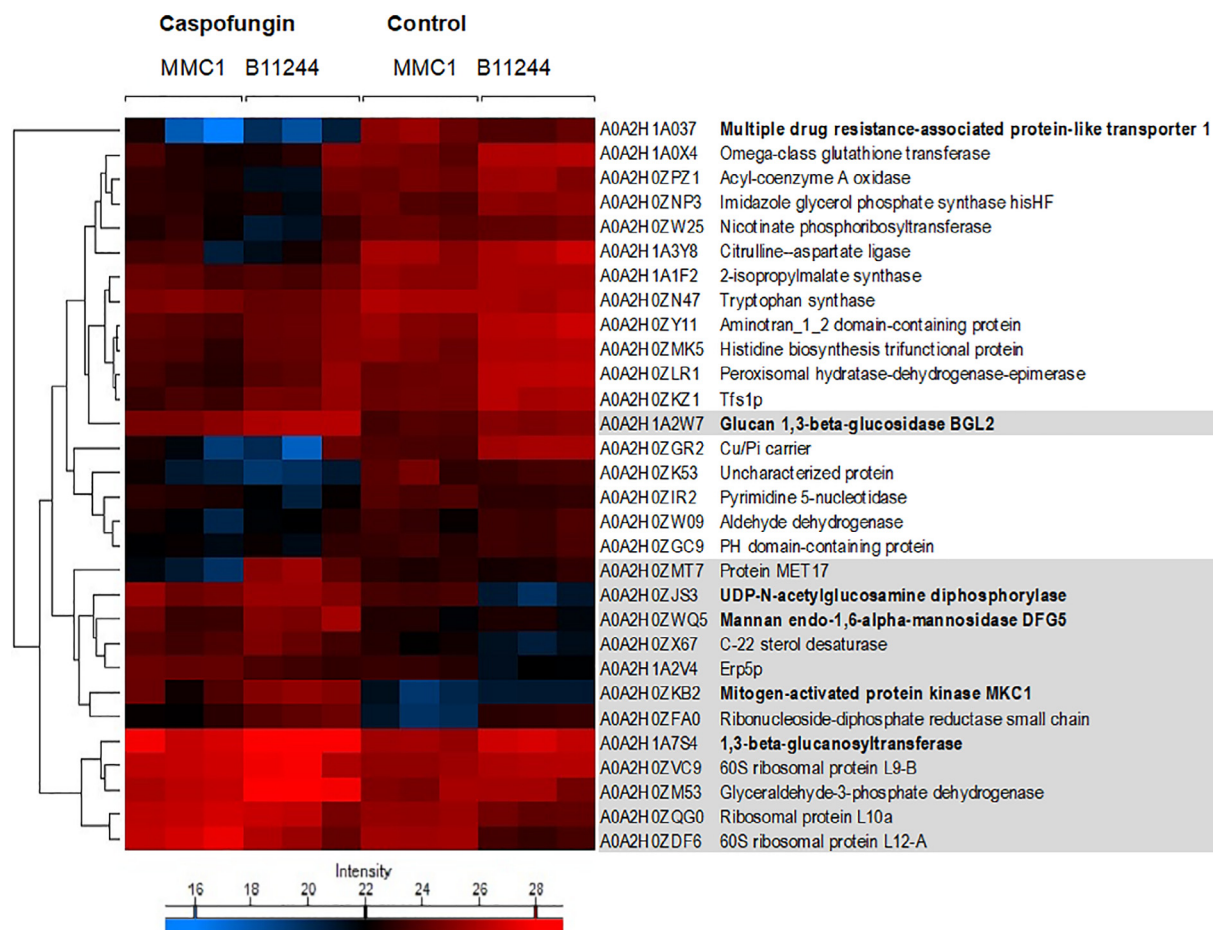


Fig. 6. Comparison between differentially expressed proteins ($FC > 2$) in caspofungin treated and control cells common in B11244 and MMC1 strains ($n = 12$). The B11244 or MMC1 strains (columns) and protein groups (lines) were hierarchically clustered. The protein intensity was represented by color scale (blue, lower intensity; red, higher intensity). Highlighted in grey are the proteins more abundant in the caspofungin treatment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Table S5). In addition, during the biofilm formation in *C. auris*, the most consistent mRNAs upregulated were those coding ribosomal proteins [22] (Table S5). In a study that combined proteomics and microarray analyses of *A. fumigatus* treated for 24 h with caspofungin, 81% of the overexpressed proteins and 86.4% of the mRNAs were ribosomal [52]. This change was suggested to be associated with a ribosomal reshuffling response, which reflects a requirement for more protein synthesis to overcome the inhibition caused by the antifungal drug [53]. In a recent work, a *C. auris* strain was adapted to high concentrations of caspofungin and subjected to RNA-seq. Similar to our observations, most of the differentially expressed transcripts enriched in response to caspofungin coded for cell wall proteins [51]. We then compared our data with the results obtained of *C. auris* after 3 h in the presence of high caspofungin concentration and it was possible to observe a partial overlap in the transcripts differentially expressed. The common enriched pathways were fungal cell wall, amino sugar metabolic process, chitin synthase and mannan endo-1,6-alpha-mannosidase activity (Table S5). These similarities confirm our data and reinforces the important role not only of chitin, but also other cell wall proteins as a compensatory mechanism to allow cell survival.

Our proteomic analysis supported the transcriptomic data. The cell wall biogenesis and degradation were enriched in our proteomic and transcriptomic analyses after exposure to caspofungin. The enrichment of transcripts and proteins related to biofilm for-

mation, translation, GPI-anchored proteins, and mannose related proteins during caspofungin treatment was also consistently verified in both analyses. It is already known that the establishment of biofilms contributes to the success of the infection [54], just as they confer a greater resistance of the organism to antifungals [55]. *C. auris* expresses proteins related to biofilm formation and maintenance in higher levels compared to *C. albicans* [56]. It is worth mentioning the presence of two important proteins that play roles in various metabolic pathways Mkc1 and Hog1. Mkc1 is an important kinase in pathogenic fungi, is part of a MAPK pathways, associated to many metabolic pathways in the cell. Mkc1 is involved in cell cycle and also in maintaining cell wall integrity [57]. It is also involved in the tolerance of *C. albicans* to caspofungin [35,58]. Hog1 is also part of the MAPK response and was identified more expressed in the B11244 strain. The HOG pathway plays an essential role in *C. albicans*, including infection, virulence, and stress response [59]. In *C. auris*, Hog1 is also associated to virulence and stress response [60]. The deletion of hog1 in *C. auris* lead to a reduced resistance to caspofungin, amphotericin B and cell wall composition [61]. This result is in accordance with our observation that in the presence of caspofungin HOG1 was more expressed, and this could allow adaptation in the presence of the antifungal and cell wall remodeling.

We showed that an extensive cell wall remodeling, transcriptional and translational alterations occur in *C. auris* upon caspofungin treatment. In distinct *Candida* species, it has been

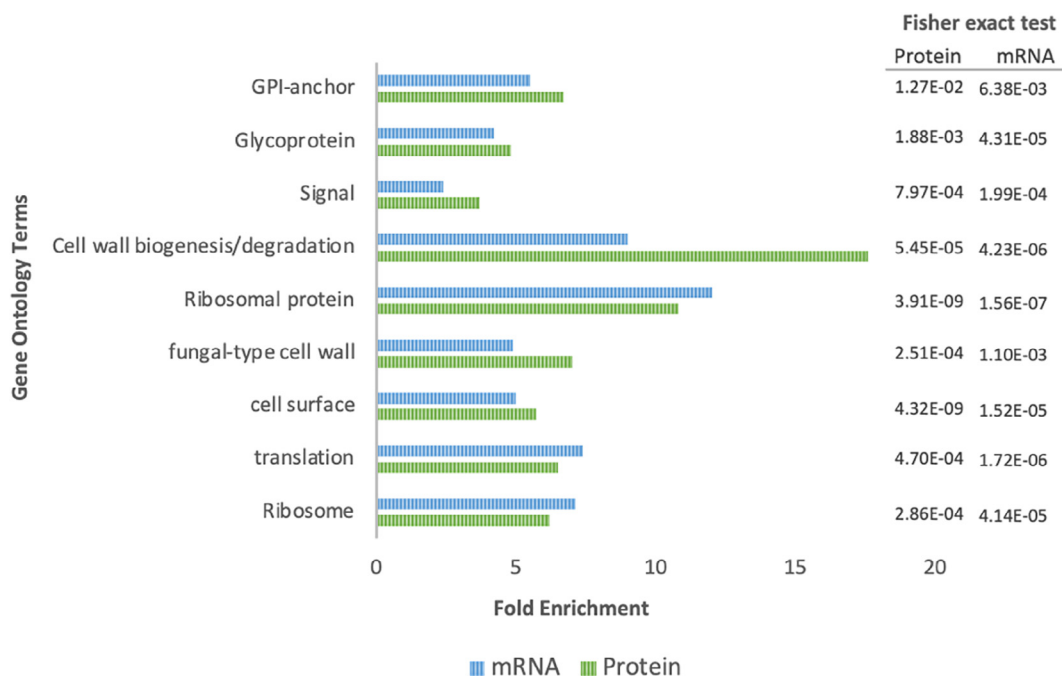


Fig. 7. Comparison of the gene ontology terms enriched in the transcriptome and proteome upon caspofungin treatment. The bar charts represent the enriched functional categorization of the transcripts based on gene ontology (GO) annotations. In blue the terms associated to mRNAs and in green the terms associated to the proteomic data from both strains. The x-axis represents the fold enrichment for each term and the numbers on the right express the statistic values - Fisher exact test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

described that in response to caspofungin, the cells increased the chitin content and b-1,3-glucan become more exposed on the cell surface [46,47,62]. We did not observe a clear enrichment in chitin; however, we observed an increased detection of mannans. In accordance with our current observations in *C. auris*, in *Candida glabrata* caspofungin treatment led to higher amounts of mannans on the cell wall [63]. Therefore, our results consolidate the notion that not only chitin but also mannan synthesis, is an important of *C. auris* to a long exposure to caspofungin. Interestingly, *C. auris* mannoproteins are unique compared to other pathogenic *Candida* species [64]. In fact, the presence of these unique mannans in *C. auris* affects the recognition by and modulation of the host immune cells. When cell wall components derived from *C. albicans* and *C. auris* were used to stimulate PBMCs, it was observed that after 4 h, the PBMC transcriptomic alteration was due to the β -glucan in both species. However, in a late response (24 h), *C. auris* mannans were the main component eliciting the response in PBMC gene expression, and this was not observed in *C. albicans*, maybe due to the specific mannan composition in *C. auris* cell wall [65]. Our study demonstrates, by transcriptomics, proteomics and cellular measurement, an important role for mannan in the adaptation of *C. auris* during growth with caspofungin, in addition to chitin, which has been extensively explored. This biosynthesis pathway can be a drug target and should be better explored, as already described for host-pathogen interaction.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank the staff of the Genomics section of the Life Sciences Core Facility (LaCTAD), part of the University of Campinas (UNI-

CAMP), for their contributions to RNA-sequencing. J.D.N., D.Z.-M. and E.S.N. were partially supported by NIH R21 AI124797. M.L.R. was supported by grants from the Brazilian Ministry of Health (grant number 440015/2018-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grants 405520/2018-2, and 301304/2017-3) and Fiocruz (grants VPPCB-007-FIO-18 and VPPIS-001-FIO18). The authors also acknowledge support from the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças de Populações Negligenciadas (INCT-IDPN). M.L.R. is currently on leave from the position of Associate Professor at the Microbiology Institute of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. L.R.A received financial support from Inova Fiocruz/Fundação Oswaldo Cruz [Grant number VPPCB-07-FIO-18-2-52] and CNPq [Grant number 442317/2019-0]. L.R.A is a research fellow awardee from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.09.007>.

