

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

***Aspergillus fumigatus* produz vesículas extracelulares biologicamente ativas
capazes de estimular a resposta imune *in vitro* e *in vivo*.
Caracterização estrutural e funcional**

Jéssica Amanda Marques Souza

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

BELO HORIZONTE
SETEMBRO – 2019

JÉSSICA AMANDA MARQUES SOUZA

***Aspergillus fumigatus* produz vesículas extracelulares biologicamente ativas
capazes de estimular a resposta imune *in vitro* e *in vivo*.
Caracterização estrutural e funcional**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

BELO HORIZONTE
SETEMBRO - 2019

043

Souza, Jéssica Amanda Marques.

Aspergillus fumigatus produz vesículas extracelulares biologicamente ativas capazes de estimular a resposta imune *in vitro* e *in vivo*: caracterização estrutural e funcional [manuscrito] / Jéssica Amanda Marques Souza. – 2019.

111 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. *Aspergillus fumigatus*. 3. Fungos. 4. Vesículas extracelulares. I. Soriani, Frederico Marianetti. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

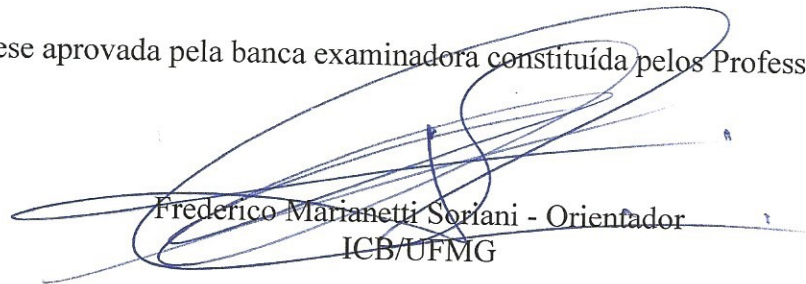
CDU: 575



**"Aspergillus fumigatus produz vesículas extracelulares biologicamente
ativas capazes de estimular a resposta imune in vitro e in vivo.
Caracterização estrutural e funcional"**

Jéssica Amanda Marques Souza

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Frederico Marianetti Soriani - Orientador
ICB/UFMG


Leonardo Nimrichter
UFRJ


Iran Malavazi
UFSCar


Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
UFMG


Nalu Teixeira de Aguiar Peres
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2019.

COLABORAÇÕES

Dra. Ludmila de Matos Baltazar – UFMG
Prof. Dra. Virgínia Mendes Carregal – UFMG
Me. Ludmila Gouveia-Eufrasio – UFMG
Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira – UFMG
Dr. Wendell Girard Dias – Fundação Oswaldo Cruz
Dra. Marina Campos Rocha – UFSCar
Dra. Izabela Galvão – UFMG
Prof. Dr. Dário Zamboni – USP
Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda – UFRJ
Prof. Dr. Iran Malavazi – UFSCar
Prof. Dr. Daniel de Assis Santos – UFMG
Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard – UFMG
Prof. Dra. Daniele da Glória de Souza – UFMG
Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira – UFMG

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos – UFMG
Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro – UFMG
Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados – UFMG
Laboratório de Micologia - UFMG
Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth - Fundação Oswaldo Cruz
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer – UFRJ
Departamento de Genética e Evolução - UFSCar

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e proteção divina derramadas sobre a minha vida.

À mãezinha Maria, por passar na frente e abrir meus caminhos.

À FAPEMIG e a CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Biológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética.

Ao meu orientador Prof. Dr. Frederico Soriani, pela oportunidade e confiança ao me receber no laboratório. Pelos ensinamentos e por sempre me incentivar a amadurecer cientificamente. Obrigada também pelos momentos descontraídos e por ser compreensível nos momentos de dificuldades.

À Dra. Ludmila de Matos Baltazar, Profa. Virgínia Mendes Carregal, Ludmila Gouveia-Eufrasio, Dra. Izabela Galvão, Prof. Dário Zamboni, Prof. André Oliveira, Dr. Wendell Girard Dias, Prof. Kildare Miranda, Prof. Iran Malavazi, Prof. Daniel Assis Santos, Prof. Frédéric Jean Georges Frézard, Profa. Danielle da Glória de Souza, Prof. Mauro Martins Teixeira, Prof. Oscar Mesquita, Profa. Maria Isabel Guedes, Prof. Ricardo Gazzinelli e Prof. Gustavo Menezes, pela imensa colaboração prestada para o desenvolvimento deste trabalho.

Às “meninas” do laboratório, Isabella, Nathália, Karina, Flávia e Tássia, por toda solicitude, conselhos, força e amizade. Por dividirem comigo meus momentos de aflições e também os de alegrias. Vocês são muito especiais e merecem brilhar sempre!

A todos os alunos de iniciação científica que estão ou passaram pelo laboratório, pela disponibilidade em ajudar em seus momentos de aprendizado.

Ao grupo Imunofar, pela colaboração e por disponibilizarem recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, alunos e funcionários do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, pelos ensinamentos, solicitude e amizade.

À Ilma e Rosemeire, pelo cuidado com o laboratório e por estarem sempre disponíveis para ajudar. Vocês são muito queridas por todos nós!

Ao Jamil, por abrir as portas (e janelas) de seu laboratório e disponibilizar o uso de materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grata pelos seus conselhos e por ser tão atencioso e disposto a ajudar quando sempre precisei.

À Eneida, pelo apoio e por disponibilizar o uso de equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos laboratórios de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia, Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, Pesquisa em Virologia Animal, Micologia, Center Of Gastrointestinal Biology e Laboratório de Tecnologia Genética, por abrirem gentilmente as portas tornando a concretização deste trabalho possível.

Ao meu irmão Filipe, familiares e amigos, que sempre estiveram torcendo por mim. Por se alegrarem com as minhas conquistas e por compreenderem meus momentos de ausência.

Aos meus amados pais Diva e Carlos, pelo apoio, amparo nos momentos difíceis e por não me deixarem desistir. Vocês não mediram esforços e me proporcionaram tudo o que precisei para que eu chegasse até aqui. Essa conquista também é de vocês! Amo vocês!

Ao meu esposo Lucas, por ser meu porto seguro e o meu maior incentivador. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão e por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Te amo!

A todos que, de alguma forma, participaram da realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A liberação de biomoléculas pelas células de diferentes organismos tem sido associada à secreção de vesículas extracelulares (VEs), um mecanismo evolutivamente conservado e considerado um veículo de comunicação intercelular. Estudos recentes demonstraram que a liberação de VEs por vários microrganismos, incluindo fungos patogênicos, está associada a fisiologia e patogenicidade destes microrganismos. Neste trabalho, nós isolamos, pela primeira vez, VEs produzidas por *Aspergillus fumigatus*, um organismo ubíquo e saprofítico e considerado um importante agente patogênico. As primeiras caracterizações estruturais das VEs de *A. fumigatus* demonstraram uma produção de estruturas circulares delimitadas por uma bicamada lipídica, características de VEs, que apresentam predominantemente 100 a 200 nm de diâmetro. As VEs de *A. fumigatus* possuem ergosterol e uma carga proteica bastante diversa, com proteínas relacionadas ao remodelamento da parede celular e metabolismo, além de proteínas envolvidas na virulência como, resistência ao estresse oxidativo e alérgenos. Demonstramos que fagócitos são capazes de internalizar VEs de *A. fumigatus* e a sensibilização prévia de macrófagos e neutrófilos derivados da medula óssea (BMDN) com VEs, antes do desafio com o fungo, resultou em um aumento da capacidade fagocítica culminando em uma maior depuração do patógeno fúngico. Foi demonstrado também que as VEs deste fungo são capazes de induzir a produção de TNF- α e CCL2 por macrófagos e um efeito aditivo foi observado na produção destes mediadores quando as células foram desafiadas com conídios do fungo. Em BMDN, sensibilizados com VEs, foi observado um aumento na produção de TNF- α e IL-1 β , frente a exposição aos conídios. Adicionalmente, em modelo animal de imunização com VEs de *A. fumigatus*, foi observado uma redução do infiltrado inflamatório para os alvéolos dos animais, após infecção intranasal com conídios de *A. fumigatus*. A imunização também conferiu uma redução na produção dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6 e CXCL1 e um aumento de IL-17, após infecção. A diminuição da produção de IL-1 β , em animais imunizados, foi corroborada com uma menor ativação do inflamassoma, caracterizada por uma menor ativação de caspase-1. Por fim, nós avaliamos a participação das proteínas do complexo ESCRT na biogênese das VEs de *A. fumigatus*. Nós observamos uma regulação positiva de proteínas de todos os complexos proteicos pertencentes a via ESCRT durante o crescimento de *A. fumigatus*, sugerindo a participação destes complexos na secreção de VEs neste fungo. Em conjunto, demonstramos que *A. fumigatus* produz VEs biologicamente ativas capazes de impactar na resposta imune e inflamatória, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, aumentando a depuração fúngica e diminuindo a resposta inflamatória. Neste sentido, VEs de *A. fumigatus* podem representar um novo alvo na formulação de métodos profiláticos contra aspergilose.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, fungos filamentosos, *Aspergillus fumigatus*.

ABSTRACT

The release of biomolecules by cells of different organisms have been associated with the secretion of extracellular vesicles, an evolutionarily conserved mechanism considered a potent vehicle of intercellular communication. Recent studies demonstrated that EV liberation from many microorganisms, including pathogenic fungi, is associated with the physiology and pathogenicity of these microorganisms. In this work we isolated, for the first time, EVs produced by *A. fumigatus*, an ubiquitous and saprophytic organism, considered an important pathogen in immunocompromised patients. The first structural EVs characterizations from *A. fumigatus* demonstrated a production of circular bilayer structures, a characteristic of EVs, with 100 to 200 nm diameter. *A. fumigatus* EVs have ergosterol and a protein burden very diverse, containing proteins related to the remodeling of cell wall and metabolism, and proteins involved in virulence like REDOX proteins and allergens. We demonstrated that phagocytes are able to internalize *A. fumigatus* EVs, and the sensitization of phagocytic cells (macrophages and bone-marrow derived neutrophils – BMDN) with EVs, before fungus challenging, resulted in an increasing of phagocytic capacity culminating in a higher clearance of the fungal pathogen. It was also demonstrated that EVs of this fungus are able to induce production of TNF- α and CCL2 by macrophages and an additive effect was observed in production of these mediators when the cells were challenged with conidia. In EVs sensitized BMDN, there was an increase in TNF- α and IL-1 β production after conidia exposure. Moreover, in an animal immunization model with EVs from *A. fumigatus*, there was a reduction in inflammatory infiltrate to alveoli of animals after intranasal infection with *A. fumigatus* conidia. The immunization also conferred a reduction in production of the pro-inflammatory mediators IL- β , IL-6 and CXCL1, and a slight increase of IL-17 after infection. The decrease of IL-1 β in immunized animals was corroborated by a lower activation of inflammasome, characterized by a lower activation of caspase-1. We also evaluated the participation of proteins from ESCRT complex in *A. fumigatus* EVs biogenesis. We observed a positive regulation of protein expression in all ESCRT complexes during the *A. fumigatus* growth for up to 48 hours, suggesting the participation of those complexes in EVs secretion in this fungus. Taken together, we demonstrated that *A. fumigatus* produces biologically active EVs that are able to impact in immune and inflammatory response, both *in vitro* and *in vivo*, increasing the fungal clearance and decreasing the inflammatory response. In this sense, *A. fumigatus* EVs may represent a new target for the formulation of prophylactic methods against aspergillosis.

Keywords: Extracellular vesicles, filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de biogênese de VEs	19
Figura 2. Formação de VEs em procariotos: Três hipóteses	21
Figura 3. Modelo de liberação de VEs por organismos eucarióticos	23
Figura 4. Ciclo assexual do <i>Aspergillus fumigatus</i>	30
Figura 5. Composição da parede celular do <i>Aspergillus fumigatus</i>	31
Figura 6. Ciclo de infecção do <i>A. fumigatus</i> em indivíduos imunocomprometidos	33
Figura 7. Modelo de imunização com VEs de <i>A. fumigatus</i>	54
Figura 8. Efeito das VEs na modulação do influxo de células totais para os alvéolos	61
Figura 9. Contagem diferencial de células por BAL	62
Figura 10. Efeito das VEs no controle de extravasamento de proteínas para os alvéolos ..	63
Figura 11. Perfil de células no parênquima pulmonar após infecção por <i>A. fumigatus</i>	64
Figura 12. Capacidade fagocítica de células presentes no BAL de animais infectados.....	65
Figura 13. Perfil de mediadores inflamatórios nos alvéolos.....	66
Figura 14. Ativação de caspase-1 frente infecção por <i>A. fumigatus</i>	67
Figura 15. Brotamento de microvesículas a partir da membrana plasmática	73
Figura 16. Modelo de liberação de exossomos	74
Figura 17. Formação de VEs mediada por ESCRT	75
Figura 18. Modelo de interação entre as proteínas dos complexos ESCRT	76
Figura 19. Nível de expressão de ESCRT-0 em culturas de <i>A. fumigatus</i>	83
Figura 20. Nível de expressão de ESCRT-I em culturas de <i>A. fumigatus</i>	84
Figura 21. Nível de expressão de ESCRT-II em culturas de <i>A. fumigatus</i>	85
Figura 22. Nível de expressão de ESCRT-III em culturas de <i>A. fumigatus</i>	85
Figura 23. Nível de expressão do complexo Vps4 em culturas de <i>A. fumigatus</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes para transcrição reversa	79
Tabela 2. Números de acessos das proteínas dos complexos ESCRT em <i>S. cerevisiae</i> e <i>A. fumigatus</i>	80
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> para PCR em tempo real	80
Tabela 4. Reagentes para reação de qPCR	81

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA** – Aspergilose broncopulmonar alérgica
- Afu** – *Aspergillus fumigatus*
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BAL** – Lavado broncoalveolar (do inglês, *bronchoalveolar lavage*)
- BMDM** – Macrófagos derivados da medula óssea (do inglês, *bone-marrow-derived macrophage*)
- BMDN** – Neutrófilo derivado da medula óssea (do inglês, *bone marrow-derived neutrophils*)
- Bro1** – Proteína vacuolar de classificação (do inglês, *vacuolar-sorting protein BRO1*)
- BSA** – Albumina do soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CR3** – Receptor do complemento 3 (do inglês, *complement receptor*)
- DENV** – Vírus da dengue (do inglês, *dengue virus*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- DOA4** – Hidrolase C-terminal de ubiquitina (do inglês, *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4*)
- DTT** – Ditioneitol
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EGFRvIII** - Receptor de fator de crescimento epidérmico (do inglês, *epidermal growth factor receptor variant III*)
- ELISA** - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- EPO** – Peroxidase de eosinófilos (do inglês, *eosinophil peroxidase*)
- ESCRT** – Proteínas do complexo endossomal requerido para transporte (do inglês, *Endosomal sorting complexes required for transport*)
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- g** – Força G
- GLUE** – Ligação Ub tipo GRAM (do inglês, *GRAM-like Ub binding*)
- GXM** – Glucuronoxilomanana
- HETAB** – do inglês, *hexadecyltrimethylammonium bromide*
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *human immunodeficiency virus*)
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- Hse1** - Proteína de distribuição vacuolar de classe E (do inglês, *class E vacuolar protein-sorting machinery HSE1*)
- H₂SO₄** – Ácido sulfúrico
- Hsp60** - proteína de choque térmico 60 (do inglês, *heat shock protein 60*)
- IFN** – Interferon
- Ig** – Imunoglobulina
- IL** – Interleucina

IL1R1 – Receptor tipo 1 – Interleucina 1

ILVs – Vesículas intraluminais (do inglês, *intraluminal vesicles*)

IPA – Aspergilose pulmonar invasiva (do inglês, *invasive pulmonary aspergillosis*)

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

mA – Miliamperagem

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

mg – Miligramas

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)

MIM – Motivo de interação MIT (do inglês, *MIT interacting Motif*)

MIT – Interação e tráfego de microtúbulos (do inglês, *Microtubule interacting trafficking*)

mL – Mililitros

mM – Milimolar

MMP1 – Metaloproteinase-1 (do inglês, *matrix metalloproteinase-1*)

MPO – Mieloperoxidase

mRNA – RNA mensageiro

MSC – Células estromais mesenquimais (do inglês, *mesenchymal stromal cells*)

MVBs – Corpos multivesiculares (do inglês, *multivesicular bodies*)

Mvb12 – Fator de distribuição de corpo multivesicular 12 (do inglês, *multivesicular body sorting factor 12*)

NaCl – Cloreto de sódio

Na₂EDTA - etilendiamintetracético disódio

NAG - N-acetil-β-D-glucosaminidase

NaF - Fluoreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

Na₃PO₄ – Fosfato de sódio

NaVO₃ - Metavanadato de sódio

NET - Armadilhas extracelulares dos neutrófilos (do inglês, *neutrophil extracellular traps*)

NI – Não infectado

nm – Nanômetros

OMVs – Vesículas de membrana externa (do inglês, *outer membrane vesicles*)

OPD – do inglês, *o-Phenylenediamine dihydrochloride*

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*)

PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffered saline*)

PCM – Paracoccidiodomicose

pH – Potencial hidrogeniônico

PMN – Células polimorfonucleares (do inglês, *polymorphonuclear cells*)

PMSF – Fenilmetilsulfonilflúor

PorB – Porina

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern recognition receptor*)

PSA – Persulfato de amônio

PspA – Proteína de superfície pneumocócica A (do inglês, *pneumococcal surface protein A*)

PSPD – peptídeo de nove resíduos (do inglês, *nine-residue peptide*)

PTAP – do inglês, *overlapping motifs*

PtdIns3P - fosfatidilinositol 3-fosfato (do inglês, *phosphatidylinositol 3-phosphate*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

rpm – Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*)

SNC – Sistema nervoso central

Snf7 - Proteína de distribuição vacuolar Snf7 (do inglês, *vacuolar-sorting protein SNF7*)

SPF - livres de patógenos específicos (do inglês, *specific pathogen free*)

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

TGF-β – Fator de transformação de crescimento (do inglês, *transforming growth factor beta*)

Th – do inglês, *T-helper*

TLRs – Receptores do tipo Toll (do inglês, *toll-like receptors*)

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF-α – Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

Tris-HCl – Tris-hidrocloreto

UEV – Variante de ubiquitina E2 (do inglês, *ubiquitin E2 variant domain*)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEs – Vesículas extracelulares

Vps2 - Proteína de distribuição vacuolar 2 (do inglês, *vacuolar protein-sorting-associated 2*)

Vps4 - Proteína de distribuição vacuolar 4 (do inglês, *vacuolar protein sorting-associated 4*)

Vps20 - Proteína de distribuição vacuolar 20 (do inglês, *vacuolar protein sorting-associated 20*)

Vps22/SNF8 - Proteína de distribuição vacuolar (do inglês, *vacuolar-sorting protein SNF8*)

Vps23 – Proteína do complexo de distribuição endossomal 23 (do inglês, *endosomal sorting complex protein 23*)

Vps24 - Proteína de distribuição vacuolar 24 (do inglês, *vacuolar protein-sorting-associated 24*)

Vps25 - Proteína de distribuição vacuolar 25 (do inglês, *vacuolar protein-sorting-associated 25*)

Vps27 – Proteína de distribuição vacuolar 27 (do inglês, *vacuolar protein sorting-associated 27*)

Vps28 - Proteína de distribuição vacuolar 28 (do inglês, *vacuolar protein sorting-associated 28*)

Vps36 - Proteína de distribuição vacuolar 36 (do inglês, *vacuolar protein sorting 36*)

Vps37 - Proteína de distribuição vacuolar 37 (do inglês, *vacuolar protein sorting-associated 37*)

Vps60 - Proteína de distribuição vacuolar 60 (do inglês, *vacuolar protein-sorting-associated 60*)

Vta1 - Proteína de distribuição vacuolar 60 (do inglês, *vacuolar protein sorting-associated VTA1*)

α – Alfa

α-Gal - α-galactopiranosil

β – Beta

°C – grau Celsius

μg – Microgramas

μL – Microlitros

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Vesículas extracelulares (VEs)	18
1.1.1 VEs de procariotos e rotas de biogênese.....	19
1.1.1.1 Funções das VEs de procariotos	21
1.1.2 VEs de eucariotos e biogênese	22
1.1.2.1 VEs de mamíferos.....	23
1.1.2.2 VEs de parasitas, vírus e células infectadas.....	25
1.1.2.3 VEs de fungos.....	26
1.2 O fungo <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
1.2.1 Patogênese e aspectos imunológicos da aspergilose	32
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS VEs DE <i>A. fumigatus</i> EM FAGÓCITOS, <i>IN VITRO</i> - ARTIGO	38
5. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS VEs DE <i>A. fumigatus</i> <i>IN VIVO</i>	51
5.1 Vesículas extracelulares e suas implicações no estímulo do sistema imune do hospedeiro	51
5.2 Materiais e Métodos	54
5.2.1 Imunização e infecção dos animais	54
5.2.2 Avaliação da resposta inflamatória dos animais.....	55
5.2.2.1 Contagem de células totais e diferenciadas do BAL.....	55
5.2.2.2 Fagocitose <i>in vivo</i>	55
5.2.2.3 Avaliação da quantidade de proteínas presentes no BAL.....	56
5.2.2.4 ELISA.....	56
5.2.2.5 Avaliação dos efeitos inflamatórios no tecido pulmonar.....	57
5.2.2.6 Avaliação de caspase-1 ativa por Western Blot.....	58
5.2.3 Análises estatísticas	59
5.3 Resultados	60
5.3.1 Avaliação do efeito das VEs em <i>in vivo</i>	60
5.3.1.1 Avaliação da resposta inflamatória de animais imunizados com VEs de <i>A. fumigatus</i>	60
5.3.1.2 Alterações na capacidade fagocítica das células <i>in vivo</i>	64
5.3.1.3 Produção de mediadores inflamatórios após infecção por <i>A. fumigatus</i>	65

5.3.1.4 Avaliação da ativação de caspase-1 após infecção por <i>A. fumigatus</i>	66
5.4 Discussão	68
6. CAPÍTULO 3: PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESCRT NA BIOGÊNESE DAS VES DE <i>A. fumigatus</i>	72
6.1 A participação de proteínas dos complexos ESCRT na liberação de VES em células eucarióticas	72
6.2 Materiais e Métodos	78
6.2.1 Avaliação do nível de expressão gênica das proteínas ESCRT em <i>A. fumigatus</i>	78
6.2.1.1 Extração de RNA total.....	78
6.2.1.2 Síntese de cDNA.....	79
6.2.1.3 Desenho de <i>primers</i> para PCR em tempo real	79
6.2.1.4 Avaliação da expressão gênica das proteínas ESCRT por PCR em tempo real	81
6.2.2 Análises estatísticas	82
6.3 Resultados	83
6.3.1 Expressão de Vps27, do ESCRT-0, em culturas de <i>A. fumigatus</i>	83
6.3.2 Expressão do complexo ESCRT-I em culturas de <i>A. fumigatus</i>	83
6.3.3 Expressão do complexo ESCRT-II em culturas de <i>A. fumigatus</i>	84
6.3.4 Expressão do complexo ESCRT-III em culturas de <i>A. fumigatus</i>	85
6.3.5 Expressão do complexo Vps4 em culturas de <i>A. fumigatus</i>	86
6.4 Discussão	87
7. CONCLUSÃO	91
8. PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXO 1: Figura suplementar 1 - Artigo	104
ANEXO 2: Tabela suplementar 1 - Artigo	105
ANEXO 3: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vesículas extracelulares (VEs)

A secreção de proteínas, polissacarídeos, metabólitos secundários e outros fatores, é um processo vital que ocorre desde organismos simples, como as bactérias, até organismos multicelulares complexos, incluindo mamíferos. A secreção dessas moléculas objetiva a alteração do microambiente para atender as necessidades das células. Em procaríotos, esses modificadores ambientais podem ser proteínas com atividade catalítica que degradam macromoléculas para fornecer nutrientes. Por outro lado, a secreção de toxinas, por exemplo, pode diminuir a competição entre espécies. Já em organismos multicelulares, a secreção de moléculas pode contribuir na criação de matriz extracelular resultando na junção entre células [1]. Estes processos secretórios têm sido associados à liberação de vesículas extracelulares (VEs), um mecanismo celular considerado evolutivamente conservado, implicando que as vesículas podem servir como um sistema de exportação [2, 3].

As VEs compreendem um conjunto amplo e extremamente heterogêneo de vesículas, que possuem funções, propriedades biofísicas e rotas de biogênese diferentes. “Vesículas extracelulares” é um termo genérico que se refere a todas as vesículas de membrana secretadas para o espaço extracelular, porém VEs podem ser divididas em três categorias baseadas em seu tamanho e biogênese, sendo então denominadas de: exossomos, microvesículas ou ectossomas e corpos apoptóticos. Os exossomos são vesículas de 30-100 nm, os quais são liberados por exocitose. As microvesículas são vesículas maiores (150-1000 nm), que são secretadas por brotamento externo da membrana plasmática. Já os corpos apoptóticos (50-1000 nm) são liberados por células em estágios posteriores a apoptose, de modo que os detritos celulares podem ser facilmente eliminados pelas células fagocíticas (Figura 1) [4–6]. Uma característica comum em todos os três subtipos de VEs é a presença de uma membrana de bicamada lipídica, formando um lúmen, que envolve uma carga específica de biomoléculas incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos [2].

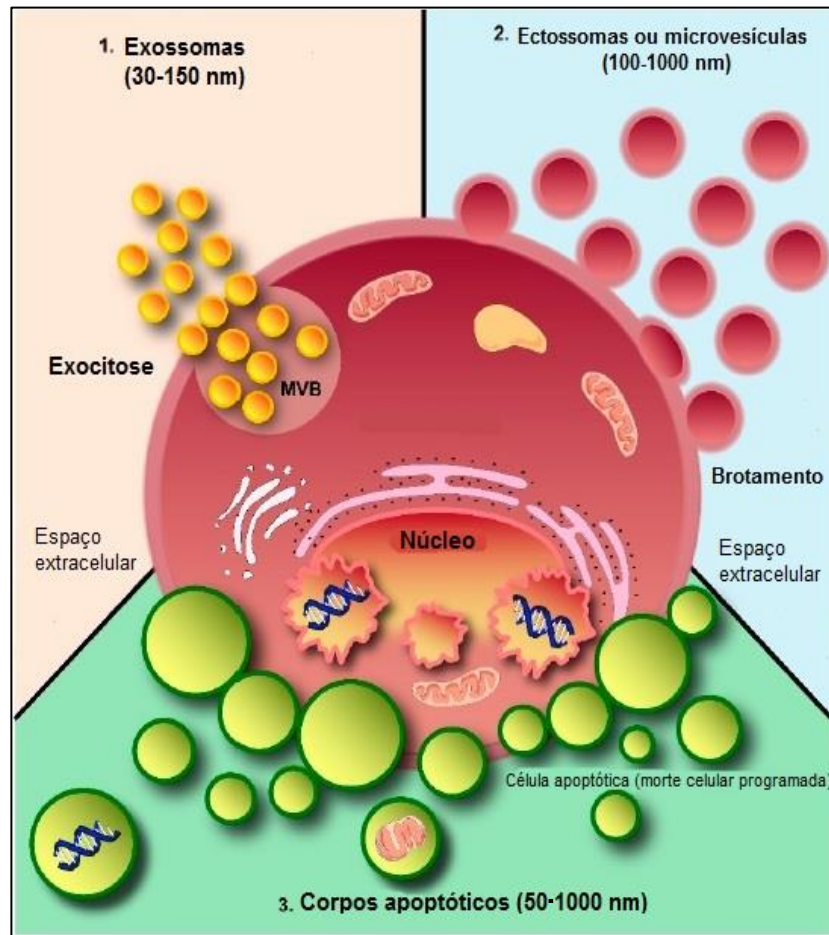


Figura 1: Mecanismos de biogênese de VEs. As VEs podem ser amplamente divididas em três categorias baseadas em sua biogênese. As vias de biogênese resultam em subconjuntos de VEs, nomeadas em: exossomos, ectossomas ou microvesículas e corpos apoptóticos (Kalra et al., 2016 – Adaptado).

As primeiras observações das VEs e a sua importância ocorreram simultaneamente em vários cenários fisiológicos, sem a percepção de que essa forma de função e comunicação é uma propriedade biológica celular compartilhada universalmente [7]. Estudos posteriores permitiram compreender que as VEs são importantes na comunicação intercelular e são biologicamente ativas, podendo causar morte da célula hospedeira, provocando respostas e, em alguns casos, conferindo proteção a doenças [3].

1.1.1 VEs de procariotos e rotas de biogênese

As VEs de procariotos foram relatadas pela primeira vez na década de 60 em bactérias Gram-negativas, em *Escherichia coli*, quando foi observado a presença de LPS solúvel no sobrenadante da cultura proveniente de uma condição de crescimento limitadora de lisina [8]. A liberação destas VEs foi demonstrada por microscopia eletrônica (ME) por Knox e

colaboradores (1966), que observaram a liberação de estruturas esféricas por bactérias [9]. As VEs de bactérias Gram-negativas são originadas a partir da membrana externa, e, portanto, são geralmente referidas como vesículas de membrana externa (OMVs). A existência de VEs em bactérias Gram-positivas não foi mencionada na literatura até 1990, quando investigaram a presença de DNA empacotado em VEs de bactérias Gram-negativas e positivas [3, 10–12].

Em bactérias Gram-negativas, as VEs são liberadas a partir da membrana externa, por brotamento, que ocorre a partir de uma compressão e encapsulamento dos componentes do espaço periplasmático e, presumivelmente, não há barreira para a liberação destas VEs para o espaço extracelular [3, 13, 14]. Por outro lado, bactérias Gram-positivas e micobactérias possuem uma parede celular mais complexa. As bactérias Gram-positivas não possuem essa membrana externa, mas possuem uma camada espessa de peptidoglicano sobre a membrana celular. Em micobactérias, o peptidoglicano está covalentemente ancorado ao arabinogalactano, que por sua vez está ligado ao ácido micólico. Esta parede está então rodeada por uma cápsula mais externa composta por polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Juntas, essas observações sugerem que, devido a esta complexidade da parede celular, as VEs destes organismos não conseguiriam escapar por estas barreiras [3]. No entanto, a hipótese de que somente bactérias Gram-negativas poderiam liberar VEs foi perdida quando estas estruturas começaram a ser identificadas em micobactérias e bactérias Gram-positivas. Na última década, VEs foram isoladas da matriz extracelular de *Mycobacterium ulcerans* [15, 16], e Lee e colaboradores (2009) identificaram pela primeira vez a produção de VEs pela bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* [17].

Pouco se sabe sobre o processo de liberação de VEs em procariotos, mas, considerando o fato de que todos estes organismos sejam capazes de liberar VEs, existe um suporte na literatura para três hipóteses, não excludentes, de como estas VEs podem ser liberadas (Figura 2). As vesículas podem ser forçadas através da parede por turgescência, após liberação da membrana plasmática (Figura 2a). Alternativamente, ou adicionalmente, enzimas modificadoras de parede celular podem facilitar um afrouxamento da parede para permitir a liberação de VEs (Figura 2b). E finalmente, as VEs podem ser liberadas através de canais (Figura 2c) [3].

