



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA



Arthur Cadamuro Guedes

Papel das vesículas extracelulares produzidas por *Paracoccidioides
brasiliensis* na homeostase de ferro

Ribeirão Preto

2023

ARTHUR CADAMURO GUEDES

Papel das vesículas extracelulares produzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* na homeostase de ferro

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Versão corrigida da dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Clínica Médica em 02/02/2024. A versão original encontra-se disponível no departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.;

Orientador: Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida

Ribeirão Preto

2023

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

GUEDES, ARTHUR, CADAMURO

Papel das vesículas extracelulares produzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* na homeostase de ferro/Arthur Cadamuro Guedes; Orientador, Fausto Bruno dos Reis Almeida – 2023.

64 p.

Dissertação apresentada ao Programa de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Versão original

Vesículas extracelulares, *Paracoccidioides*, gene HapX.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GUEDES, Arthur Cadamuro

Título: Papel das vesículas extracelulares produzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* na homeostase de ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Aprovado em:/...../.....

Banca Examinadora

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao amor da minha vida, **Virgínia Silvestrini**, não há palavras para expressar minha gratidão por todo o apoio e contribuição que você dedicou ao auxílio da minha tese de Mestrado. Sua presença constante, seu incentivo e seu profundo conhecimento na área foram fundamentais para o sucesso desta etapa. Sua paciência, compreensão e amor incondicional me inspiraram a alcançar este marco em minha jornada acadêmica. Você é o meu pilar e minha inspiração. Obrigado por ser minha fonte inesgotável de força e apoio.
- ❖ Aos meus queridos pais, **Fernando e Elieti**, quero expressar minha eterna gratidão. Todo amor, incentivo e valores moldaram a pessoa que sou hoje. O exemplo de dedicação, ética e determinação que vocês representam me guiou em cada passo da minha jornada acadêmica. A confiança de vocês em mim sempre foi o combustível que impulsionou meu progresso.
- ❖ Aos meus amados avós, **Dirceu e Edelazil**, e aos meus padrinhos, Nivaldo e Solange, minha gratidão é profunda. A influência positiva e os ensinamentos valiosos que compartilharam comigo ao longo dos anos desempenharam um papel essencial na minha formação como pessoa. Seus exemplos de vida, sabedoria e carinho sempre foram uma fonte de inspiração e orientação.
- ❖ Agradeço também ao meu dedicado orientador, **Fausto Almeida**, pela paciência, amizade e ensinamentos durante a elaboração do trabalho. Sua orientação foi fundamental para a conclusão deste projeto. Sua capacidade de transmitir conhecimento e sua disposição em responder a todas as minhas dúvidas fizeram desta jornada acadêmica uma experiência enriquecedora.
- ❖ Aos integrantes da **banca examinadora** e aos funcionários e amigos do departamento de **Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP-USP**, que disponibilizaram seu tempo para análise deste trabalho, meu sincero agradecimento.
- ❖ A **CAPES** pelo apoio e incentivo a pesquisa.
- ❖ A **minha família e meu querido orientador**, agradeço por serem parte deste capítulo da minha vida e por terem contribuído de maneira tão significativa para o meu sucesso. Sou imensamente grato por ter pessoas tão incríveis ao meu lado. Este trabalho é uma homenagem a todos vocês, e cada página escrita é um reflexo do amor, apoio e inspiração que recebi ao longo desta jornada.

Com todo o meu carinho e gratidão,

Arthur Cadamuro Guedes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

Gênero <i>Paracoccidioides</i>	14
Patogênese da PCM	15
Importância do ferro na virulência fúngica e maquinaria de controle	17
Vesículas extracelulares.....	19

OBJETIVOS

Objetivos específicos	24
-----------------------------	----

METODOLOGIA

Linhagens e condições de cultivo.....	27
Modelos animais	27
Produção e purificação de VEs	27
Determinação do tamanho e concentração de VEs	27
Preparo e cultivo de macrófagos.....	28
Dosagem de citocinas	28
Mensuração da produção de óxido nítrico.....	29
Ensaio de atividade fagocítica por macrófagos	29
Ensaio de carga fúngica e sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i>	30
Infecção de camundongos	30
Análise estatística	30

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de VEs pelo mutante de <i>P. brasiliensis</i>	33
Avaliação da atividade fagocítica	34
Avaliação <i>in vivo</i> da infecção pelo mutante de HapX de <i>P. brasiliensis</i>	37

CONCLUSÕES

REFERÊNCIAS

ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO

LISTA DE ABREVIATURAS

A. flavus - *Aspergillus flavus*
A. Fumigatus - *Aspergillus fumigatus*
BHI - *Brain Heart Infusion*
BMDMs - *Bone marrow derived macrophage*
C. albicans - *Candida albicans*
C. Auris - *Candida auris*
C. gattii - *Cryptococcus gattii*
C. neoformans - *Cryptococcus neoformans*
CFU - Unidades Formadoras de Colônia
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DP - Desvio Padrão da média
EPM - Erro padrão da média
Fe - Ferro
G. Mellonella - *Galleria mellonella*
H. capsulum - *Histoplasma capsulatum*
IFN- γ - Interferon Gama
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - Interleucina 1 Beta
IL-6 - Interleucina 6
NO - Óxido Nítrico
NTA - nanopartículas
P. brasiliensis - *Paracoccidioides brasiliensis*
P. lutzii - *Paracoccidioides lutzii*
PB - *Paracoccidioides brasiliensis*
PBS - Solução Salina tamponada com Fosfato
PCM - Paracoccidioidomicose
PDA - Potato dextrose agar
S. Brasiliensis - *Sporothrix brasiliensis*
SBF - Soro Bovino Fetal
TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta
Th1 - Resposta por células T auxiliares tipo 1
Th2 - Resposta por células T auxiliares tipo 2

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

VEs - Vesículas Extracelulares

WT - *Wild type*

SÍMBOLOS

% - Porcentagem

nm - Nanômetros

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrometro

cm - Centímetro

g - Grama

KDa - Quilodalton

M - Molar

mL - Mililitro

ng - Nanograma

pH - Log negativo da concentração de H⁺

RPM - Rotações por minuto

xg - Força centrífuga relativa

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Esquema simplificado demonstrando a regulação do ferro em *A. fumigatus*, focando o papel dos fatores de transcrição SreA e HapX. Adaptado de (SCHRETTL; HAAS, 2011) _____ **15**

Figura 2: Desafios na análise de vesículas extracelulares (VEs) fúngicas. Em fungos, a presença de uma parede celular espessa foi considerada como uma barreira física para a liberação de substâncias, mas evidências recentes mostraram que a parede celular apresenta uma estrutura viscoelástica e diferentes hipóteses foram propostas para explorar como ela é compatível com o trânsito de membranas lipídicas (**Figura 2 – 1,2**). A diversidade de morfologia, tamanho e conteúdo de VEs dificultam uma análise padrão para os diversos microrganismos. Além disso, os protocolos atuais utilizados para purificar VEs não evitam a contaminação com agregados potencialmente contendo proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, limitando assim o conhecimento sobre a estrutura e carga das VEs (**Figura 2 – 3**). Apesar da sua composição complexa, incluindo ácidos nucleicos, glicanos, pigmentos, proteínas, RNA, e diferentes lipídios, marcadores específicos de EVs fúngicos não foram identificados até o momento (**Figura 2 – 4**). Por fim, pouco se sabe sobre o papel dos VEs fúngicas na comunicação célula-célula entre diferentes hospedeiros e fungos, mas também entre células fúngicas. A diversidade de VEs poderia estar associada a uma diversidade de funções e respostas das células receptoras na presença de diferentes tipos de vesículas. Esta compreensão pode trazer aplicabilidade na medicina, incluindo ferramentas de imunomodulação, veículos de distribuição de medicamentos e potenciais alvos de vacina (**Figura 2 – 5**). Adaptado de RIZZO; RODRIGUES; JANBON, 2020 _____ **18**

Figura 3: Análise de rastreamento de nanopartículas das vesículas extracelulares (VEs) produzidas por mutante de *Paracoccidioides brasiliensis* para o gene HapX. VEs foram purificadas do sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* e quantificadas por NanoSight NS300. (A) Histograma mostrando a distribuição (VEs x 10⁹/ml vs tamanho em nanômetros). (B) Captura de tela proveniente do vídeo gravado utilizando o equipando NS300, mostrando a distribuição das VEs produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX _____ **30**

Figura 4. Vesículas extracelulares (VEs) produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX induz a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). BMDM (1.5 x 10⁶/ml) provenientes de camundongos C57BL/6 foram incubados a 37 °C por 48h com as quantidades indicadas de VEs (eixo X). O meio e LPS (1µg/mL) mais IFN-γ (2ng/mL) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os sobrenadantes de cultura foram mensurados para TNF-α (A), IL-6 (B), IL-1β (C), NO (D), IL-10 (E) e TGF-β (F). Os resultados foram comparados aos níveis das células não estimuladas (somente meio). Diferenças foram consideradas significativas quando p < 0.05 (*) _____ **32**

Figura 5. Vesículas extracelulares (VEs) produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX estimula atividade fungicida por macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). (A) BMDM foram plaqueados em lamínulas e cultivados com VEs (10⁷ partículas/ml) por 30 min e tratados com leveduras de *P. brasiliensis* (macrófagos/levedura = 1:1) por 4 horas a 37 °C, e o índice fagocítico determinado. (B) BMDM previamente tratados com VEs (10⁷ partículas/ml) por 30 min leveduras de *P. brasiliensis* (macrófagos/conídios = 1:1) por 48 horas a 37 °C. As células foram lisadas e o lisado foi plaqueado para detecção dos fungos viáveis por contagem de CFU. Os

dados representam resultados de três experimentos independentes. Somente meio e meio contendo IFN- γ foram usados com controles negativo e positivo, respectivamente. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$ (*) _____ **33**

Figura 6: Vesículas extracelulares (VEs) produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX induz efeito protetivo no modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*. (A) As larvas de *G. mellonella* (n = 6 larvas por grupo) foram estimuladas com VEs de *P. brasiliensis* Pb18, ou com o mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX ou com PBS como controle por 48 horas após a infecção por células leveduriformes de *P. brasiliensis*. As larvas foram homogeneizadas e os níveis de carga de CFU determinados após 48 horas após a infecção. (B) A curva de sobrevivência (n = 6 larvas por grupo) foi realizada durante 13 dias pós infecção. Os dados representam os resultados de dois experimentos independentes. Os testes de One-way ANOVA e de comparação múltipla de Bonferroni foram usados para analisar a carga fúngica e o teste de Mantel-Cox foi utilizado para as análises da curva de sobrevivência. *. $P < 0.05$ __ **35**

Figura 7. Curva de sobrevivência de camundongos machos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* Pb18 ou pelo mutante de *P. brasiliensis* HapX (Pb HapX) (1×10^7 células leveduriformes por animal). Os animais foram monitorados diariamente para ocorrência de morte durante um período de 60 dias após a infecção. Os dados representam os resultados de dois experimentos independentes _____ **36**

Papel das vesículas extracelulares produzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* na homeostase de ferro

O Ferro (Fe) apresenta uma posição central na interface patógeno-hospedeiro. Em mamíferos, um sistema altamente especializado atua na captura de Fe dos patógenos, e a capacidade dos patógenos de resistir à privação de Fe é considerado um fator crucial de virulência. No contexto da paracoccidioidomicose, uma doença causada por membros do complexo *Paracoccidioides*, há um aumento da aquisição de Fe em resposta a privação deste elemento. Isso inclui a produção por sideróforos, a captação de heme e ferro extracelular, processos regulados pelo fator de transcrição HapX. No entanto, existem poucos estudos em relação aos mecanismos de captação e síntese de sideróforos, a via de captação de heme da molécula de hemoglobina e dos genes que controlam a homeostase de Fe em *Paracoccidioides*. Sabe-se que vesículas extracelulares (VEs) desempenham um papel essencial na interação patógeno-hospedeiro durante infecções fúngicas. Dessa forma, investigamos o papel de VEs produzidas por *P. brasiliensis* na captação de ferro e mecanismos fisiopatológicos associados à infecção. Para isso, utilizamos uma linhagem mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX, a fim de avaliar a produção de VEs e seu impacto na virulência fúngica. Identificamos que VEs produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX possuem propriedades imunomoduladoras, desencadeando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, aumentando a capacidade fagocítica e a capacidade de killing por macrófagos derivados de medula óssea. Além disso, essas VEs demonstraram efeito protetivo no modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella* contra a infecção por *P. brasiliensis*. Em conjunto, nossos resultados sugerem uma correlação significativa entre a privação de Fe e mecanismos de secreção via VEs que contribuem para o sucesso da infecção por *P. brasiliensis*, contribuindo para o avanço no entendimento da paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: Vesícula extracelular, Ferro, paracoccidioidomicose.

Role of extracellular vesicles produced by *Paracoccidioides brasiliensis* in iron homeostasis

Iron (Fe) holds a central position at the pathogen-host interface. In mammals, there is a highly specialized system for capturing Fe from pathogens, and the ability of pathogens to resist Fe deprivation is considered a crucial factor of virulence. In the context of paracoccidioidomycosis, a disease caused by members of the *Paracoccidioides* complex, there is an increase in Fe acquisition in response to the deprivation of this element. This includes the production of siderophores, the uptake of heme and extracellular iron, processes regulated by the transcription factor HapX. However, there are few studies regarding the mechanisms of siderophore uptake and synthesis, the heme uptake pathway from hemoglobin, and the genes that control Fe homeostasis in *Paracoccidioides*. It is known that extracellular vesicles (EVs) play an essential role in the pathogen-host interaction during fungal infections. Therefore, we investigated the role of EVs produced by *P. brasiliensis* in iron uptake and physiopathological mechanisms associated with infection. To do this, we used a mutant strain of *P. brasiliensis* for the HapX gene to assess the production of EVs and their impact on fungal virulence. We found that EVs produced by the *P. brasiliensis* mutant for the HapX gene have immunomodulatory properties, triggering the release of pro-inflammatory mediators, enhancing phagocytic capacity, and mediating the killing of bone marrow-derived macrophages. Furthermore, these EVs demonstrated a protective effect in an in vivo model of *Galleria mellonella* larvae against *P. brasiliensis* infection. Collectively, our results suggest a significant correlation between Fe deprivation and secretion mechanisms via EVs that contribute to the success of *P. brasiliensis* infection, advancing our understanding of paracoccidioidomycosis.

keywords: Extracellular vesicle, Iron, Paracoccidioidomycosis.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a recorrência de infecções fúngicas tem aumentado, atingindo aproximadamente 4 milhões de casos anualmente (ALMEIDA; RODRIGUES; COELHO, 2019). Sua incidência está intrinsecamente ligada a uma complexa interação de fatores, incluindo características socioeconômicas, geográficas e efetividade do sistema imunológico (BONGOMIN *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas podem ser manifestar de diferentes formas, como infecções locais e disseminadas, com características distintas. As infecções locais são restritas a uma área específica do corpo, que pode incluir infecções de pele, unhas, cabelo, boca, e outros tecidos. Estas infecções são menos graves do que as infecções disseminadas, que ocorrem quando os fungos se espalham por todo corpo, afetando múltiplos órgãos ou sistemas. As infecções disseminadas são mais comuns em pessoas com sistemas imunológicos vulneráveis, como em pacientes com câncer, HIV/AIDS, ou aqueles que fazem uso de imunossuppressores (BONGOMIN *et al.*, 2017).

Dentre os fungos responsáveis por infecções sistêmicas, os mais prevalentes na América Latina são os do gênero *Paracoccidioides*, que figuram entre as dez principais causas de mortes por doenças parasitárias infecciosas no país (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

1.1 GÊNERO *PARACOCCIDIOIDES*

O gênero *Paracoccidioides* é composto por fungos patogênicos responsáveis por causar infecções conhecidas como paracoccidioidomicose (PCM). Dentro deste gênero, duas espécies notáveis são identificadas como principais causadoras de PCM: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (TRAVASSOS; TABORDA; COLOMBO, 2008). Estas espécies fúngicas apresentam distribuição geográfica limitada ao México, a América Central e do Sul, com maior número de casos no Brasil, Argentina e Colômbia (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

P. brasiliensis e *P. lutzii* são fungos dimórficos pertencentes ao Filo *Ascomycota*, Ordem *Onygenales*, e Família *Onygenaceae*. Podem estar presentes no solo e possui dimorfismo morfológico termo-dependente, os quais à temperatura de 35°C (*in vitro*, em meios enriquecidos ou no tecido do

hospedeiro em condição de parasitismo) possui forma de leveduras com multi-brotamentos, e a 25°C (*in vitro* ou em ambiente sob condições de saprofitismo) cresce na forma micelial (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2020).