References






- [1] Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *J Fungi* 2017;3:57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- [2] Cortegiani A, Misseri G, Chowdhary A. What's new on emerging resistant *Candida* species. *Intensive Care Med* 2019;45(4):512–5. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5363-x>.
- [3] Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>.
- [4] de Jong AW, Hagen F. Attack, defend and persist: how the fungal pathogen *Candida auris* was able to emerge globally in healthcare environments. *Mycopathologia* 2019;184(3):353–65. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00351-w>.
- [5] Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016;5(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0132-5>.

- [6] Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis* 2017;64(2):134–40. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>.
- [7] Rhodes J, Abdolrasouli A, Farrer RA, Cuomo CA, Aanensen DM, Armstrong-James D, et al. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. *Emerg Microbes Infect* 2018;7(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0045-x>.
- [8] Nett JE. *Candida auris*: An emerging pathogen “incognito”? 2019;6–11.
- [9] Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol* 2009;53:41–4. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>.
- [10] Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A, et al. *Candida auris*: a review of the literature. *Clin Microbiol Rev* 2018;31(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-17>.
- [11] Eyre DW, Sheppard AE, Madder H, Moir I, Moroney R, Quan TP, et al. *Candida auris* outbreak and its control in an intensive care setting. *N Engl J Med* 2018;379(14):1322–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714373>.
- [12] Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, et al. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *J Clin Microbiol* 2017;55(10):2996–3005. <https://doi.org/10.1128/JCM.00921-17>.
- [13] Adams E, Quinn M, Tsay S, Poirot E, Chaturvedi S, Southwick K, et al. *Candida auris* in healthcare facilities, New York, USA, 2013–2017. *Emerg Infect Dis* 2018;24(10):1816–24. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180649>.
- [14] Lamoth F, Kontoyiannis DP. The *Candida auris* Alert: facts and perspectives. *J Infect Dis* 2018;217:516–20. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix597>.
- [15] Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Paul RA, Sood P, Kaur H, Capoor MR, et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1794–801. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx034>.
- [16] Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S, et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:891–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx480>.
- [17] Kordalewska M, Lee A, Park S, Berrio I, Chowdhary A, Zhao Y, et al. Understanding Echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e00238–e318. <https://doi.org/10.1128/AAC.00238-18>.
- [18] Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis* 2017;23(2):328–31. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161320>.
- [19] Horton MV, Nett JE. *Candida auris* infection and biofilm formation: Going beyond the surface. *Curr Clin Microbiol Rep* 2020;7(3):51–6. <https://doi.org/10.1007/s40588-020-00143-7>.
- [20] Dominguez EG, Zarnowski R, Choy HL, Zhao M, Sanchez H, Nett JE, et al. Conserved role for biofilm matrix polysaccharides in *Candida auris* drug resistance. *MSphere* 2019;4(1). <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00680-18>.
- [21] Huang MY, Woolford CA, May G, McManus CJ, Mitchell AP, Lin X. Circuit diversification in a biofilm regulatory network. *PLoS Pathog* 2019;15(5):e1007787.
- [22] Kean R, Delaney C, Sherry L, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. *MSphere* 2018;3. 10.1128/mSphere.00334-18.
- [23] Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010;11(3):R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.
- [24] McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:4288–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gks042>.
- [25] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- [26] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–402.
- [27] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 2009. 10.1093/nar/gkn923.
- [28] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4(1):44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [29] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009. 10.1373/clinchem.2008.112797.
- [30] Wiśniewski JR, Gaugaz FZ. Fast and sensitive total protein and peptide assays for proteomic analysis. *Anal Chem* 2015;87(8):4110–6. <https://doi.org/10.1021/ac504689z>.
- [31] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008;26(12):1367–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>.
- [32] Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016;13(9):731–40. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
- [33] Gow NAR, Latge J-P, Munro CA, Heitman J. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiol Spectr* 2017;5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.
- [34] Heilmann CJ, Sorgo AG, Mohammadi S, Sosinska GJ, de Koster CG, Brul S, et al. Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2013;12(2):254–64. <https://doi.org/10.1128/EC.00278-12>.
- [35] LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AAL, et al. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* 2010;6(8):e1001069.
- [36] Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V. Environmental *Candida auris* and the global warming emergence hypothesis. *MBio* 2021;12(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-21>.
- [37] Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G, et al. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog* 2020;16(10):e1008921.
- [38] Rodrigues ML, Nosanchuk JD, Reynolds TB. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(2):e0007964. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007964>.
- [39] Muñoz JF, Gade L, Chow NA, Loparev VN, Juieng P, Berkow EL, et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun* 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07779-6>.
- [40] Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis* 2017;64:134–40. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>.
- [41] Chowdhary A, Sharma C, Meis JF, Hogan DA. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog* 2017;13(5):e1006290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006290>.
- [42] Kurtz MB, Douglas CM. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *Med Mycol* 1997;35(2):79–86. <https://doi.org/10.1080/02681219780000961>.
- [43] Saravolatz LD, Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. *Clin Infect Dis* 2003;36:1445–57. <https://doi.org/10.1086/375080>.
- [44] Song JC, Stevens DA. Caspofungin: Pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical uses and treatment outcomes. *Crit Rev Microbiol* 2016;42(5):813–46. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1068271>.
- [45] Thak EJ, Lee S Bin, Xu-Vanpala S, Lee DJ, Chung SY, Bahn YS, et al. Core N-glycan structures are critical for the pathogenicity of cryptococcus neoformans by modulating host cell death. *MBio* 2020;11. 10.1128/mBio.00711-20.
- [46] Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NAR, et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* 2008;4(4):e1000040. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000040>.
- [47] Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(1):146–54. <https://doi.org/10.1128/AAC.01486-12>.
- [48] Walker LA, Lee KK, Munro CA, Gow NAR. Caspofungin treatment of *Aspergillus fumigatus* results in ChsG-dependent upregulation of chitin synthesis and the formation of chitin-rich microcolonies. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(10):5932–41. <https://doi.org/10.1128/AAC.00862-15>.
- [49] Pardo M, Monteoliva L, Vázquez P, Martínez R, Molero G, Nombela C, et al. PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* 2004. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26924-0>.
- [50] O’Kane CJ, Weild R, M. Hyland E. Chromatin structure and drug resistance in *Candida* spp. *MDPI AG* 2020;6(3):121. <https://doi.org/10.3390/jof6030121>.
- [51] Lara-Aguilar V, Rueda C, García-Barbazán I, Varona S, Monzón S, Jiménez P, et al. Adaptation of the emerging pathogenic yeast *Candida auris* to high caspofungin concentrations correlates with cell wall changes. *Virulence* n.d.;12:1400–17. 10.1080/21505594.2021.1927609.
- [52] Cagas SE, Jain MR, Li H, Perlin DS. Profiling the *Aspergillus fumigatus* proteome in response to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:146–54. <https://doi.org/10.1128/AAC.00884-10>.
- [53] Shishodia SK, Tiwari S, Shankar J. Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. *Mycology* 2019;10:151–65. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1574927>.
- [54] Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijk P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol* 2010;10:114. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-114>.
- [55] Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranyake LP. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics* 2010;10:1444–54. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900611>.
- [56] Zamith-Miranda D, Heyman HM, Cleare LG, Couvillion SP, Clair GC, Bredeweg EL, et al. Multi-omics Signature of *Candida auris*, an Emerging and Multidrug-Resistant Pathogen. *MSystems* 2019. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00257-19>.
- [57] Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and

- morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* 1998;144:411–24. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-2-411>.
- [58] Caplan T, Polvi EJ, Xie JL, Buckhalter S, Leach MD, Robbins N, et al. Functional Genomic Screening Reveals Core Modulators of Echinocandin Stress Responses in *Candida albicans*. *Cell Reports* 2018;23:2292–8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.084>.
- [59] Alonso-Monge R, Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Pla J, Yagüe G, Argüelles JC. The Fungicidal Action of Micafungin is Independent on Both Oxidative Stress Generation and HOG Pathway Signaling in *Candida albicans*. *Microorganisms* 2020;8:1867. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121867>.
- [60] Day AM, McNiff MM, da Silva DA, Gow NAR, Quinn J. Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. *MSphere* 2018. <https://doi.org/10.1128/msphere.00506-18>.
- [61] Shivarathri R, Jenull S, Stoiber A, Chauhan M, Mazumdar R, Singh A, et al. The Two-Component Response Regulator Ssk1 and the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1 Control Antifungal Drug Resistance and Cell Wall Architecture of *Candida auris*. *MSphere* 2020;5. 10.1128/mSphere.00973-20.
- [62] Lee KK, MacCallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NAR, et al. Elevated Cell Wall Chitin in *Candida albicans* Confers Echinocandin Resistance *In Vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:208–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00683-11>.
- [63] Rodrigues CF, Rodrigues ME, Henriques M. Susceptibility of *Candida glabrata* biofilms to echinocandins: alterations in the matrix composition. *Biofouling* 2018;34:569–78. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1472244>.
- [64] Yan L, Xia K, Yu Y, Miliakos A, Chaturvedi S, Zhang F, et al. Unique Cell Surface Mannan of Yeast Pathogen *Candida auris* with Selective Binding to IgG. *ACS Infect Dis* 2020;6:1018–31. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.9b00450>.
- [65] Bruno M, Kersten S, Bain JM, Jaeger M, Rosati D, Kruppa MD, et al. Transcriptional and functional insights into the host immune response against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Microbiol* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0780-3>.



Fungal Extracellular Vesicles Are Involved in Intraspecies Intracellular Communication

 Tamires A. Bitencourt,^a Otavio Hatanaka,^a Andre M. Pessoni,^a Mateus S. Freitas,^a Gabriel Trentin,^a Patrick Santos,^a Antonio Rossi,^b
 Nilce M. Martinez-Rossi,^b
 Lysangela L. Alves,^c
 Arturo Casadevall,^d Marcio L. Rodrigues,^{c,e}
 Fausto Almeida^a

^aDepartment of Biochemistry and Immunology, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirao Preto, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^cGene Expression Regulation Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Curitiba, PR, Brazil

^dDepartment of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA

^eInstituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT Fungal infections are associated with high mortality rates in humans. The risk of fungal diseases creates the urgent need to broaden the knowledge base regarding their pathophysiology. In this sense, the role of extracellular vesicles (EVs) has been described to convey biological information and participate in the fungus-host interaction process. We hypothesized that fungal EVs work as an additional element in the communication routes regulating fungal responses in intraspecies interaction systems. In this respect, the aim of this study was to address the gene regulation profiles prompted by fungal EVs in intraspecies recipient cells. Our data demonstrated the intraspecies uptake of EVs in pathogenic fungi, such as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Paracoccidioides brasiliensis*, and the effects triggered by EVs in fungal cells. In *C. albicans*, we evaluated the involvement of EVs in the yeast-to-hypha transition, while in *P. brasiliensis* and *A. fumigatus* the function of EVs as stress transducers was investigated. *P. brasiliensis* and *A. fumigatus* were exposed to an inhibitor of glycosylation or UV light, respectively. The results demonstrated the role of EVs in regulating the expression of target genes and triggering phenotypic changes. The EVs treatment induced cellular proliferation and boosted the yeast to hyphal transition in *C. albicans*, while they enhanced stress responsiveness in *A. fumigatus* and *P. brasiliensis*, establishing a role for EVs in fungal intraspecies communication. Thus, EVs regulate fungal behavior, acting as potent message effectors, and understanding their effects and mechanism(s) of action could be exploited in antifungal therapies.