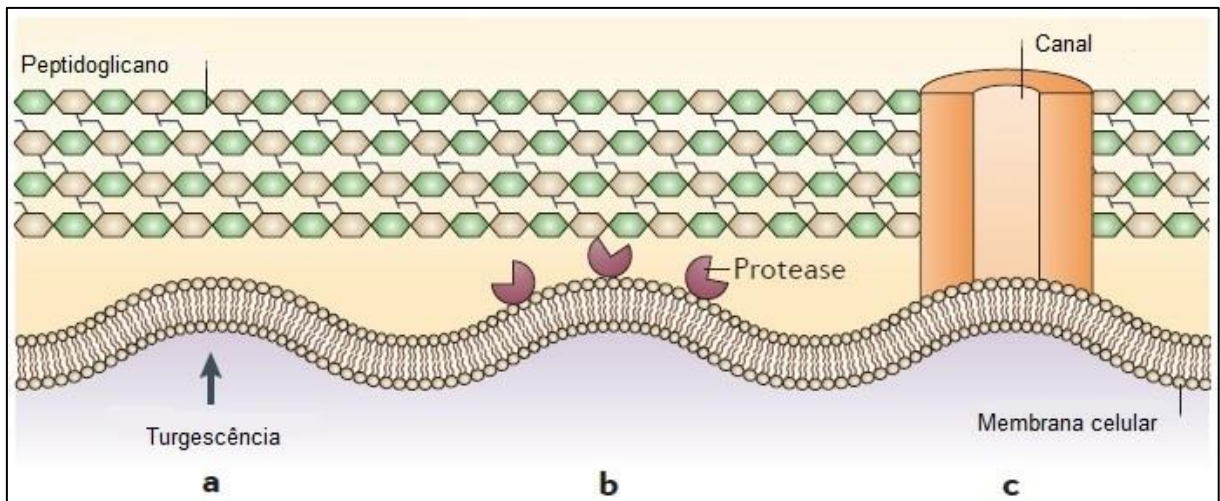


Figura 2: Formação de VEs em procariotos: Três hipóteses. (a) As vesículas podem ser forçadas através da parede celular por turgescência. (b) Enzimas modificadoras podem desprender a parede, aumentando o tamanho dos poros e facilitando a liberação de VEs. (c) Canais podem orientar as VEs para o espaço extracelular (Brown et al., 2015 – Adaptado).

O crescente campo de pesquisa sobre VEs em procariotos revelou até agora possíveis papéis das VEs na ecologia bacteriana, fisiologia e interações microrganismo-hospedeiro ligadas à doença. Considerando isto, as VEs também possuem um potencial valor em aplicações médicas e clínicas [18].

1.1.1.1 Funções das VEs de procariotos

Desde a identificação da liberação de VEs por procariotos, muitos estudos vêm sendo realizados objetivando compreender o papel destas estruturas na fisiologia e na patogênese destes organismos. As VEs de procariotos possuem uma carga variada de compostos, incluindo fatores de virulência, adesinas, toxinas, fatores imunomoduladores e de eliminação de nutrientes. Devido a esta composição bastante diversa, as VEs destes organismos foram associadas à citotoxicidade, invasão de células hospedeiras, fusão de membranas, produção de biofilme, transferência de DNA, receptores e proteínas relacionadas à resistência a antibióticos [11].

Em *E. coli*, frações de α -hemolisina foram identificadas dentro de VEs e demonstraram ter atividade citotóxica, capazes de causar hemólise [19]. Similarmente, as VEs de *S. aureus* tiveram seu conteúdo proteico elucidado por Gurung e colaboradores (2011) e foi demonstrada sua capacidade de interagir com a célula hospedeira e descarregar o seu conteúdo induzindo citotoxicidade [20]. Prados-Rosales e colaboradores (2011) também demonstraram que duas espécies de importância médica, *Mycobacterium tuberculosis* e *M.*

bovis, produzem VEs capazes de estimular a produção de citocinas e quimiocinas a partir de macrófagos isolados de camundongos. Além disto, foi demonstrado que quando camundongos receberam VEs, antes de serem infectados com *M. tuberculosis*, apresentaram uma resposta inflamatória local acelerada com aumento da replicação bacteriana nos pulmões e baço [16]. De maneira semelhante, foi demonstrado que VEs de *Streptococcus pneumoniae*, internalizadas por células epiteliais pulmonares e células dendríticas humanas, induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, essas VEs foram reconhecidas por anticorpos circulantes, resultando na deposição de complemento. Por outro lado, a adição de VEs ao soro humano diminuiu a depuração de pneumococos encapsulados, sugerindo que as VEs expõem alvos para fatores do complemento do soro, promovendo a evasão pneumocócica desta defesa do hospedeiro [21].

Juntos, estes resultados mostram que a liberação de VEs é essencial para promover interações entre células microbianas e células hospedeiras, uma vez que desempenham um importante papel na fisiologia celular e na patogênese de infecções. Portanto, uma investigação mais aprofundada dos conteúdos de VEs e dos processos de liberação em diversas condições ambientais poderá revelar como essas estruturas são essenciais para a vida microbiana [3, 14, 22].

1.1.2 VEs de eucariotos e biogênese

As primeiras descobertas da existência de VEs produzidas por células eucarióticas foram observadas em mamíferos e se iniciaram há 30 anos, quando foi demonstrado que receptores de transferrina, associados com pequenas vesículas de aproximadamente 50 nm, são liberados de reticulócitos em maturação no sangue para o espaço extracelular [23–25].

Nos sistemas eucarióticos, a presença de algumas proteínas comuns é crucial para a biogênese de VEs, sugerindo que estas proteínas estejam envolvidas na curvatura da membrana. Este mecanismo de biogênese determina, em grande parte, a forma, tamanho e composição das VEs, sendo que, a incorporação de uma determinada proteína nas VEs pode, inclusive, depender do local onde está sendo gerada. O mecanismo é inespecífico e ocorre em VEs formadas tanto por exocitose quanto por brotamento. Estudos têm demonstrado um papel para as proteínas do complexo de classificação endossomal requerido para transporte (ESCRT), que é composto por aproximadamente vinte proteínas que se unem favorecendo o fechamento do brotamento da membrana (microvesículas) ou a formação de vesículas intraluminais (ILVs), que são liberadas por exocitose (Figura 3) [7, 26–28]. As subunidades monoméricas dos complexos ESCRT estão presentes na sua forma inativa no citosol e, após seu recrutamento para a membrana e interação com domínios específicos, tornam-se ativas.

Após a formação das vesículas, o complexo ESCRT retorna para o citosol através de um processo de dissociação catalisado por ATPases [14].

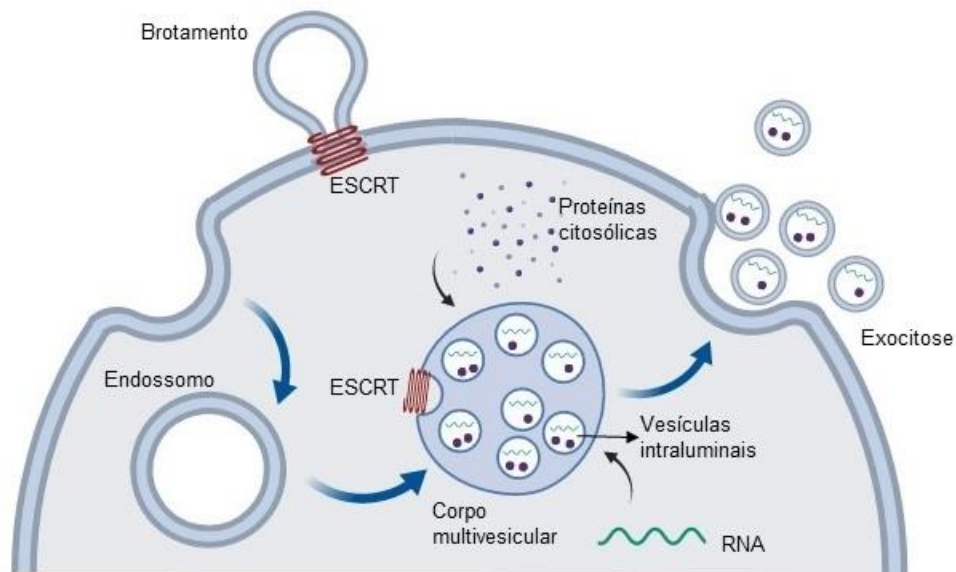


Figura 3: Modelo de liberação de VEs por organismos eucarióticos. As proteínas ESCRT estão envolvidas na maquinaria de secreção de microvesículas, por favorecerem o fechamento do brotamento da membrana plasmática. Além disso, o complexo ESCRT também participa na liberação de VEs por exocitose. Após a formação do endossomo, moléculas citosólicas são incorporadas em seu interior, com auxílio de proteínas ESCRT, conduzindo a formação de vesículas intraluminais (ILVs). Um endossomo com várias ILVs é denominado de corpo multivesicular (MVB). Os MVBs podem ser direcionados para a superfície da célula, onde, em seguida, fundem-se com a membrana plasmática e liberam o seu conteúdo, as ILVs (Figura construída pelo aplicativo BioRender).

A utilização de processos semelhantes de liberação de VEs por organismos tão variados, com o mesmo propósito, suporta a importância da produção de VEs pelos eucariotos [14].

1.1.2.1 VEs de mamíferos

Após o primeiro relato da produção de VEs por células de mamíferos, foi demonstrado que moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHCs) podem ser liberadas associadas a VEs, sugerindo o papel das vesículas na apresentação de antígenos [29, 30]. Estes primeiros estudos impulsionaram o interesse em elucidar o papel destas estruturas, levando à identificação de liberação de VEs em vários tipos de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, como Linfócitos T CD8+, mastócitos, neurônios, oligodendrócitos, células de Schwann e células epiteliais intestinais [31, 32]. Além disto, VEs já foram isoladas de diversos fluidos corporais, incluindo sêmen, sangue, urina, saliva, leite materno, líquido amniótico e bile

[4]. Dada a importância da liberação das VEs por células de mamíferos, vários estudos realizados na última década investigaram o potencial destas vesículas como biomarcadores com potenciais utilizações para diagnóstico precoce, antígenos para vacinação e aplicações terapêuticas em várias doenças [33]. Cruz e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram que a administração de VEs de células estromais mesenquimais (MSCs) em camundongos com asma severa, induzida por extrato de hifas de *Aspergillus*, conseguiu melhorar a inflamação ocasionada pela infecção, sugerindo que a composição destas vesículas possui um efeito benéfico na resolução da infecção [34].

O processo de comunicação celular é frequentemente desregulado no câncer. Visto que as VEs desempenham um importante papel na intercomunicação celular, o papel destas estruturas tem sido extensivamente estudado como um mecanismo que medeia a progressão da doença [35]. Al-Nedawi e colaboradores (2008), demonstraram que, em camundongos, o EGFRvIII (receptor de fator de crescimento epidérmico) pode ser compartilhado entre células de glioma, a partir de transferência microvesículas entre as células, sugerindo o papel das VEs na transferência de moléculas associadas ao câncer [36]. Yokoi e colaboradores (2017) demonstram que VEs, provenientes de células de câncer de ovário altamente metastáticas, induziram fortemente um comportamento metastático em tumores moderadamente metastáticos. Além disso, essas VEs induziram eficientemente morte celular apoptótica em células mesoteliais humanas *in vitro* e *in vivo*, resultando assim na destruição da barreira do mesotélio peritoneal. Adicionalmente, neste estudo foi identificado níveis elevados de *MMP1* em células mesoteliais tratadas com as VEs. A expressão do mRNA *MMP1* no câncer de ovário está correlacionada com o prognóstico. Estes resultados mostram que os mRNAs de *MMP1* são incorporados seletivamente nas VEs [37]. Em conjunto, estes estudos mostram o papel das VEs na evolução do câncer e como estas estruturas podem servir como utilização para diagnóstico da doença.

Outro exemplo de liberação de VEs por células de mamíferos é a participação na função normal do sistema nervoso central (SNC) e nos distúrbios neurológicos [38]. Lachenal e colaboradores (2011) demonstraram que os neurônios liberam exossomos, e que essa liberação é modulada pela atividade sináptica glutamatérgica, sugerindo que esse processo pode ser parte da fisiologia sináptica normal [39].

Sendo assim, as VEs representam um tema desafiador para pesquisa básica e aplicada, permitindo uma compreensão de diferentes mecanismos e abertura de novas ferramentas para combater e diagnosticar doenças [33].

1.1.2.2 VEs de parasitas, vírus e células infectadas

A liberação de vesículas a partir de parasitas, descrita por muitos grupos nos últimos 20 anos, é agora amplamente aceita como um fenômeno de significado fisiológico. Diferentes VEs foram caracterizadas na maioria dos grupos de protozoários, incluindo flagelados, esporozoários e microsporidianos [40, 41]. A produção de VEs tem sido descrita em várias infecções parasitárias, atuando tanto na intercomunicação parasitária, quanto nas interações parasita-hospedeiro, proporcionando assim cargas de proteínas e RNAs que podem modular as células receptoras [42, 43].

Muitos estudos vêm sendo realizados objetivando compreender a função de VEs liberadas pelos parasitas e por células parasitadas. Em infecções por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* foram demonstrados que os níveis plasmáticos de VEs de plaquetas, eritrócitos e leucócitos são aumentados durante a infecção e este aumento pode estar relacionado com a febre e a duração dos sintomas [44, 45]. Adicionalmente, VEs liberadas por *Leishmania spp.* ou células parasitadas por *Toxoplasma gondii* se mostraram potentes em induzir a produção de citocinas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente [41, 46–48]. De maneira interessante, Gaur e Chaturvedi (2016) estudaram moléculas de RNA que estavam presentes nas VEs de *Trypanosoma cruzi* em diferentes estágios de vida e, foi demonstrado, que o conteúdo de RNA das VEs foi estágio-específico [49]. Estes resultados reforçam o papel das VEs na patogenicidade dos parasitas e, neste sentido, as VEs podem ser significativamente úteis na descoberta de biomarcadores de prognósticos e diagnósticos.

A liberação de VEs também pode ser controlada durante infecções virais. Os vírus podem coordenar os mecanismos de replicação da célula, podendo culminar na morte celular. No entanto, estes microrganismos podem, também, utilizar da maquinaria de secreção de VEs da célula para liberação de mais vírus ou partículas virais. Muitos retrovírus podem interagir com os complexos ESCRT, conduzindo a sua incorporação em ILVs, por exemplo, seguido de sua liberação por exocitose [50, 51]. Estudos demonstraram que células infectadas por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus da Hepatite C ou Vírus da Dengue (DENV) são capazes de impactar na liberação de VEs e abrigar fatores reguladores virais, como RNAs e proteínas, que ajudam a estabelecer infecções e modular as respostas celulares [52].

Tomados em conjunto, estes estudos mostram que a liberação de VEs influenciam na patogenicidade bacteriana, parasitária e viral a partir da disseminação de fatores de virulência derivados destes patógenos, podendo promover ou inibir a resposta imune.

1.1.2.3 VEs de fungos

A caracterização de VEs fúngicas iniciou em 2007 quando, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi demonstrado pela primeira vez a produção de VEs por *Cryptococcus neoformans*. As VEs de *C. neoformans* contêm glucuronoxilomanana (GXM), um componente chave da cápsula criptocócica e conhecido por interferir na ativação de células T e migração de neutrófilos para o local da infecção, considerado, portanto, um de seus principais fatores de virulência. Além disso, foi identificada a presença de lipídeos como glicosilceramida (GliCer) e esteróis nas VEs de *C. neoformans*. Estes achados mostram que o polissacarídeo capsular de *C. neoformans* é sintetizado intracelularmente e transportado para o espaço extracelular para a montagem da cápsula, por meio de um mecanismo que envolve a produção de vesículas. Estas informações suportam o fato de que a liberação de VEs é um importante processo na fisiologia e na patogenicidade de *C. neoformans*. [53]. A importância da identificação destas vesículas é reforçada pelo fato de que vesículas contendo GXM foram produzidas durante ensaios *in vitro* de infecção de macrófagos com *C. neoformans* [54]. Após a identificação da produção destas VEs, Rodrigues e colaboradores (2008) caracterizaram a morfologia, composição proteica, atividade enzimática e reatividade sorológica de VEs de *C. neoformans*. A partir de análises proteômicas, foram identificadas 76 proteínas, incluindo várias relacionadas a virulência e proteção contra estresse oxidativo. Testes bioquímicos identificaram as atividades das enzimas lacase, urease e fosfatase nas preparações de VEs. De maneira interessante, a partir de análises imunoenzimáticas, foi demonstrado que haviam anticorpos reativos para proteínas presentes no extrato de VEs no soro de pacientes com criptococose, sugerindo o potencial imunogênico destas estruturas [55]. Além disso, posteriormente, foi demonstrado que VEs de *C. neoformans* são incorporadas por macrófagos e são capazes de induzir a produção de vários mediadores inflamatórios, como citocinas e óxido nítrico, indicando que estas VEs podem estimular a função dos macrófagos, aparentemente ativando essas células e aumentando a sua atividade antimicrobiana. Juntas, essas observações mostram que as VEs deste microrganismo são biologicamente ativas [56].

Desde as primeiras descobertas de liberação de VEs por fungos, novos estudos começaram a ser realizados objetivando caracterizar e compreender a participação destas VEs na fisiologia e patogenicidade destes microrganismos. Atualmente, os fungos que tiveram suas estruturas vesiculares elucidadas incluem *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* [57], *Malassezia sympodialis* [58], *Paracoccidioides brasiliensis* [59], *Alternaria infectoria* [60], *Sporothrix brasiliensis* [61] e *Trichophyton interdigitale* [62].

As primeiras caracterizações de VEs em *H. capsulatum* foram realizadas por Albuquerque e colaboradores (2008), os quais demonstraram que o conteúdo das VEs estava associado ao metabolismo, reciclagem celular, sinalização e virulência. Adicionalmente, foi demonstrado, a partir de análises imunoenzimáticas, que o soro de pacientes com histoplasmose reagiram com proteínas presentes nas VEs de *H. capsulatum*. A proteína de choque térmico 60 (Hsp60) está presente em *H. capsulatum* e é considerada um antígeno imunodominante e o principal ligante de superfície aos receptores CR3 em macrófagos [57, 63]. De maneira interessante, Baltazar e colaboradores (2016), demonstraram que o tratamento de células de *H. capsulatum* com anticorpos monoclonais de ligação a Hsp60, sendo 6B7 (IgG1, anticorpo protetor) e 7B6 (IgG2b, não protetor), foi capaz de alterar o tamanho das VEs produzidas pelo fungo e conseqüentemente aumentar o conteúdo proteico. Além disso, o tratamento com os anticorpos foi capaz de diminuir a atividade enzimática de fosfatase e lacase, sugerindo que estes anticorpos modulam a produção, o tráfego e a liberação de importantes fatores de virulência. Foi observada uma regulação negativa de proteínas β -glucanas, sugerindo uma modificação na síntese de β -glucana, um constituinte estrutural da parede celular fúngica. Neste sentido, estes resultados sugerem que o tratamento com os anticorpos pode afetar a virulência desse microrganismo [64]. Este estudo fornece informações adicionais sobre novas abordagens que podem modificar a fisiologia e a patogênese de fungos, mediada por VEs.

Estudos com VEs de *C. albicans* também caracterizaram sua morfologia, composição e função. Análises proteômicas das VEs isoladas deste fungo revelaram várias proteínas relacionadas à patogenicidade, organização celular, metabolismo de carboidratos e lipídios, resposta ao estresse e várias outras funções. Os principais lipídios identificados foram ergosterol, lanosterol e GliCer. Essas análises demonstram que a liberação de VEs possui um importante papel na manutenção celular e na patogênese de *C. albicans* [57, 65, 66].

M. sympodialis é uma levedura capaz de aumentar a sensibilidade de pacientes adultos com eczema atópico. Gehrman e colaboradores (2011) demonstraram que *M. sympodialis* libera VEs portadoras de alérgenos capazes de estimular a produção de IL-4 e TNF- α por células mononucleares (PBMC), depletadas de CD14 e CD34, provenientes de pacientes com eczema atópico. Essas novas observações têm implicações na compreensão das interações microrganismo-hospedeiro na patogênese dessa doença [58].

Em *P. brasiliensis* a liberação de VEs também foi identificada por MET e foi demonstrado, a partir de ensaio imunoenzimático, que os anticorpos presentes no soro de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) reagiram fortemente com epítomos de α -galactopiranosil (α -Gal), considerados altamente imunogênicos, que estavam presentes em VEs deste fungo [59]. Corroborando com estas observações, foi demonstrado que as VEs de *P. brasiliensis* estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos além

de induzir a polarização de macrófagos M1, demonstrando a capacidade das VEs em favorecer a atividade fungicida pelos macrófagos [67]. Tomados em conjunto, estes estudos demonstram a importância do papel das VEs de *P. brasiliensis* na interação patógeno-hospedeiro.

As primeiras caracterizações de vesículas extracelulares fúngicas ocorreram em leveduras, no entanto, Silva e colaboradores (2014), identificaram pela primeira vez a produção de VEs por um fungo filamentoso, *A. infectoria*. Dentre as proteínas identificadas nas VEs, foram observadas proteínas que estão envolvidas no metabolismo de polissacarídeos, provavelmente relacionadas à invasão do hospedeiro ou à biossíntese/degradação dos componentes da parede celular, e proteínas nucleares, especialmente enzimas de reparo do DNA. Também foram encontradas enzimas relacionadas à síntese de pigmentos, adesão à célula hospedeira e transporte de vesículas/organelas/moléculas, sugerindo que estas VEs podem desempenhar um papel na virulência de *A. infectoria* [60]. Recentemente, um segundo fungo filamentoso, o *T. interdigitale* teve as suas estruturas vesiculares investigadas. Bitencourt e colaboradores (2018) demonstraram que as VEs de *T. interdigitale* são capazes de estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) e queratinócitos. Além disso, as VEs foram capazes de induzir a polarização de BMDM para M1 e diminuir a expressão de marcadores para M2. Adicionalmente, as VEs aumentaram a capacidade fungicida dos BMDM. A polarização para M1 foi perdida quando observado o efeito das VEs em células de camundongos knockouts para receptor Toll-2, além de não ter sido mais observado a produção das citocinas pró-inflamatórias [62].

Em adição aos estudos mais recentes, foi identificado a produção de VEs por *S. brasiliensis*. Estas estruturas foram capazes de induzir um aumento do índice fagocítico e da carga fúngica em células *in vitro*, desafiadas com *S. brasiliensis*. Além disso, foram capazes de estimular o aumento da produção de IL-12p40 e TNF- α . Quando as VEs foram inoculadas em camundongos, antes de uma infecção subcutânea, os camundongos apresentaram um aumento da carga fúngica e do tamanho da lesão. Esses dados demonstraram que estas VEs de *S. brasiliensis* desempenham um papel importante na virulência e modulação do sistema imune do hospedeiro durante a infecção [61].

Evidências que sugerem o papel de VEs na patogenicidade vieram da identificação de fatores de virulência como parte do conteúdo de VEs. Porém, a virulência não pode ser considerada a única função das VEs, uma vez que, no modelo não patogênico *Sacharomyces cerevisiae*, as VEs liberadas também já foram caracterizadas estruturalmente e como mecanismo de exportação. Análises proteômicas revelaram que as proteínas de *S. cerevisiae* presentes nas VEs estão envolvidas no transporte de moléculas, organização celular e biogênese, metabolismo de carboidratos, resposta ao estresse, dentre outras funções,

suportando o fato de que estas estruturas são de suma importância para a fisiologia da célula [68, 69].

As caracterizações das VEs fúngicas revelaram uma grande variedade de cargas de proteínas que, além de seu papel na virulência, incluem proteínas que possuem papéis no metabolismo celular, transdução de sinal, além de proteínas nucleares e de estrutura [3]. Os dados com relação a liberação de VEs por fungos são bastante recentes e concentram-se, principalmente, em leveduras, enquanto a liberação destas estruturas por fungos filamentosos é pouco explorada. A importância da liberação de VEs por fungos patogênicos sugere que este possa ser também um importante processo em outros organismos de importância médica que ainda não tiveram estas estruturas vesiculares identificadas e caracterizadas, como por exemplo o fungo filamentoso patogênico *Aspergillus fumigatus*.

1.2 O fungo *Aspergillus fumigatus*

O gênero *Aspergillus* compreende fungos ubíquos e saprofíticos que desempenham um importante papel na reciclagem ambiental de carbono e nitrogênio [70]. Seu nicho ecológico principal são o solo e vegetações em decomposição, porém fungos desse gênero podem sobreviver à uma ampla gama de condições ambientais devido à produção de pequenos conídios hidrofóbicos que se dispersam facilmente pelo ar. Esses conídios são produzidos a partir de estruturas reprodutivas assexuais, denominadas de conidióforos. Subsequentemente à sua produção, os conídios começam a intumescer e germinar, formando tubos germinativos que darão origem às hifas, também chamadas de micélio, que são as estruturas vegetativas do *Aspergillus* (Figura 4). As hifas podem aderir-se umas às outras e formar uma matriz extracelular, dando origem a uma estrutura denominada de biofilme [71].

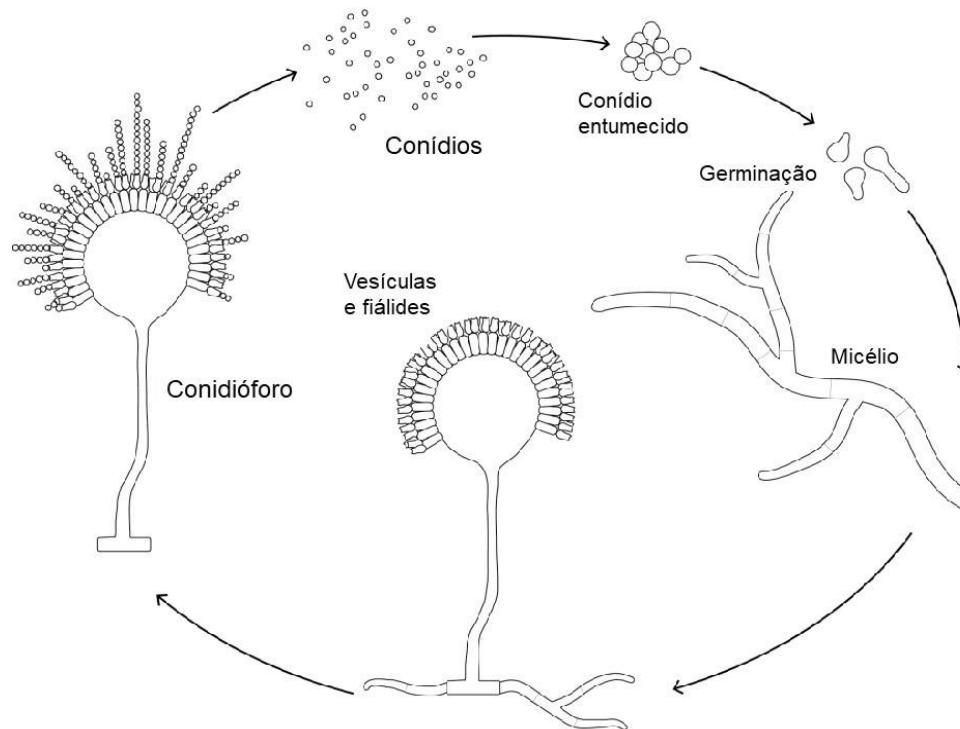


Figura 4: Ciclo assexuado do *Aspergillus fumigatus*. O conidióforo é considerado uma hifa fértil, onde na sua extremidade dilata-se levando a formação de uma vesícula que abriga as fiáldes. As fiáldes são células conidiogênicas que produzem os conídios. Os conídios podem se desprender destas estruturas e, uma vez em condições favoráveis, entumecem e germinam, levando a formação de tubos germinativos, novas hifas e estruturas reprodutivas (www.semanticscholar.org - Adaptado).

O gênero *Aspergillus* inclui cerca de 200 espécies, sendo algumas consideradas importantes patógenos em humanos. As doenças fúngicas podem ir desde infecções superficiais de pele até infecções invasivas a órgãos internos, sendo as infecções superficiais mais comuns e de fácil tratamento. Já as invasivas são menos frequentes, porém podem ser letais. Entre as espécies patogênicas de *Aspergillus*, o *Aspergillus fumigatus* é o principal agente causador de infecções. Não existe uma característica única que determina a patogenicidade de *A. fumigatus*. A sua capacidade de se adaptar a altas temperaturas, ao estresse oxidativo, a limitações de nutrientes, condições de hipóxia, bem como a sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários e secretar enzimas para a absorção de nutrientes, contribuem para a sobrevivência de *A. fumigatus* no interior do corpo humano [72, 73].

Uma das características principais de *A. fumigatus*, que é essencial para sua virulência, é a composição da parede celular. A camada mais externa da parede celular do conídio de *A. fumigatus* é composta por proteínas *rodlet* hidrofóbicas, as quais conferem propriedades de hidrofobicidade aos conídios. Adicionalmente, os conídios possuem uma densa camada de melanina, o que confere pigmentação à camada externa. Estas propriedades favorecem a capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro. A parede

celular dos conídios é composta por α e β -glucanas e quitina. Por outro lado, o micélio não possui a camada externa, e sua parede celular é composta por galactomanana, glicosaminoglicano (GAG), α e β -glucanas e quitina (Figura 5) [74–76].

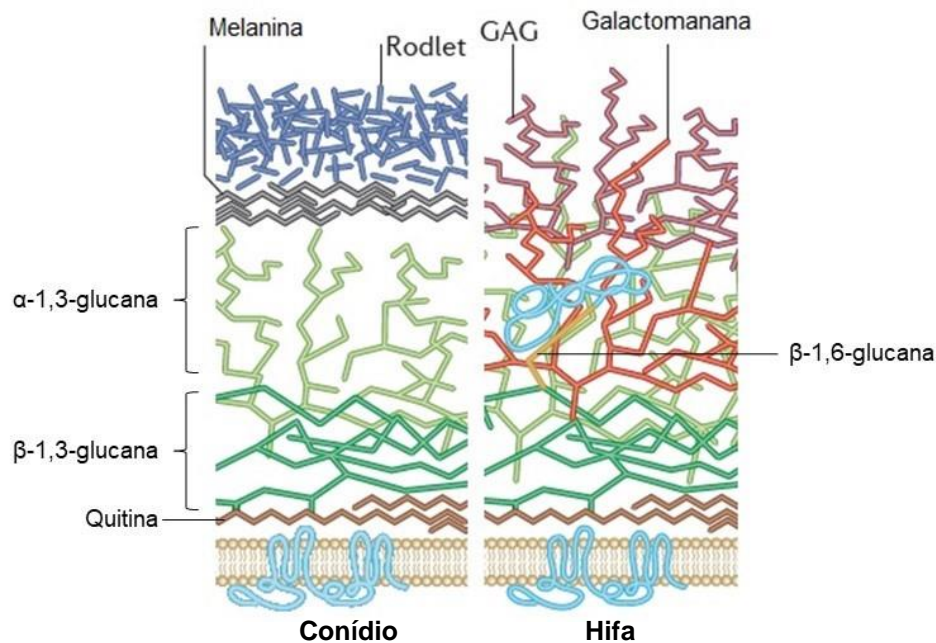


Figura 5: Composição da parede celular do *Aspergillus fumigatus*. Representação da composição e organização estrutural da parede celular de conídio e micélio do *A. fumigatus*. Os conídios de *A. fumigatus* possuem uma camada externa de proteínas *rodlet* hidrofóbicas e uma camada de melanina interna, enquanto a parede celular é constituída de α e β -glucanas e quitina. Já a parede celular do micélio é formada por galactomanana, glicosaminoglicano (GAG), α e β -glucanas e quitina (Erwig et al., 2016 – Adaptado).