Estratégias moleculares foram utilizadas para diferenciar *P. brasiliensis* de *P. lutzii*. Foram identificadas diversas espécies de *P. brasiliensis*: 1) *P. brasiliensis sensu stricto* (variantes S1a e S1b), que foi isolado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; 2) *Paracoccidioides americana* (também conhecida como PS2), presente no Brasil, Venezuela, Uruguai e Argentina; 3) *Paracoccidioides restrepiensis* (também conhecido como PS3), presente principalmente na Colômbia; 4) *Paracoccidioides venezuelensis* (também conhecido como PS4), encontrado exclusivamente na Venezuela (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2020). *P. lutzii* ocorre predominantemente na região centro-oeste do Brasil, com menor incidência no sul e norte do Brasil e no Equador (THEODORO *et al.*, 2012).

Clinicamente, o impacto dessa diversidade genotípica é baixo. Em um estudo comparativo de 51 pacientes infectados por *P. brasiliensis* e 16 por *P. lutzii*, não foram identificadas diferenças epidemiológicas, manifestações clínicas e resposta às terapias entre os dois grupos, de forma significativa. A principal diferença é que pacientes infectados por *P. lutzii* podem apresentar resultados negativos para o teste imunológico de detecção contra gp43, principal antígeno utilizado para diagnóstico (BATISTA *et al.*, 2010; FLAVIA POPI; LOPES; MARIANO, 2002).

1.2 PATOGÊNESE DA PCM

A paracoccidioidomicose, descrita pela primeira vez em 1.908 pelo cientista brasileiro Adolf Lutz, é uma doença sistêmica, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas que podem evoluir para lesões no pulmão, pele, mucosas e outros tecidos. No Brasil, é a principal micose sistêmica, representando uma das dez principais causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias, crônicas e recorrentes no país.

A principal porta de entrada das espécies de *Paracoccidioides* é por inalação pulmonar. Após sua aspiração, células de defesa como neutrófilos e macrófagos ativados poderão atuar para bloquear e inibir o crescimento fúngico, impedindo sua disseminação. Respostas por células T auxiliares tipo 2 (Th2) tem

sido associada à suscetibilidade de doenças, enquanto uma resposta tipo 1 (Th1) tem sido associada ao controle da infecção (BENARD *et al.*, 2001; KARHAWI; COLOMBO; SALOMÃO, 2000; MAMONI; BLOTTA, 2005; MARQUES MELLO; SILVA-VERGARA; RODRIGUES, 2002).

Pacientes expostos aos patógenos *P. lutzi* ou *P. brasiliensis* podem formar granulomas locais de infecção primária, com focos metastáticos em alguns casos, contendo formas viáveis dos fungos. A perda da homeostase imunológica, permite a progressão da doença em sua forma crônica. Menos frequentemente, a doença sistêmica pode progredir a partir do foco primário de infecção em período de latência, com rápida deterioração clínica (PCM aguda ou subaguda) (TRAVASSOS; TABORDA; COLOMBO, 2008).

1.3 IMPORTÂNCIA DO FERRO NA VIRULÊNCIA FÚNGICA E MAQUINARIA DE CONTROLE

O Fe metálico redox é um importante cofator em uma variedade de processos celulares, como a fosforilação oxidativa, desintoxicação de compostos e metabólicos. Paradoxalmente, a mesma propriedade redox torna este metal potencialmente tóxico por aumentar a produção de estresse oxidativo. Portanto, a homeostase do Fe precisa ser perfeitamente regulada em termos de captação e armazenamento para satisfazer as necessidades celulares, e ao mesmo tempo, evitar seu excesso tóxico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; HASCHKA; HOFFMANN; WEISS, 2021).

Os mecanismos de homeostase do Fe são diferentes dentre vários tipos de infecção. Este controle é realizado por fatores de transcrição como HapX e SreS, que além de estarem relacionados à regulação da homeostase do Fe, estão envolvidos na regulação da virulência fúngica e resposta imunológica do hospedeiro (JUNG; SÁNCHEZ-LEÓN; KRONSTAD, 2021). Em *Aspergillus fumigatus*, quando há quantidade adequada de Fe disponível, o fator SreA reprime a captação de Fe para evitar efeitos tóxicos, através de dois mecanismos: conversão de Fe em uma forma utilizável e captura de Fe com a ajuda de sideróforos; metabólitos secundários específicos para íons de Fe. Já em privação de Fe, o fator de transcrição HapX ativa a captação de Fe mediada por sideróforos e reprime as vias de consumo para poupar sua utilização, como

biossíntese do grupamento heme, respiração e biogênese do ribossomo (**Figura 1**) (GSALLER *et al.*, 2014).

Os fatores transcricionais SreA e HapX estão regulados negativamente, SreA reprime a expressão de HapX durante a suficiência de Fe, enquanto HapX reprime SreA durante a falta de Fe. Além disso, HapX é essencial para a desintoxicação do Fe, ativando o importador de Fe vacuolar CccA sob condições de alto teor de Fe (GSALLER *et al.*, 2012, 2014). Em *Aspergillus nidulans*, a inativação de ambos os reguladores é sinteticamente letal, sublinhando a importância do metabolismo do Fe para a sobrevivência celular (HORTSCHANSKY *et al.*, 2007). Devido ao seu papel central na homeostase do Fe, o fator de transcrição HapX demonstrou ser um determinante de virulência em vários patógenos fúngicos humanos, como *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, bem como no fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* (HSU; YANG; LAN, 2011; JUNG *et al.*, 2010).

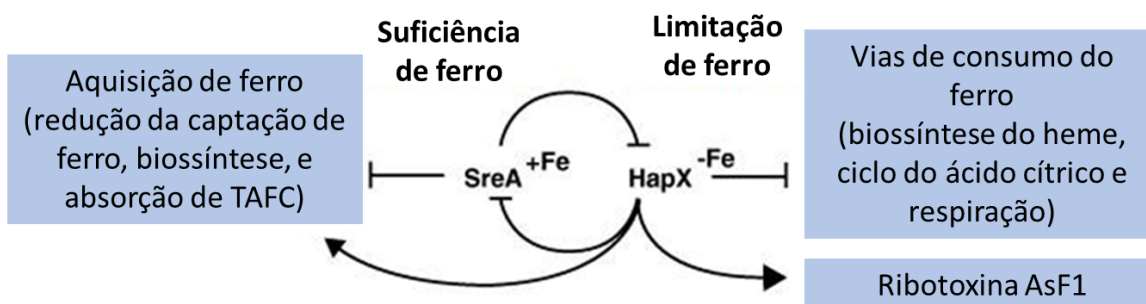


Figura 1: Esquema simplificado demonstrando a regulação do ferro em *A. fumigatus*, focando o papel dos fatores de transcrição SreA e HapX. Adaptado de (SCHRETTL; HAAS, 2011).

Conforme já descrito, o Fe é um nutriente crítico para proliferação e patogenicidade de microrganismos, e sua desregulação representa um risco crucial para infecções potencialmente invasivas (PETZER *et al.*, 2019). Após a infecção por patógenos extracelulares, a ação de citocinas e proteínas de fase aguda induz a aquisição e retenção de Fe dentro dos macrófagos, tornando o Fe menos acessível aos microrganismos circulantes. Em contraste, infecções de macrófagos com micróbios intracelulares causam mobilização de Fe celular, desregulando sua homeostase (GANZ; NEMETH, 2015; RIEDELBERGER *et al.*, 2020). Este mecanismo tem sido descrito em espécies fúngicas, porém precisa

ser melhor investigado em *Paracoccidioides*, já que sofre regulação da homeostase do Fe durante a infecção intracelular.

1.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares (VEs) desempenham papel fundamental na comunicação intercelular e na regulação de diversos processos biológicos. As EVs são liberadas no espaço extracelular e podem variar em tamanho, geralmente medindo de 50 a 2.000 ηm de diâmetro. As VEs são constituídas por uma bicamada lipídica e apresentam composição de membrana, carga e funções biológicas distintas (XU *et al.*, 2018).

Dentro da categoria das VEs, os exossomos são considerados uma subclasse menor, com diâmetros variando de 30 a 150 ηm , e são produzidos pela via endossomal. Já as microvesículas são estruturas maiores, de 50 a 2000 ηm , formadas por brotamento direto da membrana plasmática (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Embora as VEs sejam secretadas tanto por células procarióticas quanto eucarióticas, as produzidas por células eucarióticas têm sido objeto de investigação mais aprofundada. Todos os tipos de células vivas podem produzir VEs, podendo ser encontradas em vários fluidos biológicos, como sangue, líquido sinovial, urina e saliva (MATHIEU *et al.*, 2019).

As VEs podem ser liberadas em condições fisiológicas e patológicas. Diferentes estudos têm demonstrado o importante papel das VEs em várias doenças, como Alzheimer e câncer, e na fisiopatologia de variados microrganismos patogênicos. Além disso, têm despertado interesse como promissores biomarcadores para diagnóstico e como potenciais alvos terapêuticos. Estratégias terapêuticas direcionadas às VEs visam impedir a liberação de seus conteúdos ou a sua captação por células vizinhas, abrindo perspectivas na busca por tratamentos eficazes (CHENG; HILL, 2022).

VEs também têm sido descritas como essenciais durante o processo de infecção viral. Ao infectar células hospedeiras, os vírus podem injetar seus próprios componentes via VEs. Uma vez liberadas, as VEs transportam seu conteúdo, podendo afetar tanto células mais próximas como células distantes. Assim, ácidos nucleicos virais, como RNAs não codificantes de proteínas expressas em VEs, podem enganar o sistema imunológico e até influenciar

células hospedeiras não infectadas, permitindo que os vírus consigam sua permanência (PUHM; FLAMAND; BOILARD, 2022). Recentemente, foram identificados produtos de genes virais que podem promover o silenciamento epigenético de determinados genomas, aumentando seu potencial como alvo em infecções latentes (MCNAMARA; DITTMER, 2020). Similarmente, herpes vírus também podem utilizar VEs como mediadores de sua patogênese e facilitador da comunicação célula-célula (GRABOWSKA *et al.*, 2020).

Estudos da década de 1970 sugeriram a existência de VEs em diferentes modelos fúngicos. Em 1972, foi analisada a ultraestrutura de protoplastos de *Aspergillus nidulans*, descrita como uma “*região de plasmalema de protoplastos exibindo expulsão*”, que leva a produção de partículas membranosas externas. Outro exemplo de evidência microscópica da existência de VEs foi relatado por Takeo *et al.*, 1973 (TAKEO *et al.*, 1973), demonstrando “*invaginações esféricas que secretam as vesículas da membrana celular*” em *C. neoformans*. Foi somente em 1977 que o termo “*vesículas extracelulares*” foi utilizado pela primeira vez na literatura fúngica, descrevendo a análise de estruturas lipídicas extracelulares produzidas por *Candida tropicalis* (CHIGALEĬCHIK *et al.*, 1977).

A primeira descrição de VEs fúngicas foi em 2007 com a identificação de VEs produzidas por *Cryptococcus neoformans*, demonstrando sua importância na exportação de carboidratos através da parede celular fúngica (RODRIGUES *et al.*, 2007). Em seguida, diversos estudos continuaram a investigar a produção de VEs fúngicas, como *C. gattii* (BIELSKA *et al.*, 2018), *Histoplasma capsulatum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008), *C. albicans* (VARGAS *et al.*, 2015), *C. parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis* (IKEDA *et al.*, 2018), *Paracoccidioides brasiliensis* (VALLEJO *et al.*, 2012), *P. lutzii* (PERES DA SILVA *et al.*, 2019), *Malassezia sympodialis* (GEHRMANN *et al.*, 2011), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* (LEONE *et al.*, 2018) e *Exophiala dermatitidis* (LAVRIN *et al.*, 2020).

Nosso grupo de pesquisa vem investindo a importância de VEs para a patogênese e resposta imune contra infecções fúngicas (ALMEIDA *et al.*, 2017; ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; BITENCOURT *et al.*, 2018; MARTINS-SANTANA *et al.*, 2023). Demonstramos que o aumento na expressão da lectina galectina-3 (Gal-3) durante a infecção fúngica por *C. neoformans*, desencadeia a lise de VEs produzidas por *C. neoformans*. Este processo desempenha papel

crítico na interferência com a resposta imune do hospedeiro, o que abre perspectivas para terapias direcionadas ao combate de infecções fúngicas (ALMEIDA *et al.*, 2017). Em *C. albicans*, verificamos que a indução do estresse oxidativo pode levar a liberação de importantes moléculas lipídicas influenciando a relação patógeno hospedeiro. A análise destas VEs por espectrometria de massas identificou metabólitos secundários relacionadas à diversos processos biológicos, como o glicerofosfolípideo e vias de esfingolípídios, que podem atuar em diferentes níveis, favorecendo uma miríade de respostas adaptativas (TRENTIN *et al.*, 2023).

Os mecanismos fundamentais pelos quais os fungos patogênicos exportam moléculas por VEs são complexos, já que possuem a capacidade de carregar fatores de virulência e interagir com o ambiente extracelular, desempenhando papel crucial na patogenicidade e resposta imunológica do hospedeiro. Embora algumas informações sobre VEs já tenham sido identificadas e apresentem desafios (**Figura 2**), pouco se sabe sobre a regulação diferencial na formação de VEs fúngicas (RIZZO; RODRIGUES; JANBON, 2020).

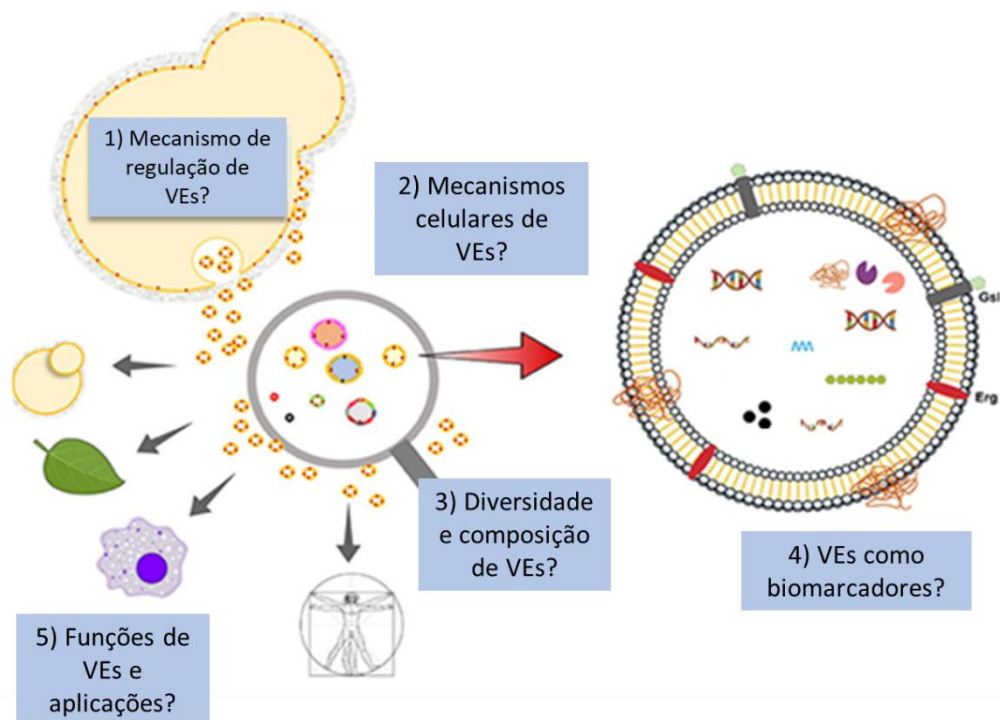


Figura 2: Desafios na análise de vesículas extracelulares (VEs) fúngicas. Em fungos, a presença de uma parede celular espessa foi considerada como uma barreira física para

a liberação de substâncias, mas evidências recentes mostraram que a parede celular apresenta uma estrutura viscoelástica e diferentes hipóteses foram propostas para explorar como ela é compatível com o trânsito de membranas lipídicas (**Figura 2 – 1,2**). A diversidade de morfologia, tamanho e conteúdo de VEs dificultam uma análise padrão para os diversos microrganismos. Além disso, os protocolos atuais utilizados para purificar VEs não evitam a contaminação com agregados potencialmente contendo proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, limitando assim o conhecimento sobre a estrutura e carga das VEs (**Figura 2 – 3**). Apesar da sua composição complexa, incluindo ácidos nucleicos, glicanos, pigmentos, proteínas, RNA, e diferentes lipídios, marcadores específicos de EVs fúngicos não foram identificados até o momento (**Figura 2 – 4**). Por fim, pouco se sabe sobre o papel dos VEs fúngicas na comunicação célula-célula entre diferentes hospedeiros e fungos, mas também entre células fúngicas. A diversidade de VEs poderia estar associada a uma diversidade de funções e respostas das células receptoras na presença de diferentes tipos de vesículas. Esta compreensão pode trazer aplicabilidade na medicina, incluindo ferramentas de imunomodulação, veículos de distribuição de medicamentos e potenciais alvos de vacina (**Figura 2 – 5**). Adaptado de RIZZO; RODRIGUES; JANBON, 2020.