IMPORTANCE Here, we report a study about extracellular vesicles (EVs) as communication mediators in fungi. Our results demonstrated the role of EVs from *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Paracoccidioides brasiliensis* regulating the expression of target genes and phenotypic features. We asked whether fungal EVs play a role as message effectors. We show that fungal EVs are involved in fungal interaction systems as potent message effectors, and understanding their effects and mechanisms of action could be exploited in antifungal therapies.

KEYWORDS fungal infections, extracellular vesicles, fungal biology, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, cellular communication, *Paracoccidioides brasiliensis*

Fungal infections are responsible for over 1.6 million deaths per year. It is estimated that more than a billion cases of severe fungal diseases affect the world population. Despite these numbers it is likely that they represent an underestimate of the fungal diseases that ail humans (1, 2). The diseases caused by *Aspergillus* spp., *Candida* spp.,

Invited Editor Scott G. Filler, Lundquist Institute for Biomedical innovation at Harbor-UCLA Medical Center

Editor Yong-Sun Bahn, Yonsei University

Copyright © 2022 Bitencourt et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Fausto Almeida, fbralmeida@usp.br.

The authors declare no conflict of interest.

Received 3 November 2021

Accepted 8 November 2021

Published 11 January 2022

and the agents of mycoses such as *Paracoccidioides* species are among the deadliest mycoses (1, 2).

In recent years, extracellular vesicles (EVs) have been studied in cell-walled microorganisms. In fungi, they were first described in 2007 in *Cryptococcus neoformans* (3). So far, EVs have been characterized in approximately 20 fungal species, including yeasts forms of *H. capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia sympodialis*, *P. brasiliensis*, *C. albicans*, *Pichia fermentans*, *C. gattii*, *S. brasiliensis*, *P. lutzii*, and *Exophiala dermatitidis* (4–13) and filamentous fungi such as *Alternaria infectoria*, *Trichophyton interdigitale*, *Rhizopus delemar*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus flavus* (14–20).

EVs function as vehicles carrying complex cargoes with diverse biological functions, including proteins, carbohydrates, pigments, nucleic acids, and lipids. EVs can contribute to fungal infection outcomes (21). EVs likely have roles in bidirectional communication, raising the possibility of communication between fungal cells (22). Previous reports have demonstrated the participation of fungal EVs in biofilm formation (10), stimulation of cytokine production (6, 9, 11, 15, 20, 23), and favoring pathogen infection (4, 24). Bidirectional communication mediated by fungal EVs has been demonstrated in the interaction of fungal cells with plants (25, 26) and in communication with mammalian cells (27, 28).

The possibility of EV-mediated virulence transfer and/or antifungal resistance between strains has gathered attention. In the *Cryptococcus* model, previous studies demonstrated that the Vancouver Island outbreak strain of *C. deuterogatti*, namely, R265, can transfer its ability to proliferate within the host macrophages to an avirulent strain, which was attributed to an EV-regulated process (11, 29). Another report showed that the supernatant from a highly virulent strain of *C. neoformans* culture stimulated the pathogenic potential of a less virulent isolate, an effect also attributed to EVs (30). Furthermore, EVs isolated from biofilms of wild-type (WT) *C. albicans* restored the biofilm production and fluconazole tolerance in mutant strains with a negative background in orthologs of endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) subunits (31). Recently, a study advocated the role of EVs from *C. albicans* as messaging compartments involved in growth, morphogenesis, and biofilm production (32). Altogether, these studies suggested a role for fungal EVs in intraspecies communication; however, at the molecular level, many aspects related to the mechanisms switched on by EVs remain to be investigated. Here, we sought to analyze the fungal cellular communication mediated by EVs using the fungal pathogens *P. brasiliensis*, *A. fumigatus*, and *C. albicans* using multiple approaches. Our data demonstrate that fungal EVs mediate cellular communication by regulating the expression of target genes and by controlling cellular proliferation.

RESULTS

Intercellular transfer of fungal EVs. Because EVs can transport multiple molecules that play essential roles in fungal biology (22, 28, 33), we examined whether fungal EVs would be transferred intercellularly from cells of the same species. Using [^{14}C] palmitic acid metabolic labeling, radiolabeled fungal EVs were produced as previously described (34, 35). Radioactive assays confirmed that fungal EVs produced by *P. brasiliensis* (Fig. 1A), *A. fumigatus* (Fig. 1B), and *C. albicans* (Fig. 1C) could be transferred from cell to cell within the same species. We tracked the radioactivity added to the fungal cell cultures during the time course after 0 h (control), 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h from the addition of radiolabeled EVs to the cultures (Fig. 1). The fungal cells were pelleted and washed with phosphate-buffered saline (PBS), and pulse-chase measurements were performed. We verified that purified radiolabeled EVs were taken up by fungal cells or at least associated with the cell surface as the radioactive signal increased over

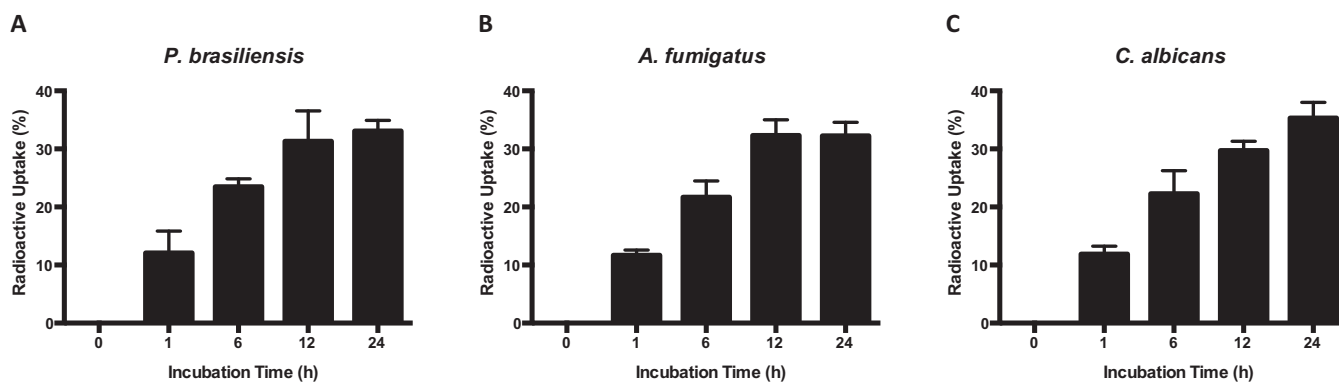


FIG 1 Evaluation of extracellular vesicles (EVs) uptake in different fungal species. The absorption of radioactive VEs was evaluated after 0, 1, 6, 12, and 24 h in the following yeast cells: *P. brasiliensis* (A), *A. fumigatus* (B), and *C. albicans* (C).

time. In this respect, we posit that EVs are taken up and internalized, or at least associated, with the fungal cell surface.

***P. brasiliensis* EVs as cellular communicator during ER stress.** We previously demonstrated that the genes *HACA* and *IRE1* showed increased expression during tunicamycin (TM) treatment (36), suggesting that they are involved in the endoplasmic reticulum (ER) stress response of *P. brasiliensis*. Thus, we purified EVs from *P. brasiliensis* treated with TM (TM EVs) and added these EVs to *P. brasiliensis* yeast cells that did not receive TM treatment (Fig. 2A). We observed that TM EVs increased *HACA* and *IRE1* expression significantly (Fig. 2B and C, red bars). On the other hand, fungal EVs obtained from untreated *P. brasiliensis* yeast cells (CONTROL EVs) were added to *P. brasiliensis* yeast cells, which did not alter *HACA* and *IRE1* expression (Fig. 2B and C, blue bars). PBS (NO EVs) was used as a negative control (white bar), while TM was the positive-control condition (black bars). These results strongly suggested that *P. brasiliensis* EVs could participate in intercellular communication during ER stress, possibly promoting fungal adaptive responses.

EVs from *A. fumigatus* act as stress message effectors. To verify whether the observations made with *P. brasiliensis* applied to other fungi, we isolated EVs from UV-irradiated cultures and from nonirradiated *A. fumigatus* cells (control). The EVs obtained from UV-treated cells were named UV EVs, whereas the EVs obtained from regular cultures from *A. fumigatus* were named CONTROL EVs. Our data showed an overall population size in the range of 100 to 200 nm and a minor population of EVs with sizes varying from 320 to 394 nm in regular cultures or a range of 240 to 614 nm in cultures that underwent UV irradiation (Fig. S1).

EVs obtained from both *A. fumigatus* cultures after UV irradiation (UV EVs) or without UV irradiation (CONTROL EVs) (Fig. 3A) caused a prominent decrease in colony formation in *A. fumigatus* (Fig. 3B). Approximately 40% of colony reduction was achieved after EVs uptake (Fig. 3B). Thereafter, the gene expression analysis reinforced a possible role of these EVs as stress message effectors, showing the upregulation of the *mpkC* gene under both EVs uptake conditions. The *mpkC* gene, which encodes the mitogen-activated protein kinase (MAPK) ortholog, known as Hog1p, plays a role in adaptive responses to different stress agents, such as osmotic stress, oxidative stress, heat shock, and cell wall damage and also acts in cellular division regulation, as demonstrated in *A. fumigatus* (37, 38). The cultures that received UV EVs showed higher induction of the *mpkC* gene (Fig. 3C). In addition, UV EVs also caused a significant increase in the *akuA* transcript levels (Fig. 3D), supporting a role of EVs in cellular communication events. The *akuA* gene encodes the Ku70 component involved in DNA repair (39). In addition, the presence of EVs caused a subtle downregulation of the *nimA* gene, the encoding gene of cell cycle-regulated protein kinase, which may reflect another level of cell cycle regulation (Fig. 3E). To prove that the communication process relies only on intact EVs, we also tested heated EVs. In such cases, we evaluated the effects triggered by heated