O *A. fumigatus* é considerado um importante agente causador de aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergiloma e aspergilose pulmonar invasiva (IPA), particularmente em indivíduos imunocomprometidos [72, 77]. A incidência de AI aumentou substancialmente nos últimos 30 anos devido a inclusão de práticas médicas como, a imunossupressão em pacientes transplantados e tratamentos de quimioterapia nos casos de câncer [78]. A IPA acomete cerca de 15% dos pacientes com transplantes alogênicos, e as taxas de mortalidade associadas à doença variam de 30 a 100%, mesmo com a utilização correta de agentes antifúngicos disponíveis [79, 80].

Ao longo da última década, tem havido uma expansão considerável na pesquisa de drogas antifúngicas e no desenvolvimento de compostos e estratégias dirigidas contra aspergilose. Atualmente os compostos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), disponíveis para o tratamento de IPA, incluem: Anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol e caspofungina [81]. Embora estas drogas antifúngicas sejam eficientes, elas podem desencadear graves efeitos secundários, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade,

considerados fatores limitantes para o tratamento. Além disso, o surgimento de infecções resistentes a estas drogas representa mais um desafio. A resistência ao itraconazol foi relatada pela primeira vez em 1997 a partir de isolados clínicos da Califórnia. O aparecimento de resistência ao itraconazol é considerado um motivo de preocupação, uma vez que o surgimento de resistência cruzada aos demais antifúngicos poderia ser devastador [82, 83]. A terapia a longo prazo do paciente com azol e a aplicação de compostos azóis no ambiente podem levar ao desenvolvimento de mutações no fungo, que conferem resistência a compostos azólicos [84]. Estudos também demonstraram que o tratamento com equinocandinas, como a caspofungina por exemplo, pode levar a resistência a este antifúngico, devido à seleção de alterações fisiológicas mutacionais, ou reversíveis, que diminuem a suscetibilidade a esses agentes antifúngicos [85].

1.2.1 Patogênese e aspectos imunológicos da aspergilose

A principal via de infecção por *A. fumigatus* ocorre pela inalação de conídios presentes no ar seguida pela deposição de conídios nos bronquíolos ou nos espaços alveolares [80]. Os conídios que não são eliminados pela depuração mucociliar encontram células epiteliais ou macrófagos alveolares, que são os fagócitos residentes nos pulmões [72]. Os conídios são eficazmente eliminados em indivíduos saudáveis pela imunidade inata, porém em pacientes imunocomprometidos os conídios podem escapar dessas defesas (Figura 6) [80]. Além disto, estes conídios possuem potentes alérgenos que são responsáveis por diferentes complicações clínicas em indivíduos hipersensíveis [86]. O reconhecimento de *A. fumigatus* por intermédio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células epiteliais e macrófagos alveolares, conduz a formação de uma resposta pró-inflamatória caracterizada pela produção de citocinas e quimiocinas, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2 e IL-8 [72, 87, 88].

O início da resposta pró-inflamatória mediada pelos macrófagos induz o recrutamento de leucócitos de primordial importância para o local da infecção, como os neutrófilos [72, 89]. O recrutamento de neutrófilos é iniciado por mudanças na superfície do endotélio que, por sua vez, aumenta a expressão de moléculas de adesão como E-selectina e P-selectina as quais, a partir da interação com os receptores de neutrófilos, levam à captura dos mesmos para a superfície do endotélio e subsequente rolamento na direção do fluxo sanguíneo [90]. Após o rolamento, os neutrófilos aderem firmemente ao endotélio a partir de integrinas leucocitárias, como β 1 e β 2, com moléculas de adesão (ICAMs e VCAMs) presentes na superfície das células endoteliais. A fase final da migração, conhecida como diapedese ou transmigração, culmina na passagem da célula leucocitária através das células endoteliais para o local da infecção [89].

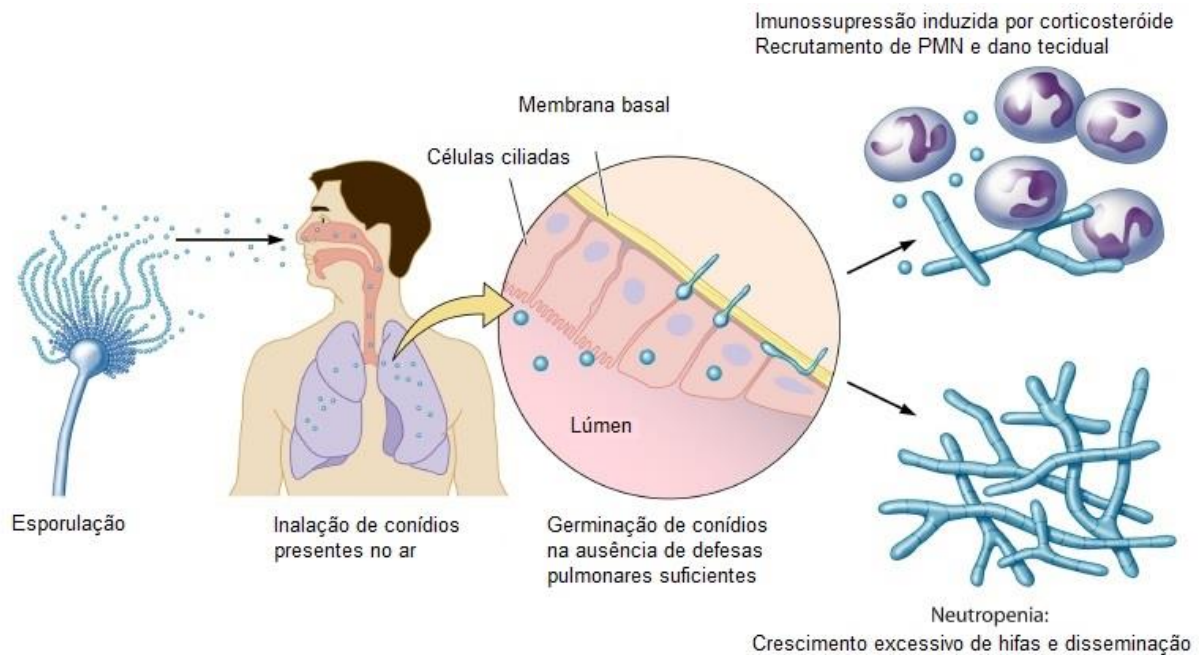


Figura 6: Ciclo de infecção do *A. fumigatus* em indivíduos imunocomprometidos. A reprodução assexuada de *A. fumigatus* leva a dispersão de conídios pelo ar. A inalação de conídios por imunossuprimidos resulta no estabelecimento de conídios nos pulmões, germinação e controle significativo mediado por células polimorfonucleares (PMN). Na ausência de PMN em indivíduos imunocomprometidos, ocorre um crescimento descontrolado de hifas e, em casos mais graves, a disseminação (Dagenais e Keller, 2009 – Adaptado).

De maneira semelhante aos macrófagos, os neutrófilos utilizam vários PRRs para reconhecer e responder ao *A. fumigatus*, incluindo receptores do tipo *Toll* (TLRs) e dectina-1 [72]. Os neutrófilos são considerados as principais células de defesa contra as hifas devido a sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de conteúdo granular e formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET). Desta forma, indivíduos neutropênicos, devido a tratamentos imunossupressores em casos de câncer e transplante de órgãos, estão especialmente mais propensos a infecções provocadas por diferentes patógenos, como *A. fumigatus* [72, 76, 91–93].

O papel crítico destas células foi destacado em diversos estudos onde foi demonstrado que a depleção de fagócitos mononucleares acelera a proliferação de fungos nos tecidos e conferem um aumento da mortalidade. Além disso, a depleção de neutrófilos em camundongos é capaz de conferir uma maior mortalidade e estabelecimento de IPA nos animais [76, 94]. Mircescu e colaboradores (2009) demonstraram que a depleção de macrófagos, em camundongos, antes da infecção por *A. fumigatus* culminou em um recrutamento normal de neutrófilos e uma restrita invasão tecidual pelas hifas. Em contraste, animais que tiveram a depleção de neutrófilos antes, ou dentro de 3 horas após a infecção, apresentaram uma alta mortalidade [95].

Os fungos detectados pelas células da imunidade inata levam à produção de citocinas, recrutamento de diferentes células do sistema imune inato e, podem também, desencadear respostas imunes adaptativas. A exposição aos conídios de *A. fumigatus* leva ao desenvolvimento de diversas respostas por linfócitos T CD4⁺, que incluem células T auxiliares (Th1, Th2 e Th17). Vários fatores contribuem para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ por *A. fumigatus*, incluindo a frequência de exposição e o tipo de antígeno [96]. Estudos demonstraram que camundongos desafiados repetidamente com conídios de *A. fumigatus* apresentaram um predomínio de IgE, eosinófilos e IL-4, que são característicos de Th2, o que contribui para o desenvolvimento de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) [97, 98]. Uma resposta Th2 exagerada está associada a uma reação inflamatória prejudicial como a eosinofilia, aumento da produção do muco e troca de classe de imunoglobulina para IgE [99]. Exposições repetidas em modelo murino de *A. fumigatus* também podem resultar em um aumento no recrutamento de células Th17 [96]. Estudos indicam que uma resposta Th17 pode estar diretamente envolvida em doença fúngica alérgica [100]. Murdock e colaboradores (2012) demonstraram que camundongos *knockout* para IL-17, desafiados repetidamente com conídios de *A. fumigatus*, apresentaram uma atenuação da inflamação e redução significativa de eosinófilos. Por outro lado, em modelos de exposição única, a resposta específica para *A. fumigatus* consiste em uma resposta predominantemente Th1 [96]. O papel protetor da resposta Th1 durante infecção por *A. fumigatus* foi demonstrado, tanto em pacientes imunocomprometidos [101, 102], quanto em camundongos neutropênicos, devido a sua capacidade de neutralizar citocinas induzidas por uma resposta Th2 [103].

O aumento da incidência de doenças fúngicas ao longo das últimas décadas tem reforçado o interesse em compreender os mecanismos pelos quais a doença é prevenida em indivíduos normais e métodos para a modulação imunológica que podem proteger os indivíduos susceptíveis [104]. Em 2005, Nierman e colaboradores realizaram o sequenciamento da linhagem Af293 de *A. fumigatus*. O estudo revelou 9.926 genes que estão envolvidos em diferentes funções, como: manutenção do fungo, sobrevivência e patogenicidade [105]. Os genes envolvidos na patogenicidade estão relacionados a termotolerância, composição e manutenção da parede celular, resistência à resposta imune, toxinas, absorção de nutrientes no crescimento invasivo, sinalização, regulação metabólica, resposta a condições de stress e alérgenos [106]. Muitos destes genes identificados, principalmente relacionados à virulência, estão envolvidos na produção de moléculas que ocupam diferentes regiões do fungo, bem como aquelas que são secretadas para o espaço extracelular [75, 106, 107]. Muitas destas moléculas já possuem suas funções descritas, em estudos que comparam um organismo mutante ao selvagem. O que ainda não se sabe é se estas moléculas estão envolvidas em processos ainda não conhecidos de *A. fumigatus*, como

a sua presença em VEs liberadas, uma vez que ainda não existem estudos descrevendo este tipo de processo neste fungo.

2. JUSTIFICATIVA

A liberação de VEs é considerada um processo evolutivamente conservado tanto em procariotos quanto eucariotos. Nas últimas décadas tem sido descrito que as VEs possuem um papel na secreção de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. O interesse em estudar estas estruturas cresceu por acreditar-se que a liberação de VEs proporciona um meio de comunicação intercelular e transmissão de macromoléculas entre células. Além disso, em bactérias e microrganismos eucarióticos, as VEs desempenham um importante papel na liberação de fatores de virulência para o meio extracelular contribuindo na interação patógeno-hospedeiro [6, 108].

Estudar as VEs produzidas pelos diferentes organismos é uma estratégia particularmente promissora para a compreensão de como a composição destas estruturas auxiliam na sobrevivência do microrganismo e na patogenicidade no hospedeiro. Bactérias, micobactérias, mamíferos, parasitas e fungos já possuem seus primeiros estudos de identificação e caracterização de VEs. Porém, para o fungo *A. fumigatus* ainda não existem estudos identificando e caracterizando a liberação destas estruturas. Embora a identificação de VEs seja recente, principalmente no Reino Fungi, as evidências encontradas até o momento concentram-se em leveduras, enquanto para fungos filamentosos suas funções permanecem pouco exploradas. Considerando o papel fisiológico e na virulência das VEs em outros fungos, sugere-se que a liberação destas estruturas possa ser também um importante mecanismo de secreção de moléculas em *A. fumigatus*, uma vez que este é considerado um importante patógeno em indivíduos imunocomprometidos [72, 77]. Portanto, caracterizar as VEs e investigar a sua função em *A. fumigatus* é importante para o entendimento dos mecanismos de comunicação célula-célula e célula-hospedeiro durante infecções por este microrganismo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar as vesículas extracelulares do fungo filamentosso patogênico *Aspergillus fumigatus* e avaliar como estas estruturas afetam fagócitos isolados e o sistema imunológico do hospedeiro mamífero.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1: Isolamento, caracterização e avaliação dos efeitos das VEs de *A. fumigatus* em fagócitos, *in vitro* - Artigo

- Padronizar as condições de isolamento de VEs liberadas por *A. fumigatus*;
- Caracterizar estruturalmente as VEs;
- Identificar o conteúdo proteico e de ergosterol;
- Avaliar o potencial de imunogenicidade das VEs utilizando soro de camundongo infectado por *A. fumigatus*;
- Avaliar a atividade das VEs, *in vitro*, em células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos).

Capítulo 2: Avaliação dos efeitos das VEs de *A. fumigatus* *in vivo*

- Padronizar as condições de imunização de camundongos com VEs isoladas da cultura de *A. fumigatus*;
- Avaliar a resposta inflamatória após infecção por *A. fumigatus*;
- Avaliar a capacidade de depuração fúngica dos animais imunizados, após a infecção por *A. fumigatus*.

Capítulo 3: Participação da via ESCRT na biogênese das VEs de *A. fumigatus*

- Avaliar a regulação da expressão gênica da via de produção de VEs, ESCRT, em *A. fumigatus*.



Characterization of *Aspergillus fumigatus* Extracellular Vesicles and Their Effects on Macrophages and Neutrophils Functions

Jéssica Amanda Marques Souza¹, Ludmila de Matos Baltazar², Virginia Mendes Carregal³, Ludmila Gouveia-Eufrazio⁴, André Gustavo de Oliveira⁵, Wendell Girard Dias⁶, Marina Campos Rocha⁷, Kildare Rocha de Miranda⁸, Iran Malavazi⁷, Daniel de Assis Santos⁴, Frédéric Jean Georges Frézard³, Daniele da Glória de Souza², Mauro Martins Teixeira⁹ and Frederico Marianetti Soriani^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Maurizio Sanguinetti,
Catholic University of the Sacred
Heart, Italy

Reviewed by:

Francoise Botterel,
Université Paris-Est Créteil Val de
Marne, France
Roberta Gaziano,
University of Rome Tor Vergata, Italy

*Correspondence:

Frederico Marianetti Soriani
fredsori@icb.ufmg.br;
fredsori@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 July 2019

Accepted: 16 August 2019

Published: 04 September 2019

Citation:

Souza JAM, Baltazar LdM, Carregal VM, Gouveia-Eufrazio L, Oliveira AGd, Dias WG, Rocha MC, Miranda KRd, Malavazi I, Santos Dda, Frézard FJG, Souza DdGd, Teixeira MM and Soriani FM (2019) Characterization of *Aspergillus fumigatus* Extracellular Vesicles and Their Effects on Macrophages and Neutrophils Functions. *Front. Microbiol.* 10:2008. doi: 10.3389/fmicb.2019.02008

¹ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Lab Circuitos Fisiológicos, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁷ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, ⁸ Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁹ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Extracellular vesicles (EVs) has been considered an alternative process for intercellular communication. EVs release by filamentous fungi and the role of vesicular secretion during fungus-host cells interaction remain unknown. Here, we identified the secretion of EVs from the pathogenic filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*. Analysis of the structure of EVs demonstrated that *A. fumigatus* produces round shaped bilayer structures ranging from 100 to 200 nm size, containing ergosterol and a myriad of proteins involved in REDOX, cell wall remodeling and metabolic functions of the fungus. We demonstrated that macrophages can phagocytose *A. fumigatus* EVs. Phagocytic cells, stimulated with EVs, increased fungal clearance after *A. fumigatus* conidia challenge. EVs were also able to induce the production of TNF- α and CCL2 by macrophages and a synergistic effect was observed in the production of these mediators when the cells were challenged with the conidia. In bone marrow-derived neutrophils (BMDN) treated with EVs, there was enhancement of the production of TNF- α and IL-1 β in response to conidia. Together, our results demonstrate, for the first time, that *A. fumigatus* produces EVs containing a diverse set of proteins involved in fungal physiology and virulence. Moreover, EVs are biologically active and stimulate production of inflammatory mediators and fungal clearance.

Keywords: extracellular vesicles, filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*, host-pathogen interactions, macrophages, neutrophils

INTRODUCTION

Intercellular communication is a crucial process that occurs from simple organisms, as bacteria, up to complex organisms, including mammals. Communication can happen by direct interaction between cells or by secretion of molecules that act directly to coordinate cellular functions (Nilsen-Hamilton and Hamilton, 1982; Yoon et al., 2014; Yáñez-Mó et al., 2015). Recently, the release of extracellular vesicles (EVs) has been associated with the process of intercellular communication (Yoon et al., 2014). EVs are structures secreted by cells and formed by a lipid bilayer membrane, forming a lumen containing a specific burden of biomolecules, for example, proteins, lipids, polysaccharides and nucleic acids (Yoon et al., 2014). Release of EVs offers simultaneous delivery of many different messenger molecules and may be able to reach sites distant from vesicular origin (Yáñez-Mó et al., 2015).

There is now substantial evidence to suggest that EVs may be key-mediators of the pathogenesis of infections caused by bacteria, parasites, virus and fungi (Joffe et al., 2016). These vesicles may cause host cell death, elicit immune response, and in some cases, confer protection against diseases (Brown et al., 2015). For example, in prokaryotes, molecules able to confer cytotoxicity to host cells, factors responsible for biofilm production and antibiotic resistance have been identified in EVs (Kuehn and Kesty, 2005). In *Escherichia coli*, α -hemolysin fractions were identified inside EVs and were shown to be relevant in red blood cells lysis (Balsalobre et al., 2006). Similarly, *Staphylococcus aureus* EVs may induce cytotoxicity and are able to induce apoptosis *in vitro* cells (Gurung et al., 2011). *Mycobacterium tuberculosis* EVs are able to stimulate the cytokine and chemokine *in vitro* production, and favor the pathogen infection *in vivo* model (Prados-Rosales et al., 2011).

It has been demonstrated that fungi are able to produce biologically active EVs under culture and during infection (Rodrigues et al., 2007; Albuquerque et al., 2008; Gehrmann et al., 2011; Vallejo et al., 2011; Silva et al., 2014; Bitencourt et al., 2018; Ikeda et al., 2018). The characterizations of fungal EVs revealed great variety of molecules with biological function as lipids, polysaccharides and nucleic acids. Besides that, it was also identified proteins known to participate in virulence, cellular metabolism, signal transduction, and nuclear and structure proteins (Albuquerque et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Vallejo et al., 2011; Silva et al., 2014, 2015; Brown et al., 2015; Gil-Bona et al., 2015; Vargas et al., 2015; Ikeda et al., 2018). For example, *C. neoformans* EVs are able to stimulate immunomodulatory mediators by phagocytes and increase fungal clearance (Oliveira et al., 2010). This immunomodulatory role was also observed in EVs released by *C. albicans*, in which the vesicles were able to stimulate innate and adaptive response and trigger an increase in fungal clearance (Vargas et al., 2015).

Of interest, most studies have characterized EVs in yeast, while the release and characterization of these structures in filamentous fungi, such as *Aspergillus fumigatus*, have been poorly explored. *A. fumigatus* is a filamentous, ubiquitous and saprophytic fungus of significant medical importance to humans (Latgé, 1999).

To the best of our knowledge, the production, secretion and function of EVs in *A. fumigatus* has not been described. Considering the capacity of EVs to contribute to the pathogenesis of various fungal infection, we characterized and investigated the immune effects of *A. fumigatus* EVs. Our results demonstrated that the EVs are released by *A. fumigatus* and their production is affected by the time of growth. We also identified that EVs are able to stimulate phagocytes and improve the phagocytic capacity and fungal clearance by these cells.

MATERIALS AND METHODS

Culture Conditions

The *A. fumigatus* A1163 strain was used to EVs isolation. This strain is derived from *A. fumigatus* CEA17, a strain converted in *pyrG+* by the insert of *Aspergillus niger pyrG+* gene. CEA17 strain is a uracil auxotrophic strain from *A. fumigatus* clinical isolate CEA10 (Fedorova et al., 2008). To standardize EVs production, 1×10^7 conidia from *A. fumigatus* were inoculated in 50 mL of YG medium (0.5% w/v yeast extract powder; 2% w/v glucose; 0.1% v/v trace elements). Conidia were incubated for 24, 48, 72, 96, and 120 h under 120 rpm at 37°C. The mycelia was filtered in paper filter, then dried and weighed. After standardizing the time of culture, inoculums were made in 1 L of culture.

EVs Isolation

The isolation of EVs was performed according to Rodrigues and colleagues (Rodrigues et al., 2007), adapted. At each time point, the mycelium was separated from supernatant by filtration using paper filter. Supernatant was filtered using a 0.45 μ m filter (Sartorius) and concentrated up to 25 mL Amicon ultra-concentration system (cutoff 100 KDa, Millipore). The concentrated supernatant was centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C. The pellet of EVs was washed with phosphate-buffered saline 1X (PBS) and centrifuged in the same conditions. Pellet was resuspended in 260 μ L PBS 1X, treated with Protease Inhibitor Cocktails 10X (Sigma) in 1:100 and stored at -80°C (Figure 1).

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Quantity and distribution of EVs size were measured by NTA, using the Nanosight appliance (Malvern Instruments) and NTA 3.0 software. NTA is a technic of optical dispersion to determine the distribution of size, in a nanometer scale, of particles in a solution. The appliance allows a direct individual light dispersion visualization of particles illuminated by a laser beam (Rupert et al., 2017).

Transmission Electronic Microscopy (TEM)

TEM was used to visualize the EVs from supernatant of *A. fumigatus* culture. Pellets obtained from six independent preparations were fixed with glutaraldehyde 2.5% v/v + 4% v/v formaldehyde in sodium cacodylate buffer 0.1 M; pH 7.2. Next, samples were washed in PBS and incubated for

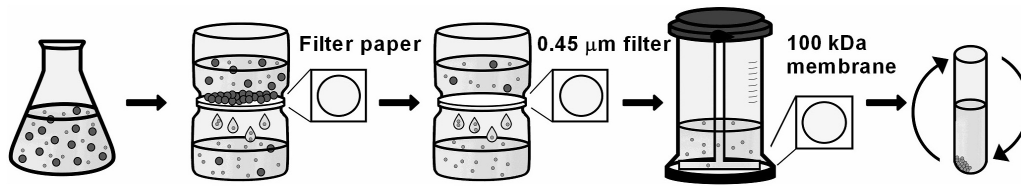


FIGURE 1 | Experimental strategy to isolate EVs. 2×10^8 conidia/L were inoculated in YG media for 48, 72, 96, and 120 h at 37°C. After mycelium filtration with paper filter, the supernatant was filtered in a 0.45 µm membrane to retain reminiscent cells. Then, the flow-through was concentrated using a 100 kDa membrane. The supernatant was concentrated at 100,000 g to isolate the vesicles pellet.

60 min in 1% osmium, dehydrated in ethanol series, and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections (70 nm) were obtained in Leica UC7 ultramicrotome and contrasted with 5% w/v uranyl acetate for 20 min and 0.5% w/v lead citrate for 5 min. Samples were observed in a JEOL 1200EX transmission electron microscope operating at 80 kV (Rodrigues et al., 2007; Albuquerque et al., 2008).

Proteins and Ergosterol Quantification

Proteins were quantified using Bradford reagent (Bio-Rad) at 595 nm, using a standard curve (5–30 µg/µL) of Bovine Serum Albumin (BSA). Ergosterol was quantified by modifications of Vargas and colleagues protocol (Vargas et al., 2015). Briefly, speedvac dried EVs were resuspended in 50 µL methanol. It was added 450 µL of chloroform, homogenated and centrifuged at 18,000 g for 5 min. The supernatant dried in speedvac and resuspended in 200 µL of absolute ethanol. The quantification was done by colorimetry using a calibration curve (0.5–1.024 µg/mL) of ergosterol, at 282 nm.

Animals

Experiments in mice were approved by the ethics committee (Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-255/2018) of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). All experiments were performed in accordance with international guidelines and regulations. Ten to twelve weeks mice C57BL/6 were infected with 2×10^7 conidia of *A. fumigatus* A1163, once a week, during 3 weeks. One week after the last infection, serum of animals was obtained and stored at -20°C . Animals were euthanized in order to remove tibia and fibula bones. These bones were washed with RPMI medium in order to obtain bone-marrow for neutrophils isolation. The content was centrifuged at 430 g for 10 min at 4°C . After that, red blood cells were lysed with ACK Lysis buffer and cells were centrifuged again in the same conditions. Histopaque 1077-1 (Sigma) (1:1) was used to separate the polymorphonuclear cells, prior to their centrifugation at 430 g for 30 min at 4°C .

SDS-PAGE and Immunoblotting

Two µg of proteins of EVs were resuspended in sample buffer (Tris-HCl 0.5 M; Glycerol; SDS 10% w/v; β-mercaptoethanol; blue of bromofenol), and resolved in SDS-PAGE 12%. The total proteins profile was stained by silver.

For immunoblotting, 2 µg of proteins of EVs were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking with 5% w/v skimmed milk the membrane was

incubated with serum from mice stimulated with *A. fumigatus* (1:10). After overnight incubation, anti-mouse IgG-HRP secondary antibody (Santa Cruz) was added for 1 h in room temperature. The membrane revealed with Luminata solution (Luminata Classico Western HRP Substrate, Millipore). Cropping, faint background, contrast and colors edition were done using Photos software from Windows 10.

Proteomic Analysis by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

The lyophilized samples digested using ProteaseMAX stock (Promega) and 2 µg of trypsin. After digestion with trypsin was used µ-C18 ZipTip (Merck Millipore) for cleaning up peptide samples. After, the samples were dried in speedvac and used for the analysis.

An Easy-nLC 1200 system (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, United States) was coupled to an Orbitrap Fusion Lumos instrument equipped with a nanospray source (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, United States). Nano-LC solvents were water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile: water (80:20) with 0.1% formic acid (B) and the flow rate was 300 nL/min. Samples (3 µL) were injected onto a trapping column (Acclaim PepMap 0.075 mm, 2 cm, C18, 3 µm, 100 Å; Thermo) in line with a Nano-LC column (Acclaim PepMap RSLC (0.075 mm, 15 cm, C18, 2 µm, 100 Å; Thermo). The sample was loaded in the trap column and washed with 20 µL of solvent A at constant pressure (500 bar). After that, the sample was eluted to the column using a flow of 300 nL/min.

MS/MS analyses were conducted in the ESI⁺ mode. The instrument settings included the spray voltage at 1950 kV, capillary temperature at 300°C, and S-Lens RF level at 30%. A full-scan event was performed in profile mode over the mass range of m/z 400–1600 at a resolution of 120,000 followed by MS/MS analyses in a cycle time of 3 s. High-collision dissociation (HCD) with a normalized collision energy set at 30% was used for fragmentation. The resulting MS/MS fragment ions were detected in the mass range of m/z 100–2000 using the Orbitrap mass analyzer at a resolution of 30,000 using centroid mode. An AGC target of $5e^4$ and a maximum injection time of 54 ms were used.

A. fumigatus databank available at UniProt¹ were loaded into MaxQuant (Tyanova et al., 2016) and used to identify the protein

¹<https://www.uniprot.org>

content on EVs. A combined list of proteins identified in all independent replicates ($n = 3$) were generated.

Phagocytic and Clearance Ability of Immune Cells After Stimulation With Vesicles

Macrophages RAW 264.7 were cultivated in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), supplemented with Fetal Bovine Serum 10% v/v (FBS). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. 5×10^4 macrophages were stimulated for 5 h with *A. fumigatus* EVs in a final amount of 0.1; 0.2; or 0.4 µg of proteins. After stimulation period, 5×10^5 conidia of A1163 strain (Multiplicity of Infection – MOI 10:1) were added to cell culture. Content of wells was collected after 6 h of stimulus. Macrophages were washed with 1X PBS to remove the non-phagocytosed conidia, lysed with sterile water, and conidia were plated in YAG medium to quantify the colony forming units (CFU).

To evaluate phagocytosis, 5×10^4 macrophages were stimulated for 5 h with EVs in a final amount of 0.4 µg of proteins. 5×10^5 conidia of A1163 strain (MOI 10:1) were added to cell culture. After 4 and 6 h of stimulus, supernatant was collected, cells were stained with Quick Panoptic (Laborclin).

The capacity of fungal clearance by cells stimulated with EVs was also evaluated in neutrophils. 5×10^5 neutrophils (BMDN) were stimulated for 3 h with EVs in a final amount of 0.4 µg of proteins, at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. 5×10^5 conidia (MOI 1:1) were added to culture of cells. After 3 h of challenge, content of wells was collected, neutrophils were lysed with sterile water and the reminiscent conidia were plated in YAG medium to quantify the CFU.

To evaluate phagocytosis, 5×10^5 neutrophils were stimulated for 3 h with EVs (0.4 µg of proteins). 2.5×10^6 conidia of A1163 strain (MOI 5:1) were added to neutrophil culture. After 3 h, supernatant was collected and submitted to a citospin for 5 min at 35 g, the slides were stained with Quick Panoptic (Laborclin). Non-stimulated cells, cells stimulated only with EVs and cells challenged only with the fungus were used as control.

Confocal Microscopy

5×10^5 macrophages RAW 264.7 were plated in a 24 wells plate. The cells were incubated with CellMask Green (Thermo Fisher Scientific) in order to stain them, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, for 10 min. *A. fumigatus* EVs were treated with 3 µM of DiI_{C18} (Thermo Fisher Scientific) for 1 h. EVs were washed one time with PBS 1X, resuspended in DMEM medium and co-incubated with macrophages for 30 min (Nicola et al., 2009; Oliveira et al., 2010). After this period, well was washed 3 times with DMEM medium and the slice submitted to confocal microscopy (4X zoom, increase of 20X).

Cytokines Measurement

Supernatant of cells stimulated with EVs and challenged with *A. fumigatus* were obtained and the levels of pro-inflammatory cytokines and chemokine TNF-α, IL-1β, IFN-γ, and CCL2, and

the modulatory cytokine IL-10 were evaluated, according to manufacturer instructions (R&D Systems).

Statistical Analysis

Statistical differences among experimental groups were determined by one way analysis of variance (One Way-ANOVA), followed by Tukey post-test. Results involving two experimental groups were analyzed by t Student test. All data was considered statistically significant if $p < 0.05$. Statistical analysis were realized using the GraphPad Prism 6 software.