Neste contexto, estudos envolvendo o papel das VEs produzidas por *Paracoccidioides* está sendo estudado por nosso grupo de pesquisa em colaboração com a Profa. Dra. Celia Maria de Almeida Soares da Universidade Federal de Goiás (UFG). Em 2014, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Celia Maria de Almeida Soares demonstrou a capacidade de *Paracoccidioides* spp. utilizar a hemoglobina como fonte de Fe, indicando a possível captação por meio de vias mediadas por receptores relacionados a mecanismos patogênicos (BAILÃO *et al.*, 2014). No entanto, para uma compreensão mais aprofundada da interação de *Paracoccidioides* spp com o hospedeiro durante a infecção, foram realizadas análises funcionais mais específicas de genes envolvidos na aquisição de Fe pelo fungo, conforme supracitado. Sabe-se que o funcionamento eficaz da imunidade inata, principalmente mediada por macrófagos e neutrófilos, desempenha um papel crucial na eliminação das leveduras de *Paracoccidioides*, impedindo a progressão da doença. Essas células possuem mecanismos para identificar o fungo e seus produtos, fagocitando e eliminando seus microorganismos.

Embora a interação entre VEs e células do sistema imune tenha sido descrito para vários fungos, como *C. neoformans*, *C. albicans* e *H. capsulatum* (JOFFE *et al.*, 2016), *P. brasiliensis* (DA SILVA *et al.*, 2016) e *Trycophyton Interdigitale* (BITENCOURT *et al.*, 2018), o envolvimento das EVs fúngicas e a privação de Fe, o conteúdo e as funções das VEs fúngicas ainda não foram completamente elucidadas. Dada a relevância da infecção causada por *P.*

brasiliensis, a presente dissertação investigou a influência das VEs de *P. brasiliensis* nos mecanismos de aquisição de Fe, bem como sua contribuição para a patofisiologia fúngica. Portanto, a avaliação e entendimento dos mecanismos envolvidos pelas VEs produzidas por *Paracoccidioides* durante a privação de Fe tem o potencial de gerar novas estratégias de tratamento não apenas para a PCM mas também para outras infecções fúngicas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar e avaliar o papel das vesículas extracelulares produzidas por *P. brasiliensis* em mecanismos fisiopatológicos associados à captação de Fe.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o papel das vesículas extracelulares produzidas por *P. brasiliensis* durante a privação de Fe;
- Avaliar, *in vitro*, a produção de mediadores inflamatórios e atividade celular de macrófagos estimulados com mutantes de *Paracoccidioides* para o gene HapX;
- Comparar a sobrevivência de camundongos C57Bl/6 e larvas de *Galleria mellonella* infectados pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX.

METODOLOGIA

3.1 LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) foi cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion), suplementado com 4% de glicose a 36° C durante 4 a 7 dias, para obtenção da forma leveduriforme. Em seguida, as células de levedura foram coletadas por centrifugação a 7000g, 25°C por 8 minutos e lavado duas vezes com PBS estéril pH 7.2 para os próximos estudos.

3.2 MODELO ANIMAL

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 tipo selvagem, machos, entre 6 e 8 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com os princípios propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O projeto está aprovado pelo comitê de ética da FMRP-USP, com número de protocolo 100/215.

3.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS VEs

Foi utilizado leveduras do mutante para o gene HapX de *Paracoccidioides brasiliensis*, gentilmente cedido pelo grupo da Profa. Dra. Celia Maria de Almeida Soares da Universidade Federal de Goiás. O mutante foi cultivado por 72 h, 37°C, com agitação contínua de 150 rpm em meio BHI (VALLEJO *et al.*, 2011). O isolamento das VEs foi realizado conforme adaptações à metodologia descrita para *C. neoformans* (DE LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018). A partir de uma cultura em meio BHI, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 5.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e novamente centrifugado a 15.000xg (4°C) para remoção de partículas menores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi concentrado através de ultrafiltração, utilizando o sistema Amicon (100 kDa). Em sequência, o concentrado foi centrifugado a 15.000xg (4°C) e o sobrenadante resultante foi filtrado (0,45µm), descartando-se os *pellets*. Posteriormente, a amostra foi ultracentrifugada a 60.000xg, durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido, foi lavado por cinco vezes consecutivas de água ultrapura (ThermoFisher©) e inibidor de protease – PIC (ThermoFisher©), a fim

de evitar degradação por proteases remanescentes ao meio. As amostras foram congeladas a -80°C .

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TAMANHO DAS VEs

Foi empregado o método descrito por Bitencourt et al., 2018 para *Trichophyton interdigitale* (BITENCOURT et al., 2018). Foi utilizado um analisador de nanopartículas *NanoSight NS300* (Malvern Instruments, Malvern, UK), equipado com *software* de captura rápida de vídeo e rastreamento de nanopartículas. As vesículas purificadas do mutante HapX de *P. brasiliensis* foram diluídas em 1mL de água ultrapura, desagregadas utilizando seringa e agulha (1-mL 29-gauge \times $\frac{1}{2}$), 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 partículas e, posteriormente, as medidas obtidas em triplicata foram analisadas pelo *software NanoSight* (versão 3.2.16). Os dados referentes ao tamanho das VEs produzidas pelo mutante HapX de *P. brasiliensis* foram expressos como as médias calculadas \pm DP (Desvio Padrão da média) da distribuição de tamanho.

3.5. PREPARO E CULTIVO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), conforme previamente descrito (BITENCOURT et al., 2018). Macrófagos derivados da medula óssea foram cultivados em meio DMEM (Thermo Fisher Scientific - Gibco™ Cell Culture) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen). As células foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 como previamente descrito (MARCIL et al., 2002).

3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS

A concentração de citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o Kit OptEIA™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. As citocinas dosadas foram: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-

10 e TGF- β . As concentrações de citocinas foram determinadas a partir de curvas padrão, utilizando citocinas recombinantes murinas. A absorbância foi lida a 450 nm no espectrofotômetro de microplacas (Power Wave-X; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

3.7 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de NO foi mensurada conforme descrito (GREEN *et al.*, 1982). Para análise, 50 μ L do sobrenadante celular foi incubado com o mesmo volume de reagente de Griess (1,0% sulfanilamida, 0,1% dicloridrato de naftaleno diamina, 2,5% H₃PO₄) por 10 min a temperatura ambiente. O conteúdo foi analisado por espectrômetro de varredura de microplacas (PowerWave-X; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) com onda a 550nm. A curva padrão foi gerada usando as concentrações conhecidas de NaNO₂ diluído em meio RPMI e os dados de absorbância foram convertidos em valores de concentração de NO.

3.8 ENSAIO DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA POR MACRÓFAGOS

O ensaio de atividade fagocítica foi realizado conforme previamente descrito (BITENCOURT *et al.*, 2018). Os BMDMs (bone marrow-derived macrophage) foram semeados a 2×10^5 células/poço em lamelas de vidro de 13 mm e colocadas em placas de 24 poços. O cultivo foi realizado a 37°C e 5% de CO₂ em DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram tratadas com VEs (10^7 partículas/mL) ou apenas o meio DMEM. Os macrófagos foram desafiados com 2×10^5 *P. brasiliensis* (macrófagos: *P. brasiliensis*= 1:1) nas placas de 24 poços por 4h a 37°C, e então as lamínulas de vidro foram lavadas com PBS e coradas com Giemsa. Foram contados em média 100 macrófagos para determinar a porcentagem de macrófagos e o índice fagocítico.

As células fagocíticas foram utilizadas para avaliar a morte de *P. brasiliensis* na proporção 1:1, com 5×10^5 cells. As microplacas de 24 poços foram centrifugadas por 10 min a 3.500 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas com PBS para remover quaisquer células fúngicas que não tivessem sido fagocitadas. Os BMDMs foram lisados com água fria e os lisados foram plaqueados em meio ágar dextrose de batata e incubados a 28 °C durante 72h. As amostras foram analisadas quanto à presença de células

fúngicas viáveis através da determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.9 ENSAIOS DE CARGA FÚNGICA E SOBREVIVÊNCIA DE *GALLERIA MELLONELLA*

Os ensaios de carga fúngica e de sobrevivência de *G. mellonella* foram realizados conforme descrito previamente (VARGAS *et al.*, 2015) com pequenas modificações. Resumidamente, foram selecionadas 10 larvas por grupo com peso semelhante (aproximadamente 275 a 330 mg) e sem marcas de coloração cinza. Em seguida, um volume de 50 µL contendo 10^7 VEs foi injetado na última pata esquerda, diretamente na hemocele. PBS foi usado como controle. As larvas foram mantidas a 37°C no escuro por 48h. Em seguida, foi preparado uma solução de esporos de *P. brasiliensis* Pb18 (1×10^4 esporos/ml) e inoculado um volume de 10 µL em todas as larvas selecionadas, totalizando 100 esporos/larvas, no mesmo local de injeção. A taxa de mortalidade das larvas (n = 6) foi monitorada diariamente durante 15 dias e as larvas que não apresentaram movimento após a estimulação de toque foram consideradas mortas. Dois dias após a infecção, as larvas (n = 6) foram homogeneizadas em PBS e a solução resultante foi plaqueada em PDA (potato dextrose agar) As placas foram incubadas a 37°C, por 48h, e as contagens de UFC foram determinadas.

3.10 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS

A infecção foi realizada através da inoculação intranasal com células leveduriformes da cepa selvagem *P. brasiliensis* Pb18 ou pelo mutante de *P. brasiliensis* HapX, cultivadas em meio BHI. Camundongos BALB/c (n = 10 para cada grupo) foram inoculados com 1×10^6 células de levedura, contidas em 20 µL de PBS. Os camundongos foram monitorados diariamente quanto à ocorrência de morte por 60 dias após a infecção.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Todas as análises estatísticas e comparações foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Para

as análises entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste t-Student. O teste log rank foi utilizado para comparar as taxas de sobrevida entre os grupos de estudo. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE VEs PELO MUTANTE DE *P. BRASILIENSIS*

Para verificar a produção de VEs pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX, o sobrenadante foi obtido a partir de cultura das leveduras em meio BHI e posteriormente purificado. Em seguida, por meio da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), foi determinado o tamanho e o perfil de distribuição das VEs dessa linhagem (**Figura 3**).

A população das VEs obtidas variou em tamanho de 25 a 310 nm, com tamanho médio de 140 nm. A moda do diâmetro da maioria das VEs obtidas foi de aproximadamente 100 nm. O tamanho e o perfil de distribuição estão ilustrados na **Figura 3A**, enquanto o tamanho e o perfil de distribuição são demonstrados na **Figura 3B** através de captura de tela do vídeo gravado pelo sistema *NanoSight NS300*. Importante destacar que foi obtido perfil semelhante ao encontrado pelo WT, previamente publicado pelo nosso grupo (DA SILVA *et al.*, 2016). Ambas as linhagens - WT e mutante - apresentam a moda do perfil de VEs com tamanho aproximado de 100 nm.

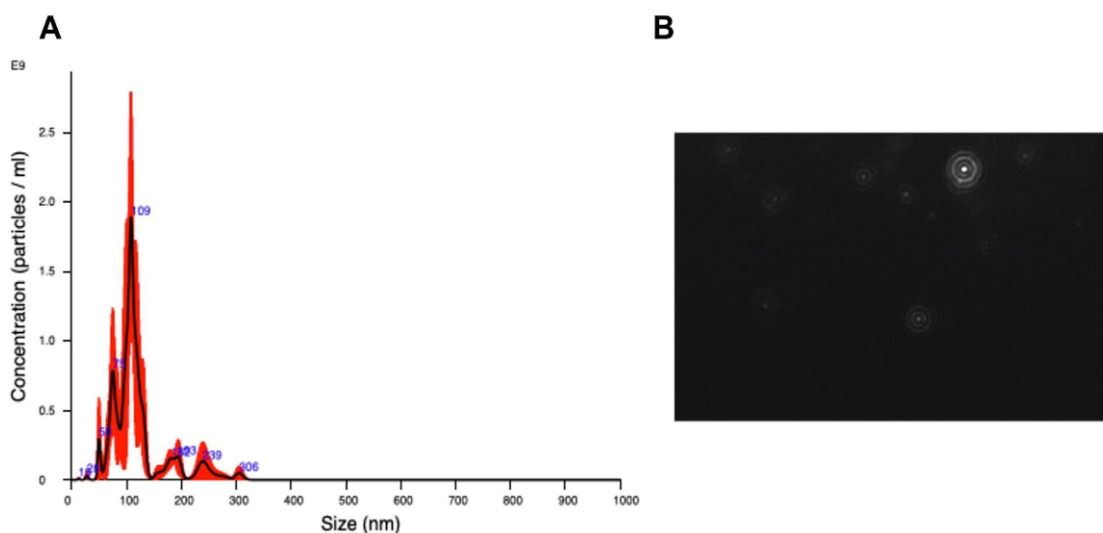


Figura 3: Análise de rastreamento de nanopartículas das vesículas extracelulares (VEs) produzidas por mutante de *Paracoccidioides brasiliensis* para o gene HapX. VEs foram purificadas do sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* e quantificadas por NanoSight NS300. (A) Histograma mostrando a distribuição (VEs x 10⁹/ml vs tamanho em nanômetros). (B) Captura de tela proveniente do vídeo gravado utilizando o equipando NS300, mostrando a distribuição das VEs produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX.

Em seguida, verificamos se VEs produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX poderiam induzir mediadores inflamatórios por BMDM. Conforme demonstrado na **Figura 4**, as VEs testadas estimularam a produção de TNF- α (2A), IL-6 (2B), IL-1 β (2C) e NO (2D) por BMDM. Por outro lado, não houve diferença significativa na produção de IL-10 (2E) e TGF- β (2F) por BMDM.

As VEs obtidas foram adicionadas em diferentes concentrações, variando de 10^4 a 10^7 VEs/ml e incubadas com BMDM por 48h e a determinação das citocinas foi determinada pelo uso do kit RD Sciences, de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados apresentados na **Figura 4** demonstram um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios após a exposição às VEs obtidas da linhagem mutante HapX. Estes resultados sugerem que as VEs produzidas pelo mutante HapX de *P. brasiliensis* estimulam um perfil de polarização M1 de macrófagos e, corroboram com os dados prévios publicados pelo nosso grupo, no qual observa-se um aumento expressivo da secreção de citocinas pro-inflamatórias, e polarização do perfil M1 dos macrófagos utilizados quando estimulados com VEs produzidas por *P. brasiliensis* (DA SILVA *et al.*, 2016).

Dessa forma, ao considerarmos os mecanismos de aquisição de Fe e a contribuição destes sistemas, podemos destacar papéis cruciais para a virulência fúngica. Além disso, é preciso levar em consideração o papel imunomodulador das VEs, que tem capacidade tanto de favorecer a adaptação e sobrevivência do fungo quanto de estimular sua eliminação pelas células hospedeiras. Acreditamos que existe uma correlação entre as funções que contribuem para o desenvolvimento do patógeno e o sucesso da infecção por *P. brasiliensis*.

4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA

Resultados preliminares do nosso grupo, demonstram que VEs produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX possuem efeito na capacidade fagocítica (**Figura 5A**) e capacidade de killing (**Figura 5B**) de BMDM.