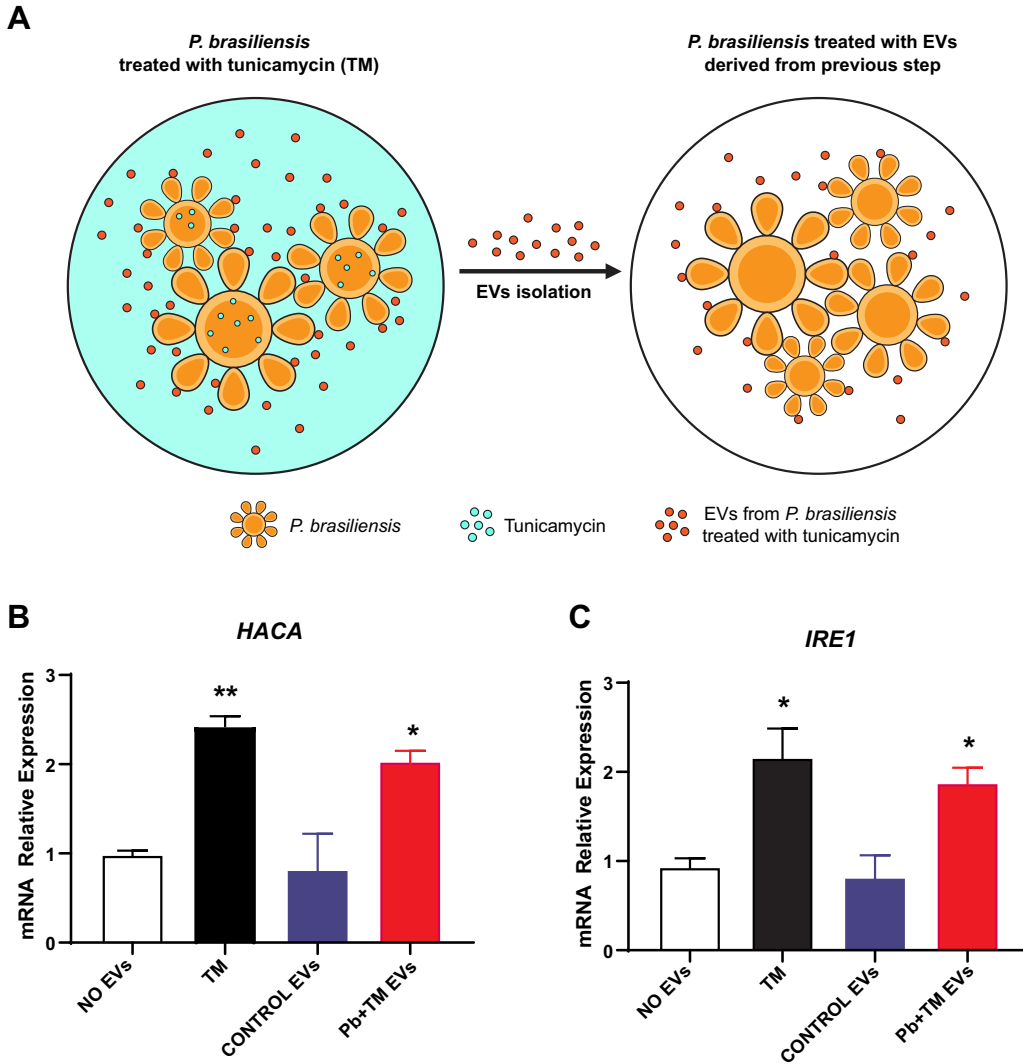


FIG 2 EVs from *P. brasiliensis* as cellular communicator during ER stress. (A) Schematic representation of EVs obtained after tunicamycin exposure. The relative expression of UPR genes *HACA* (B) and *IRE1* (C) was determined after EVs uptake (4×10^9 /ml EVs in 10^5 /ml recipient cells). Significantly different values are indicated by asterisks as determined using ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test ($P < 0.05$). The calibrator was the NO EVs condition, and the positive control was tunicamycin (TM).

EVs from both conditions (CONTROL EVs and UV EVs) on colony formation and *akuA* modulation (Fig. S2). Similar profiles of colony formation were observed when recipient cells were treated with heated EVs or non-heated EVs (about 40 to 45% reduction). Conversely, the uptake of heated UV EVs did not impact *akuA* modulation. The condition control EVs (heated) were associated with a decrease in *akuA* transcript levels.

EVs induce hypha formation and regulate the cell cycle in *C. albicans*. Next, we investigated whether EVs obtained from yeast culture and a yeast-to-hypha culture in the *C. albicans* model would mediate communication, affecting its morphological transition. Therefore, we isolated EVs from *C. albicans* from hypha-inducing cultures and from yeast cultures. We analyzed the size and distribution of EVs in both cultures (see Fig. S1 in the supplemental material). EVs obtained after *C. albicans* grown on cultures in YPD at pH 6.3 at 30°C were named CONTROL EVs, whereas EVs obtained from *C. albicans* grown on cultures in YPD at pH 7.4 at 37°C were named TRANS EVs. Our results showed a heterogeneous EV distribution profile within these conditions, and the majority of EVs obtained from yeast-to-hypha transition cultures (TRANS EVs) had a size

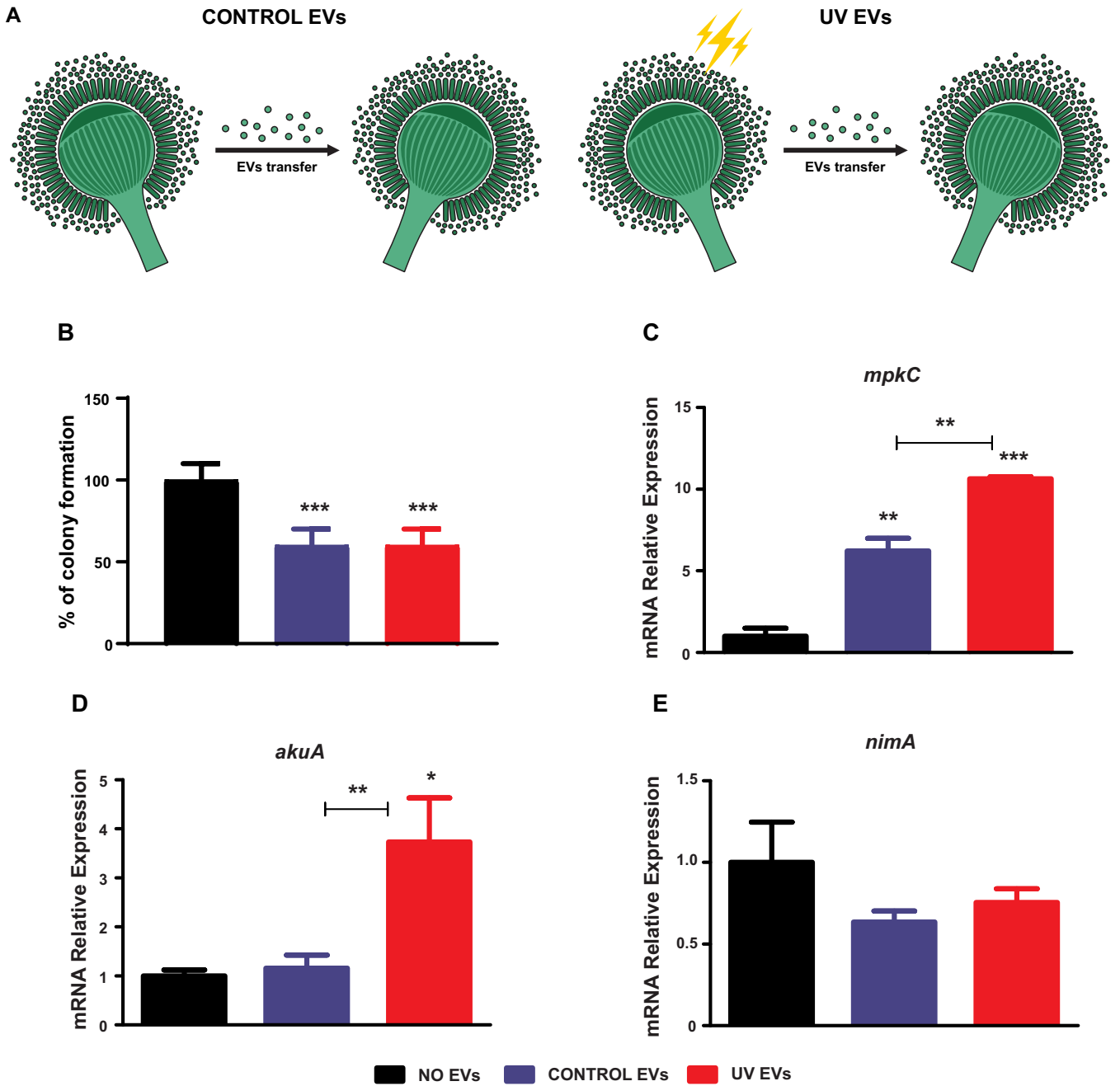


FIG 3 EVs from *A. fumigatus* as stress message effectors. (A) Schematic representation of EVs obtained from regular cultures, without UV exposure (CONTROL EVs), and EVs obtained from UV-exposed cultures (UV EVs). The thunder diagram represents UV light exposure. The EVs uptake was performed with 5×10^8 /ml of EVs in 10^9 /ml recipient cells. (B) The colony formation was counted and a percentage value was determined after EVs uptake. (C to E) RT-qPCR for *A. fumigatus* genes *mpkC* (C), *akuA* (D), and *nimA* (E). Relative expression was assessed using the NO EVs condition as a reference sample and 18S and *βtub* as a reference for normalization. Significantly different values are indicated by asterisks as determined using ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

range from 99 to 182 nm and minor populations with sizes varying from 23 to 85 nm and 232 to 440 nm. For EVs isolated from *C. albicans* yeast cultures (CONTROL EVs), the majority of EVs had a size range from 107 to 154 nm and a minor population in the range of 211 to 440 nm. Previous studies have demonstrated the heterogeneity of EVs from *Candida* spp., showing a distribution profile with population sizes ranging from 60 to 280 nm, and in *C. albicans*, the sizes varied from 100 nm to 600 nm (5, 40, 41).

We also evaluated the gene expression profiles of selected genes (*HWP1*, *SAP5*, *CHT2*, and *SEC24*) during *C. albicans* growth in yeast-to-hypha transition cultures