RESULTS

A. fumigatus Produce EVs During Growth

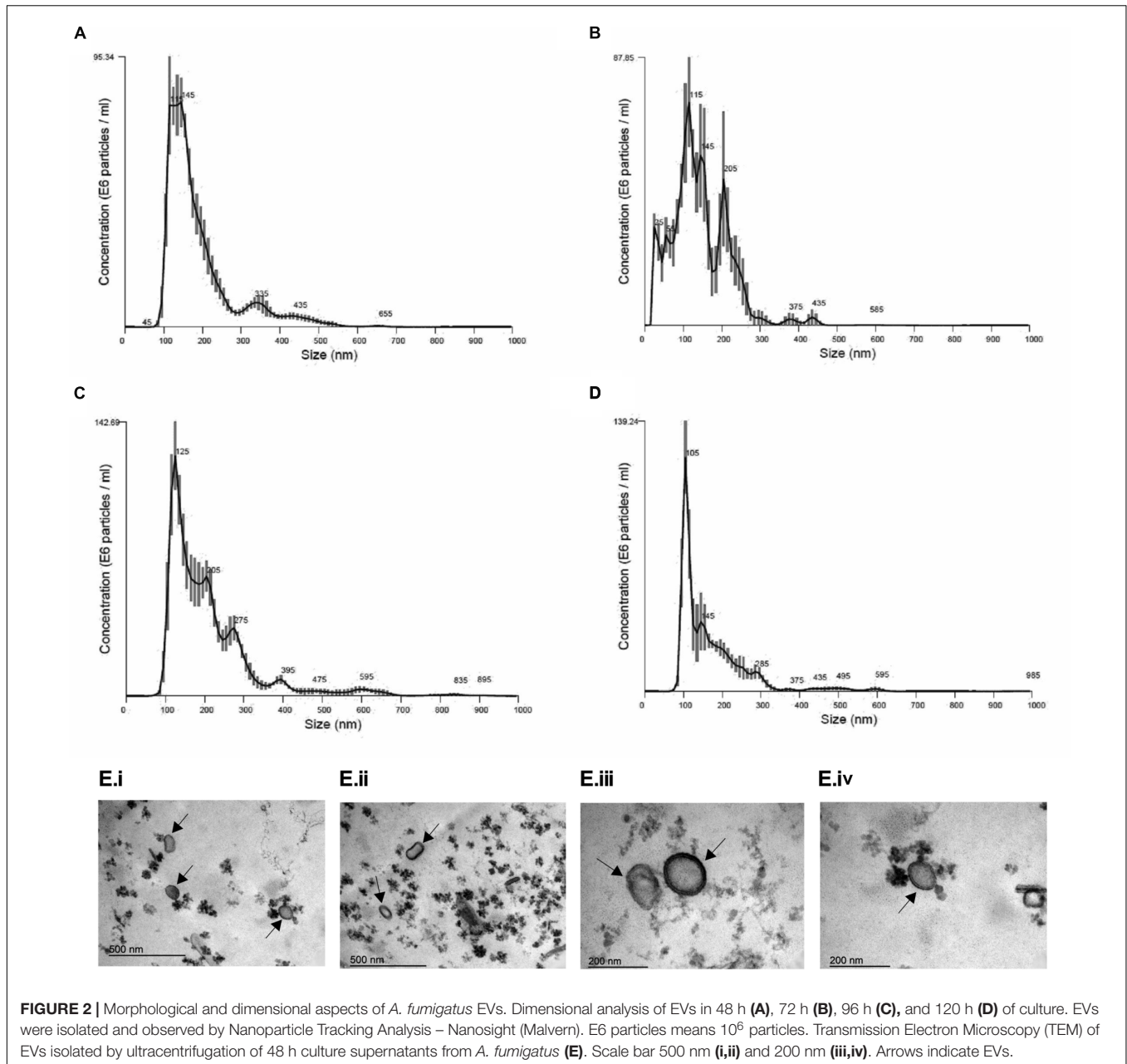
In order to establish conditions of growth and production of EVs, we analyzed different culture time points (24, 48, 72, 96, and 120 h at 37°C). It was observed that fungal mass increased exponentially until 72 h and the growth speed decreased after that (**Supplementary Figure S1**), suggesting this time point was the beginning of the stationary phase. Based on the *A. fumigatus* growth curve, we analyzed the size and yield of EVs production. We observed that the yield of EVs production was similar in all time points (**Table 1**). Besides that, *A. fumigatus* produced a majority amount of EVs with average size between 100 and 200 nm and a minor population of EVs varying from 300 to 595 nm (**Figures 2A–D**). Further experiments were conducted using fungi collected at 48 h of culture, as this was optimal in terms of growth, time of incubation and yield. Using these 48 h cultures, Transmission Electronic Microscopy (TEM) analysis revealed the presence of spherical structures displaying electrodense bilayers, characteristics of EVs. Quantification showed that these isolated EVs had the same average diameter as demonstrated by NTA (**Figure 2E**).

A. fumigatus EVs Composition

In order to investigate the profile of protein content in *A. fumigatus* EVs, a silver stained SDS-PAGE was performed. **Figure 3A** shows the electrophoretic resolved profile of protein content in the EVs demonstrating at least 9 major bands of proteins varying from 50 to 250 kDa (**Supplementary Figure S2**). These proteins were transferred to nitrocellulose membrane and incubated with total serum obtained from mice previously infected with *A. fumigatus*. Serum reactive proteins of approximately 37–150 kDa were found in *A. fumigatus* EVs (**Figure 3B** and **Supplementary Figure S3**).

TABLE 1 | Concentration of EVs released by *A. fumigatus* in different periods of culture.

NTA analysis	
Period of culture (h)	Concentration (particles/mL)
48	$8.56 \times 10^9 \pm 3.76 \times 10^8$
72	$8.91 \times 10^9 \pm 4.91 \times 10^8$
96	$1.33 \times 10^{10} \pm 3.51 \times 10^8$
120	$6.67 \times 10^9 \pm 3.93 \times 10^8$

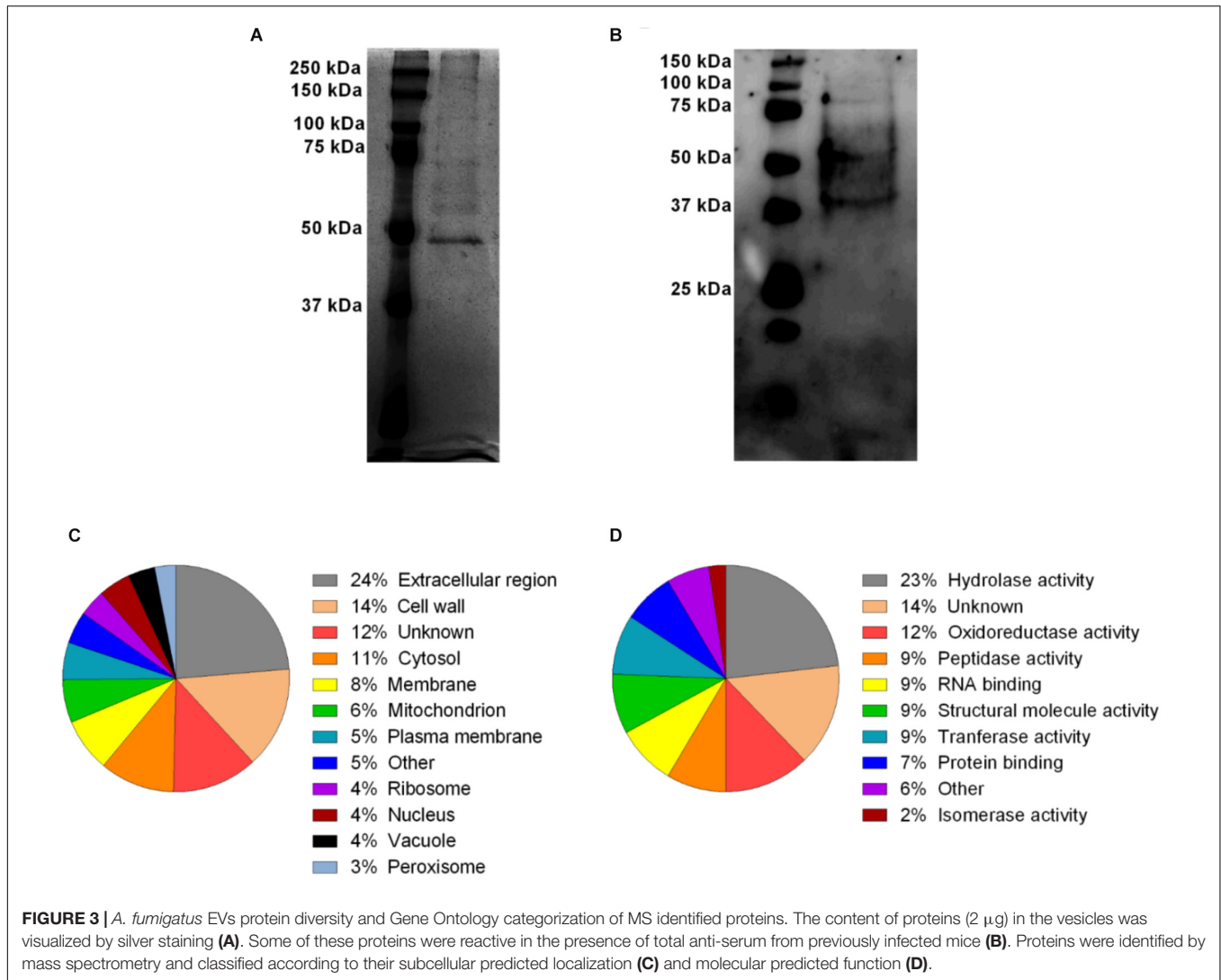


Considering that the protein profile in *A. fumigatus* EVs is unknown, the protein composition was identified using proteomics. According to our analysis, 60 proteins were identified (Table 2). The cellular composition and the molecular and biological functions proposed for these proteins are shown in Supplementary Table S1. Using the UniProt² and AspGD³ databases, proteins were classified according to their predicted cellular localization and molecular putative functions in the fungal cells (Figures 3C,D), and included hydrolases, oxydoreductase, peptidases, tranferases, RNA/carbohydrate/protein binding, structural activity,

isomerases and phosphatases. The proteins were also classified according to cellular localization. The identified proteins were associated to the extracellular region (24%), cell wall (14%), cytosol (11%), membrane (8%), mitochondrion (6%), plasma membrane (5%), ribosome (4%), nucleus (4%), vacuole (4%) and peroxisome (3%) (Figure 3C). The proteins were also classified according to their biological function. The majority of vesicular proteins classified were associated to carbohydrate metabolic processes and response to cellular stress, and also to proteins associated to pathogenesis (Supplementary Table S1). The presence of proteins with antigenic potential, in association with pathogenesis and host response stimulation in EVs proteome, led us to investigate if the *A. fumigatus* EVs were able to stimulate macrophages and neutrophils, as competent phagocytes.

²<https://www.uniprot.org/>

³<http://www.aspgd.org/>



Ergosterol is the main lipid in fungal membranes and its content is also important to maintain plasma membrane integrity in EVs. Results demonstrated that in 1.5×10^{10} *A. fumigatus* EVs particles there were 13.5 μ g of ergosterol.

***A. fumigatus* EVs Are Recognized by Macrophages and Promote an Increase of Fungicide Capacity and Production of Inflammatory Mediators**

EVs are known to modulate host responses and function as virulence factors. In order to identify the effects of *A. fumigatus* EVs in phagocytes, macrophages were stimulated with different amounts of EVs and challenged with *A. fumigatus*. Results demonstrated that 0.1 and 0.2 μ g of EVs (measured as total protein content) were not able to induce *A. fumigatus* clearance by macrophages (Figure 4). However, 0.4 μ g of EVs were very effective in stimulating the clearance of conidia by macrophages, leading to more than 50% killing of conidia after challenge. When compared to the

positive control, the stimulation of phagocytes with 0.4 μ g of EVs was able to double the killing effector functions of macrophages (Figure 4).

In order to verify whether the mechanisms of fungal recognition and internalization by macrophages were affected by EVs, the phagocytic capacity of macrophages previously stimulated with *A. fumigatus* EVs was evaluated. After 5 h incubation, results demonstrate that EVs were able to increase phagocytosis by approximately 12% in comparison to macrophages not exposed to EVs (Figure 5A). In addition, complementary analysis showed that the number of phagocytosed conidia in the EVs stimulated macrophages was higher than in the control group (Figure 5B). Macrophages from both groups (non-EVs or EVs stimulated) demonstrated an equivalent phagocytic capacity, in terms of internalizing 1, 2, 3, or 4 conidia per macrophage. On the other hand, the presence of EVs was able to induce macrophages capacity to internalize conidia as seen by an increase of almost 50% in the number of macrophages with more than 4 fungal cells inside cells (Figure 5C).

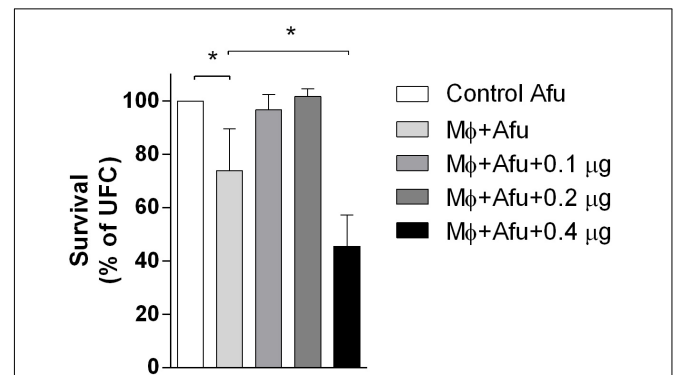
TABLE 2 | List of protein groups identified by proteomic analysis of extracellular vesicles from *A. fumigatus*.

Protein group number	<i>A. fumigatus</i> genome database accession number	Protein name
1	AFUB_063700	Glutamate dehydrogenase
2	AFUB_016770	Uncharacterized protein
3	AFUB_063890	Ecm33
4	AFUB_096050	Allergen Asp F3 (Peroxiredoxin family protein)
5	AFUB_037910	Ubiquitin (UbiC), putative
6	AFUB_015530	Extracellular cell wall glucanase Crf1/allergen Asp F9
7	AFUB_066130	Aminopeptidase
8	AFUB_094680	FAD/FMN-containing isoamyl alcohol oxidase MreA
9	AFUB_094730	IgE-binding protein, putative
10	AFUB_097210	Carboxypeptidase
11	AFUB_095500	GPI anchored protein, putative
12	AFUB_005920	Glycogenin
13	AFUB_002680	Uncharacterized protein
14	AFUB_099560	Tripeptidyl-peptidase (TppA), putative
15	AFUB_004489	FG-GAP repeat protein, putative
16	AFUB_045170	Cell wall protein phiA
17	AFUB_048140	Extracellular phytase, putative
18	AFUB_020900	Allergen Asp F4
19	AFUB_022370	1,3-beta-glucanosyltransferase gel4
20	AFUB_052010	Nucleoside diphosphate kinase
21	AFUB_052060	Thioredoxin reductase, putative
22	AFUB_052270	Class III chitinase ChiA1
23	AFUB_050860	Major allergen Asp F1
24	AFUB_052690	Molecular chaperone Mod-E/Hsp90
25	AFUB_085650	Endo-chitosanase
26	AFUB_046050	Alpha,alpha-trehalose glucohydrolase TreA/Ath1
27	AFUB_048180	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase eglC
28	AFUB_047510	Extracellular conserved serine-rich protein
29	AFUB_047560	FAD-dependent oxygenase, putative
30	AFUB_037350	Phosphoglucomutase PgmA
31	AFUB_050510	BYS1 domain protein, putative
32	AFUB_040810	Aspartyl aminopeptidase
33	AFUB_010890	1,3-beta-glucanosyltransferase Bgt1
34	AFUB_023440	60S ribosomal protein L18
35	AFUB_018250	1,3-beta-glucanosyltransferase gel1
36	AFUB_009540	Adenosylhomocysteinase
37	AFUB_066060	GPI anchored cell wall protein, putative
38	AFUB_087520	Isoamyl alcohol oxidase, putative
39	AFUB_006000	40S ribosomal protein S3, putative
40	AFUB_004410	Ubiquitin UbiA, putative
41	AFUB_079620	Uncharacterized protein
42	AFUB_050490	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
43	AFUB_023550	Probable Xaa-Pro aminopeptidase pepP

(Continued)

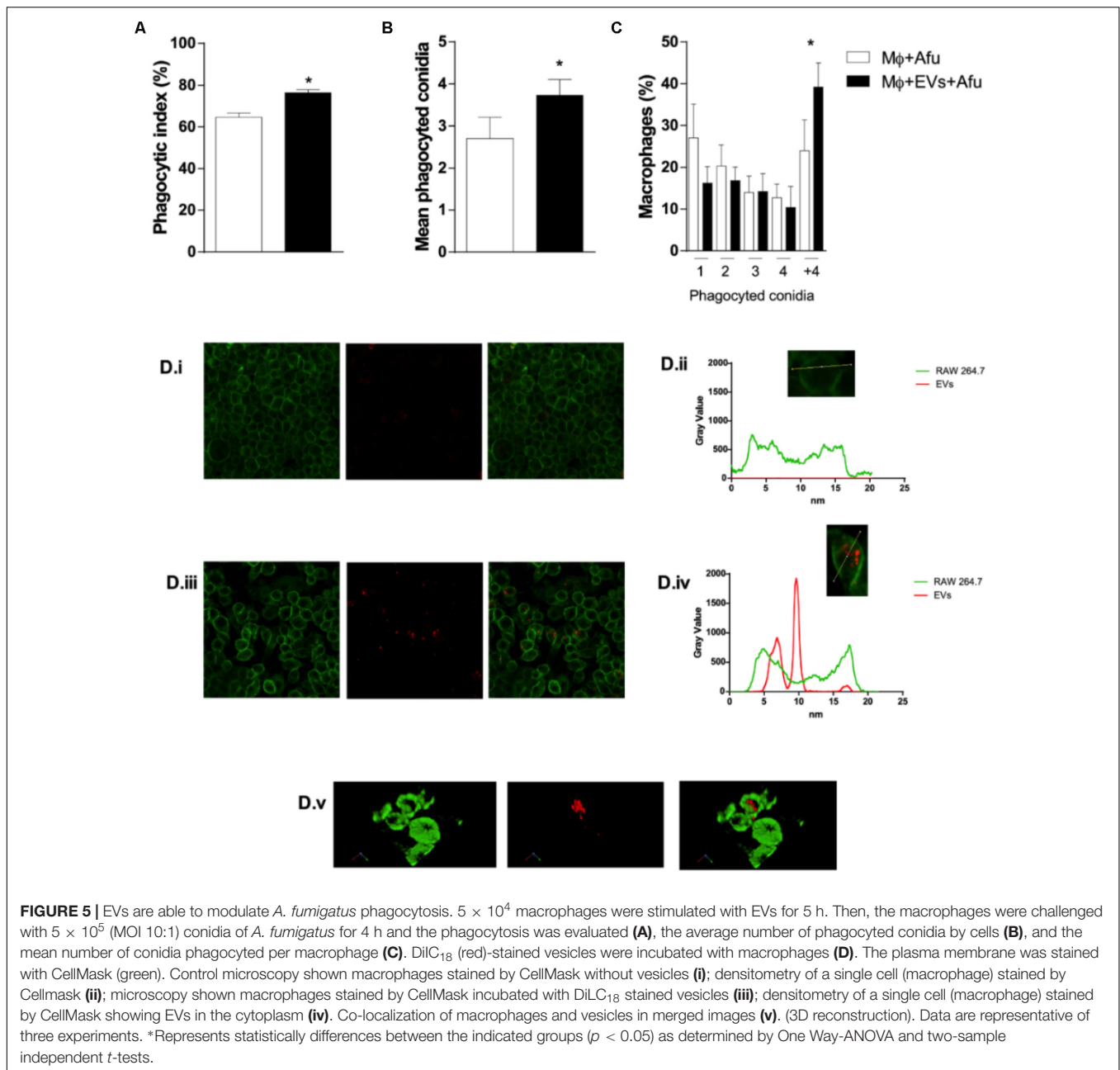
TABLE 2 | Continued

Protein group number	<i>A. fumigatus</i> genome database accession number	Protein name
44	AFUB_005160	Probable NAD(P)H-dependent D-xylose reductase xyl1
45	AFUB_036480	Putative UDP-galactopyranose mutase
46	AFUB_034560	Uncharacterized protein
47	AFUB_093550	Actin Act1
48	AFUB_021670	ER Hsp70 chaperone BiP, putative
49	AFUB_006770	Elongation factor 1-alpha
50	AFUB_056780	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
51	AFUB_007770	Molecular chaperone Hsp70
52	AFUB_009760	Phosphoglycerate kinase
53	AFUB_036860	60S ribosomal protein L22, putative
54	AFUB_025910	60S acidic ribosomal protein P2/allergen Asp F 8
55	AFUB_017890	Purine nucleoside permease, putative
56	AFUB_000660	CFEM domain protein
57	AFUB_089500	Uncharacterized protein
58	AFUB_070900	Uncharacterized protein
59	AFUB_024920	Dipeptidyl-peptidase 5
60	AFUB_001190	Ribosomal protein S13p/S18e

**FIGURE 4** | *A. fumigatus* killing by macrophages. 5×10^4 RAW 264.7 macrophages were stimulated with 0.1, 0.2, and 0.4 μg of EVs (measured as total protein content) for 5 h. After that, the macrophages were challenged with 5×10^5 (MOI 10:1) conidia of *A. fumigatus* for 6 h. The amount of live conidia was quantified in YG media as unit forming colony (UFC). Data are representative of three experiments. * Represents statistically differences between the indicated groups ($p < 0.05$) as determined by One Way-ANOVA.

The phagocytosis of EVs by macrophages was observed under confocal microscopy. Images show that there were vesicles outside and inside macrophages. 3D reconstitution of images demonstrated that EVs were in the cytoplasm of macrophages, confirming their internalization (**Figures 5Di–v** and **Supplementary Movie S1**).

Considering that EVs are able to increase the uptake of the fungus by macrophages, levels of inflammatory mediators produced by EVs stimulation were evaluated. After 5 h stimulation, EVs were able to induce significant secretion of

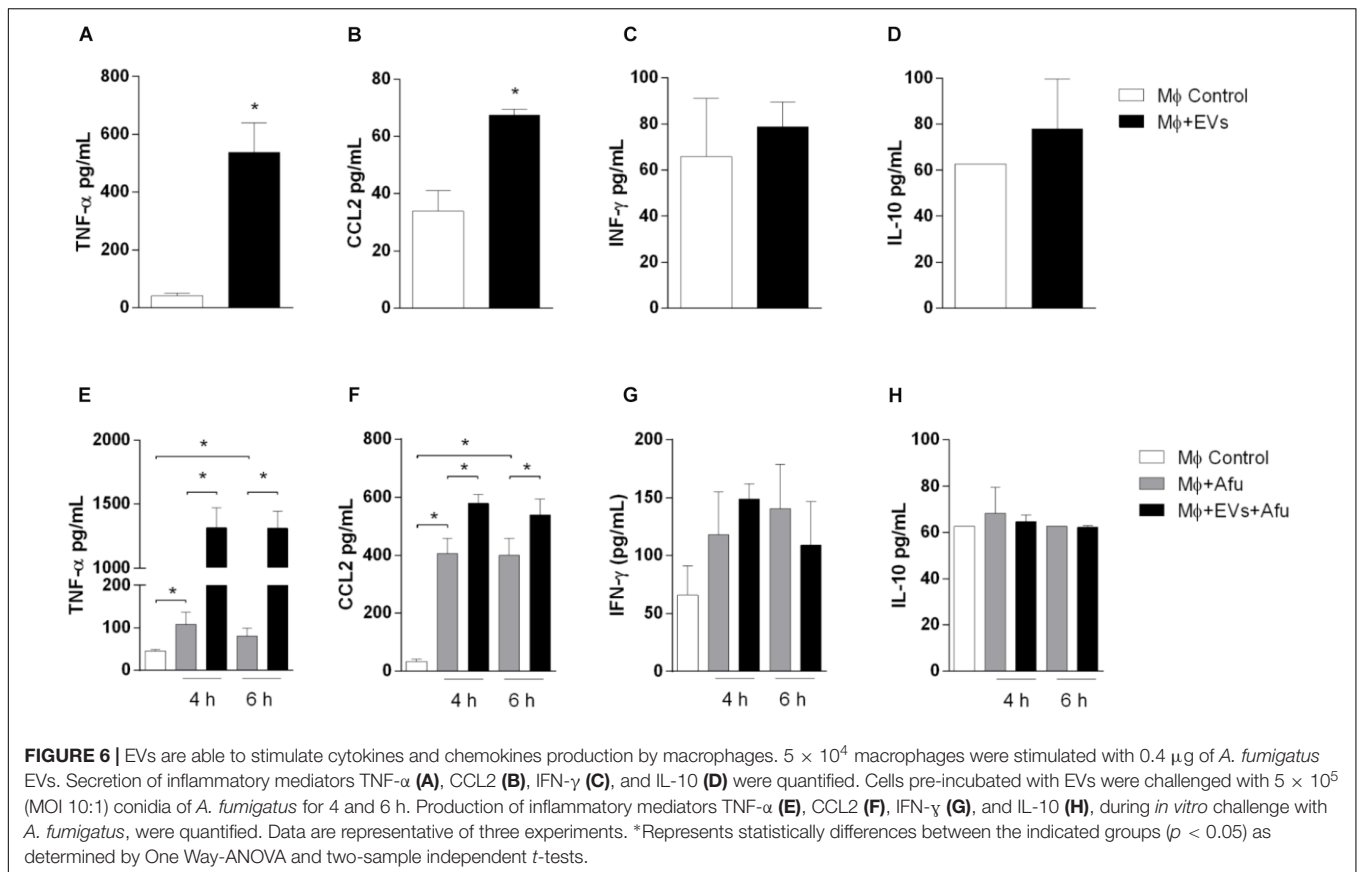


pro-inflammatory mediators TNF- α (approximately 10 times) and a twofold change in CCL2 levels compared to non-stimulated cells (Figures 6A,B). Results demonstrated no changes in IFN- γ levels and IL-10, after EVs stimulation (Figures 6C,D).

We analyzed the production of cytokines during *in vitro* *A. fumigatus* infection. Results demonstrate that EVs stimulation prior to fungal challenge is responsible for an increase of approximately 15 times in the production of TNF- α (Figure 6E). The levels of the chemokine CCL2 were also increased, around 30%, when compared to non-EVs control group (Figure 6F). No differences were observed in IFN- γ and IL-10 levels (Figures 6G,H).

EVs Promote an Increase in Fungicide Capacity by Neutrophils and Enhance Cytokine Production After *A. fumigatus* Challenge

Neutrophils are recruited in response to *A. fumigatus* challenge (Dagenais and Keller, 2009; Muller, 2013). We investigated the capacity of EVs to stimulate bone marrow-derived neutrophils (BMDN) and to improve their fungicide capacity. After 3 h of EVs stimulation, there was a pattern of response similar to that of macrophages. EVs stimulation could enhance phagocytic capacity by approximately 17% when compared to the control non-EVs group (Figure 7A). This effect was accompanied



by induction of fungal clearance by BMDN (Figure 7B). Together, these results show that the sensitization of phagocytes with *A. fumigatus* EVs was able to prime these cells and increase their phagocytic capacity, hence culminating in higher fungal clearance.

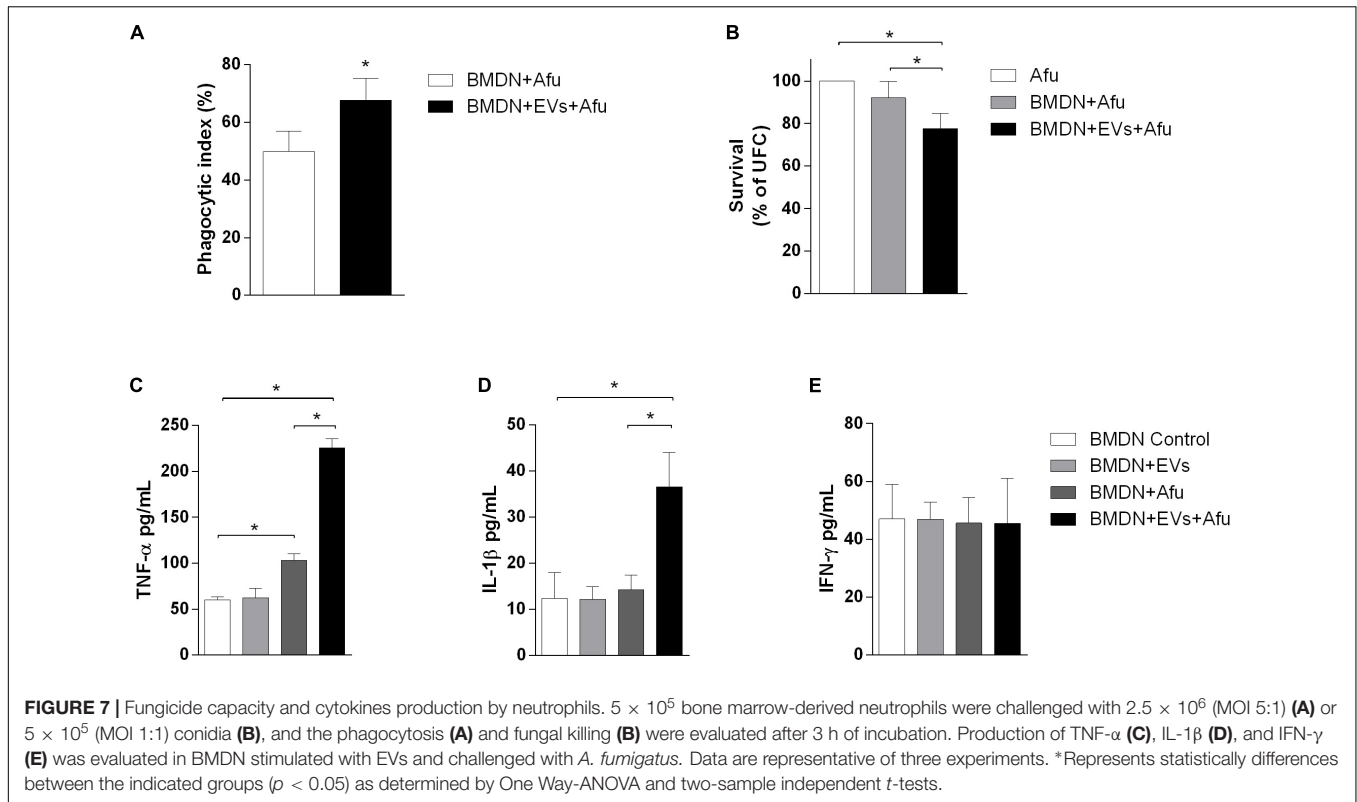
Considering that the EVs were able to induce the production of inflammatory mediators by macrophages, we also evaluated the capacity of these structures to stimulate cytokine production in BMDN. After 3 h of stimulus, EVs were not able to induce TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ production (Figures 7C–E, respectively). On the other hand, results demonstrated that stimulation with EVs induced an increase of TNF- α and IL-1 β production after fungal challenge. Levels of IFN- γ did not change after challenge (Figures 7C–E).