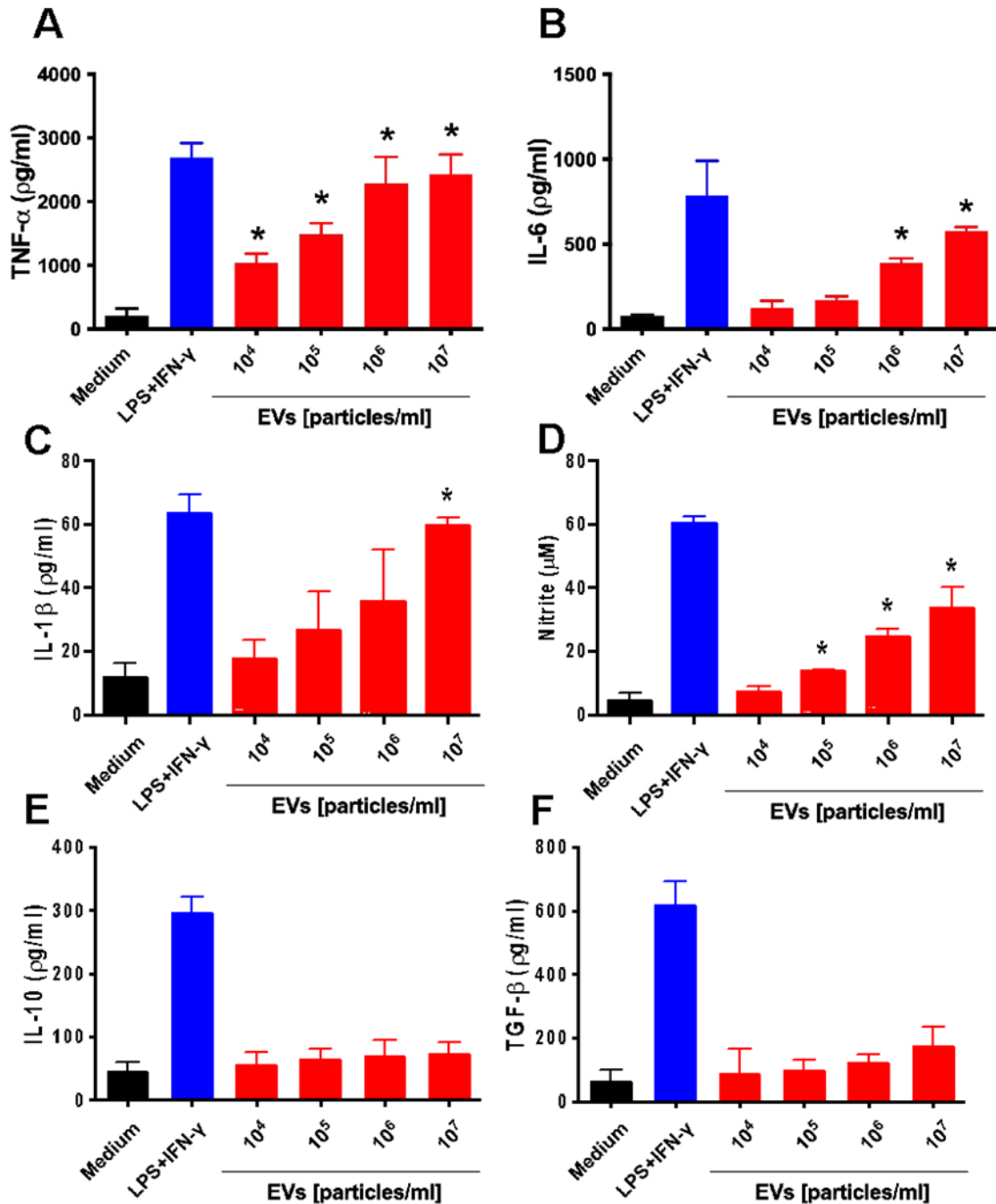


Figura 4. Vesículas extracelulares (VEs) produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX induz a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). BMDM ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) provenientes de camundongos C57BL/6 foram incubados a 37°C por 48h com as quantidades indicadas de VEs (eixo X). O meio e LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) mais IFN- γ ($2\text{ng}/\text{mL}$) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os sobrenadantes de cultura foram mensurados para TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), NO (D), IL-10 (E) e TGF- β (F). Os resultados foram comparados aos níveis das células não estimuladas (somente meio). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$ (*).

As VEs fúngicas podem afetar a forma como células fúngicas são internalizadas e eliminadas por células de defesa, como macrófagos.

Previamente, foi demonstrado pelo nosso grupo que células fagocíticas pré-tratadas tanto com VEs de *A. fumigatus*, quanto VEs de *P. brasiliensis* eram capazes de aumentar a eliminação de conídios desta espécie (DA SILVA *et al.*, 2016). Semelhantemente, quando analisado por outros grupos de pesquisa, a exposição com VEs de *C. albicans* potencializaram a atividade fungicida de macrófagos e VEs produzidas pelas espécies de *C. auris* e *C. albicans* induziram a ativação de células dendríticas (ZAMITH-MIRANDA *et al.*, 2021). Além disso, o pré-tratamento com VEs produzidos pela linhagem mutante de HapX de *P. brasiliensis* potencializa uma resposta fagocítica e maior killing contra leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 6).

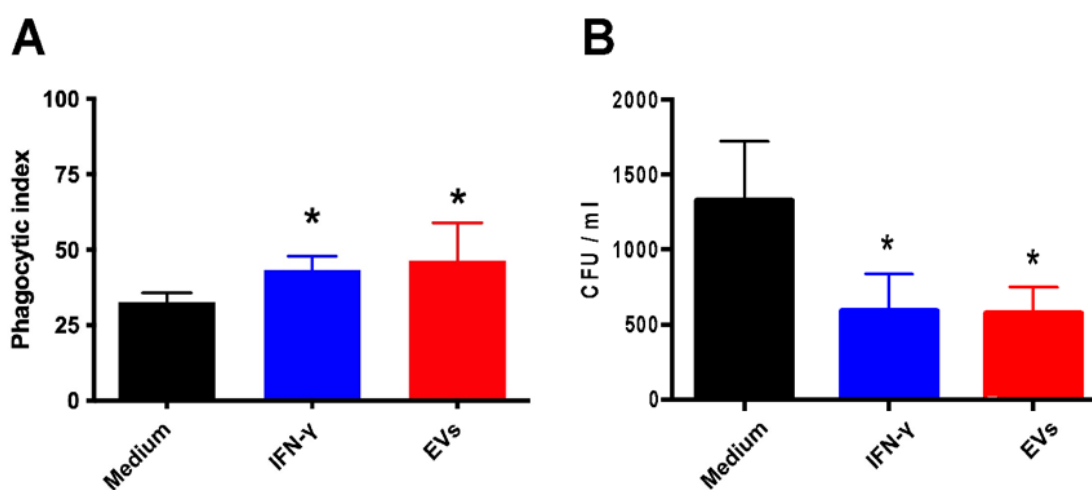


Figura 5. Vesículas extracelulares (VEs) produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX estimula atividade fungicida por macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). (A) BMDM foram plaqueados em lamínulas e cultivados com VEs (10^7 partículas/ml) por 30 min e tratados com leveduras de *P. brasiliensis* (macrófagos/levedura = 1:1) por 4 horas a 37 °C, e o índice fagocítico determinado. (B) BMDM previamente tratados com VEs (10^7 partículas/ml) por 30 min leveduras de *P. brasiliensis* (macrófagos/conídios = 1:1) por 48 horas a 37 °C. As células foram lisadas e o lisado foi plaqueado para detecção dos fungos viáveis por contagem de CFU. Os dados representam resultados de três experimentos independentes. Somente meio e meio contendo IFN-γ foram usados com controles negativo e positivo, respectivamente. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$ (*).

Um estudo demonstrou que a incubação de VEs produzidas por *C. neformans* com macrófagos da linhagem RAW 264.7 resultou em níveis aumentados de citocinas, tais como, TNF-α, IL-10 e TGF-β. Além disso, as preparações de vesículas resultaram em uma estimulação concentração-dependente para produção de óxido nítrico (NO) pelos fagócitos, sugerindo que os componentes da vesícula estimulam a produção de compostos antimicrobianos e que mesmo em tempo prolongado, 16 horas após a incubação,

não houve lise celular. Isso demonstrou que nas condições experimentais utilizadas neste estudo, os compostos vesiculares não causaram toxicidade aguda a essas células (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Dados sobre o efeito regulatório das VEs durante a incubação com macrófagos RAW 264.7 em *C. albicans* indicam que há indução da produção de NO de forma dose-dependente. Esses resultados sugeriram que a resposta não é idêntica à de células primárias ou culturas de macrófagos em comparação com as VEs de *C. albicans* (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em complemento, os estudos demonstram que VEs de *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus flavus* (BRAUER, *et al.*, 2020) foram capazes de aumentar a atividade efetora de macrófagos em diferentes modelos experimentais.

4.3 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA INFECÇÃO PELO MUTANTE HAPX DE *P. BRASILIENSIS*

Uma vez que VEs produzidas pelo mutante HapX de *P. brasiliensis* podem afetar a resposta imune do hospedeiro *in vitro*, resolvemos analisar a infecção em modelo *in vivo* de larvas de *G. mellonella*. Previamente ao desafio, as larvas foram tratadas com 10^7 VEs produzidas pelo mutante HapX de *P. brasiliensis* ou com solução PBS como controle. Após 48 horas, leveduras de *P. brasiliensis* Pb18 foram inoculadas nas larvas. Como mostrado na figura 4A e 4B, a estimulação de VEs resultou em níveis de CFU diminuídos e maior sobrevivência das larvas, respectivamente. Esses resultados sugerem que as VEs produzidas pelo mutante HapX podem preparar o sistema imunológico inato do hospedeiro para eliminar a infecção fúngica.

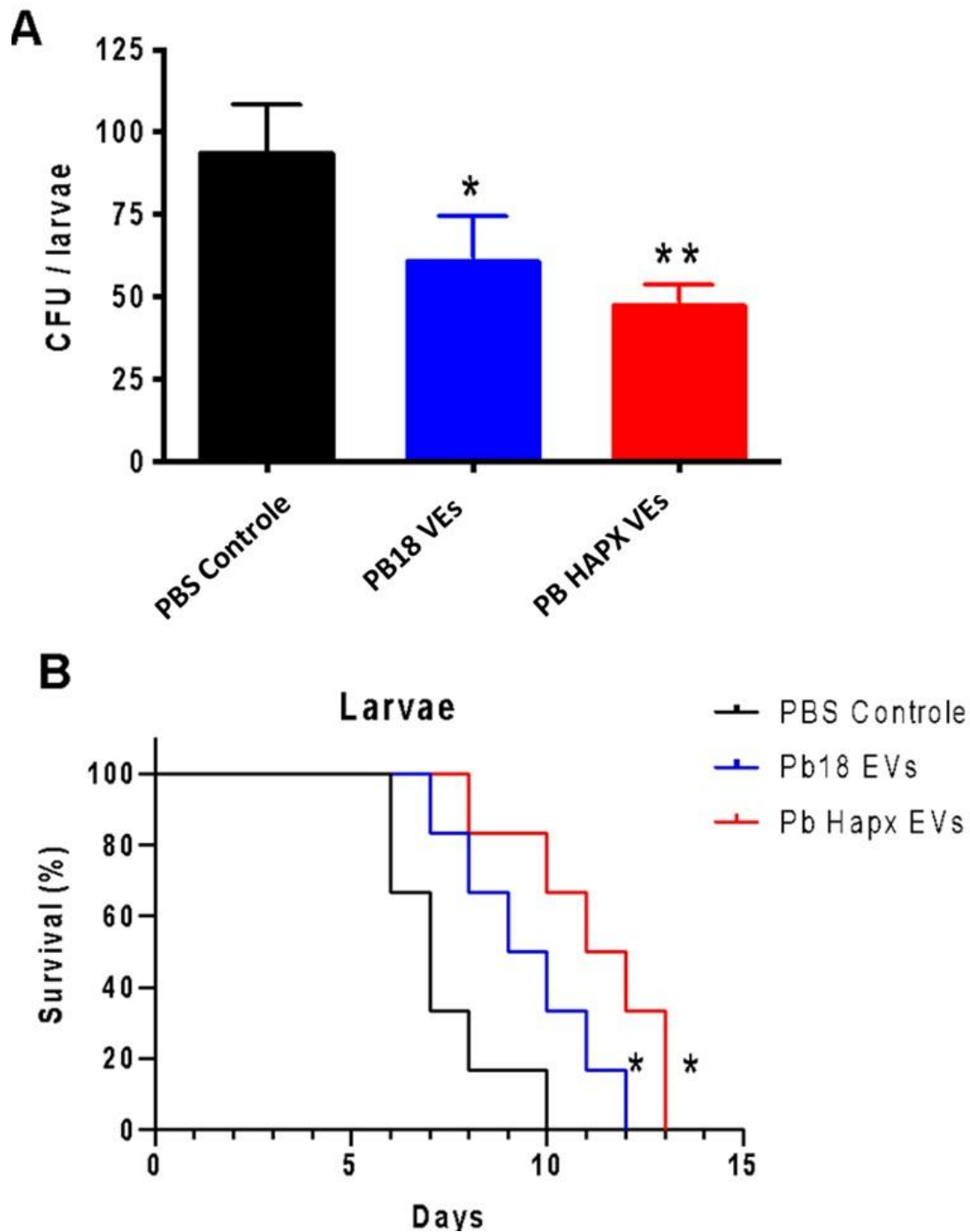


Figura 6: Vesículas extracelulares (VEs) produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX induz efeito protetivo no modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*. (A) As larvas de *G. mellonella* (n = 6 larvas por grupo) foram estimuladas com VEs de *P. brasiliensis* Pb18, ou com o mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX ou com PBS como controle por 48 horas após a infecção por células leveduriformes de *P. brasiliensis*. As larvas foram homogeneizadas e os níveis de carga de CFU determinados após 48 horas após a infecção. (B) A curva de sobrevivência (n = 6 larvas por grupo) foi realizada durante 13 dias pós infecção. Os dados representam os resultados de dois experimentos independentes. Os testes de One-way ANOVA e de comparação múltipla de Bonferroni foram usados para analisar a carga fúngica e o teste de Mantel-Cox foi utilizado para as análises da curva de sobrevivência. *. $P < 0.05$.

Por último, considerando que VEs produzidas pelo mutante HapX de *P. brasiliensis* podem afetar a resposta imune do hospedeiro *in vitro*, bem como afetar a infecção em modelo *in vivo* de larvas de *G. mellonella*, resolvemos investigar o papel de HapX no curso da infecção por paracoccidiodomicose experimental em camundongos. Assim, comparamos a sobrevivência de camundongos BALB/c à infecção por mutante de *Paracoccidiodoides* para o gene HapX (**Figura 7**). Nossos resultados não apresentaram diferenças significativas na curva de sobrevivência quando comparado a infecção de camundongos BALB/c pela cepa selvagem de *P. brasiliensis* Pb18 com o mutante de *Paracoccidiodoides* para o gene HapX.

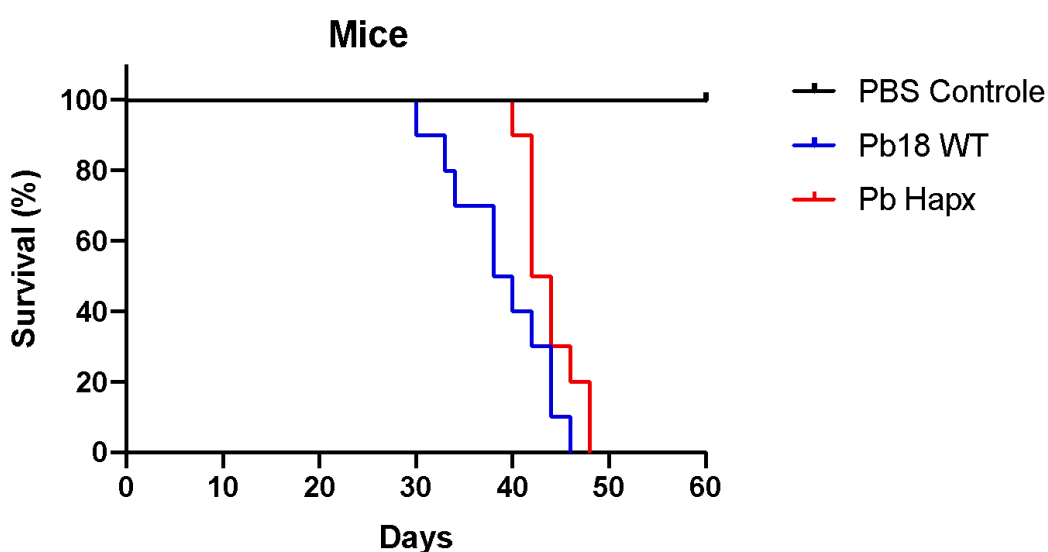


Figura 7. Curva de sobrevivência de camundongos machos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* Pb18 ou pelo mutante de *P. brasiliensis* HapX (Pb HapX) (1×10^7 células leveduriformes por animal). Os animais foram monitorados diariamente para ocorrência de morte durante um período de 60 dias após a infecção. Os dados representam os resultados de dois experimentos independentes.

Os mecanismos envolvidos na relação entre VEs e o sistema imunológico ainda não estão claros. As VEs transportam um enorme conteúdo de biomoléculas, incluindo moléculas que interagem com os receptores de reconhecimento padrão expressos em células do sistema imunológico (por exemplo, receptores da família das lectinas do tipo C), resultando na ativação de respostas inatas e/ou adaptativas e proteção de o hospedeiro contra a infecção (PATIN; THOMPSON; ORR, 2019; PERES DA SILVA *et al.*, 2015). Assim, VEs podem atuar como moduladores chave da resposta imune para diferentes

infecções fúngicas, demonstrando assim o potencial dessas estruturas como possíveis alvos para intervenções imunes (FREITAS *et al.*, 2019).