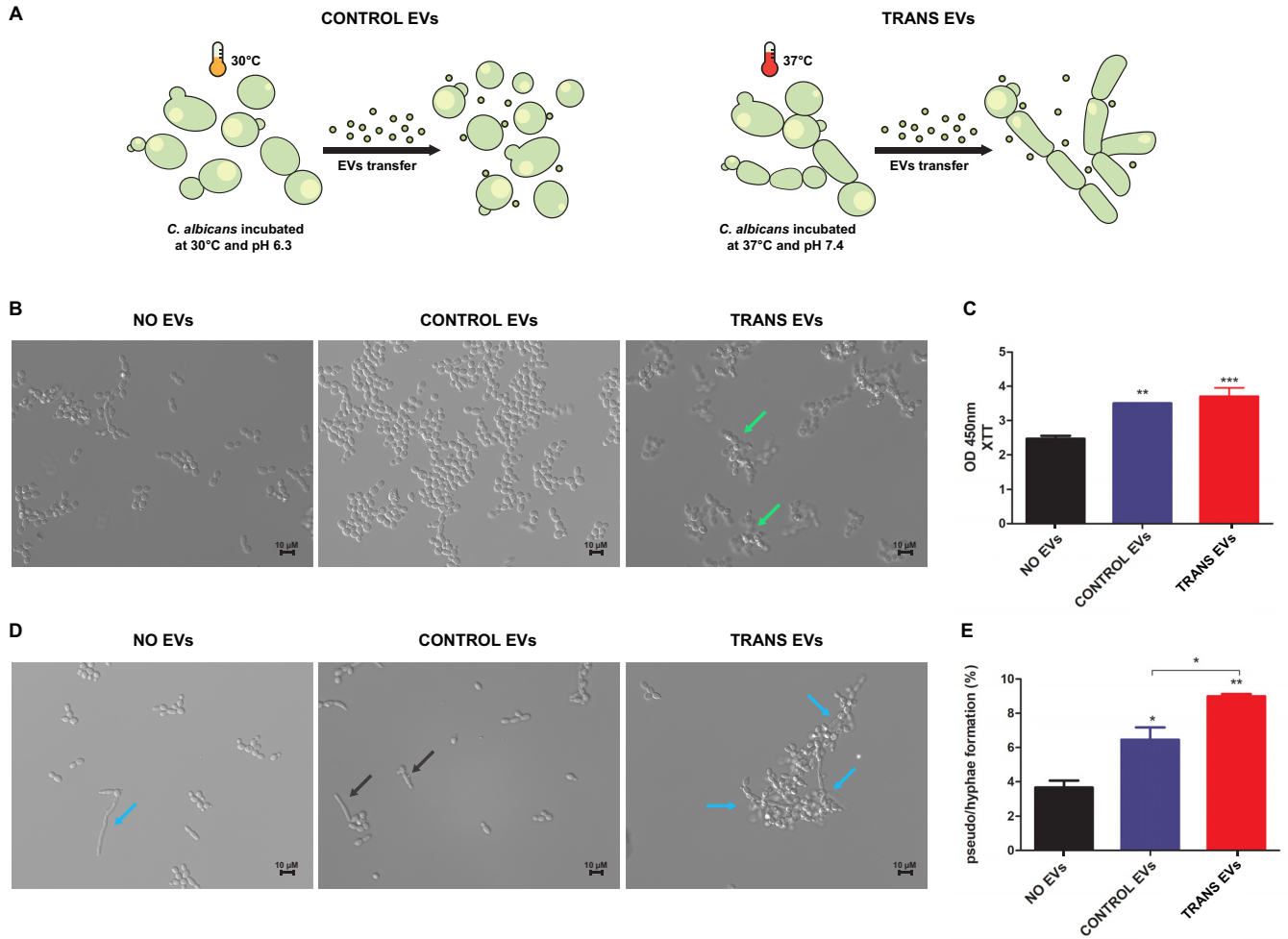


FIG 4 EVs heighten the cellular proliferation and pseudohypha formation in *C. albicans*. (A) Schematic representation of EVs obtained from yeast cultures (CONTROL EVs) and yeast-to-hypha cultures (TRANS EVs). (B) Morphological appearance was investigated by microscope images of *C. albicans* cells grown on YPD, pH 7.4, at 37°C after EVs uptake for 2 h. Green arrows depict clump structures observed in cultures that underwent TRANS EVs uptake. (C) XTT reduction assay to assess cellular proliferation after EVs uptake during 2 h of growth on transition condition. Identification of hypha and pseudohypha morphologies in *C. albicans* grown on transition condition for 4 h is shown. (D) Black arrows depict pseudohyphae and blue arrows depict hypha structures. (E) Estimation of morphotype abundance after 4 h of *C. albicans* growth on transition condition.

compared to yeast cultures after different incubation times, such as 0.5, 1, 2, and 4 h (Fig. S3). These genes were previously modulated in microarray data of *C. albicans* grown as hyphae with serum at 37°C, and *SAP5* (secreted aspartyl protease) and *HWP1* (cell wall protein hyphal wall protein 1) were highly upregulated (42). We identified a time-dependent modulation for the genes *CHT2* (endochitinase) and *SEC24* (ER to Golgi transport). A prominent upregulation was verified for the *HWP1* gene at all time points evaluated. The *SAP5* gene was upregulated at all times analyzed. Taking advantage of this information, we compared gene expression profiles after EVs uptake in *C. albicans*. Thus, the *C. albicans* cells were incubated with TRANS EVs or CONTROL EVs (Fig. 4A). Thereafter, the cells were recovered through centrifugation and resuspended in a yeast-to-hypha medium. By analyzing the morphological features of *C. albicans* under yeast-to-hypha conditions assessed throughout the incubation time points, we identified the occurrence of the three main morphologies presented by *C. albicans*, yeast, pseudohyphae, and hyphae. Moreover, the cultures that underwent TRANS EVs uptake appeared to present changes in yeast development in which a particular cellular clumping was detected at earlier time points (Fig. 4B). Our results also showed a possible increase in cellular proliferation after EVs uptake compared to NO EVs uptake cultures. The 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[carbonyl (phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) assay reinforced the involvement of EVs in cell cycle

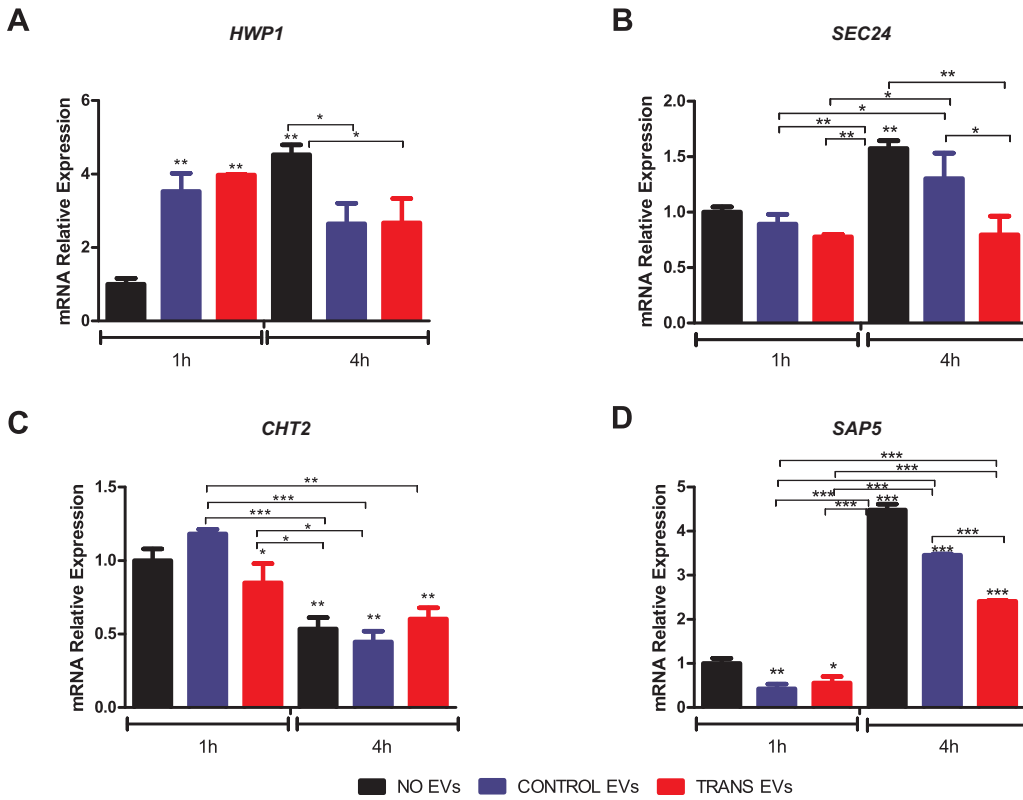


FIG 5 EVs prompted a boost in yeast-to-hypha transition gene expression response. The EVs uptake was carried out with EVs (5×10^6 /ml) and *C. albicans* in cellular density adjusted to an OD_{600} of 0.100 to 0.130. RT-qPCR evaluated a set of *C. albicans* genes after EVs uptake during 1 h and 4 h of growth on transition cultures. *HWP1* (A), *SEC24* (B), *CHT2* (C), and *SAP5* (D). The relative expression was assessed using NO EVs condition at the 1-h time point as the reference sample after normalization with the *RPP2B* and *TDH3* genes. Significantly different values are indicated by asterisks, determined using ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

regulation (Fig. 4C). Furthermore, during the course of growth, the cultures that received TRANS EVs displayed more developed hyphae than the other conditions, NO EVs and CONTROL EVs (Fig. 4D). The estimation of morphotype abundance also indicated that *C. albicans* cultures receiving EVs presented an enhancement of pseudohypha and/or hypha formation, which was mostly predominant after TRANS EVs treatment (Fig. 4E). In parallel, the effect of heated EVs on the regulation of morphotypes was analyzed. Although *C. albicans* treated with heated EVs displayed heightened pseudohypha and/or hypha formation (about 7%), regardless of the type of EV treatment, CONTROL EVs (heated) or TRANS EVs (heated) (Fig. S4), it was lower than uptake of intact TRANS EVs (about 9%).

EVs uptake caused a rapid response to hypha-inducing stimuli, with a more significant upregulation of the *HWP1* gene at an earlier incubation time point (1 h) followed by a decay in its transcript levels later (4 h), which was observed for both uptake conditions, CONTROL EVs and TRANS EVs (Fig. 5A). The transition panel (Fig. S3) suggested a fluctuation in *HWP1* modulation, with a higher increase in the transcript levels after 2 h, showing an approximately 50-fold difference. In addition, the EVs from control and transition cultures promoted a repression of the *SEC24* gene after 4 h, which was more pronounced by TRANS EVs treatment (Fig. 5B). The transition panel demonstrated its downregulation, particularly in delayed incubation time points, in which hyphae were more commonly found. In addition, the *CHT2* gene was repressed after EVs uptake from transition cultures after 1 h, and no change in its transcription levels was observed after 4 h compared with the NO EVs condition at the same time point (Fig. 5C). A previous study showed that the downregulation of this *CHT2* gene is a

remarkable feature in hyphae (43). Therefore, our data suggest a boost in hypha induction after EVs stimulation. Curiously, *SAP5*, which is mainly upregulated in cells with hyphal morphology, presented a decrease in transcription levels under EVs uptake conditions (Fig. 5D). We also investigated the effects of heated EVs on the regulation of the *HWP1* gene and observed a subtle induction triggered by CONTROL EVs (heated), with an increase in transcript levels of about 1.34-fold. No differences in gene modulation were induced by TRANS EVs (heated) compared with NO EVs (Fig. S4).

DISCUSSION

Intercellular communication occurs through contact with cells or by the secretion of molecules such as quorum-sensing (QS) effectors. A recent study demonstrated that EVs enriched with Fks1 and Chs3 from *Saccharomyces cerevisiae* rescued the yeast cells from cell wall disturbance (44), which suggested the possibility that EVs function in fungal intraspecies communication.

Here, we evaluated whether EVs are capable of mediating intraspecies communication in fungi by applying three approaches in three different fungal pathogens. We used uptake times of 1 and 2 h, which were sufficient to allow the incorporation of radioactive EVs or at least to promote their aggregation with fungal cells, as mentioned above (Fig. 1). It is expected that subtle differences in EVs uptake could be responsible for altering and regulating gene expression, because fungi have the refined ability to sense any change in the environment and adjust their cellular machinery in response to these changes.

Our study demonstrated a role for EVs as stress message effectors in the fungal agents *P. brasiliensis* and *A. fumigatus*. In the *P. brasiliensis* model, the genes belonging to the UPR pathway were studied after cultures underwent EVs uptake (EVs were obtained from previous tunicamycin-exposed cultures) compared to cells directly exposed to tunicamycin. The UPR pathway is switched on to reestablish endoplasmic reticulum homeostasis by heightening the folding capability and controlling misfolded protein disposal (45). In fungi, this pathway comprises the ER-transmembrane sensor Ire1/IreA (Ser/Thr kinase) and transcription factor Hac1/HacA (46). Our experiments demonstrated the upregulation of both genes after TM EVs uptake, suggesting that EVs function in fungal communication.

In the *A. fumigatus* model, EVs obtained from a regular or an irradiated culture triggered a stress response in fresh *A. fumigatus* cultures, as evidenced by colony reduction formation and upregulation of a stress response gene, the *mpkC* gene. We hypothesize that fungitoxic compounds in EVs from *A. fumigatus* are responsible for these effects. Previously, the production of antifungal compounds by filamentous fungi such as *A. fumigatus* was reported (47). However, the characterization and understanding of the processes mediated by EVs in *A. fumigatus* have been poorly explored. Recently, a study showed the production and cargo description of EVs from *A. fumigatus* in which approximately 60 proteins were identified with potential roles in immunomodulation and pathogenicity (19).