DISCUSSION

In this work, we demonstrated for the first time the release of EVs by the pathogenic filamentous fungus, *A. fumigatus*. Considering that the liberation of EVs can happen in both the saprophytic phase or during the colonization of mammal hosts, different *in vitro* growth conditions could interfere with EVs production. In this sense, we analyzed several culture time points to determine the ideal condition to isolate the EVs released by *A. fumigatus*. The exponential phase of fungal growth is the period of highest metabolic activity of cells (Brown et al., 2015). According to our

data and the literature, this time point for *A. fumigatus* comprises up to 72 h, when the stationary phase begins (Meletiadiis et al., 2001; Reeves et al., 2004). Considering the growth of the fungus and that the production of EVs was similar at 48 and 72 h, 48 h of incubation was chosen as the optimal point to carry out the functional characterizations of *A. fumigatus* EVs.

In all *A. fumigatus* growing conditions two main populations of vesicles were identified, one major population constituted by small vesicles with size between 100 and 200 nm diameter and a minor population of vesicles up to 595 nm. Variations in the diameters of isolated EVs may indicate that different pathways may be important in their biogenesis. Our findings are consistent with the diameter of EVs observed in other fungi such as in *H. capsulatum*, *C. neoformans*, and *P. brasiliensis* (Rodrigues et al., 2007; Albuquerque et al., 2008; Vallejo et al., 2011; Baltazar et al., 2016). Other *A. fumigatus* strains probably release EVs with differences in size and consequently in composition, once it was already demonstrated that EVs released by different *C. neoformans* strains showed different protein composition. In *C. albicans* the EVs population can vary from 50 to 100 nm up to larger populations from 450 to 850 nm or 350 to 450 nm depending on the strain, and also showed differences in their protein content, demonstrating that fungal EVs are considered heterogeneous among species (Albuquerque et al., 2008; Vargas et al., 2015). The differences in EVs using other *A. fumigatus* strains will be investigated in future studies.



Secretion of EVs is considered an important vehicle of molecule transportation to the extracellular environment. The importance of EVs as a way of transportation is sustained by the fact that a great number of proteins have been identified in pathogenic fungi EVs. A variety of functions have been associated with these identified proteins, as biofilm formation, cell wall organization and remodeling, carbohydrates, lipids and protein metabolism, cell response to drugs, heat shock proteins, transport and vesicular fusion and antioxidants (Albuquerque et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Vargas et al., 2015; Zarnowski et al., 2018). In this work it was demonstrated that *A. fumigatus* EVs proteins were recognized by total serum antisera from previously *A. fumigatus* infected mice, suggesting that proteins of *A. fumigatus* transported by EVs are antigenic and sensitize host immune system. Similar findings have been reported for other fungal species, such as *H. capsulatum*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, and *C. albicans* (Albuquerque et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Vallejo et al., 2011; Vargas et al., 2015).

The characterization of the proteins inside EVs identified proteins involved in metabolic processes, filamentous growth, sporulation, cell cycle and transport. Most of the proteins were classified as hydrolases. The presence of proteins that are able to hydrolyze the components of cell wall is interesting, once they can promote the remodeling of cell wall allowing the secretion of EVs (Albuquerque et al., 2008; Brown et al., 2015). Among proteins involved in cell wall remodeling in *A. fumigatus*, we identified the presence of glucanoyltransferases (Gel1, Gel4, and Bgt1), Ecm33 and EglC that participate in the elongation of cell wall glucan chain leading to maintenance and resistance of cell

wall, suggesting that these proteins in the EVs participate of mechanisms of fungal growth (Chabane et al., 2006; Gastebois et al., 2010; Zhao et al., 2013; Champer et al., 2016).

Many proteins were predicted to localize in the intracellular or extracellular space, suggesting that these vesicles are serving as a mechanism of transport for proteins beyond cells. Some identified proteins, as nucleoside diphosphate kinase and superoxide dismutase, have an important role in *A. fumigatus* polarization growth and in the resistance to high temperatures (Momany et al., 1999; Lin et al., 2003; Lambou et al., 2010; Dinamarco et al., 2012). These proteins are also involved in the pathogenesis and host response activation. Nucleoside diphosphate kinase plays a key role in resistance to oxidative stress. It was demonstrated in *Neurospora crassa* that a knockout mutant for this protein showed hypersensitivity to oxidative and thermal stress (Yoshida et al., 2006). Superoxide dismutase detoxifies superoxide reactive anions and contributes to oxidative burst inhibition. *A. fumigatus* SODs knockout mutants showed sensitivity to higher temperatures and ROS donors and their clearance by *in vitro* macrophages were higher than the wild type (Holdom et al., 2000; Lambou et al., 2010). In the same way, the thioredoxin reductase is able to inhibit the respiratory burst in neutrophils by breaking the NADPH oxidase, facilitating the fungus dissemination (Tsunawaki et al., 2004; Shi et al., 2012).

Chaperones are involved in morphogenesis, stress response (temperature and pH), osmolarity and antifungal resistance. This family of proteins were also identified in EVs of others fungi, such as *C. neoformans*, *H. capsulatum*, and *C. albicans* (Albuquerque et al., 2008; Rodrigues et al., 2008;

Vargas et al., 2015) and are related to virulence and resistance to antifungals (Cordeiro et al., 2016; Cleare et al., 2017; O'Meara et al., 2017). HSP90 is an essential component of cytoplasmic chaperone network HSP70-HSP90 responsible for protein folding. Besides that, HSP90-calcineurin pathway have a crucial role in the antifungal resistance (Soriani et al., 2008; O'Meara and Cowen, 2014; Tiwari et al., 2015).

Other components of significant relevance to *A. fumigatus* virulence are proteins known to possess significant allergenic properties in the host. In the EVs of *A. fumigatus* the allergens Asp f-1, Asp f-3, Asp f-4, Asp f-8, and Asp f-9 were identified. The ribotoxin Asp f-1 is able to reach the cytosol of mammalian host cells and inactivate the ribosomes inhibiting the proteins synthesis (Olmo et al., 2001; Lacadena et al., 2007). Asp f-3 is a peroxiredoxin able to bind IgE and inactivate ROS (Ramachandran et al., 2002; Hillmann et al., 2016). Asp f-4 is also one of the main antigens of *A. fumigatus*, with unknown function, and it is used as a marker for diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) (Kurup et al., 2000). Together, these data suggest that the milieu of proteins in *A. fumigatus* EVs have a role in invasion, resistance and host fungus growth, demonstrating that EVs secretion may be related to virulence of *A. fumigatus*.

Studies with EVs of pathogenic microorganisms demonstrate that EVs are able to interfere with a proper immune response. *A. fumigatus* EVs increased fungal killing by phagocytes and this property is in accordance with results described for EVs derived from *C. neoformans* (Oliveira et al., 2010), *Trichophyton interdigitale* (Bitencourt et al., 2018), *S. aureus* (Choi et al., 2015), and *C. albicans* in a *Galleria mellonella* larva model of infection (Vargas et al., 2015). Together, these and our study show that EVs are immunologically active and have a potential to interfere with the course of infection, in general causing higher clearance of the pathogen after stimulation with the vesicles. These findings were unexpected as the fungus would be spending a considerable amount of energy producing EVs with proteins that do no favors its relation with host cells. However, these same protein may be associated with fungal growth and communication and enhancement of immune responses could be an unwanted effect (to the fungus) of secreted EVs. Further studies, however, are necessary to fully characterize the role of these EVs for fungal physiology and during *in vivo* infection, where multiple interactions between various cell types may occur.

The immunomodulatory components of EVs from pathogens indicate that the molecules associated to EVs can promote survival and dissemination of these organisms. On the other hand, they can also stimulate host immune response for pathogen clearance. The exact role of EVs derived from pathogens in the host-pathogen interactions probably depends on the development stage of the pathogens, environmental conditions and/or specific tissue (Schorey et al., 2015; Kuipers et al., 2018). In our work, we identified that the components present in *A. fumigatus* EVs have potential in stimulating an *in vitro* pro-inflammatory response, and increasing the capacity of clearance of the fungus.

Exposure of phagocytic cells to *A. fumigatus* was able to induce inflammatory mediators production, and interestingly,

cells previously stimulated with EVs showed an additive effect in production of TNF- α , IL-1 β , and CCL2. In *A. fumigatus* infections, TNF- α is a critical component of the innate immune response, as its signaling deficiency is able to result in a decrease of neutrophil influx and increase in mortality of infected animals. The administration of a TNF- α agonist, prior to infection with *A. fumigatus*, is able to increase the survival of mice (Mehrad et al., 1999). CCL2 is one of the main chemoattractant molecules regulating innate immunity, and it is positively regulated during *in vitro* challenge by *A. fumigatus*. The administration of anti-CCL2 serum in mice was able to decrease the clearance of conidia and increase the hyper-reactivity into the airways of mice infected with *A. fumigatus* (Blease et al., 2001; Loeffler et al., 2009).

CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that *A. fumigatus* produce EVs that are rich in a range of bioactive proteins. EVs production is affected by different environmental conditions, which suggests that these structures can have an important function during growth. EVs can be recognized by phagocytes and stimulate phagocytosis and production of pro-inflammatory mediators and impact on fungal clearance.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

Animal Subjects: The animal study was reviewed and approved by Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), 255/2018, of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FS conceived the study. JS and FS designed the experiments and wrote the manuscript. JS, LB, VC, LG-E, AO, WD, MR, KM, and IM performed the experiments. JS, LB, VC, LG-E, AO, WD, KM, IM, and FS interpreted the results and analyzed the data. LB, VC, LG-E, AO, WD, KM, IM, DAS, FF, DGS, MT, and FS contributed reagents, materials, and analysis tools. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (474528-2012-0 and 483184-2011-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-01756-10, APQ-02198-14, and APQ-03950-17). This study was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior – Brasil (CAPES) (Finance Code 001), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Interação Microrganismo Hospedeiro (INCT em Dengue), and Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Universidade Federal de Minas Gerais for the opportunity to develop this work. We are thankful to

Ilma Marçal S., Rosemeire A. Oliveira, Jamil S. de Oliveira, Grazielle C. Florentino, and Eneida Paganini V. for technical support. We are grateful to Maria Isabel M. C. Guedes and Ricardo T. Gazzineli for ultracentrifuge and Gustavo B. Menezes for confocal microscopy.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02008/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancope-oliveira, R. M., et al. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell. Microbiol.* 10, 1695–1710. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x.Vesicular
- Balsalobre, C., Silván, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., and Wai, S. N. (2006). Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 59, 99–112. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04938.x
- Baltazar, L., Nakayasu, E. S., Sobreira, T. J., Choi, H., Casadevall, A., Nimrichter, L., et al. (2016). Antibody binding alters the characteristics and contents of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum*. *mSphere* 1:e00085-15. doi: 10.1128/mSphere.00085-15
- Bitencourt, T. A., Rezende, C. P., Quaresimin, N. R., Moreno, P., Hatanaka, O., Rossi, A., et al. (2018). Extracellular vesicles from the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. *Front. Immunol.* 9:2343. doi: 10.3389/fimmu.2018.02343
- Blease, K., Mehrad, B., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., and Hogaboam, C. M. (2001). Antifungal and airway remodeling roles for murine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 during pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J. Immunol.* 166, 1832–1842. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1832
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 620–630. doi: 10.1038/nrmicro3480
- Chabane, S., Sarfati, J., Ibrahim-Granet, O., Du, C., Schmidt, C., Mouyna, I., et al. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ecm33p influences conidial cell wall biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3259–3267. doi: 10.1128/aem.72.5.3259-3267.2006
- Champer, J., Ito, J. I., Clemons, K. V., Stevens, D. A., and Kalkum, M. (2016). Proteomic analysis of pathogenic fungi reveals highly expressed conserved cell wall proteins. *J. Fungi* 2:6. doi: 10.3390/jof2010006
- Choi, S. J., Kim, M. H., Jeon, J., Kim, O. Y., Choi, Y., Seo, J., et al. (2015). Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity. *PLoS One* 10:e0136021. doi: 10.1371/journal.pone.0136021
- Cleare, L. G., Zamith-Miranda, D., and Nosanchuk, J. D. (2017). Heat shock proteins in *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. *Clin. Vaccine Immunol.* 24:e00221-17. doi: 10.1128/CI.00221-17
- Cordeiro, R. A., Evangelista, A. J. J., Serpa, R., Marques, F. J. F., Melo, C. V., Oliveira, J., et al. (2016). Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. *Microbiology* 162, 309–317. doi: 10.1099/mic.0.000222
- Dagenais, T. R. T., and Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 447–465. doi: 10.1128/CMR.00055-08
- Dinamarco, T., Brown, N. A., Almeida, R. S. C., Castro, P. A., Savoldi, M., Goldman, M. H. S., et al. (2012). *Aspergillus fumigatus* calcineurin interacts with a nucleoside diphosphate kinase. *Microbes Infect.* 14, 922–929. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.003
- Fedorova, N., Khaldi, N., Joardar, V., Maiti, R., Amedeo, P., Anderson, M., et al. (2008). Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* 4:e1000046. doi: 10.1371/journal.pgen.1000046
- Gastebois, A., Fontaine, T., Latgé, J. P., and Mouyna, I. (2010). β (1-3)glucanoyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 9, 1294–1298. doi: 10.1128/ec.00107-10
- Gehrmann, U., Qazi, K. R., Johansson, C., Hultenby, K., Karlsson, M., Lundeberg, L., et al. (2011). Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses – novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One* 6:e21480. doi: 10.1371/journal.pone.0021480
- Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., et al. (2015). Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J. Proteome Res.* 14, 142–153. doi: 10.1021/pr5007944
- Gurung, M., Moon, D. C., Choi, C. W., Lee, J. H., Bae, Y. C., Kim, J., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One* 6:e27958. doi: 10.1371/journal.pone.0027958
- Hillmann, F., Heinekamp, T., Brakhage, A. A., Bzymek, K. P., Straßburger, M., Bagramyan, K., et al. (2016). The crystal structure of peroxiredoxin Asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* 6:33396. doi: 10.1038/srep33396
- Holdom, M. D., Lechenne, B., Hay, R. J., Hamilton, A. J., and Monod, M. (2000). Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J. Clin. Microbiol.* 38, 558–562.
- Ikeda, M. A. K., De Almeida, J. R. F., Jannuzzi, G. P., Cronemberger-Andrade, A., Torrecilhas, A. C. T., Moretti, N. S., et al. (2018). Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. *Front. Microbiol.* 9:2286. doi: 10.3389/fmicb.2018.02286
- Joffe, L. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., and Del Poeta, M. (2016). Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *mSphere* 1:e00099-16. doi: 10.1128/mSphere.00099-16
- Kuehn, M. J., and Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 19, 2645–2655. doi: 10.1101/gad.1299905
- Kuipers, M. E., Hokke, C. H., Smits, H. H., and Nolte-’t Hoen, E. N. M. (2018). Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: an overview. *Front. Microbiol.* 9:2182. doi: 10.3389/fmicb.2018.02182
- Kurup, V. P., Banerjee, B., Hemmann, S., Greenberger, P. A., Blaser, K., and Cramer, R. (2000). Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clin. Exp. Allergy* 30, 988–993. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00837.x
- Lacadena, J., Álvarez-García, E., Carreras-Sangrà, N., Herrero-Galán, E., Alegre-Cebollada, J., García-Ortega, L., et al. (2007). Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 212–237. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00063.x

- Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., and Latge, J. P. (2010). Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 75, 910–923. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310–350.
- Lin, X., Momany, C., and Momany, M. (2003). SwoHp, a nucleoside diphosphate kinase, is essential in. *Society* 2, 1169–1177. doi: 10.1128/EC.2.6.1169
- Loeffler, J., Haddad, Z., Bonin, M., Romeike, N., Mezger, M., Schumacher, U., et al. (2009). Interaction analyses of human monocytes co-cultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 58, 49–58. doi: 10.1099/jmm.0.003293-0
- Mehrad, B., Strieter, R. M., and Standiford, T. J. (1999). Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J. Immunol.* 162, 1633–1640. doi: 10.3389/fphys.2017.00232
- Meletiadi, J., Meis, J. F. G. M., Mouton, J. W., and Verweij, P. E. (2001). Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J. Clin. Microbiol.* 39, 478–484. doi: 10.1128/jcm.39.2.478-484.2001
- Momany, M., Westfall, P. J., and Abramowsky, G. (1999). *Aspergillus nidulans* two mutants show defects in polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *Genetics* 151, 557–567.
- Muller, W. A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet. Pathol.* 50, 7–22. doi: 10.1177/0300985812469883
- Nicola, A. M., Frases, S., and Casadevall, A. (2009). Lipophilic dye staining of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles and capsule. *Eukaryot. Cell* 8, 1373–1380. doi: 10.1128/EC.00044-09
- Nilsen-Hamilton, M., and Hamilton, R. T. (1982). Secreted proteins, intercellular communication, and the mitogenic response. *Cell Biol. Int. Rep.* 6, 815–836. doi: 10.1016/0309-1651(82)90142-4
- Oliveira, D. L., Freire-de-Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L., and Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect. Immun.* 78, 1601–1609. doi: 10.1128/IAI.01171-09
- Olmo, N., Turnay, J., de Buitrago, G. G., de Silanes, I. L., Gavilanes, J. G., and Lizarbe, M. A. (2001). Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. *Eur. J. Biochem.* 268, 2113–2123. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02086.x
- O'Meara, T. R., and Cowen, L. E. (2014). Hsp90-dependent regulatory circuitry controlling temperature-dependent fungal development and virulence. *Cell. Microbiol.* 16, 473–481. doi: 10.1111/cmi.12266
- O'Meara, T. R., Robbins, N., and Cowen, L. E. (2017). The Hsp90 chaperone network modulates *Candida* virulence traits. *Trends Microbiol.* 25, 809–819. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.003
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martinez, L. R., Luque-Garcia, J., Kalscheuer, R., Veeraghavan, U., et al. (2011). Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1471–1483. doi: 10.1172/JCI44261
- Ramachandran, H., Jayaraman, V., Banerjee, B., Greenberger, P. A., Kelly, K. J., Fink, J. N., et al. (2002). IgE binding conformational epitopes of Asp f 3, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Immunol.* 103, 324–333. doi: 10.1006/clim.2002.5219
- Reeves, E. P., Messina, C. G. M., Doyle, S., and Kavanagh, K. (2004). Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158, 73–79. doi: 10.1023/B:MYCO.0000038434.55764.16
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., et al. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot. Cell* 7, 58–67.
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., et al. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot. Cell* 6, 48–59. doi: 10.1128/ec.00318-06
- Rupert, D. L. M., Claudio, V., Lässer, C., and Bally, M. (2017). Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861, 3164–3179. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.028
- Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., and Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* 16, 24–43. doi: 10.15252/embr.201439363
- Shi, L. N., Li, F. Q., Huang, M., Lu, J. F., Kong, X. X., Wang, S. Q., et al. (2012). Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis. *BMC Microbiol.* 12:11. doi: 10.1186/1471-2180-12-11
- Silva, B. M. A., Prados-Rosales, R., Espadas-Moreno, J., Wolf, J. M., Luque-Garcia, J. L., Gonçalves, T., et al. (2014). Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med. Mycol.* 52, 202–210. doi: 10.1093/mmy/myt003
- Silva, R. P., Puccia, R., Rodrigues, M. L., Oliveira, D. L., Joffe, L. S., César, G. V., et al. (2015). Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci. Rep.* 5:7763. doi: 10.1038/srep07763
- Soriani, F. M., Malavazi, I., Ferreira, M. E., Savoldi, M., Kress, M. R., Goldman, M. H. S., et al. (2008). Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Mol. Microbiol.* 67, 1274–1291. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06122.x
- Tiwari, S., Thakur, R., and Shankar, J. (2015). Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. *Biotechnol. Res. Int.* 2015:132635. doi: 10.1155/2015/132635
- Tsunawaki, S., Yoshida, L. S., Nishida, S., Kobayashi, T., and Shimoyama, T. (2004). Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect. Immun.* 72, 3373–3382. doi: 10.1128/IAI.72.6.3373-3382.2004
- Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* 11, 2301–2319. doi: 10.1038/nprot.2016.136
- Vallejo, M. C., Matsuo, A. L., Ganiko, L., Medeiros, L. C. S., Miranda, K., Silva, L. S., et al. (2011). The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -galactosyl epitopes. *Eukaryot. Cell* 10, 343–351. doi: 10.1128/EC.00227-10
- Vargas, G., Rocha, J. D. B., Oliveira, D. L., Albuquerque, P. C., Frases, S., Santos, S. S., et al. (2015). Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* 17, 389–407. doi: 10.1111/cmi.12374
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borra, F. E., Buzas, E. I., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066
- Yoon, Y. J., Kim, O. Y., and Ghoo, Y. S. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular communication vehicles. *BMB Rep.* 47, 531–539. doi: 10.5483/BMBRep.2014.47.10.164
- Yoshida, Y., Ogura, Y., and Hasunuma, K. (2006). Interaction of nucleoside diphosphate kinase and catalases for stress and light responses in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 580, 3282–3286. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.096
- Zarnowski, R., Sanchez, H., Covelli, A. S., Dominguez, E., Jaromin, A., Bernhardt, J., et al. (2018). *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biol.* 16:e2006872. doi: 10.1371/journal.pbio.2006872
- Zhao, W., Lü, Y., Ouyang, H., Zhou, H., Yan, J., Du, T., et al. (2013). N-Glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall β -glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 23, 955–968. doi: 10.1093/glycob/cwt032

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Souza, Baltazar, Carregal, Gouveia-Eufrasio, Oliveira, Dias, Rocha, Miranda, Malavazi, Santos, Frézard, Souza, Teixeira and Soriani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS VEs DE *A. fumigatus* IN VIVO

5.1 Vesículas extracelulares e suas implicações no estímulo do sistema imune do hospedeiro

A secreção de VEs foi inicialmente descrita como um mecanismo de eliminação de compostos desnecessários para a célula, no entanto, atualmente sabe-se que as VEs possuem um importante papel na troca de moléculas entre células, atuam como veículo de sinalização e na patogenicidade [109, 110].

As proteínas representam o maior grupo de moléculas associadas as VEs de patógenos, no entanto os lipídeos e RNAs, presentes nestas estruturas, também têm sido intensamente investigados no que diz respeito a capacidade de interação com as células do hospedeiro. Estudos demonstraram que estas moléculas, associadas às VEs, possuem um potencial em estimular células do sistema imune, podendo intensificar uma infecção ou até mesmo elicitar proteção [111].

Um estudo recente investigou o impacto das VEs na patogênese de *Neisseria gonorrhoeae*, uma bactéria capaz de colonizar o trato reprodutivo. Essa colonização é mediada pela porina de membrana externa PorB, que é essencial para a absorção de íons e nutrientes, além de ser capaz de interferir nas vias de apoptose e promover infecções. Foi observado que VEs liberadas por *N. gonorrhoeae* possuem PorB, e que macrófagos expostos as estas VEs apresentaram perda do potencial da membrana mitocondrial, liberação do citocromo C, ativação de caspases apoptóticas e morte celular. Estes dados demonstram que *N. gonorrhoeae* utiliza porinas presentes nas VEs para atingir mitocôndrias e induzir a apoptose em macrófagos [112]. Kunsman e colaboradores (2015), demonstraram que a linhagem de *E. coli* O104-H4, altamente virulenta, libera VEs contendo uma diversidade de fatores de virulência, incluindo toxina Shiga (Stx) 2a, enterotoxina Shigella 1, flagelina H4 e lipopolissacarídeo O104. Adicionalmente, foi demonstrado que VEs de *E. coli* O104-H4 foram internalizadas por células epiteliais intestinais humanas e induziram apoptose, mediada por caspase-9 e secreção de IL-8 [113]. Em conjunto, estes estudos mostram como as VEs representam um importante mecanismo de entrega de fatores de virulência para as células hospedeiras.

Embora a maioria dos estudos de VEs como estruturas transportadoras de fatores de virulência tenham sido concentrados, até o momento, em microrganismos procarióticos, atualmente trabalhos vêm buscando investigar o potencial das VEs, provenientes de células fúngicas, na infecção. A esporotricose, por exemplo, é uma micose causada pelo fungo

Sporothrix brasiliensis, que afeta a pele, sistema linfático e órgãos humanos. Foi demonstrado, *in vitro*, que VEs de *S. brasiliensis* aumentaram o índice fagocítico e a carga fúngica de células dendríticas desafiadas, além de aumentar a produção das citocinas IL-12p40 e TNF- α . Quando as VEs foram inoculadas em camundongos, antes de uma infecção subcutânea, houve um aumento da carga fúngica e do tamanho da lesão dos animais infectados. Esses dados demonstraram que VEs de *S. brasiliensis* desempenham um papel importante na virulência e na modulação do sistema imune do hospedeiro durante a infecção [61].

Considerando a capacidade das VEs de carrear moléculas capazes de impactar na infecção, estas estruturas também têm sido implicadas no estímulo da resposta imune do hospedeiro e na proteção contra patógenos [111]. Estudos demonstraram que tanto VEs derivadas de microrganismos procariotos quanto de eucariotos são capazes de estimular a produção de mediadores inflamatórios, *in vitro* ou *in vivo*, e influenciar nos mecanismos de depuração do microrganismo [56, 66, 114]. Neste sentido, as propriedades pró-inflamatórias de VEs derivadas de patógenos podem ser utilizadas como estratégia de vacinação baseadas em VEs [111].

Foi demonstrado que VEs de bactérias Gram-negativas podem servir como um veículo de entrega de antígenos capazes de desencadear uma resposta imune protetora. Por exemplo, VEs derivadas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, uma linhagem modificada para sintetizar um derivado da proteína pneumocócica PspA, foram utilizadas para imunizar camundongos, via intranasal. A imunização conferiu produção de anticorpos específicos contra componentes da vesícula, como PspA, lipopolissacarídeo derivado de *Salmonella* e outras proteínas de membrana, além de estimular o desenvolvimento de IgA contra proteínas de *Salmonella*. Além disso, camundongos foram completamente protegidos contra uma dose letal de *S. pneumoniae* [115]. Choi e colaboradores (2015), demonstraram que a imunização de camundongos com VEs derivadas de *S. aureus* foi capaz de estimular a imunidade adaptativa. As VEs foram capazes de induzir a produção de moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86 *in vitro*, e estimular a produção de citocinas polarizadoras de células T na apresentação de antígenos, como IFN- γ , IL-17 e IL-4, *in vivo*. Adicionalmente, a vacinação com VEs conferiu proteção contra um desafio com dose letal de *S. aureus* e também contra pneumonia, induzida por uma dose sub-letal [114].

O potencial das VEs como estratégia vacinal já foi avaliado para a doença meningocócica B. Uma vacina para a doença meningocócica B, formulada com VEs, foi introduzida na Nova Zelândia e demonstrou ser segura e desencadear a produção de anticorpos reativos contra a bactéria em crianças de até 5 meses de idade [116].

Em fungos, estudos também vem objetivando investigar o efeito das VEs como uma alternativa profilática. Vargas e colaboradores (2015) investigaram o papel imunomodulador

de VEs de *C. albicans*. A partir de ensaios de imunotransferência, soro de camundongo previamente infectado com *C. albicans* reagiu contra duas proteínas predominantes presentes no extrato de VEs deste fungo, demonstrando o potencial imunogênico destas estruturas. Além disso, as VEs liberadas por este microrganismo foram capazes de induzir a produção de mediadores inflamatórios como IL12p40, TGF- β e TNF- α , quando realizados ensaios *in vitro*, e demonstraram elicitar proteção quando realizados testes *in vivo*, conferindo uma proteção de até 40% em *Galleria mellonella* estimuladas previamente com VEs, comparado com organismos não estimulados [66].

Tomados em conjunto, estes estudos mostram que o conhecimento aumentado das VEs ao longo das últimas décadas, poderá contribuir com o desenvolvimento futuro de uma nova geração de formulações vacinais [3, 14, 22]. Até o momento, demonstramos neste trabalho que as VEs de *A. fumigatus* possuem proteínas capazes de estimular células do sistema imune, *in vitro*, melhorando a capacidade anti-fúngica destas células, além de apresentarem imunogenicidade. Considerando isso, investigamos quais seriam os efeitos das VEs de *A. fumigatus* no sistema imune, *in vivo*. Para isso, nós padronizamos um modelo de imunização com VEs isoladas de *A. fumigatus* e avaliamos a resposta inflamatória e a capacidade de depuração fúngica dos animais, após a infecção.

5.2 Materiais e Métodos

Foram utilizados camundongos livres de patógenos específicos (SPF), isogênicos, machos, da linhagem C57BL/6J com aproximadamente 25 gramas de peso e 10-12 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram agrupados de cinco a seis animais, por gaiola, e mantidos em condições de temperatura e luz controladas, no biotério do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. A disponibilidade de ração e água foi acompanhada diariamente. O protocolo de utilização de camundongos C57BL/6J foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-255/2018) da UFMG (ANEXO 3).

5.2.1 Imunização e infecção dos animais

Após o isolamento das VEs de *A. fumigatus*, quatro grupos de camundongos C57BL/6, foram utilizados para avaliar a resposta inflamatória, após a infecção pelo fungo. Os grupos foram classificados em não infectado (NI), não infectado que recebeu VEs (NI+VEs), infectado (Afu) e camundongos que receberam VEs e foram infectados (VEs+Afu). Os animais que não foram imunizados com VEs receberam salina. Camundongos do grupo imunizado receberam $2,2 \times 10^9$ vesículas ($0,4 \mu\text{g}$) ressuspensas em salina, via intranasal. Foram administradas duas imunizações com um intervalo de 7 dias cada, sendo que, uma semana após a última imunização os animais foram infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*, via intranasal (Figura 7), conforme preparo de conídios descrito a seguir.

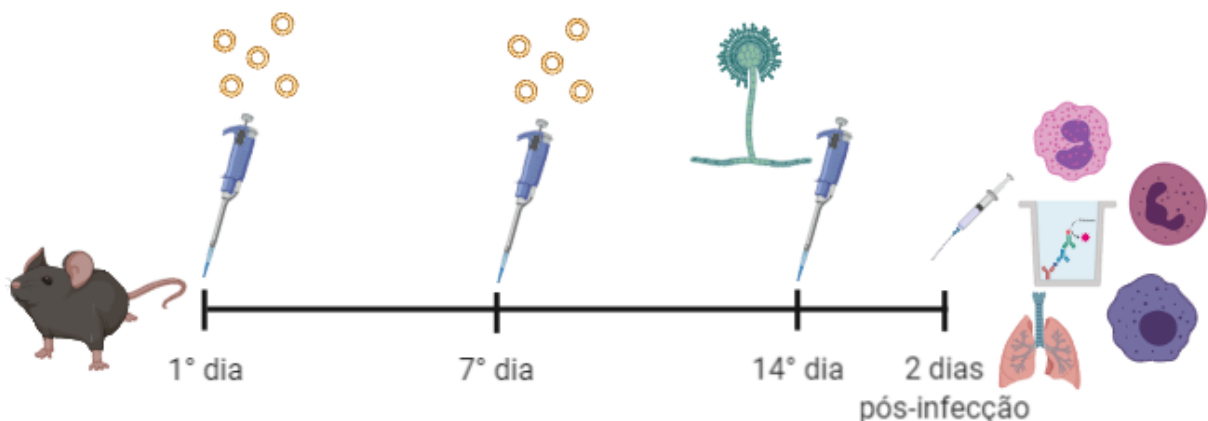


Figura 7: Modelo de imunização com VEs de *A. fumigatus*. Os camundongos receberam múltiplas imunizações, via intranasal, com $2,2 \times 10^9$ vesículas. Após, os camundongos foram infectados, via intranasal, com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Dois dias após infecção foram coletados fluidos e tecidos para avaliação da resposta inflamatória (Figura gerada pelo aplicativo Biorender).