O fenótipo M1 produzido por macrófagos desempenha um papel crucial na eliminação de fungos. Tanto o desenvolvimento de um perfil M1 quanto a inibição do fenótipo M2 são descritos como protetores contra infecções por *A. fumigatus*, *C. neoformans* e *H. capsulatum* (BROWN; BROWN, 2012; LEOPOLD WAGER; WORMLEY, 2014; MOREIRA *et al.*, 2010). Assim, nossos dados sugerem a hipótese de que a polarização M1 estimulada por VEs de *A. flavus* pode favorecer a eliminação fúngica. Aproveitando o modelo de *G. mellonella*, que imita funcionalmente o sistema imunológico inato de mamíferos e exibe funções importantes, como fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (PEREIRA *et al.*, 2018; TREVIJANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2018), demonstramos que VEs de *A. flavus* foram capazes de estimular respostas de *G. mellonella* à infecção por *A. flavus*. Este modelo já havia sido usado anteriormente para análise de patogenicidade de diferentes espécies de fungos, como *A. fumigatus* (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2015), *C. albicans* (SANTOS *et al.*, 2019) e *C. neoformans* (MYLONAKIS *et al.*, 2005), incluindo os efeitos de fungos VEs em *C. albicans* e *C. neoformans* (COLOMBO *et al.*, 2019; VARGAS *et al.*, 2015). Corroborando nossos resultados, a pré-estimulação de *G. mellonella* com VEs de *C. albicans* também resultou em diminuição dos níveis de CFU e aumento da sobrevivência das larvas (VARGAS *et al.*, 2015). Esses dados sugerem que a pré-estimulação de *G. mellonella* com VEs pode estimular o sistema imunológico e favorecer a eliminação do fungo. Por outro lado, a injeção intramuscular *in vivo* em camundongos BALB/c de VEs de *Sporothrix brasiliensis* seguida de infecção fúngica subcutânea resultou em maior carga fúngica e lesões cutâneas maiores do que as observadas em camundongos que não receberam VEs, sugerindo que VEs podem favorecer a estabelecimento da infecção por *S. brasiliensis* (IKEDA *et al.*, 2018). Apesar do uso de diferentes modelos experimentais, os dados corroboram coletivamente a visão de que as VEs produzidas por espécies fúngicas são bioativas, desempenhando funções imunomoduladoras e influenciando a patogênese da infecção.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

As VEs produzidas pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX induzem mediadores pró-inflamatórios, aumentam a capacidade fagocítica e a capacidade de killing por macrófagos derivados de medula. Ainda, estas VEs induzem efeito protetivo no modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella* contra a infecção por *P. brasiliensis*. Por outro lado, não houve diferença significativa na curva de sobrevivência de camundongos infectados pelo mutante de *P. brasiliensis* para o gene HapX quando comparado com os camundongos infectados pela cepa selvagem Pb18. Em conjunto, nossos resultados sugerem a existência de determinada correlação entre a privação de Fe e mecanismos de secreção via VEs para o sucesso da infecção por *P. brasiliensis*.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ALBUQUERQUE, Priscila Costa *et al.* Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1695–1710, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x>

ALCAZAR-FUOLI, L *et al.* An alternative host model of a mixed fungal infection by azole susceptible and resistant *Aspergillus* spp strains. **Virulence**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 376–384, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1025192>

ALMEIDA, Fausto *et al.* Galectin-3 impacts *Cryptococcus neoformans* infection through direct antifungal effects. **Nature communications**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1968, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02126-7>

ALMEIDA, Fausto; RODRIGUES, Marcio L.; COELHO, Carolina. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>

ALMEIDA, Fausto; WOLF, Julie M; CASADEVALL, Arturo. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00103-15>

BAILÃO, Elisa Flávia Luiz Cardoso *et al.* Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. e2856, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002856>

BATISTA, João *et al.* Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 176–180, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01687.x>

BENARD, G *et al.* Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 248–252, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0824>

BIELSKA, Ewa *et al.* Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1556, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03991-6>

BITENCOURT, Tamires Aparecida *et al.* Extracellular Vesicles From the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 9, p. 2343, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02343>

BONGOMIN, Felix *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof3040057>

BROWN, Sheena D; BROWN, Lou Ann S. Ethanol (EtOH)-induced TGF- β 1 and reactive oxygen species production are necessary for EtOH-induced alveolar macrophage dysfunction and induction of alternative activation. **Alcoholism, clinical and experimental research**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1952–1962, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01825.x>

CHENG, Lesley; HILL, Andrew F. Therapeutically harnessing extracellular vesicles. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 379–399, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00410-w>

CHIGALEIČHIK, A G *et al.* [Several properties of the extracellular vesicles of *Candida tropicalis* yeasts grown on n-alkanes]. **Mikrobiologija**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 467–471, 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/895555>

COLOMBO, Ana Caroline *et al.* *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan and Sterylglucoside Are Required for Host Protection in an Animal Vaccination Model. **mBio**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02909-18>

DA SILVA, Thiago Aparecido *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 35867, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep35867>

DE LEON-RODRIGUEZ, Carlos M *et al.* The Capsule of *Cryptococcus neoformans* Modulates Phagosomal pH through Its Acid-Base Properties. **mSphere**, [s. l.], v. 3, n. 5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00437-18>

FLAVIA POPI, Ana Flavia; LOPES, José Daniel; MARIANO, Mario. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular immunology**, [s. l.], v. 218, n. 1–2, p. 87–94, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0008-8749\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/s0008-8749(02)00576-2)

FREITAS, Mateus Silveira *et al.* Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune Interventions. **mSphere**, [s. l.], v. 4, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00747-19>

GANZ, Tomas; NEMETH, Elizabeta. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 500–510, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3863>

GEHRMANN, Ulf *et al.* Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and Host Exosomes Induce Cytokine Responses – Novel Mechanisms for Host-Microbe Interactions in Atopic Eczema. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. e21480, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021480>

GRABOWSKA, Kinga *et al.* Alphaherpesvirus gB Homologs Are Targeted to Extracellular Vesicles, but They Differentially Affect MHC Class II Molecules. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v12040429>

GREEN, L C *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x)

GSALLER, Fabio *et al.* The interplay between vacuolar and siderophore-mediated iron storage in *Aspergillus fumigatus*. **Metallomics**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1262, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c2mt20179h>

GSALLER, Fabio *et al.* The Janus transcription factor HapX controls fungal

adaptation to both iron starvation and iron excess. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 33, n. 19, p. 2261–2276, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/embj.201489468>

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 219, n. 1, p. 1–14, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj2190001>

HASCHKA, David; HOFFMANN, Alexander; WEISS, Günter. Iron in immune cell function and host defense. **Seminars in cell & developmental biology**, [s. l.], v. 115, p. 27–36, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.12.005>

HORTSCHANSKY, Peter *et al.* Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 26, n. 13, p. 3157–3168, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601752>

HSU, Po-Chen; YANG, Cheng-Yao; LAN, Chung-Yu. Candida albicans Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 207–225, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00158-10>

IKEDA, Marcelo Augusto Kazuo *et al.* Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02286>

JOFFE, Luna S *et al.* Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. **mSphere**, [s. l.], v. 1, n. 4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00099-16>

JUNG, Won Hee *et al.* HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. e1001209, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001209>

JUNG, Won Hee; SÁNCHEZ-LEÓN, Eddy; KRONSTAD, James W. Coordinated regulation of iron metabolism in *Cryptococcus neoformans* by GATA and CCAAT transcription factors: connections with virulence. **Current genetics**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 583–593, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00294-021-01172-5>

KARHAWI, A S; COLOMBO, A L; SALOMÃO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Medical mycology**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 225–229, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/mmy.38.3.225.229>

LAVRIN, Teja *et al.* The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 963, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9040963>

LEONE, Federica *et al.* Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 4, p. 2759–2767, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.25885>

LEOPOLD WAGER, C M; WORMLEY, F L. Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. **Mucosal immunology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1023–1035, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mi.2014.65>

MAMONI, Ronei Luciano; BLOTTA, Maria Heloisa Souza Lima. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 20–29, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.07.006>

MARCIL, A. *et al.* *Candida albicans* Killing by RAW 264.7 Mouse Macrophage Cells: Effects of *Candida* Genotype, Infection Ratios, and Gamma Interferon Treatment. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 6319–6329, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6319-6329.2002>

MARQUES MELLO, Luane; SILVA-VERGARA, Mario Leon; RODRIGUES, Virmondos. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis*

present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. **Human immunology**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 149–154, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(01\)00375-5](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(01)00375-5)

MARTINS-SANTANA, Leonardo *et al.* Addressing Microbial Resistance Worldwide: Challenges over Controlling Life-Threatening Fungal Infections. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens12020293>

MATHIEU, Mathilde *et al.* Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 9–17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>

MCNAMARA, Ryan P; DITTMER, Dirk P. Extracellular vesicles in virus infection and pathogenesis. **Current opinion in virology**, [s. l.], v. 44, p. 129–138, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.07.014>

MOREIRA, Ana Paula *et al.* Serum amyloid P attenuates M2 macrophage activation and protects against fungal spore-induced allergic airway disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 712-721.e7, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.010>

MYLONAKIS, Eleftherios *et al.* Galleria mellonella as a model system to study Cryptococcus neoformans pathogenesis. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 3842–3850, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005>

OLIVEIRA, Débora L *et al.* Extracellular vesicles from Cryptococcus neoformans modulate macrophage functions. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 1601–1609, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01171-09>

PATIN, Emmanuel C; THOMPSON, Aiysha; ORR, Selinda J. Pattern recognition receptors in fungal immunity. **Seminars in cell & developmental biology**, [s. l.], v. 89, p. 24–33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.003>

PEREIRA, Thais Cristine *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4040128>

PERES DA SILVA, Roberta *et al.* Comparison of the RNA Content of Extracellular Vesicles Derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 765, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8070765>

PERES DA SILVA, Roberta *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. **Scientific reports**, [s. l.], v. 5, p. 14213, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep14213>

PETZER, Verena *et al.* Enhanced labile plasma iron in hematopoietic stem cell transplanted patients promotes *Aspergillus* outgrowth. **Blood advances**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1695–1700, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000043>

PUHM, Florian; FLAMAND, Louis; BOILARD, Eric. Platelet extracellular vesicles in COVID-19: Potential markers and makers. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 63–74, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR0221-100R>

QUEIROZ-TELLES, Flá Vio de *et al.* New Insights on Pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 53–68, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400544>

RIEDELBERGER, Michael *et al.* Type I Interferon Response Dysregulates Host Iron Homeostasis and Enhances *Candida glabrata* Infection. **Cell host & microbe**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 454-466.e8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.023>

RIZZO, Juliana; RODRIGUES, Marcio L.; JANBON, Guilhem. Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. **Frontiers in Cellular**

and Infection Microbiology, [s. l.], v. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00346>

RODRIGUES, Marcio L. *et al.* Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 48–59, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00318-06>

SANTOS, Rafaella Braga *et al.* *Lactobacillus* species increase the survival of *Galleria mellonella* infected with *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* clinical isolates. **Medical mycology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 391–394, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myy032>

SCHRETTL, Markus; HAAS, Hubertus. Iron homeostasis--Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 400–405, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.06.002>

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 715–740, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>

TAKEO, K. *et al.* Fine Structure of *Cryptococcus neoformans* Grown In Vitro as Observed by Freeze-Etching. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 1442–1448, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.113.3.1442-1448.1973>

TEIXEIRA, Marcus de Melo *et al.* Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 140, p. 103395, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103395>

THEODORO, Raquel Cordeiro *et al.* Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e37694, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037694>

TRAVASSOS, Luiz R; TABORDA, Carlos P; COLOMBO, Arnaldo L. Treatment

options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert review of anti-infective therapy**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 251–262, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14787210.6.2.251>

TRENTIN, Gabriel *et al.* Mass Spectrometry Analysis Reveals Lipids Induced by Oxidative Stress in *Candida albicans* Extracellular Vesicles. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071669>

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria; ZARAGOZA, Oscar. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof5010003>

VALLEJO, Milene C *et al.* The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 343–351, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00227-10>

VALLEJO, Milene C. *et al.* Vesicle and Vesicle-Free Extracellular Proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparative Analysis with Other Pathogenic Fungi. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1676–1685, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr200872s>

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

VARGAS, Gabriele *et al.* Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 389–407, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12374>

XU, Rong *et al.* Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 617–638, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0036-9>

ZAMITH-MIRANDA, D. et al. Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. **mSystems**, [s.l.] v. 15, n. 10, p. e0082221, 2021. Disponível em: [10.1128/mSystems.00822-21](https://doi.org/10.1128/mSystems.00822-21)

ANEXO I

Artigo publicado

Mass spectrometry analysis reveals lipids induced by oxidative stress in *Candida albicans* Extracellular Vesicles

Gabriel Trentin, Tamires A. Bittencourt, Arthur Guedes, André M. Pessoni, Veronica S. Brauer, Alana Kelyene Pereira, Jonas Henrique Costa, Taicia Pacheco e Fausto Almeida.



Article

Mass Spectrometry Analysis Reveals Lipids Induced by Oxidative Stress in *Candida albicans* Extracellular Vesicles

Gabriel Trentin ¹, Tamires A. Bitencourt ¹, Arthur Guedes ¹, André M. Pessoni ¹, Veronica S. Brauer ¹, Alana Kelyene Pereira ², Jonas Henrique Costa ², Taicia Pacheco Fill ^{2,*} and Fausto Almeida ^{1,*}

¹ Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil

² Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas 13083-970, Brazil

* Correspondence: taicia@unicamp.br (T.P.F.); fbralmeida@usp.br (F.A.)

Abstract: *Candida albicans* is a commensal fungus in healthy humans that causes infection in immunocompromised individuals through the secretion of several virulence factors. The successful establishment of infection is owing to elaborate strategies to cope with defensive molecules secreted by the host, including responses toward oxidative stress. Extracellular vesicle (EV) release is considered an alternative to the biomolecule secretory mechanism that favors fungal interactions with the host cells. During candidiasis establishment, the host environment becomes oxidative, and it impacts EV release and cargo. To simulate the host oxidative environment, we added menadione (an oxidative stress inducer) to the culture medium, and we explored *C. albicans* EV metabolites by metabolomics analysis. This study characterized lipidic molecules transported to an extracellular milieu by *C. albicans* after menadione exposure. Through Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (LC-MS) analyses, we identified biomolecules transported by EVs and supernatant. The identified molecules are related to several biological processes, such as glycerophospholipid and sphingolipid pathways, which may act at different levels by tuning compound production in accordance with cell requirements that favor a myriad of adaptive responses. Taken together, our results provide new insights into the role of EVs in fungal biology and host–pathogen interactions.

Keywords: *Candida albicans*; extracellular vesicles; virulence factor; metabolomics; biomolecules



Citation: Trentin, G.; Bitencourt, T.A.; Guedes, A.; Pessoni, A.M.; Brauer, V.S.; Pereira, A.K.; Costa, J.H.; Fill, T.P.; Almeida, F. Mass Spectrometry Analysis Reveals Lipids Induced by Oxidative Stress in *Candida albicans* Extracellular Vesicles. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1669. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071669>

Academic Editor: Ana Claudia Torrecilhas

Received: 27 April 2023

Revised: 2 June 2023

Accepted: 6 June 2023

Published: 27 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fungal infections are responsible for over 1.6 million deaths per year [1,2]. *Candida* spp. are the main etiologic agents of systemic fungal infections, with *C. albicans* being the most prevalent species [3]. *C. albicans* is a commensal and dimorphic fungus that may cause infection in immunocompromised individuals [4,5].

C. albicans infection is characterized by morphogenetic transitions, in which saprophytic fungal cells convert themselves to parasitic hyphae [4,6]. This transition process, associated with the employment of several virulence factors, allows the establishment of *C. albicans* in the host and the development of candidiasis. As an immune defense response to invasion, phagocytes attack several reactive chemicals in an attempt to kill invading microorganisms [7,8]. The production of Reactive Oxygen Species (ROS) by phagocytes results in oxidative stress, stimulating a respiratory burst [8,9]. In host–pathogen interactions and as an adaptive response, *C. albicans* employs biomolecules and metabolic pathways to attenuate oxidative damage [10,11].

Biomolecule secretory mechanisms are associated with virulence events that lead to the breakdown of physical barriers, host cell adhesion, and immune defense evasion. Taken together, these events allow for the establishment of an infection [2,6,12,13]. Identification of these virulence-associated molecules is a key to understanding pathogenic processes and establishing strategies to design new drugs [2,6].

Extracellular vesicles (EVs) are spherical bilayered compartments secreted by all live cells [12,14]. EV production was reported in several fungal species, such as *Aspergillus flavus* [15], *Aspergillus fumigatus* [16], *C. albicans* [12], *Candida parapsilosis* [12], *Cryptococcus gattii* [17], *Histoplasma capsulatum* [12], *Malassezia sympodialis* [18], *Sporothrix brasiliensis* [19], *Sporothrix schenckii* [12], *Saccharomyces cerevisiae* [20], *Paracoccidioides brasiliensis* [21], *Trichophyton interdigitale* [22], and several other fungi. EVs are composed of proteins, polysaccharides, lipids, RNA, and pigments, and these structures may be associated with pathogenesis during fungal infection [6,12,13,23–25]. The *C. albicans* EVs play an essential role during candidiasis establishment, and the virulence-associated molecules have been identified [6,12,24,26]. These systematic characterizations allow for a better understanding of fungal physiopathology [15]. However, the molecules induced by oxidative stress have not yet been characterized.