In this study, the uptake of EVs from cultures exposed to UV light prompted the most pronounced upregulation of the *mpkC* gene. It also promoted a remarkable increase in transcript levels of the *akuA* gene. *akuA* is involved in DNA repair (39). UV exposure causes DNA damage through mutation and pyrimidine dimers and induces oxidative stress status (48, 49). A previous study demonstrated the involvement of *akuA* in cellular protection against UV radiation exposure, showing that *akuA* deletion was responsible for a significant reduction in survival rates of the mutant strain compared to the *A. fumigatus* wild type (50). Moreover, we revealed that the cultures that underwent EVs uptake from *A. fumigatus* showed a trend of downregulating an encoding gene of cyclin-dependent kinase, *NimA*, involved in cell cycle transition (51).

In *C. albicans*, we assessed the potential of EVs to favor hyphal formation. It is widely accepted that dimorphism in *C. albicans* is important for virulence (52). The yeast-to-hypha transition is a tightly regulated process of sensing and responding to environmental cues (53). Hypha formation is mainly associated with invasion and

adaptive responses during fungus-host interactions (54). Recently, single-cell transcriptome sequencing data showed the dynamic regulation of transition genes during macrophage infection with *C. albicans* and also highlighted the occurrence of bimodal modulation in genes related to hypha formation and cell wall remodeling concomitantly with differences in immunomodulation responses (55).

In our data, we detected a new response characterized by cell clumping after TRANS EVs uptake in which the EVs were obtained from *C. albicans* hypha-inducing cultures. Cell clumping effects probably reflect changes in surface hydrophobicity. This feature may result from cell surface changes activated in the regulation of hyphal expansion (56, 57). Furthermore, the gene modulation profile assessed after EVs uptake also showed a boost in yeast-to-hypha transition response, mainly prompted after TRANS EVs uptake, which is reinforced by the presence of long hyphae in this treatment (Fig. 4D). Hyphal growth is associated with a hypha-specific transcriptional program that paves the way toward the expression of genes related to virulence traits such as adhesion (ALS3 and HWP1), invasion (ALS3), oxidative stress response (SOD5), proteolytic activity (SAPs), and others (54). In a previous high-throughput study, a set of genes showed differential modulation after transition stimuli, including the genes *SAP5*, *HWP1*, *SEC24*, and *CHT2* (42). Furthermore, hyphal development relies on a complex network of transduction signals that respond to environmental cues and activate the molecular processes involved in driving the high-polarization growth of hyphal forms (58, 59).

Aspects of cell cycle organization are also unique in hyphae compared to pseudohyphae and yeasts. Hyphal forms showed different branching patterns, regulation of the cell cycle, and polarization (59). In addition, a phenomenon known as QS governs responses related to hyphal formation and control of cell density (60, 61). Many QS molecules might also be found within fungal EVs; however, it is also possible to speculate a cross-regulation between small RNA content in EVs and QS phenomena in fungi. A recent study showed the involvement of QS molecules such as farnesol derivatives and medium-chain fatty acids in EVs obtained from yeast culture as potential regulators of cellular proliferation and yeast-to-hypha development (32). The EVs from *C. albicans* reduced the hypha and biofilm formation and the impact of *C. albicans* EVs on invasive hypha development and virulence, as shown in a *Galleria mellonella* model (32). Moreover, that study was conducted exploring EVs obtained from yeast cultures, and it is reasonable that the cargo and the message within these EVs contributing to cells remain in this form or just evolve toward pseudohyphal morphology, as inferred from our data.

Current knowledge regarding the differences in cell cycle regulation in hyphal development associated with our data prompted the investigation of cellular proliferation after EVs uptake. We demonstrated that the conditions that underwent EV uptake presented an increase in mitochondrial activity, suggesting a function of EVs in heightening cellular metabolism and/or proliferation. EVs were previously shown to enhance cellular proliferation in *C. albicans* (32) as well as in *C. neoformans* within macrophages. The high activation of the *C. neoformans* proliferation rate was named the division of labor mechanism (11). It was ascribed to an important virulence trait transferred from an outbreak strain to a nonoutbreak strain (11).

Collectively, our data pave new avenues for EV functions in fungal intraspecies communication, supporting the role of EVs as potent message effectors regulating pathophysiological mechanisms. Although we recognize the need to develop our knowledge about the complex cellular communication circuit switched on by EVs, and regardless of how it will be addressed in the future, this study sheds new light on the role of fungal EVs in intraspecies cellular communication.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains and growth conditions. *Paracoccidioides brasiliensis* strain 18 (Pb18) was cultivated as previously described (62). The Pb18 yeast form was maintained in Fava Netto semisolid medium and incubated at 36°C. Yeast growth was determined by inoculating cultures in liquid YPD medium (2%

peptone, 1% yeast extract, and 2% glucose) at 36°C on a rotary shaker at 100 rpm for 72 h. Tunicamycin (TM) was used to induce ER stress. TM (15 µg/ml) was prepared in 20 mM NaOH, and it was added to yeast cultures in liquid YPD for 5 days at 36°C on a rotary shaker at 100 rpm to obtain EVs derived from ER-stressed fungi. The same fungal growth was seen without TM to obtain Pb18 CONTROL EVs.

The *Aspergillus fumigatus* strain CEA17 used in this study was grown in a complete agar malt medium (YAG medium supplemented with malt extract: 2% [wt/vol] glucose, 0.2% [wt/vol] yeast extract, 2% [wt/vol] malt extract, 2% [wt/vol] agar, and 0.1% [vol/vol] trace elements) for 7 days at 37°C. Conidial suspensions were obtained from 7-day-old plates with sterilized PBS, recovered by centrifugation, and filtered through sterile Miracloth (Millipore, Billerica, MA, USA). Conidial concentration was determined using a Neubauer chamber. Approximately 1×10^3 conidia were directly inoculated into complete YAG medium or the conidial suspension was first exposed to UV light for 60 s and then inoculated into a complete YAG medium. The cultures were incubated for 2 days at 37°C. These plates were used for the following experiments: EV isolation and communication assay.

Candida albicans strain ATTC-64548 was grown at 30°C in Sabouraud medium (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) for 72 h. One fresh colony was inoculated into 10 ml of yeast extract-peptone-dextrose medium (YPD pH 6.3) and cultured overnight at 30°C with shaking (150 rpm). The overnight cultures of *C. albicans* then were diluted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) range of 0.100 to 0.130 with YPD medium (pH 6.3) or YPD medium (pH 7.4) and grown at 30°C or 37°C, respectively. The cultures grown on YPD at pH 6.3 represent the control cultures in which no stimuli for hypha differentiation were offered, whereas cultures grown on YPD at pH 7.4 represent the transition cultures in which a stimulus conferred by pH (7.4) and temperature (37°C) were offered to prompt hypha differentiation. After that, the cultures were used to perform the EVs isolation experiment, the gene expression profile of yeast to hyphae, and the communication assay.

EVs isolation. EVs from Pb18 yeast cultivated in the presence or absence of TM were isolated as previously described (63). Yeast cultures of Pb18 growth in YPD medium were depleted from cell pellets by serial centrifugation at $5,000 \times g$ for 15 min and $15,000 \times g$ for 30 min at 4°C. The supernatants, containing EVs, were concentrated and filtered using Amicon systems (Millipore, Billerica, MA, USA) with a 100-kDa-cutoff membrane. The concentrated material was centrifuged again at $15,000 \times g$ for 30 min at 4°C, and the supernatants were centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4°C to collect vesicles. The EVs pellets were resuspended in PBS for nanoparticle-tracking analysis (NTA) and experiments. EVs obtained from TM-treated Pb18 were termed TM EVs, whereas EVs obtained from nontreated cultures were termed Pb EVs.

Regarding the isolation of *A. fumigatus* EVs, the procedures were performed as previously described (19, 41), with slight modifications. Two-day-old plates obtained for a regular culture or a UV-exposed culture were used to isolate EVs. UV light exposure cultures were obtained after conidial irradiation. Approximately 10^4 conidia/ml were irradiated with a UV germicidal light (G1578 UV lamp) at 16-cm distance for 60 s with constant shaking, and then 100 µl of this irradiated suspension was plated on YAG medium, yielding about 10% of the CFU compared to nonirradiated cultures. The cells were washed twice with 3 ml of sterile PBS, recovered from the dish plates with inoculation loops, and then transferred to centrifuge tubes. Thereafter, the cell suspension was filtered through sterile Miracloth (Millipore, Billerica, MA, USA), and then a sequential centrifugation and supernatant concentration in the Amicon system was performed. The EVs obtained from UV light exposure were named UV EVs, whereas the EVs obtained from regular cultures were called control EVs.

Isolation of *C. albicans* EVs was performed as described previously, with slight modifications (9, 44). The concentration of the *C. albicans* cultures was adjusted as mentioned above, and the preinocula were added into 300 ml of YPD (pH 6.3) or YPD (pH 7.4) and incubated for 4 h at 30°C or 37°C, with shaking (100 rpm). For EVs isolation, the cells and debris were removed by sequential centrifugation at $4,000 \times g$ for 15 min and $15,000 \times g$ for 15 min. Supernatants were concentrated using an Amicon ultra-concentration system (cutoff, 100 kDa; Millipore, Billerica, MA, USA). The resulting concentrated supernatant was ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4°C. Pellets (EV-containing) were collected and resuspended in ultrapure water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with protease inhibitor cocktail (10×; Sigma) (0.2%, vol/vol) to prevent cargo degradation, and then the EVs were stored at -80°C. Taking into account the culture conditions used to promote yeast-to-hypha transition (YPD medium at pH 7.4, incubated at 37°C), an additional step was included in which the cultures were first filtered using sterile Miracloth (Millipore, Billerica, MA, USA) and then subjected to differential centrifugation. EVs obtained after *C. albicans* grown on YPD at pH 6.3 at 30°C were named CONTROL EVs, while EVs obtained from *C. albicans* grown on YPD at pH 7.4 and incubated at 37°C were named TRANS EVs.

NTA. To determine the size distribution and quantification of EVs isolated from *C. albicans* cultures in two different stages, a yeast culture condition (CONTROL EVs) and a yeast-to-hypha culture condition (TRANS EVs), NTAs were performed. We also performed the NTA to measure and characterize the size distribution of EVs isolated from regular and UV-exposed *A. fumigatus* cultures. We obtained the profiles of *P. brasiliensis* EVs as previously described (35). NTA was performed using a Nanosight NS300 appliance (Malvern Instruments, Malvern, UK) with NTA 3.0. The parameters were set as recommended by the manufacturer's manual. The camera level was increased to a level of >14, in which all particles were distinctly visible, and the threshold was determined to capture as many particles as possible, within an ideal range of 20 to 100 particles per frame. The NTA is an optical dispersion technique employed to measure the size distribution of particles in a solution at the nanometer scale (64).

Determination of EVs uptake by fungal cells. To obtain radiolabeled EVs, each one of the fungal species (*P. brasiliensis*, *A. fumigatus*, and *C. albicans*) was pulsed with [$1\text{-}^{14}\text{C}$] palmitic acid for 72 h before EVs isolation (65). The culture medium used for each species and EVs isolation process were described above. Radiolabeled EVs from the same species (10^9 /ml) were added to the corresponding yeast-phase

fungi (10^7 /ml) and incubated for 0, 1, 6, 12, and 24 h at 37°C in 9.5% CO₂. After incubation, culture supernatants containing EVs that were not taken up were removed, fungal cells were washed thrice with PBS and lysed in 200 μ l of 25 mM deoxycholate, and the resultant material was collected for scintillation counting.