Conídios reativados de *A. fumigatus*, que estavam armazenados a 4°C em placa de Petri contendo meio completo (YAG) (0,5% de extrato de levedura; 2% de glicose; 2% de ágar e 100 µL de elementos traços), foram semeados em uma nova placa contendo YAG e incubados em estufa a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de conídios em PBS 1X. A suspensão foi centrifugada a 1.400 g durante 10 minutos. O *pellet* de conídios foi ressuspendido em PBS 1X e a concentração foi determinada após contagem em câmara de Neubauer. Foram inoculados, então, 1×10^8 conídios em 40 µL de PBS 1X, na via intranasal, nos animais. Dois dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e foram coletados sangue, lavado broncoalveolar (BAL) e pulmões, para avaliar a resposta inflamatória (Figura 7).

5.2.2 Avaliação da resposta inflamatória dos animais

5.2.2.1 Contagem de células totais e diferenciadas do BAL

Dois dias após a infecção, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de quetamina/xilasina. O BAL foi realizado com o auxílio de uma cânula injetando 1 mL de PBS 1X gelado nos pulmões, lavando 3 vezes. O volume recuperado foi reservado e repetiu-se o procedimento com mais 1 mL de PBS 1X. Ao final, todo o volume recuperado do lavado foi reservado em um tubo de 2 mL. Após o procedimento, o BAL foi centrifugado a 300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -20°C e o precipitado de células foi ressuspendido em 100 µL de PBS 1X. Foi realizada uma diluição de 1:10 das células, em reagente de Turk (Renylab), para a contagem total de células em câmara de Neubauer. Após a contagem total, foi realizado um citospin das amostras a 35 g por 5 minutos. As lâminas foram coradas com Kit Panótico Rápido para a contagem diferencial de células.

5.2.2.2 Fagocitose *in vivo*

Nas lâminas onde foram realizadas a contagem diferencial de células, foi realizada também a contagem de células que fagocitaram conídios. O índice fagocítico foi determinado a partir da contagem da porcentagem de células fagocíticas.

5.2.2.3 Avaliação da quantidade de proteínas presentes no BAL

As alterações na superfície do endotélio ocorrem para facilitar a migração de células para o local da infecção, o que resulta também no extravasamento de proteínas para o local, favorecendo a formação de edema [117]. A partir do sobrenadante do BAL foi realizada a dosagem de proteínas pelo ensaio colorimétrico denominado de Método de Bradford. Em uma placa de 96 poços de fundo reto, 160 μL de amostra (Diluída 1:20 ou 1:500) foram adicionados em 40 μL do reagente de Bradford (Bio-Rad). A curva padrão de concentração foi construída partindo da concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *Bovine Serum Albumin* (BSA) e a absorbância foi lida a 595 nm.

5.2.2.4 ELISA

A produção de citocinas e quimiocinas pelos animais, induzidas pela imunização com VEs e infecção pelo *A. fumigatus*, foi avaliada pelo método imunoenzimático de ELISA, utilizando-se kits de anticorpos murinos específicos para cada citocina e quimiocina, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, USA). O sobrenadante do BAL dos animais não infectados (NI), imunizados, porém não infectados (NI+VEs), infectados (Afu) e imunizados e infectados (VEs+Afu), foram utilizados. As citocinas e quimiocina avaliadas foram: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, CXCL1, e o fator do complemento C5a.

Para a realização dos ensaios, utilizou-se placas de 96 poços de fundo reto e, no primeiro dia, foram adicionados 50 μL do anticorpo de captura em PBS 1X, na concentração indicada pelo fabricante. A placa foi incubada a 4°C *overnight* em câmara úmida ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (PBS 1X; Tween 0,05%) e foram adicionados 100 μL do tampão de bloqueio (PBS 1X; BSA 1%), por poço. A placa permaneceu em agitação por 1 hora. Os poços foram lavados novamente com solução de lavagem e adicionou-se 50 μL das amostras (sobrenadante do BAL), por poço. Foi preparada também a curva-padrão, nas mesmas condições que as amostras, das citocinas e quimiocina recombinantes de acordo com as instruções do fabricante. A placa foi incubada a 4°C *overnight*. No terceiro dia, a placa foi lavada novamente 3 vezes e adicionou-se 50 μL dos anticorpos de detecção biotinizados em solução diluente (PBS 1X; BSA 0,1%), na concentração indicada pelo fabricante. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 2 horas. Após o período de incubação, os poços foram lavados novamente por 3 vezes com solução de lavagem e adicionou-se 50 μL de estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin, Pharmigen - 1:4000), em solução diluente, e incubou-se por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes e adicionou-se 50 μL de solução

de o-fenilenediamina (4 mg de OPD; 10 mL de tampão citrato; 2 μ L de H₂O₂). A reação ocorreu durante 20 minutos, e a mesma foi interrompida com H₂SO₄ 1 M. A leitura das placas foi realizada no comprimento de onda de 492 nm e a concentração das amostras foi calculada a partir da curva padrão.

5.2.2.5 Avaliação dos efeitos inflamatórios no tecido pulmonar

A quantidade de células inflamatórias presentes no tecido pulmonar foi mensurada, indiretamente, pela atividade de enzimas provenientes de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos [118, 119]. 50 mg de pulmão, previamente coletados de cada animal, foram colocados em tubo de 2 mL. 500 μ L de tampão de extração de citocinas (NaCl 0,4M; tween 20 0,05%; BSA 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina – solução preparada em PBS 1X) foram adicionados sobre cada amostra e a mesma foi homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (QIAGEN). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 9.300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi reservado em um novo tubo e o *pellet* ressuspenso em 950 μ L de Tampão 1 (NaCl 0,1 M; Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015 M; pH 4,7), com o auxílio do homogeneizador. A amostra foi centrifugada novamente a 9.300 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Sobre o *pellet*, foi adicionado 750 μ L de NaCl 0,2% e 750 μ L de NaCl 1,6% e glicose 5%. A amostra foi homogeneizada e o volume dividido em dois tubos. O material foi centrifugado 9.300 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados sobre os *pellets* 400 μ L de Tampão 2 (NaPO₄ 0,05M e HETAB 0,5%; pH 5,4), para ensaio da atividade de mieloperoxidase de neutrófilos (MPO), ou 400 μ L de Salina Triton 0,1%, para ensaio da atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase de macrófagos (NAG).

Para avaliar a atividade da enzima MPO, as amostras foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas a 9.300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi diluído 1:3 em Tampão 2 e 25 μ L de cada amostra foi colocado em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, 25 μ L de substrato (TMB 3,845 mg para 1 mL de DMSO) foram adicionados sobre as amostras e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Após a incubação, 100 μ L de H₂O₂ 0,002% em de Tampão 2 foi adicionado sobre as amostras e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos. Para interromper a reação, foi adicionado 100 μ L de H₂SO₄ (1 M) e a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 450 nm.

Para avaliar a atividade da enzima NAG, as amostras foram centrifugadas a 9.300 g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 100 μ L das amostras foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, 100 μ L de substrato (0,767 mg de p-nitrofenil-

N-acetil-beta-D-glicosaminidase para 1 mL de tampão citrato/fosfato) foram adicionados sobre as amostras e a placa foi incubada a 37°C por 10 minutos. Após o período de incubação, 100 µL de tampão glicina 0,2 M (Glicina 0,8 M; NaCl 0,8 M; NaOH 0,8 M; pH – 10,6) foram adicionados sobre as amostras e a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 405 nm.

A quantidade de eosinófilos foi mensurada pela medida indireta da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO). 50 mg de pulmão, previamente coletados de cada animal, foram colocados em tubo de 2 mL e homogeneizados com 900 µL de PBS 5X, com auxílio do homogeneizador de tecidos. As amostras foram centrifugadas a 9.300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado sobre o *pellet* 750 µL de NaCl 0,2% e 750 µL de NaCl 1,6% e glicose 5%. O *pellet* foi homogeneizado novamente e centrifugado a 9.300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado com 950 µL de PBS 1X com HETAB 0,5%. As amostras foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas a 9.300 g por 10 minutos a 4°C. Após, 75 µL de amostra foram adicionados em cada poço em uma placa de 96 poços. Acrescentou-se sobre as amostras 75 µL de substrato (4,0 mg de OPD; 10 mL de Tampão Tris-HCl pH 8,0 e 4,0 µL de H₂O₂ 30%). A placa foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e, após, a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A absorbância foi lida em um comprimento de onda de 492 nm.

5.2.2.6 Avaliação de caspase-1 ativa por Western Blot

A ativação de caspase-1 foi avaliada por Western Blot. Células provenientes do BAL de animais não infectados e infectados (Afu e VEs+Afu) foram utilizadas. Inicialmente, foi realizada uma extração de proteínas presentes nas células. Foi adicionado sobre o pellet de células de cada animal (aproximadamente 10⁶ células), 100 µL da solução de Extração de Proteínas 1X, contendo Tampão de Lise de Células 2X (Triton x100 1,0%; TrisNaCl 100 mM pH 8,0; glicerol 20%; EDTA 0,5 M – 0,2 mM), com inibidores de proteases (20 µL de aprotinina; 20 µL de leupeptina; 10 µL de NaVO₃ 1 M; 100 µL de PMSF 100 mM; 10 µL de DTT 1 M; 250 µL de NaF 1 M e 400 µL de NaCl 5 M). As amostras foram deixadas em agitação, no gelo, por 15 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 9.300 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi reservado em outro tubo e a dosagem de proteínas foi feita utilizando o método de Bradford.

O equivalente a 10 µg de cada amostra foram resolvidos em um gel de policrilamida com 4% de gel de empilhamento (1,67 mL de água; 2,5 mL de Tris 0,5 M pH 6,6; 825 µL de Acrilamida/Bisacrilamida; 8 µL de SDS 20%; 15 µL de TEMED e 50 µL de PSA 10%) e 12%

de gel de separação (4,02 mL de água; 3 mL de Tris 1,5 M pH 8,8; 4,2 mL de Acrilamida/Bisacrilamida; 15 µL de SDS 20%; 10 µL de TEMED e 100 µL de PSA 10%). A corrida ocorreu em uma voltagem constante de 100 V.

Após o término da resolução do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O aparato de transferência foi submetido a uma cuba, contendo Solução de Transferência (0,3% de Trizma base; 1,44% de Glicina; 20% de Metanol), e a transferência ocorreu em amperagem constante de 350 mA. Após a transferência, a membrana foi submetida a uma Solução de Bloqueio (Leite em pó 5% e PBS 1X/Tween 0,1%), e deixada em agitação durante 1 hora. Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (PBS 1X/Tween 0,1%), e incubada com anticorpo primário anti-caspase1 p20 (Genentech) na diluição 1:1000 em BSA 3%, *overnight*. A membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem e incubada com anticorpo secundário *goat-anti rat* (Santa Cruz), e deixada em agitação em temperatura ambiente durante 1 hora. Após a incubação, a membrana foi lavada por 30 minutos com solução de lavagem. A β -actina foi utilizada como controle constitutivo.

A revelação das bandas, provenientes das proteínas analisadas, foi realizada com a utilização de filme (Kodak). A membrana foi envolvida em um plástico e foi adicionado 1 mL do kit *Clarity Western ECL Substrate* e deixado agir durante 5 minutos. Após, o excesso da solução foi removido, e, no escuro, foi posicionado sobre a membrana o filme e foi deixado durante 1 minuto de exposição. O filme foi mergulhado em solução reveladora até o aparecimento das bandas, seguido de submersão em água e fixado com a solução fixadora. A análise das proteínas foi feita comparando as bandas com o peso padrão (BioRad).

5.2.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6 que combina ferramentas de análises de gráficos científicos, ajuste de curva e organização de dados. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas pela análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. Resultados envolvendo dois grupos experimentais foram analisados pelo teste t Student. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se valor de $p < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Avaliação do efeito das VEs *in vivo*

Considerando o exposto na parte introdutória deste capítulo, as VEs derivadas de patógenos podem ser capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro, mediar a resposta inflamatória e, até mesmo, desencadear proteção. Diante disto, utilizando um esquema de imunizações múltiplas, camundongos foram expostos a VEs de *A. fumigatus*, previamente à infecção, e os parâmetros clínicos, assim como parâmetros inflamatórios e imunológicos, foram avaliados.

5.3.1.1 Avaliação da resposta inflamatória de animais imunizados com VEs de *A. fumigatus*

Após as imunizações e infecção dos animais, foi analisado o perfil do influxo de células para os alvéolos, pela contagem total e diferencial de células. Inicialmente, avaliamos a quantidade de células totais. Os resultados mostram que os camundongos não infectados (NI e NI+VEs) não apresentaram alterações no número de células, sendo quantificadas cerca de 5×10^4 células/BAL, mostrando, inclusive, que a imunização não alterou a quantidade de células nos pulmões. Já os animais não imunizados e infectados (Afu) apresentaram um aumento na quantidade de células, na ordem de $1,4 \times 10^6$ células/BAL. No entanto, os animais que foram imunizados e infectados (VEs+Afu) apresentaram uma redução de 20% na quantidade de células, comparado ao grupo não imunizado, sugerindo que a imunização foi capaz de modular quantidade de células no infiltrado pulmonar (Figura 8).

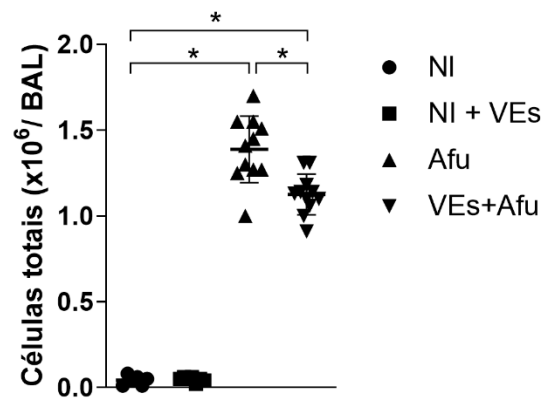


Figura 8: Efeito das VEs na modulação do influxo de células totais para os alvéolos. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Foi avaliado o influxo de células nos alvéolos de animais não infectados (● e ■) e dos animais infectados (▲ e ▼). * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

Após a contagem de células totais, foi realizada a contagem diferencial com o objetivo de avaliar o perfil de células inflamatórias presentes nos pulmões. Observamos que os camundongos não infectados (NI e NI+VEs) não apresentaram alterações no número de neutrófilos, demonstrando que não haviam alterações, pré-existent, decorrentes de um processo inflamatório nesses animais. Por outro lado, os animais infectados (Afu) apresentaram um proeminente infiltrado inflamatório, caracterizado por níveis elevados de neutrófilos, na ordem de 1×10^6 células/BAL. No entanto, o grupo de animais imunizados e infectados (VEs+Afu) apresentaram uma redução de aproximadamente 20% no influxo de neutrófilos, comparado com grupo não imunizado (Figura 9A). Além disso, foram avaliadas as quantidades de macrófagos e eosinófilos. Conforme o esperado, os grupos não infectados (NI e NI+VEs) apresentaram níveis basais destas células. Já os grupos infectados (Afu e VEs+Afu) apresentaram um aumento nos níveis de macrófagos (2×10^5 células/BAL) e eosinófilos (5×10^4 células/BAL) e não foram observadas diferenças estatísticas entre esses grupos (Figura 9B-C).

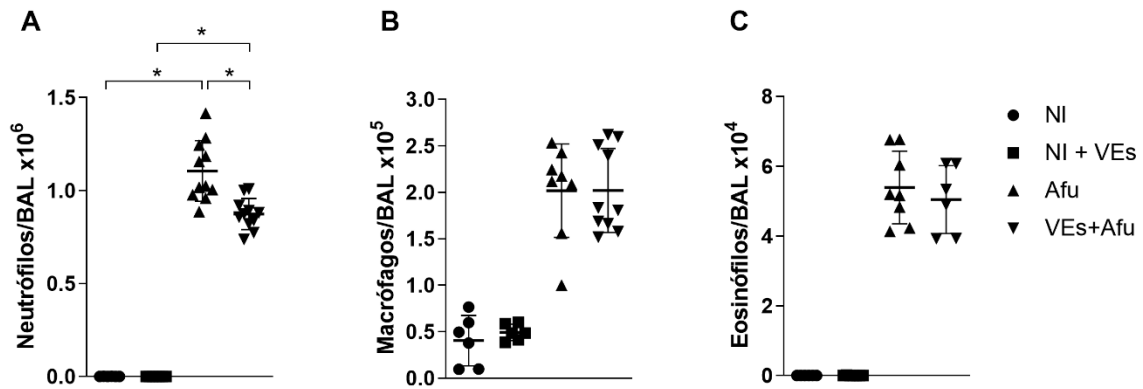


Figura 9: Contagem diferencial de células por BAL. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. O número de neutrófilos (A), macrófagos (B) e eosinófilos (C) foram quantificados nos alvéolos de animais não infectados (● e ■) e dos animais infectados (▲ e ▼). * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

O recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção é dependente, dentre outros fatores, de modificações na superfície do endotélio, que levam a alterações na permeabilidade vascular, culminando no extravasamento de células e moléculas [90]. Neste sentido, nós avaliamos as alterações nos níveis de proteínas totais presentes no BAL, após a infecção pelo *A. fumigatus*. Observamos que os grupos de animais não infectados (NI e NI+VEs) apresentaram níveis basais de proteínas (0,3 mg/mL). Já o grupo infectado (Afu) apresentou um aumento na concentração de proteínas, na ordem de 12 mg/mL. No entanto, nos animais imunizados e infectados (VEs+Afu) foi observado uma concentração de aproximadamente 8 mg/mL de proteínas, demonstrando que houve uma redução de 30% na concentração de proteínas presentes nos alvéolos dos animais que haviam sido previamente imunizados com as VEs, comparado com os animais infectados não imunizados (Figura 10).

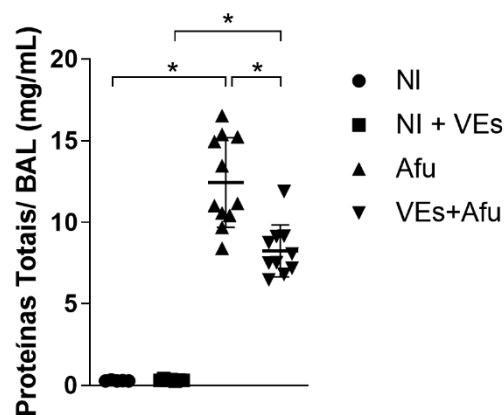


Figura 10: Efeito das VEs no controle de extravasamento de proteínas para os alvéolos. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. A quantidade de proteínas presentes nos alvéolos de animais não infectados (● e ■) e dos animais infectados (▲ e ▼) foram quantificadas. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

Juntos, estes resultados mostram que a imunização com VEs de *A. fumigatus* é capaz de modular o perfil do influxo de células para os pulmões, caracterizado principalmente por uma redução no influxo de neutrófilos e no extravasamento de proteínas.

Nós investigamos também as alterações nos perfis de células presentes no tecido pulmonar após a infecção. A quantificação indireta de leucócitos foi realizada pela medida da atividade enzimática da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), presente nos macrófagos, Mieloperoxidase (MPO), presente nos neutrófilos, e peroxidase de eosinófilos (EPO), e o resultado foi dado como unidades relativas D.O/ 50 mg de tecido. Observamos que os animais não infectados (NI e NI+VEs) apresentaram quantidades basais de neutrófilos (Figura 11A), macrófagos (Figura 11B) e eosinófilos (Figura 11C). Os animais infectados (Afu) apresentaram um aumento na quantidade neutrófilos no parênquima pulmonar (2.541 unidades relativas), enquanto que os animais imunizados e infectados apresentaram 805 unidades relativas, cerca de 30% de neutrófilos, a menos, no parênquima pulmonar, comparado com os animais que não foram imunizados. Já com relação a quantidade de macrófagos e eosinófilos, os grupos infectados (Afu e VEs+Afu) apresentaram um aumento na quantidade macrófagos (Figura 11B) e eosinófilos (Figura 11C), conforme o esperado. No entanto, não foram observadas diferenças nas quantidades relativas destas células no tecido pulmonar destes animais.

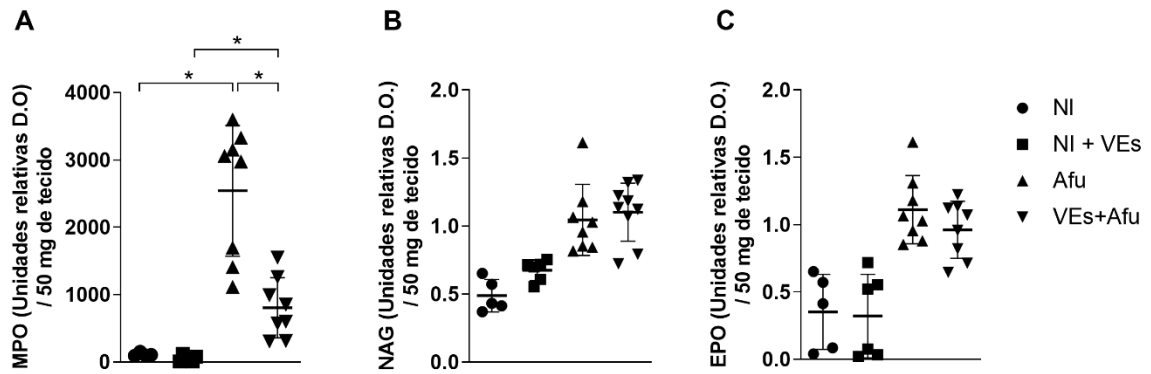


Figura 11: Perfil de células no parênquima pulmonar após infecção por *A. fumigatus*. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. A quantidade de neutrófilos (A), macrófagos (B) e eosinófilos (C), presentes no parênquima pulmonar, foram avaliados nos animais não infectados (● e ■) e nos animais infectados (▲ e ▼). * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

5.3.1.2 Alterações na capacidade fagocítica das células *in vivo*

O influxo controlado de células para o local da infecção é essencial para combater e eliminar de maneira eficaz os patógenos [94]. Os macrófagos alveolares são considerados os fagócitos de primordial importância durante a infecção por *A. fumigatus*. O início da resposta pró-inflamatória mediada pelos macrófagos induz o recrutamento de neutrófilos, que são considerados as principais células de defesa contra as hifas, principalmente [72, 76, 91–93]. Considerando isto, avaliamos a capacidade fagocítica das células presentes no BAL dos animais infectados (Afu e VEs+Afu), a partir do índice fagocítico, ou seja, quantidade de células que fagocitaram, pelo menos, um conídio. Cerca de 19% das células fagocíticas presentes no BAL dos animais infectados que não receberam VEs (Afu) apresentaram, pelo menos, 1 conídio fagocitado, por outro lado, 24% das células fagocíticas presentes no BAL dos animais infectados que receberam previamente VEs (VEs+Afu) apresentaram, pelo menos, 1 conídio fagocitado (Figura 12).

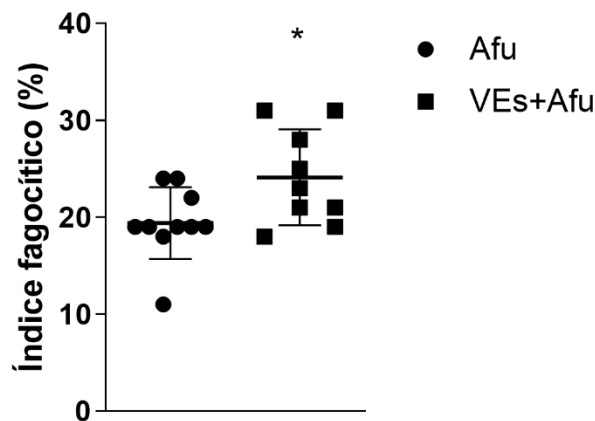


Figura 12: Capacidade fagocítica de células presentes no BAL de animais infectados. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Células do BAL provenientes dos animais infectados (Afu e VEs+Afu), que fagocitaram pelo menos 1 conídio, foram contabilizadas. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

Este resultado sugere que a imunização de camundongos com VEs de *A. fumigatus* é capaz de estimular a capacidade fagocítica destas células durante a exposição ao fungo.

5.3.1.3 Produção de mediadores inflamatórios após infecção por *A. fumigatus*

Sabemos que as VEs de *A. fumigatus* são capazes de modular a produção de mediadores inflamatórios, aumentar o reconhecimento do fungo e a depuração fúngica por células fagocíticas, *in vitro*. Agora demonstramos que a imunização de camundongos com VEs de *A. fumigatus* foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório e melhorar a capacidade fagocítica das células. Considerando isto, avaliamos a produção de mediadores inflamatórios *in vivo*.

O estímulo de PRRs por *A. fumigatus* gera uma resposta pró-inflamatória caracterizada pela produção de citocinas e quimiocinas [72]. Neste trabalho, nós avaliamos a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, CXCL1 e o componente 5a do complemento. Conforme o esperado, os grupos controles (NI e NI+VEs), apresentaram níveis basais dos mediadores inflamatórios avaliados (Figura 13A-F). Já os animais infectados (Afu e VEs+Afu) apresentaram um aumento igual de TNF- α e C5a, aproximadamente 1500 pg/mL e 1100 pg/mL, respectivamente (Figura 13A-B). Por outro lado, animais dos grupos infectados apresentaram um aumento da produção de IL-1 β , IL-6 e CXCL1, e, de maneira interessante, animais do grupo VEs+Afu apresentaram uma redução de aproximadamente 20% nos níveis de produção de IL-1 β , 20% nos níveis de IL-6 e 50% nos níveis de CXCL1, comparado com os animais

infectados que não receberam VEs (Figura 13C-E). Por fim, foi observado um aumento na produção de IL-17 pelos grupos infectados (39 pg/mL), no entanto o grupo imunizado VEs+Afu apresentou um aumento de aproximadamente 30% na produção de IL-17, comparado ao grupo Afu (Figura 13F).

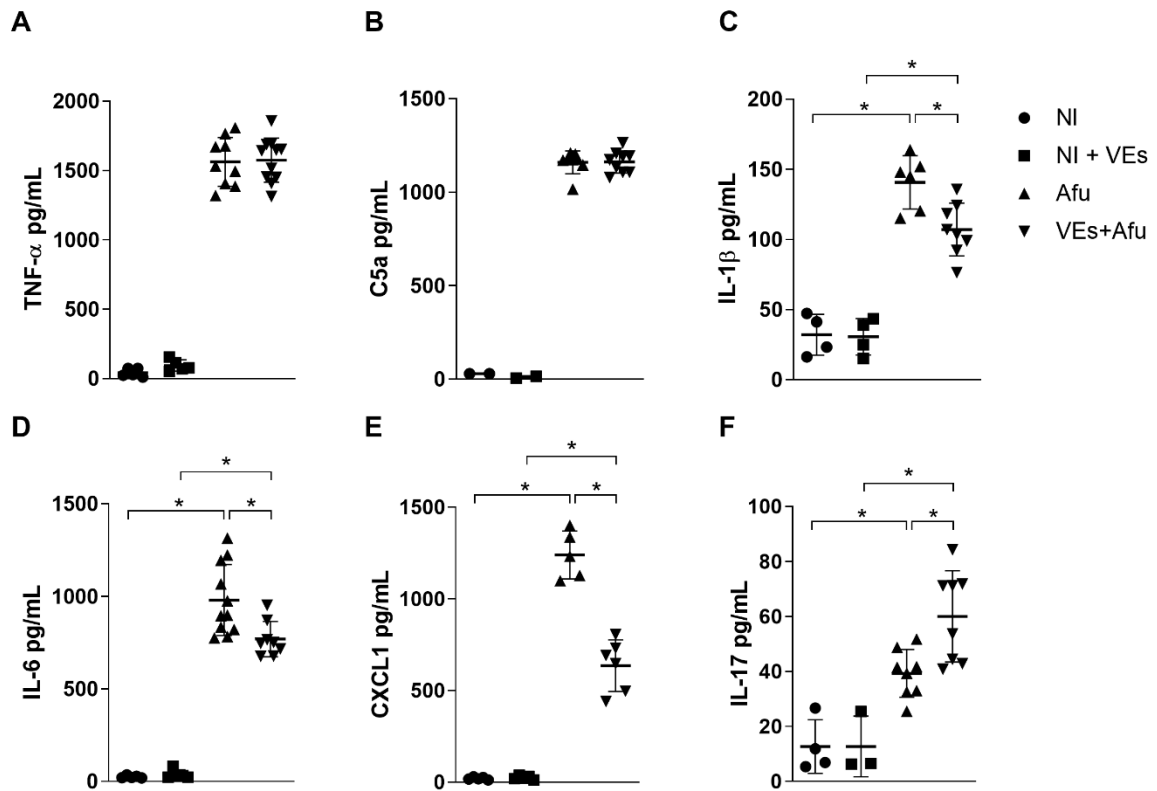


Figura 13: Perfil de mediadores inflamatórios nos alvéolos. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. A quantidade de TNF- α (A), C5a (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), CXCL1 (E) e IL-17 (F) presentes no BAL dos animais não infectados (● e ■) e dos animais infectados (▲ e ▼) foram quantificadas. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

Estes dados sugerem que a imunização de animais com VEs de *A. fumigatus* é capaz de reduzir a inflamação, pela diminuição do CXCL1 e, conseqüentemente, o infiltrado de neutrófilos e diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, após a infecção pelo fungo.

5.3.1.4 Avaliação da ativação de caspase-1 após infecção por *A. fumigatus*

Muitas proteases estão envolvidas no processamento e secreção de moléculas pró-inflamatórias [120]. Neste trabalho, nós investigamos a ativação de caspase-1, considerada essencial para a clivagem de IL-1 β . Utilizando proteínas extraídas de células do BAL de

animais não infectados e infectados (Afu e VEs+Afu) foi realizado um Western Blot e, foi observado que, conforme o esperado, animais não infectados não apresentaram produção de caspase-1 ativada. Já os animais infectados (Afu) apresentaram um aumento na produção de caspase-1 ativada e, de maneira interessante, os animais que foram previamente imunizados com as VEs e infectados com *A. fumigatus* (VEs+Afu) apresentaram uma redução na produção de caspase-1 ativada (Figura 14).

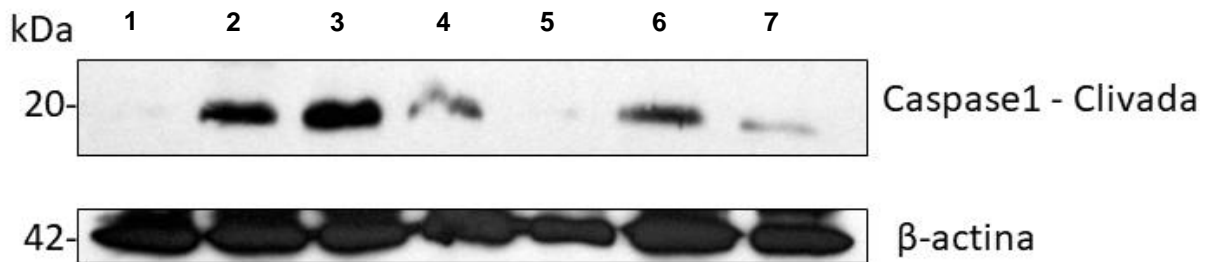


Figura 14: Ativação de caspase-1 frente infecção por *A. fumigatus*. Camundongos foram imunizados com $2,2 \times 10^9$ VEs e infectados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Proteínas foram extraídas de células do BAL e a ativação de caspase foi avaliada por Western Blot. Canaleta 1 - representa proteínas de células do BAL de animais não infectados; 2 a 4 - Animal infectado; 5 a 7 - Animal imunizado e infectado. β -actina foi utilizada como controle de expressão constitutivo.