During oxidative stress, the ROS overproduction triggers damage to several cellular components and process [9]. Specifically, lipids are susceptible to lipids peroxidation by ROS attack, leading to structural modifications, which affects membrane integrity [27,28]. Since the EVs may be plasma-membrane-derived, and lipids play a crucial role in EV biogenesis [29,30], any plasma membrane injury may alter EV production. EV cargo and production reflects the cell state [31]. The oxidative stress response alters the fungal cells' metabolism [9] and may also affect the EVs' release and content [32]. The impact of oxidative stress over *Candida albicans* extracellular vesicles is still poorly understood. This study reports the presence of metabolites in *C. albicans* EVs after menadione exposure. We characterized the metabolites using Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (LC-MS) analyses. The identified molecules may be a component of EVs' membrane and associated with oxidative stress response.

2. Materials and Methods

2.1. Growth Conditions

C. albicans strain ATCC 64548 was used in all experiments performed in this study. Yeast cells were cultivated in Sabouraud solid medium (Oxoid, Basingstoke, UK) for 72 h at 30 °C, as previously described [6].

2.2. Susceptibility Test

The susceptibility of *C. albicans* strain ATCC 64548 towards menadione was evaluated by the determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), as described by the Clinical Laboratory Standard Institute [33]. Menadione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was tested in the range of 2500 µM to 4.8 µM. The microtiter plates were incubated for 48 h at 30 °C. Then, MIC₁₀₀ was determined as the lowest concentration that inhibited the growth of *C. albicans*. The assay was performed in three biological replicates. Then, we determined the minimal fungicidal concentration (MFC) by inoculating the MIC₁₀₀ concentration and two higher concentrations on Sabouraud plates at 30 °C for 48 h.

2.3. Extracellular Vesicle Isolation, Characterization, and Quantification

EVs were isolated as previously described [34] with slight modifications. We compared the two conditions (control and oxidative stress conditions). Under the oxidative stress condition, we added 46.8 µM of menadione to 20 mL Sabouraud solid medium. Sabouraud medium alone was used as the control. Ten isolated colonies were inoculated in 10 mL Sabouraud dextrose liquid medium (Oxoid, Basingstoke, UK) and cultivated under agitation (200 rpm) at 30 °C for 48 h. The fungal cells were counted and calculated to a final concentration of 3.5×10^6 cells/mL, and they were spread onto Sabouraud solid medium and incubated for 24 h at 30 °C [34]. Yeast cells were harvested from solid medium and transferred to a centrifuge tube containing 30 mL of sterile phosphate-buffered saline. Fungal cells were separated from the supernatant using centrifugation at $5000 \times g$ for 15 min. The supernatant was harvested and centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min. The resulting supernatant was concentrated using an Amicon ultrafiltration system (100 kDa

cutoff). The liquid (EV-free) from the ultrafiltration system was collected and stored at 4 °C. The concentrate was then centrifuged again at $15,000 \times g$ for 15 min. The EV suspension was ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min. The pellet (only EVs) was resuspended in 1 mL sterile nuclease-free water (Sigma Aldrich). All steps were conducted at 4 °C. Characterization and quantification of EV preparation was performed using nanoparticle tracking analysis (NTA) in NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, UK), as previously described [22]. The experiments were performed in triplicate.

2.4. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS) Analyses

The metabolites in the EV and supernatant samples were extracted with methanol in an ultrasonic bath for 40 min and further dried under inert conditions, as previously described [35]. The dried extracts were diluted in 100 µL methanol, filtered, and loaded in a mass spectrometer. UHPLC-MS/MS analyses were performed using a Thermo Scientific QExactive[®] hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer. The chromatographic conditions were as follows: as the stationary phase, we used a Thermo Scientific Accucore C18 2.6 µm (2.1 mm × 100 mm) column. Mobile phases were 0.1% (v/v) formic acid in water (A) and acetonitrile (B). Eluent profile (A:B) 0–10 min, gradient from 95:5 up to 2:98; held for 5 min; 15–16.2 min gradient up to 95:5; held for 8.8 min. The flow rate was 0.2 mL min⁻¹ with an injection volume of 3 µL. For the Mass Spectrometry analysis, we used electrospray ionization in positive mode, the capillary voltage at +3.5 kV; the capillary temperature at 250 °C; S-lens of 50 V and *m/z* range of 133.40–2000.00. MS/MS was performed using normalized collision energy (NCE) of 30 eV, and 5 precursors per cycle were selected. Stationary phase: operation and spectra analysis were conducted using Xcalibur software (version 3.0.63) developed by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.5. Molecular Networking and Metabolomic Analyses

The metadata and data from Xcalibur software were converted to .mzML using the MSConvert software (<http://proteowizard.sourceforge.net> (accessed on 1 October 2020)). A molecular network for *C. albicans* (EVs and supernatant metabolites) was created using the online workflow (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/networking/> (accessed on 1 October 2020)) on the Global Natural Products Social (GNPS) molecular networking website platform (<http://gnps.ucsd.edu>) using the Classical Molecular Networking (CMN) tool. For CMN, the data were filtered by removing all MS/MS fragment ions within ±17 Da of precursor *m/z*. MS/MS spectra were window-filtered by choosing only the top six fragment ions in the ±50 Da window throughout the spectrum. The precursor ion mass tolerance was set to 0.02 Da and an MS/MS fragment ion tolerance of 0.02 Da. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.5 and more than five matched peaks. Furthermore, the edges between two nodes were retained in the network, if and only if each of the nodes appeared in each of the top 10 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 100, and the lowest scoring edges were removed from the molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against the GNPS spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as for the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.5 and at least 5 matched peaks [36]. The resulting molecular network is available at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=92af3c25e2d147c5af0e619b52bb0667> (accessed on 1 October 2020). Other studies using Network Annotation Propagation (NAP) and MolNetEnhancer tools were carried out on the GNPS platform. The nodes (compounds) originating from Sabouraud media and solvent analyses (methanol) were excluded from the original network to enable visualization of metabolites derived from control and oxidative stress conditions [37]. Finally, the final spectral network (.cys) was uploaded to Cytoscape 3.8 to obtain better visualization and editing. To improve the data visualization, GNPS Dashboard was used in ‘feature finding’ process using MZMine 2. The parameters used were precursor tolerance: 10 ppm; noise

level: 10×10^4 ; minimum and maximum peak width: 0.05–1.5 min; and retention time tolerance: 0.3 min. The quantification table data were submitted to MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/> (accessed on 1 October 2020) to enhance univariate and multivariate statistical analyses. Semiquantitative evaluations were performed based on Feature-Based Molecular Networking (FBMN), according to the GNPS workflow (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/feature-based/molecular/networking/> (accessed on 1 October 2020).

3. Results

3.1. *C. albicans* Extracellular Vesicle Profile

During the infection process, host cells use high levels of oxidative chemical compounds to counteract fungal invasion. To mimic the oxidative stress environment in the host milieu, we added menadione to Sabouraud medium (an oxidative stress condition) and compared the EV metabolite content in this condition with the EV metabolite content in Sabouraud medium (control). We inoculated the MIC₁₀₀ (156 μ M) in Sabouraud plates and observed insignificant growth. We needed an expressive growth to isolate EVs, and for that reason, we used MIC₃₀ (46.8 μ M).

We isolated and concentrated EVs from *C. albicans* yeast cells under control (with no treatment) and oxidative stress conditions from *C. albicans* yeast cells. NTA analysis for control revealed EV heterogeneous size ranging from 70 to 400 nm (Figure 1A), with an average size of 136.4 nm (\pm 58.5 nm) and mode diameter of approximately 100.3 nm. The EVs under oxidative stress showed a different range size (36 to 294 nm), with an average of 160.6 nm (\pm 51.6 nm) and a mode diameter of approximately 158.7 (Figure 1B). A screenshot of *C. albicans* EVs was obtained from a video recording generated using the Nanosight NS300 system (Figure 1C).

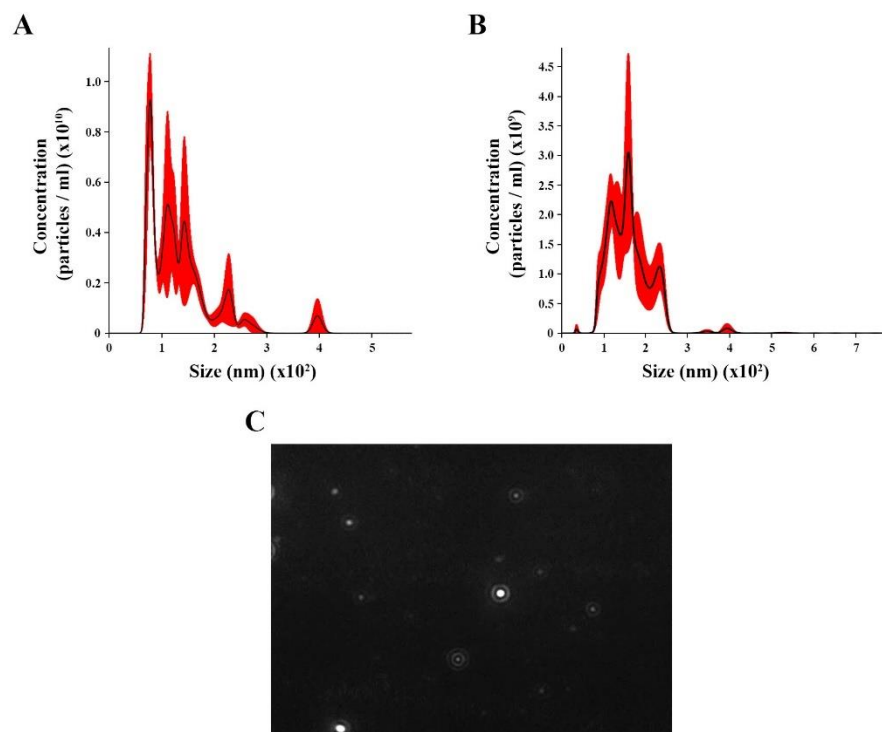


Figure 1. Nanoparticle tracking analysis (NTA) of extracellular vesicles (EVs) released by *Candida albicans*: EVs were isolated from *C. albicans* solid media analyzed through NTA. (A) The histogram showing *C. albicans* EV profile distribution (EVs $\times 10^{10}$ /mL versus size distribution (nm)) in control. (B) The histogram showing *Candida albicans* EV profiles distribution (EVs $\times 10^{11}$ /mL versus size distribution (nm)) in stress oxidative condition. (C) Screenshot obtained from a video recording generated in Nanosight NS300 showing EVs from *C. albicans*.

3.2. Statistical and Molecular Networking Analyses in *C. albicans* EVs

Principal Component Analysis (PCA) of the comparison between metabolites produced under oxidative stress (EVs and supernatant) and control conditions (EVs, supernatant, and culture media) was performed to evaluate the grouping tendencies. According to the PCA, the samples did not form a distinct cluster. Both principal components (PC1 and PC2) were responsible for 33.7% of the total data variance and did not show a clear separation between the main groups of control and samples under oxidative stress. For this reason, Partial Least Square (discriminant analysis) (PLS-DA) (Figure 2) was performed. The PLS-DA principal components were responsible for 31.11% of the total data variance (16.8% for PC1 and 14.3% for PC2) and exhibited a clear separation between the conditions evaluated. Discriminant analyses revealed validated parameters ($p < 0.01$, $R^2 = 0.99$, and $Q^2 = 0.71$). The culture media control was performed to remove Sabouraud medium interferences and show the particular behavior of culture control clusters. To analyze the chemical composition (EVs and supernatant) under control and stress conditions, a classic molecular network based on MS data was generated using the GNPS platform [37]. In both conditions, Molecular Networking consisted of 2940 nodes, in which each node indicated an MS spectrum. Some chemical families detected included sphingolipids and glycerophospholipids, which were annotated by the spectral library. Other chemical superclasses were also annotated, e.g., fatty acyls, steroids, benzene, and derivatives.

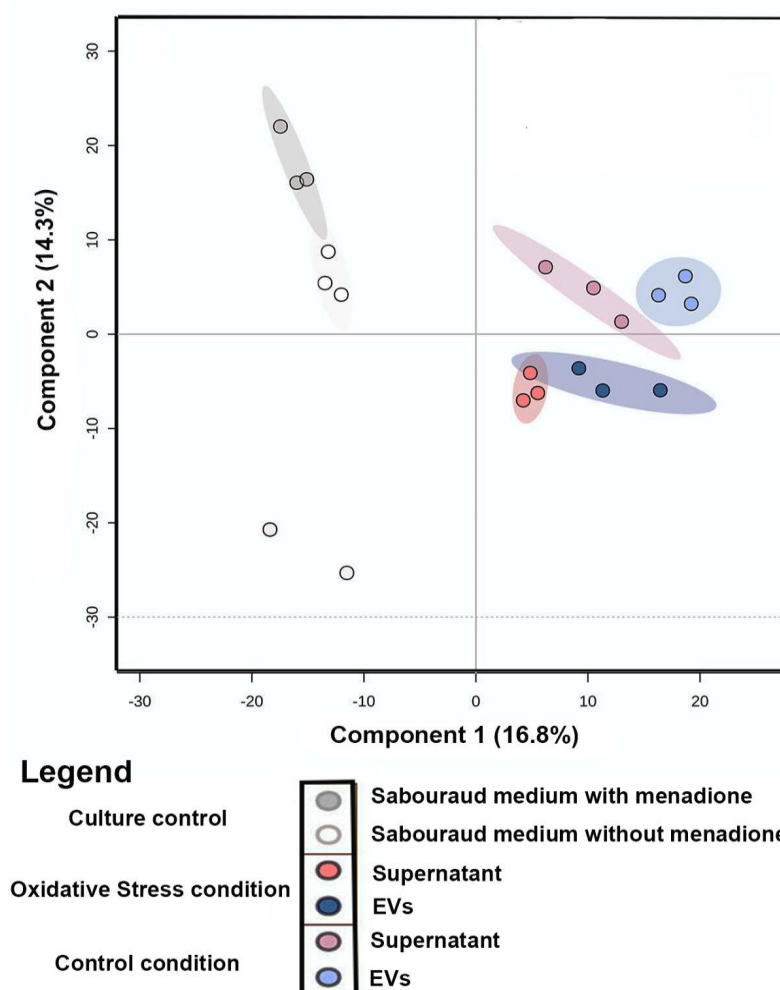


Figure 2. Statistical Analysis of LC–MS/MS data of the *C. albicans* EVs in oxidative stress and control conditions: Partial Least Square (Discriminant Analysis) (PLS-DA) of samples (EVs and supernatant) from control/oxidative stress and culture medium control.

3.3. Metabolites Annotation

During *C. albicans* infection, the fungus copes with defensive mechanisms triggered by host cells, such as oxidative stress caused by phagocytes [9]. From the menadione MIC₁₀₀ determination, we set the MIC₃₀ concentration to be used for EV isolation to 46.8 μM of menadione. During the isolation process, we hypothesized the occurrence of canonical (transporter) and noncanonical (via EVs) metabolite secretions. For this reason, filtered EVs were collected to investigate the possible presence of metabolites. To rule out any interference from Sabouraud medium, the ions present in the control were subtracted during LC-MS/MS analysis.

As we isolated *C. albicans* EVs under both conditions, we aimed to identify whether metabolite content could be differentially produced by oxidative stress stimuli. Therefore, metabolites were extracted from these EVs under both conditions and compared. EV isolation yielded approximately 10¹⁰ EVs/mL (control) and 10¹¹ EVs/mL (oxidative stress conditions). The different yields obtained among the analyzed conditions were expected because of the reduced yeast growth upon menadione exposure. We predefined MIC₃₀ concentration of menadione exposure as a concentration to promote stress and, in the meanwhile, to allow yeast growth enough for EV extraction for downstream application. The purified EVs were further extracted, and their chemical composition was analyzed by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Figure S1). The data obtained were submitted to the GNPS platform for metabolite annotation. Metabolite fragmentation profiles were compared and annotated as hits in the GNPS database (Supplementary material). Six metabolites were annotated in the network (Figure 3). The nodes represent each chemical and the lines the similarity between them.