Gene expression profile of *C. albicans* in yeast-to-hypha transition stage. The *C. albicans* inoculum was prepared, and its concentration was adjusted as previously described. It was added to 5 ml of YPD (pH 6.3) and incubated for 0.5, 2, and 4 h at 30°C (yeast culture condition). Thereafter, the cultures were centrifuged at $4,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The resulting pellet was stored at -80°C until RNA extraction. The *C. albicans* inoculum was also added to 5 ml of YPD (pH 7.4) and incubated for 0.5, 2, and 4 h at 37°C (hypha-yeast culture condition). The pellet obtained from these cultures was stored at -80°C until RNA extraction. We used the resulting material to create a panel that reflects the expression profiles of *HWP1*, *SEC24*, *SAP5*, and *CHT2* genes during the *C. albicans* transition stage.

Communication assay mediated by EVs. (i) Effect of EVs on *P. brasiliensis* endoplasmic reticulum stress. The *P. brasiliensis* yeast cells were treated with TM as previously described (36). The EVs from TM-treated and untreated yeast cultures were isolated, and the uptake of EVs (4×10^9 /ml) with *P. brasiliensis* yeast cells (10^5 /ml) was performed for 2 h at 37°C in brain heart infusion medium (Sigma). RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative PCR (qPCR) assays were performed as described previously (36).

(ii) Effects of EVs on *A. fumigatus* UV stress. The assay was performed with 5 ml of *A. fumigatus* conidial suspension (10^4 conidia/ml). The conidial suspension was incubated with 5×10^8 EVs/ml obtained from *A. fumigatus* regular cultures or UV light-exposed cultures. Additionally, the EVs from both cultures were incubated at 90°C for 15 min, and these heated EVs were also added with fungal conidia. Uptake was performed for 1 h at 37°C in PBS with shaking (100 rpm). Therefore, the fungal cells were recovered by centrifugation at $4,000 \times g$ for 10 min at room temperature, and the cultures were resuspended in 5 ml of PBS. Subsequently, approximately 100 μ l of conidia was plated on the YAG medium. After incubation at 37°C in the dark for 2 days, the CFU were counted. CFU from conidia without EVs uptake were counted as controls. The colonies were stored at -80°C until RNA extraction.

(iii) Effects of EVs on *C. albicans* dimorphism. About 5×10^8 EVs obtained from *C. albicans* yeast cultures (CONTROL EVs) or *C. albicans* yeast-to-hypha transition cultures (TRANS EVs) were added into a fresh culture of *C. albicans* with the cell density adjusted to an OD₆₀₀ of 0.10 to 0.130, as previously mentioned, in 5 ml of YPD (pH 6.3 for 1 h at 30°C), with shaking (100 rpm). Additionally, the EVs obtained from both *C. albicans* cultures were incubated at 90°C for 15 min, and these heated EVs were also added into the fresh yeast culture, as mentioned above. The yeast cells were then recovered by centrifugation. The pellets were resuspended in 5 ml of YPD (pH 7.4) and incubated for 1 h and 4 h at 37°C under shaking (100 rpm). After incubation, the cultures were centrifuged at $4,000 \times g$ for 10 min at 4°C, and the pellet was stored at -80°C until RNA extraction. Similar conditions were employed to analyze cellular proliferation through the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[carbonyl (phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) reduction assay. The XTT assay was performed as previously described (66), with slight modifications. After the uptake of EVs in *C. albicans* cultures, the yeast pellets were recovered through centrifugation at $4,000 \times g$ for 10 min at room temperature, and the pellets were resuspended in YPD (pH 7.4) and incubated for 2 h at 37°C. The medium then was removed, and the pellet was resuspended in XTT solution (1 mg/ml in PBS) and menadione (1 mM in acetone) and incubated for 3 h with gentle shaking. The activity of the yeast mitochondrial dehydrogenase reduces the tetrazolium salt XTT to formazan salts, which results in a colorimetric change that might correlate with cell viability. Colorimetric changes were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay microplate reader (Multiskan FC; Thermo Scientific) at 450 nm. Additionally, we monitored the changes in yeast-to-hypha transition in *C. albicans* cultures after EVs uptake by microscopy analysis. Images were obtained using a Zeiss Observer Z.1 microscope with AxioVision SE64 software after 1-h, 2-h, and 4-h time points. As controls, cultures that had not undergone the EVs uptake process were analyzed.

RNA extraction and RT-qPCR. The *C. albicans* cells were treated with lysis solution (20 mg/ml lysozyme, 0.7 M KCl, and 1 M MgSO₄, pH 6.8) for 1 h with shaking (100 rpm). Next, the supernatant was removed by centrifugation at $1,000 \times g$ for 10 min, and total RNA was extracted using the Illustra RNeasy Mini RNA isolation kit (GE Healthcare) by following the manufacturer's instructions. The *A. fumigatus* mycelia were lysed by mechanical pulverization with a pestle and mortar in liquid nitrogen, and total RNA extraction was performed using an Illustra RNeasy mini RNA isolation kit (GE Healthcare). *P. brasiliensis* cells were also lysed with the aid of a small mortar and pestle in liquid nitrogen before total RNA was isolated using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), as described previously (36). RNA concentration and quality were estimated using a nanophotometer (Implem). The RNA was pretreated with DNase (Sigma). cDNA synthesis was performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) by following the manufacturer's instructions. Real-time qPCR (RT-qPCR) was conducted as described previously (67). The qPCR experiments were performed with SYBR green master mix (Applied Biosystems) in the Step One Plus platform. Primer sequences were retrieved from the IDT DNA primer quest tool (www.idtdna.com/primerquest/Home/Index), and the oligonucleotide sequences are listed in Table 1. The algorithm used for gene expression analysis was the relative quantification $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method (68), and graphs were generated using GraphPad Prism v.5 software (GraphPad).

Statistical analyses. The results are presented as mean values from independent experiments \pm standard deviations. Significant differences were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* tests or unpaired *t* test, using GraphPad Prism 5 software.

TABLE 1 Primers used in RT-qPCR

Gene ID	Sequence (5'–3')	Concn (nM)	Efficiency (%)
RPP2B	FWD, TGGTGTGAAGCCGAAGAA; REV, CGGATGGGACAGAAGCTAAT	100	95.18
TDH3	FWD, CACGGTAGATACAAGGGTGAAG; REV, GGAATGTAGCTGGGTCTCTTT	150	108.6
HWP1	FWD, GCCTGATGACAATCCTCTATT; REV, GAGTAGTAGCTGGAGTTGTTGG	400	97.75
CHT2	FWD, TGGTGGTGTGGTACTATG; REV, CAGCGTCATCAAATGGTCTTTC	300	92.49
SAP5	FWD, GCGAAGCTACCGAGTTTGAT; REV, GCTTCAGCAGAGTTAAGGTAGAG	500	100.53
SEC24	FWD, GAGCTGGATATGGCGGATATG; REV, GTGGAAGGTCCTTGATAAGTC	300	99.62
18S	FWD, AAGTGCGCGGCAATAACA; REV, CTCGGCCAAGGTGATGTACT	100	89.34
<i>Btub^a</i>	FWD, TTCCCAACAACATCCAGACC; REV, CGACGGAACATAGCAGTGAA	70	119
<i>akuA</i>	FWD, GCTCCTGTGTACTGAAAGATG; REV, GGGACCGACCGAGAATTTATG	70	100.74
<i>mpkC</i>	FWD, TTCCGAGGTCCTTGACTATCT; REV, GTTCAAGAGCACTCGGATCAA	100	105.13
<i>nimA</i>	FWD, TCAGCGGCAAGCAAGAATA; REV, TGAGGGAAGATCGGGTATATCA	100	92.65
<i>HACA</i>	FWD, GATTCACCCACTCTTGCTCC; REV, GAATCTGTGAGGTCCAAGTCC	100	97.38
<i>IRE1</i>	FWD, CACAATTACAGGAGCTTGCG; REV, GAACCCTGTCTCGTCTAACTC	100	95.43
A-tubulin	FWD, CGGCTAATGGAAAATACATGCG; REV, GTCTTGGCCTTGAGAGATGCAA	100	93.12

^aSee reference 69.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, EPS file, 1.6 MB.

FIG S2, EPS file, 0.9 MB.

FIG S3, EPS file, 1.6 MB.

FIG S4, EPS file, 0.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carlos Alberto Vieira for technical support.

F.A., O.H., A.C., M.R., and T.B. conceived the study. F.A., O.H., and T.B. performed the experimental design and laboratory experiments. A.P. and M.S.F. contributed to *A. fumigatus* assays. A.P. and P.S. performed the illustrative designs. G.T. assisted in the *C. albicans* EV isolation assay. T.B., N.M., A.R., A.C., L.A., M.R., and F.A. wrote the manuscript.

This work was supported by grants from the Brazilian agencies São Paulo Research Foundation-FAPESP (proc. no. 2016/03322-7, proc. no. 2019/22596-9, and fellowship no. 2019/02504-2 to A.M.P. and fellowship no. 2019/22454-0 to M.S.F.), National Council for Scientific and Technological Development–CNPq (grant no. 420670/2018-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência-FAEPA.

REFERENCES

- Almeida F, Rodrigues ML, Coelho C. 2019. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Front Microbiol* 10:214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4:165rv13.
- Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M, 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. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-06>.
- Ikeda MAK, de Almeida JRF, Jannuzzi GP, Cronemberger-Andrade A, Torrecilhas ACT, Moretti NS, da Cunha JPC, de Almeida SR, Ferreira KS. 2018. Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. *Front Microbiol* 9:2286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02286>.
- Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, Albuquerque PC, Frases S, Santos SS, Nosanchuk JD, Gomes AMO, Medeiros LCAS, Miranda K, Sobreira TJP, Nakayasu ES, Arigi EA, Casadevall A, Guimaraes AJ, Rodrigues ML, Freire-de-Lima CG, Almeida IC, Nimrichter L. 2015. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 17:389–407. <https://doi.org/10.1111/cmi.12374>.
- Gehrmann U, Qazi KR, Johansson C, Hultenby K, Karlsson M, Lundeberg L, Gabrielsson S, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021480>.
- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancoppe-Oliveira RM, Almeida IC, Nosanchuk JD. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x>.
- Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS, Guimaraes AJ, Sobreira TJP, Nosanchuk JD, Cordero RJB, Frases S, Casadevall A, Almeida IC, Nimrichter L, Rodrigues ML. 2010. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One* 5:e11113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011113>.
- Vallejo MC, Matsuo AL, Ganiko L, Medeiros LCS, Miranda K, Silva LS, Freymüller-Haapalainen E, Sinaglia-Coimbra R, Almeida IC, Puccia R. 2011. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell* 10:343–351. <https://doi.org/10.1128/EC.00227-10>.
- Leone F, Bellani L, Muccifora S, Giorgetti L, Bongioanni P, Simili M, Maserti B, Del Carratore R. 2018. Analysis of extracellular vesicles produced in the

- biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *J Cell Physiol* 233: 2759–2767. <https://doi.org/10.1002/jcp.25885>.
11. Bielska E, Sisqueira MA, Aldeieg M, Birch C, O'Donoghue EJ, May RC. 2018. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nat Commun* 9:1556. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03991-6>.
 12. Peres da Silva R, Longo LGV, Cunha JPC, Sobreira TJP, Rodrigues ML, Faoro H, Goldenberg S, Alves LR, Puccia R. 2019. Comparison of the RNA content of extracellular vesicles derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Cells* 8:765. <https://doi.org/10.3390/cells8070765>.
 13. Lavrin T, Konte T, Kostanjšek R, Sitar S, Sepčić K, Prpar Mihevc S, Žagar E, Župunski V, Lenassi M, Rogelj B, Gunde Cimerman N. 2020. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* induces neurocytotoxicity in neuroblastoma cells and progressive cell death. *Cells* 9:963. <https://doi.org/10.3390/cells9040963>.
 14. Silva BMA, Prados-Rosales R, Espadas-Moreno J, Wolf JM, Luque-Garcia JL, Gonçalves T, Casadevall A. 2014. Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med Mycol* 52:202–210. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt003>.
 15. Bitencourt TA, Rezende CP, Quaresimin NR, Moreno P, Hatanaka O, Rossi A, Martinez-Rossi NM, Almeida F. 2018. Extracellular vesicles from the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. *Front Immunol* 9:2343. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02343>.
 16. Liu M, Bruni GO, Taylor CM, Zhang Z, Wang P. 2018. Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen *Rhizopus delemar*. *Sci Rep* 8:5243. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23611-z>.
 17. Bleackley MR, Samuel M, Garcia-Ceron D, McKenna JA, Lowe RGT, Pathan M, Zhao K, Ang C-S, Mathivanan S, Anderson MA. 2019. Extracellular vesicles from the cotton pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* induce a phytotoxic response in plants. *Front Plant Sci* 10:1610. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01610>.
 18. de Paula RG, Antoniêto ACC, Nogueira KMV, Ribeiro LFC, Rocha MC, Malavazi I, Almeida F, Silva RN. 2019. Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* 12:146. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1487-7>.
 19. Souza JAM, Baltazar LM, Carregal VM, Gouveia-Eufrasio L, de Oliveira AG, Dias WG, Campos Rocha M, Rocha de Miranda K, Malavazi I, Santos DA, Frézard FJG, de Souza DG, Teixeira MM, Soriani FM. 2019. Characterization of *Aspergillus fumigatus* extracellular vesicles and their effects on macrophages and neutrophils functions. *Front Microbiol* 10:2008. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02008>.
 20. Brauer VS, Pessoni AM, Bitencourt TA, de Paula RG, de Oliveira Rocha L, Goldman GH, Almeida F. 2020. Extracellular vesicles from *Aspergillus flavus* induce M1 polarization in vitro. *mSphere* 5:e00190-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00190-20>.
 21. de Toledo Martins S, Szwarc P, Goldenberg S, Alves LR. 2019. Extracellular vesicles in fungi: composition and functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 422:45–59. https://doi.org/10.1007/82_2018_141.
 22. Rizzo J, Rodrigues ML, Janbon G. 2020. Extracellular vesicles in fungi: past, present, and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 10:346. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00346>.
 23. Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD, Casadevall A, Rodrigues ML, Nimrichter L. 2010. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* 78:1601–1609. <https://doi.org/10.1128/IAI.01171-09>.
 24. Huang SH, Wu CH, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Brown RJ, Jong A. 2012. *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One* 7:e48570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048570>.
 25. Regente M, Pinedo M, San Clemente H, Balliau T, Jamet E, de la Canal L. 2017. Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth. *J Exp Bot* 68:5485–5495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx355>.
 26. Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin F-M, Palmquist J, Huang S-D, Jin H. 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360:1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>.
 27. Silva VKA, Rodrigues ML, May RC. 2019. Deciphering fungal extracellular vesicles: from cell biology to pathogenesis. *Curr Clin Micro Rep* 6:89–97. <https://doi.org/10.1007/s40588-019-00128-1>.
 28. Freitas MS, Bonato VLD, Pessoni AM, Rodrigues ML, Casadevall A, Almeida F. 2019. Fungal extracellular vesicles as potential targets for immune interventions. *mSphere* 4:e00747-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00747-19>.
 29. Voelz K, Johnston SA, Smith LM, Hall RA, Idrum A, May RC. 2014. “Division of labour” in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nat Commun* 5:5194. <https://doi.org/10.1038/ncomms6194>.
 30. Hai TP, Tuan TL, Anh DV, Mai TN, Huong LNP, Thwaites GE, et al. 2020. The expression of virulence by the *Cryptococcus neoformans* VNla-5 lineage is plastic and associated with host immune background. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.02.24.962134>.
 31. Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, Dominguez E, Jaromin A, Bernhardt J, Mitchell KF, Heiss C, Azadi P, Mitchell A, Andes DR. 2018. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biol* 16:e2006872. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006872>.
 32. Honorato L, Demetrio JF, Ellis CC, Piffer A, Pereira Y, Frases S, et al. 2021. Extracellular vesicles regulate yeast growth, biofilm formation, and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.01.21.427696>.
 33. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>.
 34. Wolf JM, Rivera J, Casadevall A. 2012. Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles. *Cell Microbiol* 14:762–773. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01757.x>.
 35. Hatanaka O, Rezende CP, Moreno P, Freitas Fernandes F, Oliveira Brito PKM, Martinez R, Coelho C, Roque-Barreira MC, Casadevall A, Almeida F. 2019. Galectin-3 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* growth and impacts *paracoccidioidomycosis* through multiple mechanisms. *mSphere* 4:e00209-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00209-19>.
 36. Almeida F, Antoniêto ACC, Pessoni AM, Monteiro VN, Alegre-Maller ACP, Pigosso LL, Pereira M, Soares CMA, Roque-Barreira MC. 2016. Influence of N-glycans on expression of cell wall remodeling related genes in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Curr Genomics* 17:112–118. <https://doi.org/10.2174/1389202917666151116212705>.
 37. Bruder Nascimento ACMO, Dos Reis TF, de Castro PA, Hori JI, Bom VLP, de Assis LJ, Ramalho LNZ, Rocha MC, Malavazi I, Brown NA, Valiante V, Brakhage AA, Hagiwara D, Goldman D. 2016. Mitogen activated protein kinases SakA(HOG1) and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* 100:841–859. <https://doi.org/10.1111/mmi.13354>.
 38. Pereira Silva L, Alves de Castro P, Dos Reis TF, Paziani MH, Von Zeska Kress MR, Riano-Pachon DM, et al. 2016. Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA(HOG1) and MpkC dependent. *Cell Microbiol* <https://doi.org/10.1111/cmi.12681>.
 39. Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. 2018. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 293: 10512–10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>.
 40. Karkowska-Kuleta J, Kulig K, Karnas E, Zuba-Surma E, Woznicka O, Pyza E, Kuleta P, Osyczka A, Rapala-Kozik M, Kozik A. 2020. Characteristics of extracellular vesicles released by the pathogenic yeast-like fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. *Cells* 9:1722. <https://doi.org/10.3390/cells9071722>.
 41. Reis FCG, Borges BS, Jozefowicz LJ, Sena BAG, Garcia AWA, Medeiros LC, Martins ST, Honorato L, Schrank A, Vainstein MH, Kmetzsch L, Nimrichter L, Alves LR, Staats CC, Rodrigues ML. 2019. A novel protocol for the isolation of fungal extracellular vesicles reveals the participation of a putative scramblase in polysaccharide export and capsule construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere* 4:e00080-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00080-19>.
 42. Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Harcus D, Marcil A, Bouin A-P, Sensen CW, Hogues H, van Het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY, Whiteway M. 2002. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* 13:3452–3465. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0272>.
 43. McCreath KJ, Specht CA, Robbins PW. 1995. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2544–2548. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2544>.
 44. Zhao K, Bleackley M, Chisanga D, Gangoda L, Fonseka P, Liem M, Kalra H, Al Saffar H, Keerthikumar S, Ang C-S, Adda CG, Jiang L, Yap K, Poon IK, Lock P, Bulone V, Anderson M, Mathivanan S. 2019. Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodeling. *Commun Biol* 2:305. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0538-8>.
 45. Ron D, Walter P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>.

46. Moore KA, Hollien J. 2012. The unfolded protein response in secretory cell function. *Annu Rev Genet* 46:165–183. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155644>.
47. Bladt TT, Frisvad JC, Knudsen PB, Larsen TO. 2013. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules* 18:11338–11376. <https://doi.org/10.3390/molecules180911338>.
48. Ikehata H, Ono T. 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* 52:115–125. <https://doi.org/10.1269/jrr.10175>.
49. Silva-Junior AC, Asad LM, Felzenszwalb I, Asad NR. 2011. Mutagenicity induced by UVC in *Escherichia coli* cells: reactive oxygen species involvement. *Redox Rep* 16:187–192. <https://doi.org/10.1179/1351000211Y.0000000010>.
50. Blachowicz A, Raffa N, Bok JW, Choera T, Knox B, Lim FY, Huttenlocher A, Wang CCC, Venkateswaran K, Keller NP. 2020. Contributions of spore secondary metabolites to UV-C protection and virulence vary in different *Aspergillus fumigatus* strains. *mBio* 11:e03415-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03415-19>.
51. Osmani SA, Ye XS. 1996. Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem J* 317:633–641. <https://doi.org/10.1042/bj3170633>.
52. Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4:119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
53. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:348–376. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-06>.
54. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:85–93. <https://doi.org/10.1586/eri.11.152>.
55. Muñoz JF, Delorey T, Ford CB, Li BY, Thompson DA, Rao RP, Cuomo CA. 2019. Coordinated host-pathogen transcriptional dynamics revealed using sorted subpopulations and single macrophages infected with *Candida albicans*. *Nat Commun* 10:1607. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09599-8>.
56. Whiteway M, Bachewich C. 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 61:529–553. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093341>.
57. Kumamoto CA. 2008. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nat Rev Microbiol* 6:667–673. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1960>.
58. Sudbery P, Gow N, Berman J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12:317–324. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.
59. Sudbery PE. 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* 9:737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>.
60. Finkel JS, Mitchell AP. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 9:109–118. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>.
61. Albuquerque P, Casadevall A. 2012. Quorum sensing in fungi—a review. *Med Mycol* 50:337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>.
62. Dos Reis Almeida FB, Carvalho FC, Mariano VS, Alegre ACP, Silva RN, Hanna ES, Roque-Barreira MC. 2011. Influence of N-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *PLoS One* 6:e29216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029216>.
63. da Silva TA, Roque-Barreira MC, Casadevall A, Almeida F. 2016. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep* 6:35867. <https://doi.org/10.1038/srep35867>.
64. Rupert DLM, Claudio V, Lasser C, Bally M. 2017. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochim Biophys Acta* 1861:3164–3179. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.028>.
65. Almeida F, Wolf JM, da Silva TA, DeLeon-Rodriguez CM, Rezende CP, Pessonni AM, Fernandes FF, Silva-Rocha R, Martinez R, Rodrigues ML, Roque-Barreira MC, Casadevall A. 2017. Galectin-3 impacts *Cryptococcus neoformans* infection through direct antifungal effects. *Nat Commun* 8:1968. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02126-7>.
66. Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. 2014. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling* 30:719–727. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.919282>.
67. Bitencourt TA, Oliveira FB, Sanches PR, Rossi A, Martinez-Rossi NM. 2019. The *prp4* kinase gene and related spliceosome factor genes in *Trichophyton rubrum* respond to nutrients and antifungals. *J Med Microbiol* 68:591–599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000967>.
68. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(T))} method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
69. Campos Rocha M, Fabri JHTM, de Godoy KF, de Castro PA, Hori JI, da Cunha AF, Arentshorst M, Ram AFJ, van den Hondel CAMJJ, Goldman GH, Malavazi I. 2016. *Aspergillus fumigatus* MADS-box transcription factor *rlmA* is required for regulation of the cell wall integrity and virulence. *G3 Genes Genomes Genetics* 6:2983–3002. <https://doi.org/10.1534/g3.116.031112>.