Juntos, nossos resultados sugerem que a imunização de camundongos com VEs de *A. fumigatus*, antes da infecção, é capaz de modificar o perfil de produção de mediadores inflamatórios, e que, a redução de IL-1 β em animais imunizados e infectados pode estar correlacionada com a diminuição da ativação de caspase-1.

5.4 Discussão

A resposta do hospedeiro a antígenos provenientes de microrganismos patogênicos é dependente de uma série de fatores, incluindo a capacidade do agente infeccioso de produzir e secretar moléculas biologicamente ativas, concentração de moléculas imunogênicas e exposição dessas moléculas às células efectoras [121]. Considerando que VEs secretadas por diferentes microrganismos carregam uma diversidade de moléculas capazes de estimular de diferentes formas o sistema imune, atualmente vários estudos objetivam compreender os efeitos das vesículas como uma estratégia imunomoduladora e com uma aplicação no tratamento de doenças e até mesmo profilática.

Neste trabalho nós elucidamos a composição proteica de VEs de *A. fumigatus* e identificamos a presença de proteínas envolvidas na fisiologia do fungo e também na sua virulência, como alérgenos, proteínas de choque térmico e proteínas envolvidas na resistência a estresse oxidativo, sugerindo que este cargo proteico das VEs poderia atuar como potencial estimulador do sistema imune. Identificamos, *in vitro*, que as VEs de *A. fumigatus* foram reconhecidas por fagócitos e estimularam a fagocitose, a produção de mediadores pró-inflamatórios e impactaram na depuração fúngica. Neste capítulo nós investigamos os efeitos das VEs de *A. fumigatus* no hospedeiro mamífero.

Conforme mencionado no capítulo 1, a principal via de infecção pelo *A. fumigatus* ocorre pela inalação de conídios presentes no ar, seguida pela sua deposição nos bronquíolos ou espaços alveolares. Os conídios são reconhecidos por intermédio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células epiteliais e macrófagos alveolares, o que conduz a formação de uma resposta pró-inflamatória. O início da resposta pró-inflamatória mediada pelos macrófagos induz o recrutamento de outros leucócitos para o local da infecção [72, 89]. Nós observamos que a infecção de camundongos com conídios de *A. fumigatus* induziu um aumento do infiltrado de células inflamatórias para os alvéolos, no entanto, os camundongos que foram imunizados com VEs de *A. fumigatus* apresentaram uma redução na quantidade de células no local da infecção, caracterizado principalmente por uma redução no influxo de neutrófilos. Adicionalmente, foi observado também uma menor quantidade de neutrófilos no parênquima pulmonar.

A migração de células para o local da infecção ocorre por alterações na superfície do endotélio levando a alterações na permeabilidade vascular, podendo aumentar o extravasamento de moléculas, como proteínas, conduzindo a formação de edema. Neste trabalho, a diminuição da quantidade de células nos alvéolos de camundongos imunizados e infectados foi corroborada também por uma diminuição no extravasamento de proteínas para os alvéolos, comparado com animais não imunizados.

O influxo coordenado de células para os pulmões durante uma infecção é importante, uma vez que a depleção de fagócitos acelera a proliferação de fungos nos tecidos e confere um aumento da mortalidade [76, 94]. Mircescu e colaboradores (2009) demonstraram que animais que tiveram uma depleção de neutrófilos antes, ou dentro de 3 horas após uma infecção por *A. fumigatus*, apresentaram uma alta mortalidade [95]. Por outro lado, é importante ressaltar que uma ativação excessiva e descontrolada do sistema imune inato, incluindo ativação celular, pode contribuir para um aumento da gravidade da infecção, levando à dano tecidual e insuficiência respiratória, o que ocorre principalmente em casos de sepse [122–124]. Durante os mecanismos de resposta aguda, por exemplo, células fagocíticas ativadas liberam produtos decorrentes de uma resposta inflamatória, mas podem ser tóxicos quando em excesso no ambiente, como espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e proteases, que em conjunto levam ao dano tecidual. Em conjunto, os danos provocados nos alvéolos e a formação de edema conduzem a uma troca de gases prejudicada, podendo culminar em insuficiência respiratória [125]. Neste sentido, uma ativação coordenada do sistema imune é essencial para uma eliminação efetiva do patógeno. Estudos anteriores demonstraram que a imunização com VEs de patógenos possui o potencial de estimular o sistema imune e contribuir para uma eliminação mais efetiva do microrganismo. Choi e colaboradores (2015) demonstraram que camundongos previamente imunizados com VEs de *S. aureus* foram prevenidos de um exsudato inflamatório proeminente nos pulmões, comparado com animais que não receberam VEs [114]. Desta forma, nossos resultados sugerem que a imunização com VEs pode contribuir para uma montagem coordenada dos mecanismos de resposta inflamatória, frente a uma infecção por *A. fumigatus*.

A fagocitose é um processo temporalmente posterior a ativação e recrutamento de células para o local da infecção. No capítulo 1 deste trabalho, nós observamos que o estímulo de células fagocíticas com VEs de *A. fumigatus*, *in vitro*, é capaz de aumentar a capacidade fagocítica das células. Agora, *in vivo*, nós observamos que células presentes nos alvéolos de camundongos infectados, previamente estimulados com VEs, apresentaram um aumento da capacidade fagocítica, comparado com animais que não receberam VEs. Nossos resultados corroboram a literatura, uma vez que foi observado que macrófagos previamente sensibilizados com VEs de *C. neoformans*, *in vitro*, apresentaram um aumento da capacidade fagocítica após desafio com o fungo [56]. Estes dados demonstram que VEs possuem um potencial em estimular células fagocíticas e impactar no aumento dos mecanismos de depuração fúngica.

O estímulo de PRRs por *A. fumigatus* gera uma resposta pró-inflamatória caracterizada pela produção de citocinas e quimiocinas que são importantes para a defesa do hospedeiro contra este microrganismo [72]. A ativação de uma resposta é influenciada pela viabilidade do patógeno, reconhecimento de moléculas bioativas que estão presentes na superfície do

patógeno e, além disso, a estimulação do sistema imune também está relacionada à secreção de biomoléculas a partir de células viáveis, o que é necessário para fornecer fatores de virulência solúveis e antígenos para o meio extracelular [66]. As VEs são compostas por diferentes tipos de biomoléculas e, têm sido demonstradas, capazes de induzir uma resposta no hospedeiro. Neste capítulo nós mostramos que a imunização com VEs de *A. fumigatus* foi capaz de induzir uma redução da produção de IL-1 β , IL-6 e CXCL1, após a infecção pelo fungo, comparado com animais não imunizados. A citocina IL-1 β é liberada a partir de macrófagos ativados e é essencial para a proliferação e diferenciação celular e apoptose [126]. Durante a infecção por *A. fumigatus* a produção de IL-1 β é essencial para a ativação da atividade antifúngica dos macrófagos. A importância da atividade desta citocina é reforçada pelo estudo onde foi demonstrado que camundongos deficientes para o receptor IL1R1 apresentaram uma maior susceptibilidade a infecção por *A. fumigatus*, apresentando uma deficiência no recrutamento de leucócitos e na atividade antifúngica [127].

A citocina IL-6 contribui para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de respostas de fase aguda. Em um modelo de infecção por *A. fumigatus*, camundongos *knockouts* para o receptor de IL-6 foram mais susceptíveis à infecção, apresentando um aumento da inflamação, diminuição das funções efetoras antifúngicas dos fagócitos e comprometimento do desenvolvimento de respostas do tipo Th1 [128]. Por outro lado, embora sua expressão seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a produção contínua e desregulada de IL-6 pode representar um problema. Em artrite reumatoide, por exemplo, a produção exacerbada de IL-6 leva a um efeito deletério, gerando uma inflamação crônica e autoimunidade [129].

A quimiocina CXCL1 é produzida por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais e tem atividade quimiotática para neutrófilos. A produção de CXCL1 durante as infecções por *A. fumigatus* é essencial, visto que os neutrófilos são importantes para a eliminação do fungo, uma vez que já foi demonstrado que indivíduos neutropênicos são mais susceptíveis à infecção [91, 92, 124].

Em nossos resultados, ao contrário das outras citocinas, foi observado um aumento de IL-17 em animais imunizados e infectados, comparado com os animais não imunizados. Esta citocina está relacionada ao recrutamento de neutrófilos. Estudos demonstraram que a produção comprometida de IL-17 aumenta a susceptibilidade à *A. fumigatus* [130]. Nosso grupo já demonstrou também que uma fonte importante de IL-17 na aspergilose são os eosinófilos [124], no entanto, como não foram observadas diferenças na contagem dessa célula, para entender melhor o papel dessa citocina nesse contexto, seriam necessários experimentos visando acessar os linfócitos na imunidade inata, produtores de IL-17, presentes no sítio infeccioso.

Desta forma, em conjunto com os nossos resultados em células *in vitro*, nossos resultados sugerem que um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th17 possa estar envolvido na ativação dos mecanismos inflamatórios de animais que foram imunizados com VEs. Embora seja necessário um processo inflamatório agudo, associado a uma resposta para combater os patógenos, é também necessária uma regulação eficaz para suprimir os processos inflamatórios exacerbados e, limitar os danos induzidos pela inflamação, para manter a homeostase e proteger a função tecidual [131].

Em adição, a produção de IL-1 β está intimamente relacionada com os efeitos da sensibilização com VEs. Observamos anteriormente, *in vitro*, que a sensibilização de BMDN com VEs aumenta a produção de IL-1 β , após 3 horas de desafio com *A. fumigatus*, sugerindo a instalação de uma resposta inflamatória mais rápida e robusta, enquanto nossos resultados *in vivo*, demonstram que camundongos previamente imunizados com VEs e, após 48h de infecção com *A. fumigatus*, apresentaram uma redução nos níveis de IL-1 β . A produção de IL-1 β é mediada por caspase-1. As caspases são uma família de cisteína proteases intracelulares que clivam resíduos de ácido aspártico em um número limitado de substratos. Estas proteases podem estar envolvidas em processos apoptóticos ou na produção de mediadores pró-inflamatórios. Caspase-1 está envolvida no processamento de moléculas pró-inflamatórias e está presente no citosol de células fagocíticas em sua forma inativa, denominada de pró-caspase. Após estímulos específicos, por patógenos por exemplo, a pró-caspase é ativada por clivagem proteolítica. A ativação da pró-caspase-1 é mediada por um complexo multiproteico denominado inflamassoma. Caspase-1 ativa é essencial para a clivagem de pró-IL-1 β e pró-IL-18 [120, 126]. Nossos resultados demonstraram uma redução na ativação de caspase-1 em camundongos imunizados com VEs, comparado com animais não imunizados. Este resultado corrobora com a diminuição nos níveis de IL-1 β e com a redução no influxo de células desses animais para os alvéolos. Foi demonstrado, em modelos murinos de sepse, que a produção controlada de IL-1 β contribui para uma redução da inflamação exacerbada, diminuindo os efeitos de dano tecidual no local da infecção [123]. Choi e colaboradores (2015) demonstraram que a imunização de camundongos com VEs de *S. aureus* reduziu os níveis de IL-1 β e IL-6 circulantes em animais infectados, indicando a eficácia da imunização contra pneumonia e sepse [114]. Neste sentido, a imunização com VEs representa uma estratégia promissora no controle da inflamação, após infecção.

Tomados em conjunto, os resultados aqui gerados mostram que múltiplas imunizações com VEs de *A. fumigatus* resultam em uma diminuição do infiltrado de neutrófilos para os pulmões, após infecção por *A. fumigatus*. A diminuição do recrutamento celular para os espaços alveolares foi corroborada com uma diminuição da produção de mediadores inflamatórios, especialmente CXCL-1, IL-6 e IL-1 β , sendo que a diminuição dos níveis desta última está correlacionada com uma diminuição na ativação de caspase-1.

6. CAPÍTULO 3: PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESCRT NA BIOGÊNESE DAS VES DE *A. fumigatus*

6.1 A participação de proteínas dos complexos ESCRT na liberação de VES em células eucarióticas

Conforme mencionado no capítulo 1, a secreção de VEs pelos organismos é considerada um mecanismo celular evolutivamente conservado [2, 3]. Sabe-se que as VEs são importantes na comunicação intercelular e são biologicamente ativas, podendo causar morte da célula hospedeira, induzir produção de mediadores da resposta imune e, em alguns casos, conferir proteção a doenças [3].

Embora os primeiros estudos sobre a secreção de VEs em eucariotos tenham ocorrido na década de 80, a identificação da maquinaria responsável pela liberação de VEs, por estas células, é bastante recente [132]. Conforme mencionado anteriormente, no capítulo 1, os exossomos são liberados por exocitose, enquanto microvesículas ou ectossomas são secretados pelo brotamento externo da membrana plasmática [5]. A formação de microvesículas (MVs) é iniciada a partir de domínios denominados de jangadas lipídicas, que são regiões distintas ao longo da membrana plasmática caracterizadas por altas concentrações de lipídios, como colesterol e glicosíngolipídeos, e proteínas [133, 134]. O início do brotamento da membrana é dependente do influxo de cálcio na célula e da reorganização do citoesqueleto. Os níveis intracelulares dos íons de cálcio modificam a distribuição fosfolipídica de membranas plasmáticas, por ação de proteínas específicas, denominadas flipase, flopase e scramblase. Essas proteínas são transmembranares e possuem um importante papel em mover lipídeos através da membrana plasmática, um processo dependente da hidrólise de ATP. As flipases movem lipídeos da região externa da membrana para a região citosólica, enquanto as flopases transportam na direção oposta. Já as scramblases conseguem transportar em ambos sentidos. O aumento de íons de cálcio induz a ativação da scramblase, que transloca a fosfatidilserina do folheto interno da bicamada da membrana celular para a parte externa [135]. Neste sentido, as MVs expõem grandes quantidades de fosfatidilserina em sua superfície e são enriquecidas em proteínas associadas a jangadas lipídicas de membrana (Figura 15). As vesículas originadas por brotamento são então carregadas com moléculas, vias intracelulares ativam a reorganização do citoesqueleto e o desprendimento das protrusões da membrana plasmática é mediado pelas proteínas do Complexo de Classificação Endosomal Requerido para Transporte (ESCRT). Desta forma, estruturas fechadas de bicamadas lipídicas são liberadas para o espaço extracelular [35, 133–135].

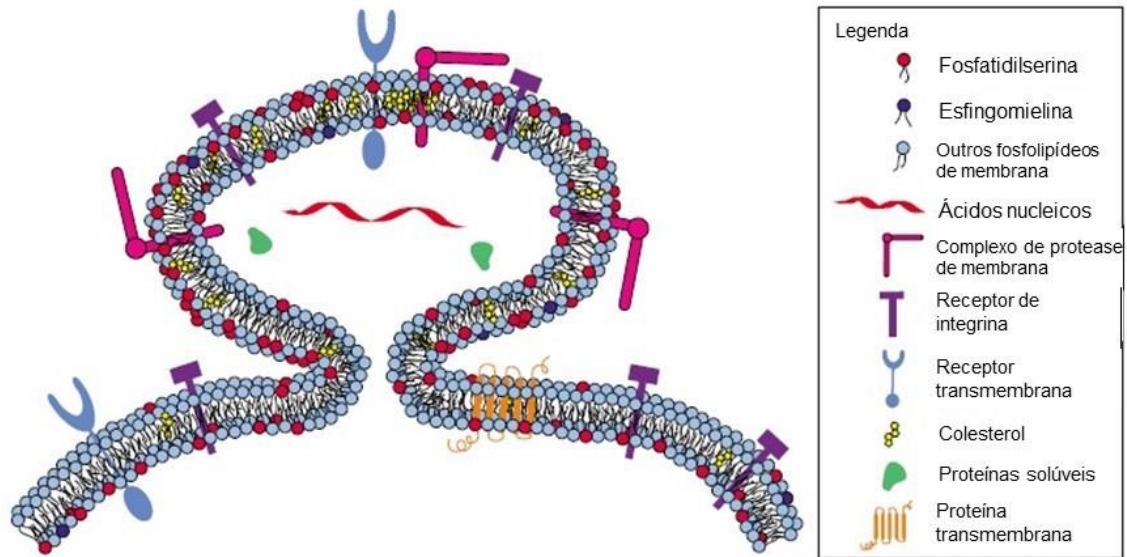


Figura 15: Brotamento de microvesículas a partir da membrana plasmática. As microvesículas são formadas pelo brotamento externo da membrana plasmática. Estas estruturas são formadas em regiões de jangadas lipídicas, enriquecidas com lipídios, como o colesterol e esfingolipídios, enquanto a fosfatidilserina é realocada para o folheto externo da membrana. O fechamento do estreitamento da membrana é mediado por proteínas ESCRT (Muralidharan-Chari, et al., 2010 – Adaptado).

Os processos de secreção de microvesículas foram investigados inicialmente em células de mamíferos, no entanto estes processos têm sido também extensivamente estudados em leveduras. A importância do papel da mobilidade de membrana na liberação de VEs foi investigada em *C. neoformans*, onde foi demonstrado que um mutante de deleção para uma flipase ($\Delta apt1$) produziu VEs com tamanhos diferentes e com menor concentração de glucuronoxilomanana (GXM), comparado à linhagem selvagem. A produção de GXM também foi diminuída em ensaios *in vitro* e *in vivo*, onde foram observados diminuição da sobrevivência do mutante nos pulmões de camundongos infectados, redução dos níveis de IL-6 e alterações na eficácia de colonização do cérebro [136]. Recentemente, Reis e colaboradores (2019) demonstraram que um mutante de deleção para scramblase ($\Delta aim25$), em *C. neoformans*, apresentou VEs com alterações no tamanho e no conteúdo de RNA, comparado à linhagem selvagem. Além disso, a mutação conferiu maior desorganização da membrana e aumento das dimensões capsulares. Quando utilizado um modelo de revestimento de superfície de uma linhagem criptocócica acapsular, com GXM vesicular derivado de VEs do mutante $\Delta aim25$, foi observado que o conteúdo vesicular foi mais eficientemente utilizado como fonte de polissacarídeos capsulares, comparado à utilização de VEs da linhagem selvagem [137]. Desta forma, esses dados demonstram que a atuação coordenada de proteínas e lipídios presentes na membrana é importante para a estrutura e liberação de microvesículas.

Os exossomos, por sua vez, são formados por um brotamento interno da membrana plasmática, formando um endossomo, que conduz a formação de corpos multivesiculares (MVBs). Durante este processo, certas proteínas e ácidos nucleicos, por exemplo, são incorporados na membrana invaginante e, na via endolisossomal, componentes citosólicos são englobados, se acumulam, e dão origem às vesículas intraluminais (ILVs). No entanto, em vez dessas moléculas serem direcionadas ao lisossomo para degradação, como normalmente ocorre, alguns dos MVBs são enviados para a superfície da célula. Nesse ponto, os MVBs se fundem com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo para o espaço extracelular (Figura 16) [23, 24, 35, 138].

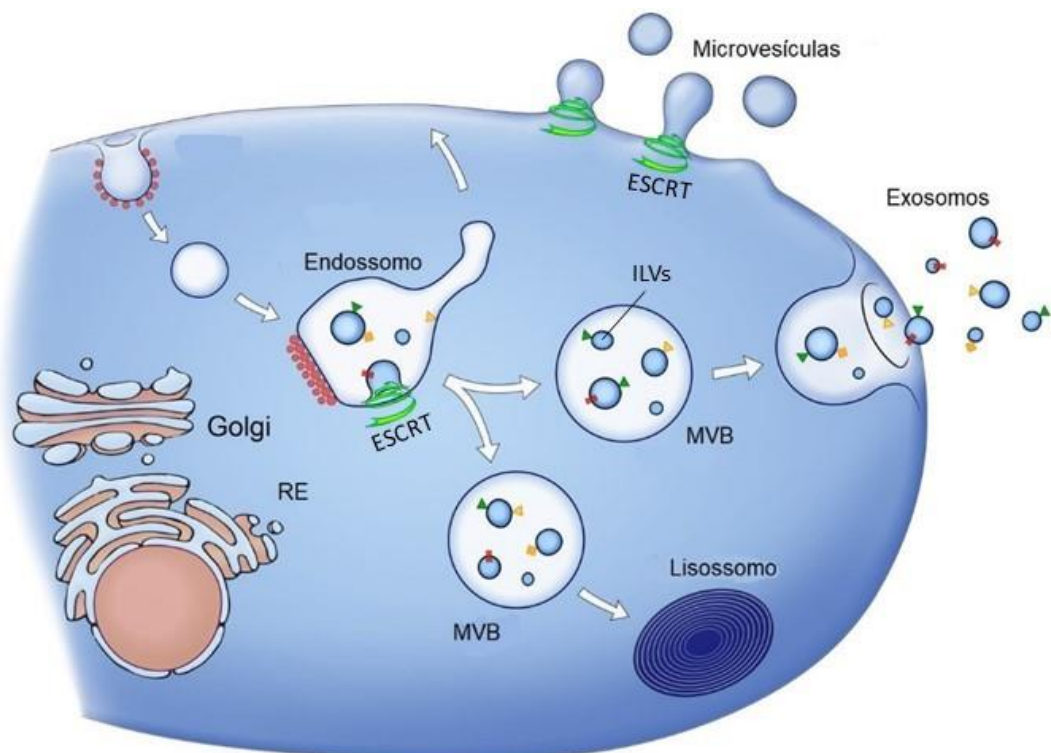


Figura 16: Modelo de liberação de exossomos. Corpos multivesiculares (MVBs) são parte da via endocítica, que incorporam moléculas citosólicas conduzindo a formação de vesículas intraluminais (ILVs). Alguns MVBs podem ser endereçados para a membrana e liberar o seu conteúdo como exossomos. O conteúdo dos exossomos pode, inclusive, variar dependendo de onde ocorreu o início da maturação (Raposo e Stoorvogel, 2013 – Adaptado).

Estudos recentes investigaram a maquinaria que estaria envolvida no processo de secreção de exossomos. A descoberta do Complexo de Classificação Endossomal Requerido para Transporte (ESCRT) forneceu um mecanismo celular para esse processo [139–141]. ESCRT é composto por cinco complexos de proteínas (ESCRT-0; ESCRT-I; ESCRT-II; ESCRT-III e complexo Vps4), os quais se unem e favorecem a formação de vesículas intraluminais (ILVs). Este processo foi inicialmente descrito na via de formação de exossomos, porém, atualmente sabe-se que os complexos ESCRT também estão envolvidos no

fechamento do brotamento de microvesículas [7, 26–28, 132, 138, 142]. A montagem dos complexos se inicia pelo reconhecimento de uma carga ubiquitinada na membrana pelo ESCRT-0, a partir de subunidades de ligação à ubiquitina desse complexo. A seguir, ESCRT-I e ESCRT-II também se ligam às cargas ubiquitinadas, e a eles mesmos, objetivando criar uma zona enriquecida de ESCRT. ESCRT-II estimula a montagem do complexo ESCRT-III, considerado um complexo proteico envolvido na promoção dos processos de brotamento. O complexo ESCRT-III recruta a maquinaria de deubiquitinação, empacota a carga de vesículas e finalmente o complexo é desmontado pelo complexo Vps4 que, a partir da hidrólise de ATP, desmonta o complexo ESCRT-III (Figura 17) [132, 138, 143].

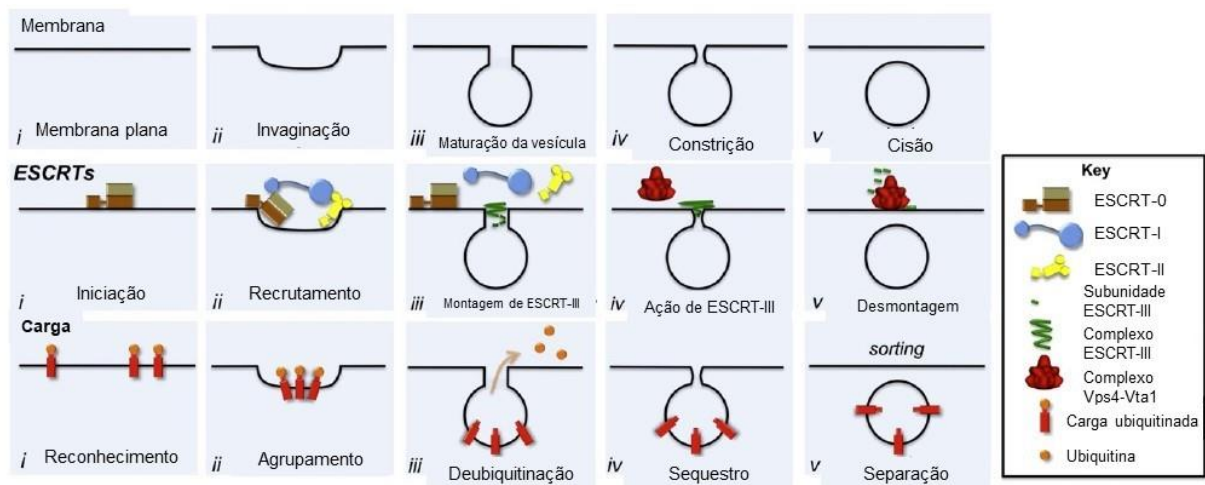
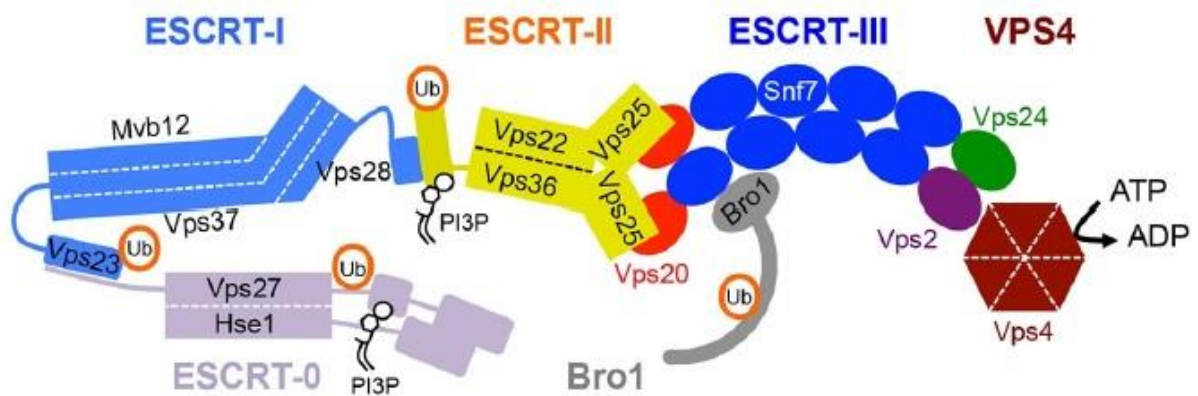


Figura 17: Formação de VEs mediada por ESCRT. Uma carga ubiquitinada na membrana é reconhecida por regiões de ligação a ubiquitina de ESCRT-0 (i), ESCRT-I e II se ligam a carga ubiquitinada e a eles mesmos, criando uma região enriquecida de ESCRT (ii), a montagem de ESCRT-III é favorecida e recruta a maquinaria de desubiquitinação (iii), resultando no brotamento vesicular (iv). A maquinaria é então desmontada pelo complexo Vps4-Vta1 (v) (Henne et al., 2011 - Adaptado).

A constituição proteica e função dos complexos ESCRT, em eucariotos, vem sendo extensivamente investigadas. O que se sabe, até o momento, é que cada complexo ESCRT é formado por 2 ou mais proteínas, as quais são recrutadas de maneira sequencial do citoplasma para a montagem da maquinaria de secreção (Figura 18). Neste trabalho, o nosso foco será discutir com base nos achados em leveduras.



ESCRT-0 Vps27 Hse1	Interage com Vps23 (ESCRT-I) pelo motivo PTAP presente em Vps27 (ESCRT-0).
ESCRT-I Vps23 Vps28 Vps37 Mvb12	Vps27 (ESCRT-0) interage com o motivo UEV de Vps23 (ESCRT-I), enquanto Vps36 (ESCRT-II) interage com região C-terminal de Vps28.
ESCRT-II Vps36 Vps22 Vps25	Vps28 (ESCRT-I) interage com domínio GLUE de Vps36 (ESCRT-II), enquanto Vps20 (ESCRT-III) interage com região C-terminal de Vps25 (ESCRT-II).
ESCRT-III Vps20 Snf7 Vps24 Vps2	Vps25 (ESCRT-II) interage com hélice-1 de Vps20 (ESCRT-III), enquanto Vps4 interage com domínios MIM na região C-terminal presente em todas as subunidades de proteínas do ESCRT-III.
Complexo Vps4 Vps60 Vta1	Interage com domínios MIM na região C-terminal presente em todas as subunidades de proteínas do ESCRT-III, via domínio MIT.

Figura 18: Modelo de interação entre as proteínas dos complexos ESCRT. A montagem dos complexos ESCRT é iniciada pelo reconhecimento de cargas ubiquitinadas na membrana, por Vps27 e Hse1 (ESCRT-0), que interagem entre si. Vps27 interage com Vps23, que se associa a Vps28, Vps37 e Mvb12, formando ESCRT-I. Vps28 interage com Vps36, que se associa a Vps22 e Vps25, formando ESCRT-II. Vps25 interage com Vps20, que se associa a Snf7, Vps24 e Vps2, formando ESCRT-III. Por fim, Vps4, associado a Vta1 e Vps60, reconhece domínios MIM na região c-terminal das subunidades de ESCRT-III e promove a dissociação deste (Henne et al., 2011, Tang et al., 2016 - Adaptado).

Conforme mencionado no capítulo 1 deste manuscrito, um dos papéis descritos para VEs é a participação na formação de matriz extracelular. Zarnowski e colaboradores (2018)

isolaram VEs a partir do biofilme de *C. albicans* e descobriram que sua composição é distinta daquelas que são liberadas livres em cultura, demonstrando mais um importante papel de VEs. Além disso, foi investigado o potencial deste microrganismo na produção de biofilme, frente a mutações em proteínas do complexo ESCRT. A maioria das mutações causou redução na produção de VEs do biofilme e nos níveis de polissacarídeo da matriz, além disso, aumentou significativamente a sensibilidade das linhagens ao antifúngico fluconazol. O acúmulo de matriz e hipersensibilidade a drogas de mutantes ESCRT foram revertidos quando adicionado VEs provenientes do biofilme da linhagem selvagem. Tomados em conjunto, esses resultados mostram a importância das VEs para a fisiologia e virulência de *C. albicans* e como mutações nas proteínas ESCRT afetam a fisiologia desta levedura [144].