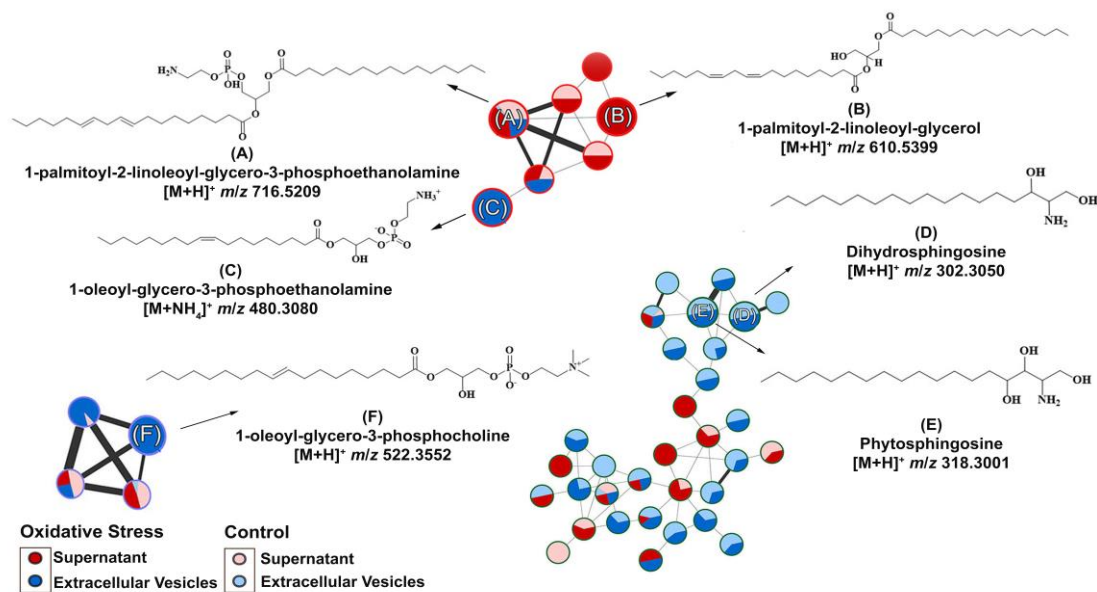


Figure 3. Molecular network and chemical structure obtained for *Candida albicans* supernatant/extracellular vesicles through LC-MS/MS analysis: A GNPS molecular network of six metabolites were identified. The GNPS grouped the metabolites according to their structural functions, percentage in supernatant or EVs, and their similarity. The glycerophospholipid compounds were grouped in clusters (A–C,F), whereas the sphingolipids were grouped in clusters (D,E).

Compounds A–F (Table 1) were divided according to their metabolic functions: glycerophospholipid metabolic pathways and sphingolipid biosynthesis. Compounds (A) (Figure 3A) and (B) (Figure 3B) were identified in the supernatants of EV isolation. Regarding compounds related to glycerophospholipid metabolism identified in the supernatant, we detected the precursor ion $[M + H]^+ m/z 716.5220$, annotated as 1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerol-3-phosphoethanolamine (A), present in control and oxidative stress conditions,

which yielded the main fragments at m/z 575.5100, characteristic of phosphoethanolamine moiety loss, and m/z 95.0860, both matching the spectral library on GNPS (Figure S2) [38]. Compound 1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerol (**B**) was induced under oxidative stress conditions and annotated with the precursor ion $[M + NH_4]^+$ at m/z 610.5400. Most of the main fragments of compound (**B**) matched the fragmentation patterns found in the GNPS database (Figure S3). The product ions at m/z 313.27 and 337.27 correspond to the loss of palmitic and linoleic acid [39], respectively.

Table 1. *C. albicans* metabolites identified and their metabolic pathways.

ID	Compounds	Ion Formula	Experimental m/z	Retention Time (min)	Supernatant or EVs	Control or Stress Oxidative Condition	Related Pathways
A	1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine	$C_{39}H_{74}NO_8P$	716.5209	9.89	Supernatant and EVs	Control and stress oxidative condition	Glycerophospholipid metabolism
B	1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerol	$C_{37}H_{68}O_5$	610.5399	15.94	Supernatant	Stress oxidative condition	Glycerophospholipid metabolism
C	1-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine	$C_{23}H_{46}NO_7P$	480.3080	9.41	EVs	Stress oxidative condition	Glycerophospholipid metabolism
D	Dihydrosphingosine	$C_{18}H_{39}NO_2$	302.3050	7.94	EVs	Control and stress oxidative condition	Sphingolipids metabolism
E	Phytosphingosine	$C_{18}H_{39}NO_3$	318.3001	7.74	EVs	Control and stress oxidative condition	Sphingolipids metabolism
F	1-oleoyl-glycero-3-phosphocholine	$C_{26}H_{52}NO_7P$	522.3552	9.74	EVs	Stress oxidative condition	Glycerophospholipid metabolism

In EVs under oxidative stress conditions, compound (**C**) was induced, and the precursor ion $[M + H]^+$ at m/z 480.3080 was annotated with high similarity to the spectral library (Figure S4) of the metabolite 1-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine (Figure 3C). The ion at m/z 339.2910 is a major fragment that corresponds to dehydrated oleoyl (18:1) glycerol, which was predicted by the HMDB database and previously described [40].

In both conditions, compounds (**D**) (Figure 3D) and (**E**) (Figure 3E) were identified in EVs. Compound dihydrosphingosine (**D**) with a precursor ion at m/z $[M + H]^+$ 302.3050. (**D**) shows the ions at m/z 254.2850, 95.0860, 81.0710, and 60.0450 as the main fragments [41]. The loss of the moiety $[H_2NCHCH_2OH]^+$ is known for compound (**D**) as the ion at m/z 60.0450 and the base peak according to the HMDB spectral and GNPS database (Figure S5). In addition, the ion $[M + H]^+$ at m/z 318.3000 was annotated in the GNPS database (Figure S6) as phytosphingosine (**E**), and the MS/MS experiment yielded major fragments at m/z 282.2780 and 60.0450, which corresponded to di-dehydration and to the fragment $[H_2NCHCH_2OH]^+$, as expected for compound (**E**) and experimentally found in the HMDB database [42].

The metabolite 1-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (**F**) (Figure 3F) was also induced in EVs during oxidative stress and was annotated with the precursor ion $[M + H]^+$ at m/z 522.350. MS/MS indicated the main fragments at m/z 86.10, 184.0730, and 104.1080, corresponding to choline fragmentation, phosphocholine, and choline ions, respectively [43]. These fragments were related to the amino-phosphate moiety loss and the cleavage between the oxygen–phosphorus bond, respectively, as can be seen in the spectral library in GNPS (Figure S7) and predicted in the HMDB spectral database. Spectral matches are available in the Supplementary Materials.

4. Discussion

Previously, we described the role of EVs during yeast-to-hypha transition and fungal cell communication in *C. albicans* strain (ATCC 64548) [44]. Zang et al. measured ROS production in the same strain [45]. Herein, we demonstrated that EVs from *C. albicans* present different metabolite contents, according to environmental changes. The oxidative stress condition was designed to simulate one of the events that occurs during the establishment of *C. albicans* infection. These changes were triggered by menadione addition to mimic the overproduction of ROS caused by a phagocytic milieu [46]. Menadione (or

vitamin K₃) is a quinone class compound [47,48]. This compound has been used as a model to study damage related to oxidative stress [47,48]. Menadione induced by the semiquinone redox process stimulates ROS production [47,48]. High levels of ROS alter cellular redox homeostasis [49]. Moreover, oxygen forms are highly harmful to cellular integrity, affecting cell growth and physiological functions [46,50]. The yields of EVs were greater for *Candida albicans* cells exposed to menadione (10¹¹ EVs/mL) than control condition (10¹⁰ EVs/mL). We attribute this behavior to yeast cell response to oxidative stress. The stress response may regulate the vesicle traffic [51]. In this respect, we compared the EV metabolite content under oxidative conditions with the EV metabolite content in the control condition (a nonstress stimuli condition). We also collected the supernatant and evaluated the possible presence of metabolites regardless of the EV loading molecules. EV content is regulated by oxidative stress.

We suggest the possible metabolites release via canonical (transporter), noncanonical (EVs), or both pathways in *C. albicans*. The presence of metabolites in supernatant and in the EVs supports our hypothesis of canonical/noncanonical transport (Figure 4). The traffic of fungal biomolecules is coordinated in response to environmental changes [52,53]. In addition, communication mediated by *C. albicans* EVs has been reported, demonstrating the vital role of EVs in environmental stress.

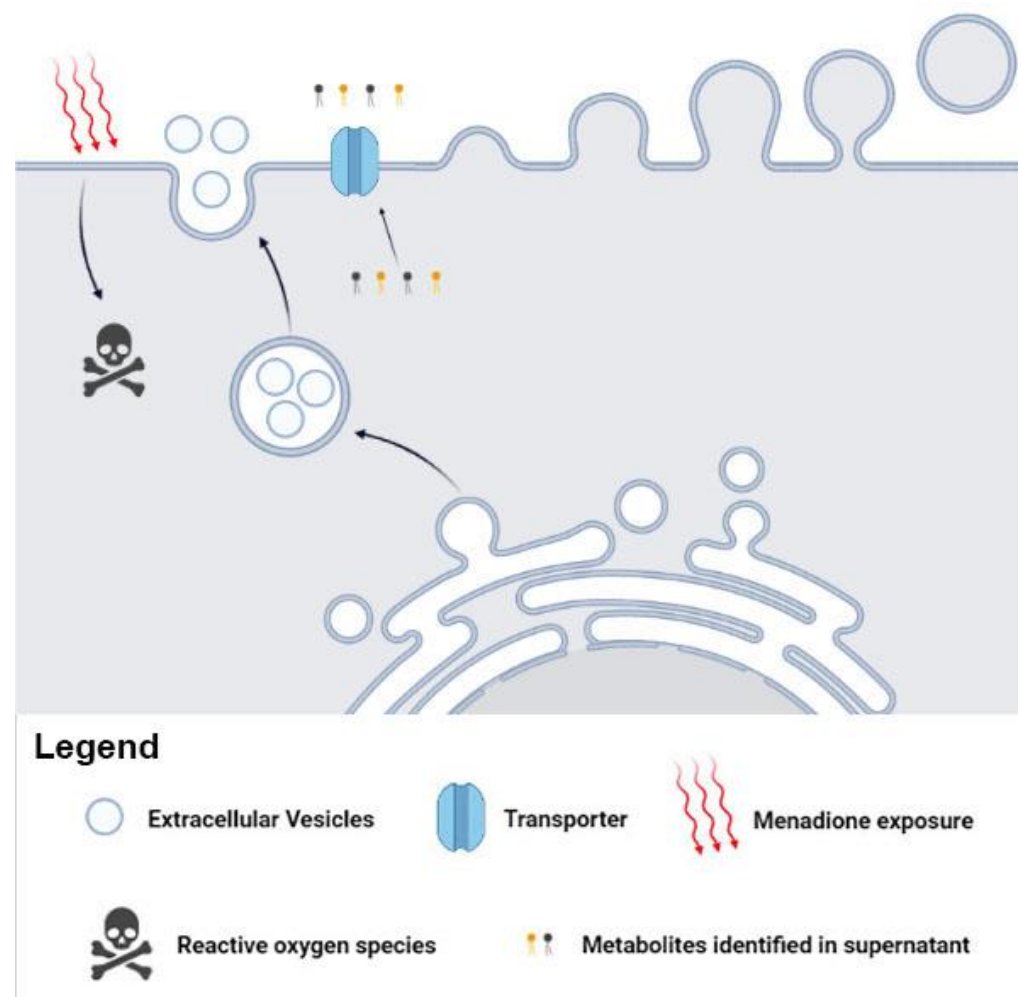


Figure 4. Metabolites can influence fungal mechanisms and alter the infection process. The *Candida albicans* EVs are involved in fungal pathogenesis and transport specific metabolites after menadione exposure. These metabolites may influence biological processes and affect several fungal adaptive responses.

The presence of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine in the supernatant and EVs under both conditions suggests that the release of these molecules is independent of cell redox homeostasis. On the other hand, the high amount of ROS leads to lipid peroxidation by a free radical chain reaction and may cause plasma membrane injury, affecting its physical propriety and dynamism [9,32]. Some membrane polyunsaturated fatty acids are the most susceptible to ROS attack [32]. Biomolecules react to ROS exposure, and previous studies have reported the release of metabolites by fungi during oxidative stress [54–56]. Furthermore, some fungal species try to avoid ROS attack through glycerophospholipid hydrolysis [57], which may justify the presence of compounds 1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerol, 1-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine, and 1-oleoyl-glycero-3-phosphocholine in the supernatant and EVs from the menadione culture. These glycerophospholipids are likely to be involved in oxidative stress pathways. Under oxidative conditions, glycerophospholipids undergo structural modifications that affect the membrane integrity [58]. In addition, our data corroborate the occurrence of metabolite transport in other ways, as previously shown in *A. fumigatus* [59].

In yeasts, sphingolipid biosynthesis initiates with an enzymatic conjugation of serine and fatty acyl-CoA, yielding 3-ketodihydrosphingosine [60]. The next step produces dihydrosphingosine (or sphinganine) dihydrosphingosine, which may be converted to phytosphingosine through hydroxylation at carbon 4 [61]. The same mass fragment pattern obtained in our data was previously described for dihydrosphingosine and phytosphingosine in analyses of pathogenic strains of *Candida albicans* and *Cryptococcus* spp. [62,63]. Previous studies also evaluated the metabolome of *C. albicans* under different growth conditions or exposed to antifungals and identified similar classes of metabolites, such as glycerophospholipid metabolism and sphingolipid metabolism [62,64,65].

The compounds 1-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine (Lyso-PE [18:1]) 1-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine and 1-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (Lyso-PC [18:1]) may also be related to glycerophospholipid pathways [66]. These compounds are classified as lysophosphatidylethanolamines (LysoPE) and lysophosphatidylcholines (LysoPC), respectively, and the same mass fragment pattern obtained in our data was previously described for 1-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolamine and 1-oleoyl-glycero-3-phosphocholine [43]. Intermediates of these pathways are the building blocks for most subcellular membranes [67]. A recent study identified LysoPE and LysoPC compounds in the pathogenic fungal *Histoplasma capsulatum* [68]. In addition, the characterization of glycerophospholipids and phospholipids in EV content has been described for the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, *C. albicans*, and *Candida auris* [69,70]. The induction of these metabolites during oxidative stress in EVs may reflect an imbalance in glycerophospholipid and phospholipid homeostasis caused by high ROS levels [71,72]. Furthermore, some lysophospholipids are directly linked to leukocyte activity and may act as virulence factors during infection [69,73,74]. A previous study reported that the integrity of fungal EVs is crucial for transmitting virulence [17]. To ensure cell-to-cell information delivery, EVs may be internalized by the acceptor cell; however, these mechanisms are not completely characterized [44,75]. The exclusive presence of LysoPC and LysoPE compounds in *C. albicans* EVs reflected the response to oxidative stress caused by menadione, and *C. albicans* cells may take up these EVs, transmitting the oxidative stress information. Accurate lipidomic analysis should be conducted in an attempt to attribute the exact locale of the identified metabolites (EVs membrane or cargo). The identified molecules have their particular pathways' biosynthesis and may not participate in central metabolism, which is involved in energy generation.

The EVs can assist in environmental sensing, showing alterations in their sorting of molecules in accordance with cellular requirements [14], which was reinforced by our data, highlighting the occurrence of specific metabolites after menadione exposure. Unveiling the metabolites content within *C. albicans* EVs may be useful to generate more information about the mechanisms underlying EV communication that may favor the fungal infection process.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11071669/s1>, Figure S1. Schematic representation of molecular network creation from tandem mass spectra data. Figure S2. GNPS data and extracted ion chromatograms for compound (A). Figure S3. GNPS data and extracted ion chromatograms for compound (B). Figure S4. GNPS data and extracted ion chromatograms of compound (C). Figure S5. GNPS data and extracted ion chromatograms of compound (D). Figure S6. GNPS data and extracted ion chromatograms for compound (E). Figure S7. GNPS data and extracted ion chromatograms for compound (F).

Author Contributions: Conceptualization and methodology, G.T., T.A.B., A.M.P., V.S.B. and F.A.; data analysis, J.H.C., A.K.P. and T.P.F.; figure design: G.T., A.M.P., A.G., A.K.P. and T.P.F.; writing—original draft preparation, G.T., T.A.B., A.G., J.H.C., A.K.P., T.P.F. and F.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from Brazilian agencies São Paulo Research Foundation—FAPESP (proc. no. 2016/03322-7, proc. no. 2021/06794-5, proc. no. 2021/00728-0, proc. no. 2022/02992-0), 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.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Metabolomics data were deposited in the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) database and are available at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=92af3c25e2d147c5af0e619b52bb0667> (accessed on 1 October 2022).

Acknowledgments: We thank Carlos Alberto Vieira for technical support. Figure 4 was constructed using [Biorender.com](https://biorender.com) (accessed on 8 March 2022).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N.A.; Levitz, S.M.; Netea, M.G.; White, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 165rv113. [[CrossRef](#)]
2. De Toledo Martins, S.; Szwarc, P.; Goldenberg, S.; Alves, L.R. Extracellular Vesicles in Fungi: Composition and Functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2019**, *422*, 45–59. [[CrossRef](#)]
3. Almeida, F.; Rodrigues, M.L.; Coelho, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 214. [[CrossRef](#)]
4. Poulain, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41*, 208–217. [[CrossRef](#)]
5. Schmiedel, Y.; Zimmerli, S. Common invasive fungal diseases: An overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. *Swiss Med. Wkly.* **2016**, *146*, w14281. [[CrossRef](#)]
6. Vargas, G.; Rocha, J.D.; Oliveira, D.L.; Albuquerque, P.C.; Frases, S.; Santos, S.S.; Nosanchuk, J.D.; Gomes, A.M.; Medeiros, L.C.; Miranda, K.; et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17*, 389–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Brown, G.D. Innate Antifungal Immunity: The Key Role of Phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 1–21. [[CrossRef](#)]
8. Komalpriya, C.; Kaloriti, D.; Tillmann, A.T.; Yin, Z.; Herrero-de-Dios, C.; Jacobsen, M.D.; Belmonte, R.C.; Cameron, G.; Haynes, K.; Grebogi, C.; et al. Integrative Model of Oxidative Stress Adaptation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Dantas, A.d.S.; Day, A.; Ikeh, M.; Kos, I.; Achan, B.; Quinn, J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* **2015**, *5*, 142–165. [[CrossRef](#)]
10. Brown, A.J.P.; Brown, G.D.; Netea, M.G.; Gow, N.A.R. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol.* **2014**, *22*, 614–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Williams Robert, B.; Lorenz Michael, C.; Andrew Alspaugh, J. Multiple Alternative Carbon Pathways Combine to Promote *Candida albicans* Stress Resistance, Immune Interactions, and Virulence. *mBio* **2020**, *11*, e03019–e03070. [[CrossRef](#)]
12. Albuquerque, P.C.; Nakayasu, E.S.; Rodrigues, M.L.; Frases, S.; Casadevall, A.; Zancoppe-Oliveira, R.M.; Almeida, I.C.; Nosanchuk, J.D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: An effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*, 1695–1710. [[CrossRef](#)]
13. Rodrigues, M.L.; Nimrichter, L.; Oliveira, D.L.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? *Lipid Insights* **2008**, *2*, 27–40. [[CrossRef](#)]

14. Cleare, L.G.; Zamith, D.; Heyman, H.M.; Couvillion, S.P.; Nimrichter, L.; Rodrigues, M.L.; Nakayasu, E.S.; Nosanchuk, J.D. Media Matters! Alterations in the loading and release of *Histoplasma capsulatum* extracellular vesicles in response to different nutritional milieus. *Cell. Microbiol.* **2020**, *22*, e13217. [[CrossRef](#)]
15. Brauer, V.S.; Pessoni, A.M.; Bitencourt, T.A.; de Paula, R.G.; de Oliveira Rocha, L.; Goldman, G.H.; Almeida, F. Extracellular Vesicles from *Aspergillus flavus* Induce M1 Polarization In Vitro. *mSphere* **2020**, *5*, e00190-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Souza, J.A.M.; Baltazar, L.d.M.; Carregal, V.M.; Gouveia-Eufrasio, L.; de Oliveira, A.G.; Dias, W.G.; Campos Rocha, M.; Rocha de Miranda, K.; Malavazi, I.; Santos, D.d.A.; et al. Characterization of *Aspergillus fumigatus* Extracellular Vesicles and Their Effects on Macrophages and Neutrophils Functions. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bielska, E.; Sisqueira, M.A.; Aldeieg, M.; Birch, C.; O'Donoghue, E.J.; May, R.C. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Vallhov, H.; Johansson, C.; Veerman, R.E.; Scheynius, A. Extracellular Vesicles Released from the Skin Commensal Yeast *Malassezia sympodialis* Activate Human Primary Keratinocytes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ikeda, M.A.K.; de Almeida, J.R.F.; Jannuzzi, G.P.; Cronemberger-Andrade, A.; Torrecilhas, A.C.T.; Moretti, N.S.; da Cunha, J.P.C.; de Almeida, S.R.; Ferreira, K.S. Extracellular Vesicles from *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2286. [[CrossRef](#)]
20. Oliveira, D.L.; Nakayasu, E.S.; Joffe, L.S.; Guimaraes, A.J.; Sobreira, T.J.; Nosanchuk, J.D.; Cordero, R.J.; Frases, S.; Casadevall, A.; Almeida, I.C.; et al. Characterization of yeast extracellular vesicles: Evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11113. [[CrossRef](#)]
21. Vallejo, M.C.; Matsuo, A.L.; Ganiko, L.; Medeiros, L.C.S.; Miranda, K.; Silva, L.S.; Freymüller-Haapalainen, E.; Sinigaglia-Coimbra, R.; Almeida, I.C.; Puccia, R. The Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* Exports Extracellular Vesicles Containing Highly Immunogenic α -Galactosyl Epitopes. *Eukaryot. Cell.* **2011**, *10*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bitencourt, T.A.; Rezende, C.P.; Quaresimin, N.R.; Moreno, P.; Hatanaka, O.; Rossi, A.; Martinez-Rossi, N.M.; Almeida, F. Extracellular Vesicles from the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2343. [[CrossRef](#)]
23. Freitas, M.S.; Bonato, V.L.D.; Pessoni, A.M.; Rodrigues, M.L.; Casadevall, A.; Almeida, F. Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune Interventions. *mSphere* **2019**, *4*, e00719–e00747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Peres da Silva, R.; Puccia, R.; Rodrigues, M.L.; Oliveira, D.L.; Joffe, L.S.; Cesar, G.V.; Nimrichter, L.; Goldenberg, S.; Alves, L.R. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rodrigues, M.L.; Nimrichter, L.; Oliveira, D.L.; Frases, S.; Miranda, K.; Zaragoza, O.; Alvarez, M.; Nakouzi, A.; Feldmesser, M.; Casadevall, A. Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. *Eukaryot. Cell.* **2007**, *6*, 48–59. [[CrossRef](#)]
26. Gil-Bona, A.; Llama-Palacios, A.; Parra, C.M.; Vivanco, F.; Nombela, C.; Monteoliva, L.; Gil, C. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 142–153. [[CrossRef](#)]
27. Yadav, D.K.; Kumar, S.; Choi, E.-H.; Chaudhary, S.; Kim, M.-H. Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4496. [[CrossRef](#)]
28. Juan, C.A.; Pérez de la Lastra, J.M.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4642. [[CrossRef](#)]
29. Zamith-Miranda, D.; Peres da Silva, R.; Couvillion, S.P.; Bredeweg, E.L.; Burnet, M.C.; Coelho, C.; Camacho, E.; Nimrichter, L.; Puccia, R.; Almeida, I.C.; et al. Omics Approaches for Understanding Biogenesis, Composition and Functions of Fungal Extracellular Vesicles. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 648524. [[CrossRef](#)]
30. Donoso-Quezada, J.; Ayala-Mar, S.; González-Valdez, J. The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications. *Traffic* **2021**, *22*, 204–220. [[CrossRef](#)]
31. Rayamajhi, S.; Sulthana, S.; Ferrel, C.; Shrestha, T.B.; Aryal, S. Extracellular vesicles production and proteomic cargo varies with incubation time and temperature. *Exp. Cell Res.* **2023**, *422*, 113454. [[CrossRef](#)]
32. Chiaradia, E.; Tancini, B.; Emiliani, C.; Delo, F.; Pellegrino, R.M.; Tognoloni, A.; Urbanelli, L.; Buratta, S. Extracellular Vesicles under Oxidative Stress Conditions: Biological Properties and Physiological Roles. *Cells* **2021**, *10*, 1763. [[CrossRef](#)]
33. CLSI M27-A3. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Approved Standard: Wayne, PA, USA, 2008.
34. Reis, F.C.G.; Borges, B.S.; Jozefowicz, L.J.; Sena, B.A.G.; Garcia, A.W.A.; Medeiros, L.C.; Martins, S.T.; Honorato, L.; Schrank, A.; Vainstein, M.H.; 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* **2019**, *4*, e00080-19. [[CrossRef](#)]
35. Costa, J.H.; Wassano, C.I.; Angolini, C.F.F.; Scherlach, K.; Hertweck, C.; Pacheco Fill, T. Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapono, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [[CrossRef](#)]
37. Oppong-Danquah, E.; Parrot, D.; Blümel, M.; Labes, A.; Tasdemir, D. Molecular Networking-Based Metabolome and Bioactivity Analyses of Marine-Adapted Fungi Co-cultivated With Phytopathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Takahashi, R.; Fujioka, S.; Oe, T.; Lee, S.H. Stable isotope labeling by fatty acids in cell culture (SILFAC) coupled with isotope pattern dependent mass spectrometry for global screening of lipid hydroperoxide-mediated protein modifications. *J. Proteom.* **2017**, *166*, 101–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Righetti, L.; Rubert, J.; Galaverna, G.; Folloni, S.; Ranieri, R.; Stranska-Zachariasova, M.; Hajslova, J.; Dall'Asta, C. Characterization and Discrimination of Ancient Grains: A Metabolomics Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1217. [[CrossRef](#)]
40. Zhu, Z.-J.; Schultz, A.W.; Wang, J.; Johnson, C.H.; Yannone, S.M.; Patti, G.J.; Siuzdak, G. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 451–460. [[CrossRef](#)]
41. Ren, J.; Snider, J.; Airola, M.V.; Zhong, A.; Rana, N.A.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. Quantification of 3-ketodihydrosphingosine using HPLC-ESI-MS/MS to study SPT activity in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[S]. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 162–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dapic, I.; Brkljacic, L.; Jakasa, I.; Kobetic, R. Characterization of Ceramides with Phytosphingosine Backbone by Hydrogen-deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Croat. Chem. Acta* **2019**, *92*, 411–417. [[CrossRef](#)]
43. Suárez-García, S.; Arola, L.; Pascual-Serrano, A.; Arola-Arnal, A.; Aragonès, G.; Bladé, C.; Suárez, M. Development and validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of mammal lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines in serum. *J. Chromatogr. B.* **2017**, *1055–1056*, 86–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bitencourt Tamires, A.; Hatanaka, O.; Pessoni Andre, M.; Freitas Mateus, S.; Trentin, G.; Santos, P.; Rossi, A.; Martinez-Rossi Nilce, M.; Alves Lysangela, L.; Casadevall, A.; et al. Fungal Extracellular Vesicles Are Involved in Intraspecies Intracellular Communication. *mBio* **2022**, *13*, e03221–e03272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wei, L.-H.; Yu, T.; Wang, X.-N.; Hou, J.-X.; Wang, X.; Wang, C.; Li, K.-K.; Jing, S.-Y.; Zhang, X. In Vitro Potent Activity of ϵ -poly-L-lysine against *Candida albicans* and the Underlying Mechanisms. *bioRxiv* **2019**, *21*, 605857. [[CrossRef](#)]
46. Jamieson, D.J.; Stephen, D.W.S.; Terrière, E.C. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *138*, 83–88. [[CrossRef](#)]
47. Chiou, T.-J.; Tzeng, W.-F. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* **2000**, *154*, 75–84. [[CrossRef](#)]
48. Li, J.; Zuo, X.; Cheng, P.; Ren, X.; Sun, S.; Xu, J.; Holmgren, A.; Lu, J. The production of reactive oxygen species enhanced with the reduction of menadione by active thioredoxin reductase. *Metallomics* **2019**, *11*, 1490–1497. [[CrossRef](#)]
49. Ayer, A.; Gourlay, C.W.; Dawes, I.W. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 60–72. [[CrossRef](#)]
50. Jamieson, D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1998**, *14*, 1511–1527. [[CrossRef](#)]
51. Levine, A. Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? *Plant. Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 531–535. [[CrossRef](#)]
52. Roper, M.; Dressaire, E. Fungal Biology: Bidirectional Communication across Fungal Networks. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, R130–R132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhou, L.; Evangelinos, M.; Wernet, V.; Eckert Antonia, F.; Ishitsuka, Y.; Fischer, R.; Nienhaus, G.U.; Takeshita, N. Superresolution and pulse-chase imaging reveal the role of vesicle transport in polar growth of fungal cells. *Sci. Adv.* **2020**, *4*, e1701798. [[CrossRef](#)]
54. Keller, N.P. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 671–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fountain, J.C.; Bajaj, P.; Nayak, S.N.; Yang, L.; Pandey, M.K.; Kumar, V.; Jayale, A.S.; Chitikineni, A.; Lee, R.D.; Kemerait, R.C.; et al. Responses of *Aspergillus flavus* to Oxidative Stress Are Related to Fungal Development Regulator, Antioxidant Enzyme, and Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Expression. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2048. [[CrossRef](#)]
56. Martín, J.F. Transport systems, intracellular traffic of intermediates and secretion of β -lactam antibiotics in fungi. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2020**, *7*, 6. [[CrossRef](#)]
57. Zhang, C.; Wang, W.; Lu, R.; Jin, S.; Chen, Y.; Fan, M.; Huang, B.; Li, Z.; Hu, F. Metabolic responses of *Beauveria bassiana* to hydrogen peroxide-induced oxidative stress using an LC-MS-based metabolomics approach. *J. Invertebr. Pathol.* **2016**, *137*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Domingues, M.R.M.; Simões, C.; da Costa, J.P.; Reis, A.; Domingues, P. Identification of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylethanolamine modifications under oxidative stress conditions by LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 588–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wang, D.-N.; Toyotome, T.; Muraosa, Y.; Watanabe, A.; Wuren, T.; Bunsupa, S.; Aoyagi, K.; Yamazaki, M.; Takino, M.; Kamei, K. GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. *Med. Mycol.* **2014**, *52*, 506–518. [[CrossRef](#)]
60. Klug, L.; Daum, G. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 2017–2036. [[CrossRef](#)]
61. Ren, J.; Hannun, Y. *Metabolism and Roles of Sphingolipids in Yeast Saccharomyces cerevisiae*; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2019; pp. 341–361.
62. Li, L.; Liao, Z.; Yang, Y.; Lv, L.; Cao, Y.; Zhu, Z. Metabolomic profiling for the identification of potential biomarkers involved in a laboratory azole resistance in *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192328. [[CrossRef](#)]
63. Singh, A.; MacKenzie, A.; Girnun, G.; Del Poeta, M. Analysis of sphingolipids, sterols, and phospholipids in human pathogenic *Cryptococcus* strains. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 2017–2036. [[CrossRef](#)]
64. Pan, J.; Hu, C.; Yu, J.-H. Lipid Biosynthesis as an Antifungal Target. *J. Fungi* **2018**, *4*, 50. [[CrossRef](#)]

65. Sant, D.G.; Tupe, S.G.; Ramana, C.V.; Deshpande, M.V. Fungal cell membrane—Promising drug target for antifungal therapy. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 1498–1510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Rattray, J.B.; Schibeci, A.; Kidby, D.K. Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* **1975**, *39*, 197–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Henry, S.A.; Kohlwein, S.D.; Carman, G.M. Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2012**, *190*, 317–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zamith-Miranda, D.; Heyman Heino, M.; Burnet Meagan, C.; Couvillion Sneha, P.; Zheng, X.; Munoz, N.; Nelson William, C.; Kyle Jennifer, E.; Zink Erika, M.; Weitz Karl, K.; et al. A *Histoplasma capsulatum* Lipid Metabolic Map Identifies Antifungal Targets. *mBio* **2021**, *12*, e02921–e02972. [[CrossRef](#)]
69. Zamith-Miranda, D.; Heyman Heino, M.; Couvillion Sneha, P.; Cordero Radames, J.B.; Rodrigues Marcio, L.; Nimrichter, L.; Casadevall, A.; Amatuzzi Rafaela, F.; Alves Lysangela, R.; Nakayasu Ernesto, S.; et al. Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems* **2021**, *6*, e00821–e00822. [[CrossRef](#)]
70. Vallejo, M.C.; Nakayasu, E.S.; Longo, L.V.G.; Ganiko, L.; Lopes, F.G.; Matsuo, A.L.; Almeida, I.C.; Puccia, R. Lipidomic Analysis of Extracellular Vesicles from the Pathogenic Phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39463. [[CrossRef](#)]
71. Wang, J.; Wang, H.; Zhang, C.; Wu, T.; Ma, Z.; Chen, Y. Phospholipid homeostasis plays an important role in fungal development, fungicide resistance and virulence in *Fusarium graminearum*. *Phytopathol. Res.* **2019**, *1*, 16. [[CrossRef](#)]
72. da Silveira dos Santos, A.X.; Riezman, I.; Aguilera-Romero, M.-A.; David, F.; Piccolis, M.; Loewith, R.; Schaad, O.; Riezman, H. Systematic lipidomic analysis of yeast protein kinase and phosphatase mutants reveals novel insights into regulation of lipid homeostasis. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 3234–3246. [[CrossRef](#)]
73. Silva-Neto, M.A.C.; Lopes, A.H.; Atella, G.C. Here, There, and Everywhere: The Ubiquitous Distribution of the Immunosignaling Molecule Lysophosphatidylcholine and Its Role on Chagas Disease. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Tounsi, N.; Meghari, S.; Moser, M.; Djerdjouri, B. Lysophosphatidylcholine exacerbates *Leishmania major*-dendritic cell infection through interleukin-10 and a burst in arginase1 and indoleamine 2,3-dioxygenase activities. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *25*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavieu, G.; Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell. Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.