Em *A. fumigatus*, identificamos que a produção de VEs possui possivelmente um importante papel na fisiologia do fungo, como proteínas de remodelamento de parede celular. Além disso, observamos que as VEs deste microrganismo são capazes de estimular o sistema imune, impactando na produção de mediadores inflamatórios e estimulando mecanismos de depuração fúngica *in vitro* e *in vivo*. Até o presente momento, não se sabe quais mecanismos podem estar envolvidos na liberação de VEs por *A. fumigatus*. Atualmente, os estudos de mecanismos de secreção de VEs em fungos estão concentrados, principalmente, em leveduras, enquanto o papel em fungos filamentosos ainda não é compreendido. Diante das evidências de que as proteínas dos complexos ESCRT estão envolvidas na liberação de VEs por células eucarióticas, sugere-se que estas proteínas também possam estar envolvidas nos mecanismos de liberação de VEs em fungos filamentosos patogênicos, como o *A. fumigatus*. Neste capítulo, nós investigamos o perfil de expressão gênica das proteínas dos complexos ESCRT, em diferentes tempos de cultivo de *A. fumigatus*.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Avaliação do nível de expressão gênica das proteínas ESCRT em *A. fumigatus*

6.2.1.1 Extração de RNA total

Para avaliar a expressão gênica das proteínas dos complexos ESCRT, foram extraídos RNA de *A. fumigatus* da linhagem A1163 em três diferentes tempos de cultivo: 0, 24 e 48 horas. Conídios de *A. fumigatus*, previamente armazenados em suspensão a 4°C, foram semeados em placas com meio YAG e incubados em estufa a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de conídios em PBS 1X estéril. A suspensão foi centrifugada a 1.400 g por 10 minutos. O *pellet* de conídios foi ressuspensão em PBS 1X estéril e a concentração foi determinada após contagem em câmara de Newbauer. Cerca de 1×10^9 conídios foram centrifugados novamente a 1.400 g durante 10 minutos e o *pellet* foi congelado a -80°C. Essa amostra representa o tempo 0.

Para os tempos de 24 e 48 horas de cultura de *A. fumigatus*, 2×10^7 conídios foram inoculados em 100 mL de meio YG e mantidos em agitação constante a 120 rpm, por 24 e 48 horas a 37°C. Todas as condições foram realizadas em triplicata. Após o término de cada período de incubação, o micélio foi separado do sobrenadante por filtração a vácuo, utilizando filtro de papel. Em seguida, o micélio foi envolvido em papel alumínio e armazenado em freezer -80°C até o uso.

Para a extração de RNA total das amostras, o *pellet* de conídios congelado e os micélios, provenientes dos tempos de 24 e 48 horas, foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo e uso de nitrogênio líquido, para o rompimento das células. Os produtos macerados foram transferidos para tubos contendo 1 mL de Trizol (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram imediatamente homogeneizadas com auxílio de agitador mecânico e incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio sobre as amostras e homogeneizadas, novamente em agitador mecânico, por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas a 9.300 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo 500 µL de isopropanol, onde os líquidos foram homogeneizados por inversão. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugadas novamente a 9.300 g, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500 µL de etanol 75% sobre o *pellet*. Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 9.300 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* deixado secar. Foram adicionados 30 µl de água livre de nuclease sobre cada *pellet*, e os mesmos foram incubados a 65 °C por

10 minutos. A concentração e pureza das amostras foram determinadas no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) e, em seguida, as amostras foram armazenadas em *freezer* -80°C.

6.2.1.2 Síntese de cDNA

Após a extração de RNA total do fungo *A. fumigatus*, nas diferentes condições, foi realizada a síntese de cDNA. As quantidades dos reagentes utilizados (BioRad) encontram-se na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1: Reagentes para transcrição reversa

Reagentes	Quantidades
<i>iScript Reaction Mix 5X</i>	2 µL
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	0,5 µL
RNA total	500 ng
Água livre de nuclease	q.s.p. 10 µL

A reação foi incubada em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 25°C por 5 minutos, 46°C por 20 minutos, 95°C por 1 minuto e 4°C *on hold*.

6.2.1.3 Desenho de *primers* para PCR em tempo real

As buscas para possíveis proteínas envolvidas nos complexos ESCRT em *A. fumigatus* foram feitas com base em ortologia por proteínas ESCRT já descritas e caracterizadas em *S. cerevisiae*. A busca das sequências proteicas de *S. cerevisiae* foi realizada, inicialmente, utilizando o banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/>). As sequências de *S. cerevisiae* foram comparadas às sequências de *A. fumigatus*, depositadas no banco de dados EnsemblFungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>). Foi realizado um *blast* e a escolha das sequências foi feita com base na identidade. Informações adicionais sobre as funções das proteínas identificadas para *A. fumigatus* foram encontradas no banco de dados de *Aspergillus* ssp. (<http://www.aspergillusgenome.org/>). Os códigos de acesso aos genes das proteínas de *S. cerevisiae* e *A. fumigatus* encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Números de acessos das proteínas dos complexos ESCRT em *S. cerevisiae* e *A. fumigatus*

Proteínas	Gene <i>S. cerevisiae</i>	Uniprot <i>S. cerevisiae</i>	Gene <i>A. fumigatus</i>	Uniprot <i>A. fumigatus</i>
Vps27	VPS27	P40343	vps27	Q4WHN8
Hse1	HSE1	P38753	AFUA_2G04670	Q4WHP5
Vps23	STP22 (VPS23)	P25604	AFUA_3G14380	Q4WYV3
Vps28	VPS28	Q02767	AFUA_1G16320	Q4WRH2
Vps36	VPS36	Q06696	AFUA_4G04100	Q4W9Q5
Vps22	SNF8 (VPS22)	Q12483	AFUA_4G03870	Q4W9S7
Vps25	VPS25	P47142	AFUA_4G12290	Q4WQC0
Vps20	VPS20	Q04272	AFUA_1G09220	Q4WTI1
Snf7	SNF7	P39929	AFUA_1G06420	Q4WJC9
Vps24	VPS24	P36095	AFUA_5G13890	Q4WVZ8
Vps2	DID4 (VPS2)	P36108	AFUA_5G13410	Q4WVV1
Vps4	VPS4	P52917	AFUA_3G09360	Q4WXF8
Vps60	VPS60	Q03390	AFUA_4G11000	Q4WPZ4
Vta1	VTA1	Q06263	AFUA_1G05910	Q4WJH9

De posse das sequências de mRNA codificadores dos genes ESCRT em *A. fumigatus*, primers foram desenhados para PCR em tempo real utilizando a ferramenta *PrimerQuest Tool* da *Integrated DNA Technologies – IDT* (<https://www.idtdna.com/pages>). As sequências dos primers encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência de primers para PCR em tempo real

Gene	Forward	Reverse
Vps27	5'- CGACATTGAAGTTAACCGATAC – 3'	5'- GAGTTCAGCATCTTCTCTT – 3'
Hse1	5'-AGTTGAAGACGCAGAATCC-3'	5'- TGCTTGGTCCGCTTTAG -3'
Vps23	5'- GCTGACTCGGGATCACTAT – 3'	5'- GGAGGAGTAAGGCAGAGAAA – 3'
Vps28	5'- CGATGAGGAAGTGAAGTAACTAGC – 3'	5'- AACTGGACTTGTACTGCTTTAG – 3'
Vps36	5'- TACGAAGGTTTCGCAGTGT – 3'	5'- ACAAGGGAGTAGAAGCAGTAG – 3'
Vps22	5'- CAGATTATGGGCGGTGATATG -3'	5'- GAACATCATCATCAGTGACCTC -3'
Vps25	5'- AGTCGGTAGCCTGGATTT – 3'	5'- TCCATACCATGCCATTCTTG – 3'
Vps20	5'- GGGCTTACCAAGAGGAAATTAG – 3'	5'- GGGACATTTGGTAAGGTGATAG – 3'
Snf7	5'- GAAGGTCCACGAGAAGAATC -3'	5'- GTTGGTCCATCGTCTCATC -3'
Vps24	5'- TCCTCAAGCGCAAATTAGG -3'	5'- TGCTTGCGAAGGGTTTC -3'
Vps2	5'- TCCGTATTCAGACCGTTTCG -3'	5'- CTATGGCATCGTCCATCATTTTC -3'
Vps4	5'- GGAAGGGTATTCTGCTCTATG – 3'	5'- TGACAAGCCTCTCACTCT – 3'
Vps60	5'- AAAGTAGACAACCGCATCG -3'	5'- TTGGGCTTCGACTGTTTC -3'
Vta1	5'- GTATTGTGCAAAGCAGTCG -3'	5'- TTGTTGTGGTGAGGGTTAG -3'
β -tubulina	5'- GGAGTTCCTGAGGCCGAGAGCA -3'	5'- GGGGCTCCTCCTCGCCGTAC -3'

Os *primers* foram ressuspensos em água livre de nuclease, de acordo com as recomendações do fabricante. A eficiência e a especificidade dos *primers* foram avaliadas utilizando uma curva de calibração com DNA genômico de *A. fumigatus*, variando de 300 ng a 300 fg. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse, utilizada na construção das curvas de calibração, foi determinada levando em conta que *A. fumigatus* é um organismo haploide, logo os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma. Adicionalmente, considerando que o tamanho do genoma do *A. fumigatus* é de 29,4 Mb [105], um genoma corresponde a aproximadamente 30 fg. Sendo assim, teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. fumigatus* correspondem à uma cópia de cada um dos genes do fungo. Diluições seriadas de 10^1 a 10^7 cópias do genoma de *A. fumigatus* foram utilizadas para construir as curvas padrão para cada gene investigado. A equação da reta obtida para cada curva padrão, bem como seu respectivo coeficiente de correlação linear (r^2), foram obtidos em cada experimento. O aparelho para detecção imediata da fluorescência utilizado nos experimentos de RT-qPCR foi o ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*).

6.2.1.4 Avaliação da expressão gênica das proteínas ESCRT por PCR em tempo real

Os cDNAs, construídos a partir dos RNAs extraídos das amostras (0, 24 e 48 horas), foram utilizados para avaliar a expressão gênica das proteínas ESCRT. Para tanto, foram utilizados também os *primers* para PCR em tempo real, anteriormente mencionados. As quantidades dos reagentes (*Applied Biosystems*) utilizados para a reação encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Reagentes para reação de qPCR

Reagentes	Quantidades
<i>Fast SYBR Green Master Mix</i>	5 μ L
<i>Primer Forward (10 μM)</i>	1 μ L
<i>Primer Reverse (10 μM)</i>	1 μ L
Água de livre de nuclease	2 μ L
cDNA	1 μ L

A reação ocorreu em termociclador *7500 Fast* (*Applied Biosystem*) seguindo as condições de ciclagem *default*. A quantificação absoluta dos genes foi determinada pela normalização dos valores Ct obtidos em cada amostra, utilizando-se *primers* para o gene constitutivo β -tubulina.

6.2.2 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas pela análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se valor de $p < 0,05$.

6.3 Resultados

6.3.1 Expressão de Vps27, do ESCRT-0, em culturas de *A. fumigatus*

As proteínas do complexo ESCRT-0 são as primeiras a interagir com o local de formação das vesículas [132]. Neste trabalho, nós investigamos expressão gênica de *vps27* (ortólogo de *VPS27*) do complexo ESCRT-0. Foi observado que *vps27* teve sua expressão aumentada, em aproximadamente 4 vezes, no tempo de 24 horas e um aumento de 2 vezes no tempo de 48 horas de cultura, comparados ao tempo 0 (Figura 19).

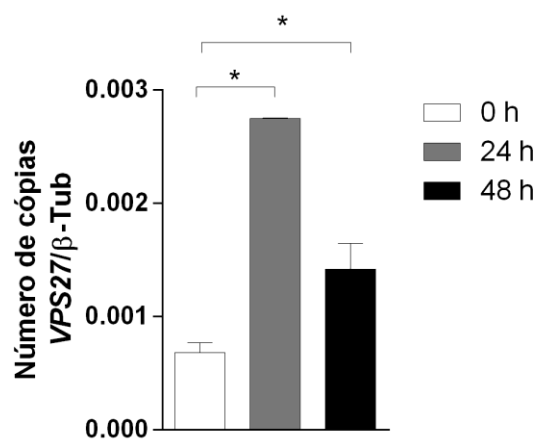


Figura 19: Nível de expressão de ESCRT-0 em culturas de *A. fumigatus*. Os níveis de expressão de cada transcrito foram avaliados por qRT-PCR após 0, 24 e 48 horas. *VPS27* é constituinte do complexo ESCRT-0. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

6.3.2 Expressão do complexo ESCRT-I em culturas de *A. fumigatus*

As proteínas do complexo ESCRT-I também reconhecem cargas ubiquitinadas e seu recrutamento do citoplasma para os endossomos requer interações proteína-proteína com o complexo ESCRT-0 [139]. Aqui, nós avaliamos a expressão gênica de AFUA_3G14380 (ortólogo de *VPS23*) e AFUA_1G16320 (ortólogo de *VPS28*). Observou-se que a expressão de AFUA_3G14380 (*VPS23*) aumentou 14 vezes no tempo de 24 horas, e apresentou um aumento de aproximadamente 16 vezes no tempo de 48 horas de cultura, comparados ao tempo 0 (Figura 20A). Por outro lado, AFUA_1G16320 (*VPS28*) manteve a sua produção basal nos tempos de 24 e 48 horas de cultura, comparados ao tempo 0 (Figura 20B).

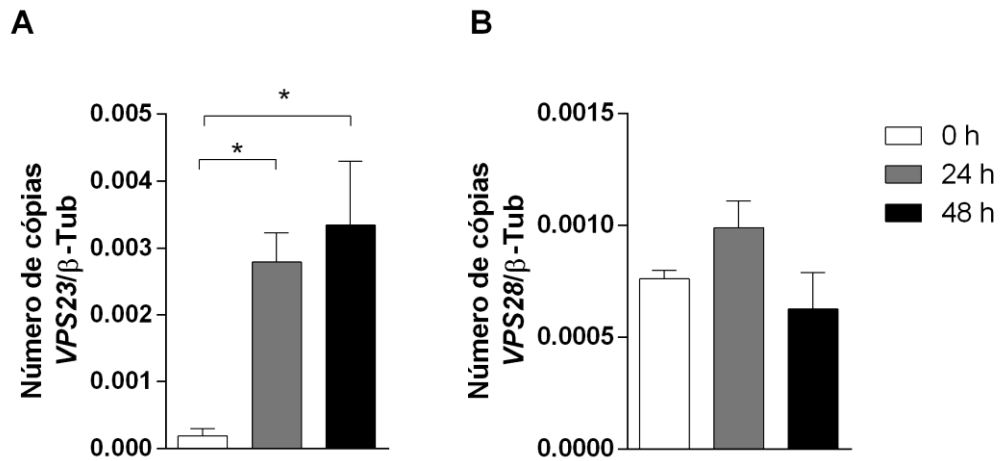


Figura 20: Nível de expressão de ESCRT-I em culturas de *A. fumigatus*. Os níveis de expressão de cada transcrito foram avaliados por qRT-PCR após 0, 24 e 48 horas. AFUA_3G14380 (*VPS23*) e AFUA_1G16320 (*VPS28*) são constituintes do complexo ESCRT-I. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

6.3.3 Expressão do complexo ESCRT-II em culturas de *A. fumigatus*

As proteínas do complexo ESCRT-II atuam a jusante do complexo ESCRT-I e são importantes para o recrutamento de proteínas do complexo ESCRT-III [136]. Avaliamos expressão gênica de AFUA_4G04100 (ortólogo de *VPS36*), AFUA_4G03870 (ortólogo de *VPS22*) e AFUA_4G12290 (ortólogo de *VPS25*). Observamos que a expressão de AFUA_4G04100 (*VPS36*) apresentou uma produção basal no tempo de 24 horas de cultura. No entanto, no tempo de 48 horas de cultura, houve uma redução significativa na expressão desse gene (Figura 21A). Por outro lado, AFUA_4G03870 (*VPS22*) apresentou um aumento na expressão após 24 e 48 horas de crescimento, comparados ao tempo 0 (Figura 21B). Já AFUA_4G12290 (*VPS25*) aumentou 5 vezes sua expressão em 24 horas de cultura, e esse aumento se manteve até 48 horas, comparadas ao tempo 0 (Figura 21C).

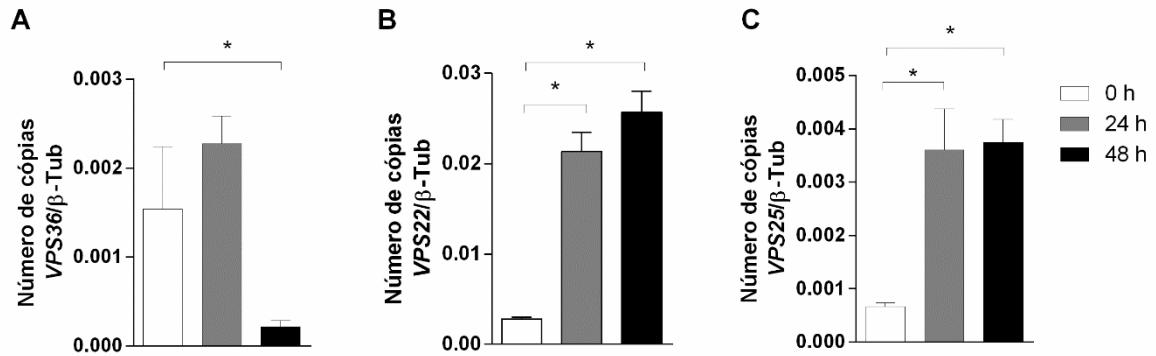


Figura 21: Nível de expressão de ESCRT-II em culturas de *A. fumigatus*. Os níveis de expressão de cada transcrito foram avaliados por qRT-PCR após 0, 24 e 48 horas. AFUA_4G04100 (*VPS36*), AFUA_4G03870 (*VPS22*) e AFUA_4G12290 (*VPS25*) são constituintes do complexo ESCRT-II. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

6.3.4 Expressão do complexo ESCRT-III em culturas de *A. fumigatus*

ESCRT-III desempenha um importante papel na deubiquitinação, antes da formação das vesículas [141]. Investigamos a expressão gênica de AFUA_1G09220 (ortólogo de *VPS20*), AFUA_1G06420 (ortólogo de *SNF7*) e AFUA_5G13410 (ortólogo de *VPS2*). Observamos que houve um aumento extremamente pronunciado na expressão dos 3 genes pertencentes a este complexo, tanto em 24 quanto em 48 horas de crescimento, quando comparados aos seus respectivos controles no tempo zero (Figura 22).

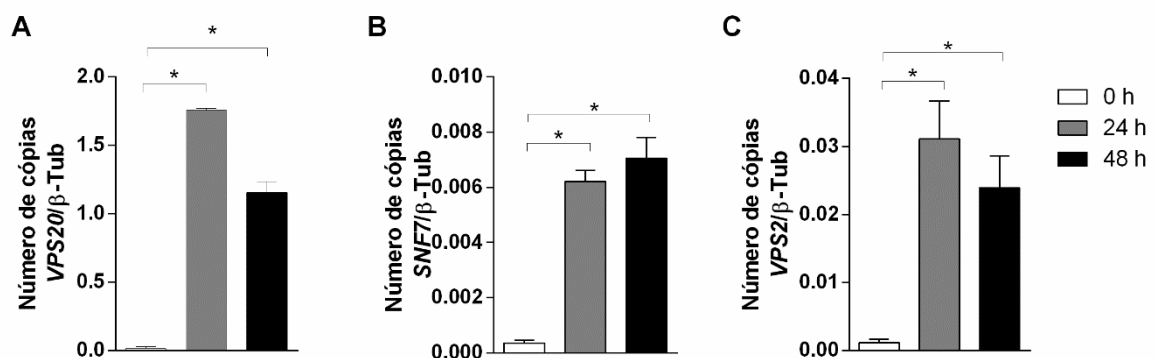


Figura 22: Nível de expressão de ESCRT-III em cultura de *A. fumigatus*. Os níveis de expressão de cada transcrito foram avaliados por qRT-PCR após 0, 24 e 48 horas. AFUA_1G09220 (*VPS20*), AFUA_1G06420 (*SNF7*) e AFUA_5G13410 (*VPS2*) são constituintes do complexo ESCRT-III. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

6.3.5 Expressão do complexo Vps4 em culturas de *A. fumigatus*

Por fim, avaliamos a expressão gênica dos constituintes do complexo Vps4, sendo eles AFUA_3G09360 (ortólogo de *VPS4*), AFUA_4G11000 (ortólogo de *VPS60*) e AFUA_1G05910 (ortólogo de *VTA1*). A montagem deste complexo possui um importante papel em fornecer energia para a dissociação, inicialmente, do complexo ESCRT-III [139]. Observou-se que AFUA_3G09360 (*VPS4*) aumentou sua expressão em aproximadamente 11 vezes no tempo de 24 horas, e apresentou um aumento de 18 vezes na expressão no tempo de 48 horas de cultura, comparados ao tempo 0 (Figura 23A). Já AFUA_4G11000 (*VPS60*) apresentou um aumento discreto de expressão após 24 horas de crescimento, comparado ao tempo 0 (Figura 23B). A expressão gênica de AFUA_1G05910 (*VTA1*) também se comportou de maneira semelhante, com um aumento após 24 horas de crescimento (Figura 23C).

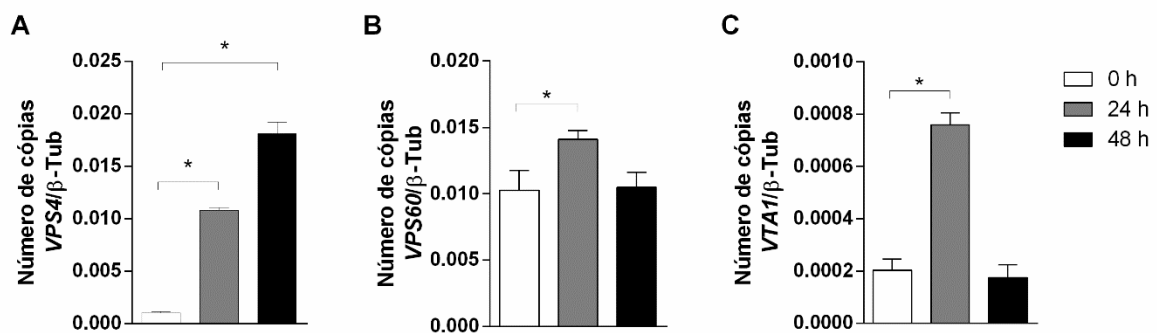


Figura 23: Nível de expressão do complexo Vps4 em culturas de *A. fumigatus*. Os níveis de expressão de cada transcrito foram avaliados por qRT-PCR após 0, 24 e 48 horas. AFUA_3G09360 (*VPS4*), AFUA_4G11000 (*VPS60*) e AFUA_1G05910 (*VTA1*) são constituintes do complexo Vps4. * representa diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

6.4 Discussão

As proteínas dos complexos ESCRTs são consideradas sistemas conservados que possuem um papel essencial na separação de protusões de membrana, regiões denominadas de “*membrane necks*”. Estudos iniciais classificaram o papel das proteínas ESCRT na biogênese de corpos multivesiculares, brotamento de vírus a partir de células infectadas e separação de membrana durante a citocinese. Entretanto, estudos atuais demonstraram que os complexos ESCRTs estão envolvidos em processos adicionais aos anteriormente descritos, como biogênese de microvesículas e exossomos, reparo de danos na membrana, manutenção do envelope nuclear e autofagia [145].

Estudos em leveduras, como em *C. neoformans* [136, 137, 146], *S. cerevisiae* [147] e *C. albicans* [144] já iniciaram suas primeiras observações com relação aos mecanismos de liberação de VEs fúngicas. No entanto, até o momento, não existe nenhum trabalho elucidando o papel destas maquinarias de secreção em fungos filamentosos patogênicos. Neste capítulo nós investigamos o nível de expressão de genes de proteínas dos complexos ESCRT envolvidas nos mecanismos de liberação de VEs de *A. fumigatus*.

Observamos que a expressão de *vps27*, do complexo ESCRT-0, aumentou nos tempos de 24 e 48 horas de cultura, comparados ao tempo 0. O complexo ESCRT-0 possui vários domínios de ligação à ubiquitina e domínio de dedo de zinco (FYVE), que tem a capacidade de se ligar ao fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P) e, por isso, possui um papel essencial em coordenar a carga ubiquitinada, além de ser importante para a interação com o complexo ESCRT-I [132, 143, 148]. Ren e Hurley (2011) demonstraram que motivos PSPD de *Vps27* interage com um domínio UEV presente em *Vps23* (ESCRT-I) e que, quando ocorre um rompimento dessa ligação, a interação entre essas proteínas é prejudicada, bloqueando o enriquecimento de *Vps23* na região [149]. Neste sentido, a regulação positiva de ESCRT-0 é essencial para a iniciação do processo de formação das vesículas e, nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de *vps27* nas culturas de *A. fumigatus* esteja relacionado a maquinaria de secreção de vesículas neste fungo, já que este aumento ocorreu em tempos experimentais em que sabidamente há produção de vesículas.

Avaliamos a expressão gênica das proteínas do complexo ESCRT-I. Este foi o primeiro complexo a ser descrito e é considerado conservado entre os organismos eucarióticos [143]. Observamos um aumento na expressão de AFUA_3G14380 (*VPS23*) nos tempos de 24 e 48 horas, comparadas ao tempo 0, enquanto AFUA_1G16320 (*VPS28*) manteve uma produção basal. Este complexo foi inicialmente descrito possuindo as proteínas *Vps23*, *Vps28* e *Vps37*, posteriormente, o corpo multivesicular 12 (Mvb12) foi identificado como uma subunidade adicional [132]. No entanto, não encontramos genes das proteínas *Vps37* e *Mvb12* por buscas

de identidade de sequências em banco de dados do genoma de *A. fumigatus*. O domínio variante de ubiquitina E2 (UEV) de Vps23, do complexo ESCRT-I, liga-se ao motivo PTAP de Vps27, do complexo ESCRT-0. Curiosamente, em mamíferos, essa interação é mimetizada pela proteína GAG do vírus HIV, demonstrando como o vírus pode utilizar da maquinaria de secreção da célula para a disseminação de mais partículas virais [132]. Foi demonstrado que um mutante de *C. neoformans* para Vps23 (*vps23*) resultou em um defeito/desregulação na captação de ferro, via endocitose. A disponibilidade de ferro é um dos principais reguladores de virulência de *C. neoformans*. Sendo assim, foi observado uma produção prejudicada de polissacarídeo capsular pela linhagem mutante, que culminou em uma atenuação da virulência em um modelo de infecção *in vivo*. Por outro lado, uma alteração de fenótipo foi observada quando uma superexpressão de *VPS23* resultou em células com cápsula ligeiramente aumentada [146]. Considerando que a montagem da cápsula de *C. neoformans* ocorre, também, por secreção de vesículas, este estudo sugere a importância da participação das proteínas do complexo ESCRT nos processos fisiológicos em fungos, mediados por VEs. A segunda proteína do ESCRT-I analisada em *A. fumigatus* foi Vps28. A proteína Vps28 não atua diretamente com a montagem do complexo ESCRT-I, estudos demonstraram que ela atua como uma adaptadora e interage com o complexo a jusante, o ESCRT-II [150]. A importância de Vps28 foi sustentada por um estudo onde foi demonstrado que uma linhagem mutante de *S. cerevisiae* para esta proteína ($\Delta vps28$) resultou em alterações na composição do endossomo, além de defeitos moderados no tráfego endocítico [151]. Em conjunto, as proteínas ESCRT-I desempenham uma importante participação nas vias de secreção celular e isto sugere que possa também representar um importante papel na liberação de VEs em *A. fumigatus*.

Avaliamos também a expressão gênica de AFUA_4G04100 (*VPS36*), AFUA_4G03870 (*VPS22*) e AFUA_4G12290 (*VPS25*) do complexo ESCRT-II. O ESCRT-II funciona a jusante do ESCRT-I, um complexo proteico que também se liga à carga endossômica ubiquitinada [140]. ESCRT-0 e I estão envolvidos na classificação de carga, enquanto ESCRT-III e complexo Vta4 estão envolvidos na liberação das vesículas, neste sentido, sugere-se que ESCRT-II possui um papel em vincular essas funções [152]. Em nosso trabalho, nós observamos um aumento da expressão de AFUA_4G03870 (*VPS22*) e AFUA_4G12290 (*VPS25*) tanto 24 horas quanto em 48 horas. No entanto, embora AFUA_4G04100 (*VPS36*) tenha aumentado sua expressão em 24 horas, sua expressão reduziu significativamente em 48 horas de cultura. Mesmo que a expressão de AFUA_4G04100 (*VPS36*) tenha diminuído, ainda foi observado aumento da expressão dos constituintes dos complexos ESCRT-III e Vps4, a jusante. Estes resultados demonstram que AFUA_4G04100 (*VPS36*) possa ser expresso em níveis baixos e, possivelmente, apresentar atividade constitutiva. Neste sentido, o motivo para essa considerável diminuição precisa ser investigado. Tang e colaboradores

(2016), propuseram um modelo de ativação paralela de ESCRT-III. Foi identificado em *S. cerevisiae* que a ativação da via de secreção de VEs pode ocorrer por ESCRT-0, I, II e III, ou, alternativamente, a proteína Bro1 pode mediar a interação entre ESCRT-0 e Snf7 de ESCRT-III [147]. Bro1 é uma proteína requerida para deubiquitinação e desempenha sua função a partir do recrutamento de Doa4 [153]. A proteína Bro1 já foi identificada em *A. fumigatus*, no entanto, ainda não elucidamos seus níveis de expressão gênica nos tempos de cultura avaliados neste trabalho. Por outro lado, Vps36 se liga a cargas ubiquitinadas na membrana e interage fortemente com Vps22 e com Vps25. Vps25 possui um papel essencial na estabilidade do complexo, uma vez que a mutação em seus motivos de interação (PPXY) leva a interrupção do complexo ESCRT-II. Além disso, é a principal subunidade responsável pelo recrutamento de Vps20 (ESCRT-III) [154]. Neste sentido, como a expressão de AFUA_4G03870 (*VPS22*) e AFUA_4G12290 (*VPS25*) aumentou nos tempos de 24 e 48 horas, sugere-se que a secreção de VEs por *A. fumigatus* possa ser mediada pela montagem dos complexos ESCRT pelas vias clássica e alternativa.

Os complexos ESCRT-0, I e II podem formar complexos proteicos estáveis no citoplasma, por outro lado, ESCRT-III se une transitoriamente nos endossomos [143]. Investigamos a expressão gênica de três, das quatro subunidades proteicas pertencentes neste complexo, sendo AFUA_1G09220 (*VPS20*), AFUA_1G06420 (*SNF7*) e AFUA_5G13410 (*VPS2*). Observamos um aumento na expressão gênica de todas as proteínas nos tempos de 24 e 48 horas de cultura. Neste sentido, sugere-se que a diminuição na produção destas proteínas nos tempos de 48 horas comparado a 24 horas, mesmo fenótipo observado em ESCRT-0 e I, pode estar relacionado com o fato de que não foram observadas um aumento considerável na produção de VEs, após 48 horas, conforme mencionado no capítulo 1. Adicionalmente, a transcrição do mRNA nos períodos iniciais de cultura de *A. fumigatus*, podem ser suficientes para o funcionamento normal dos complexos sem a necessidade da síntese de mais proteínas, no entanto isso precisa ser investigado. A interação de Vps20 com Vps25 (ESCRT-II) inicia o recrutamento de ESCRT-III. Vps20 estimula a montagem da homopolimerização de Snf7, que é a subunidade mais abundante deste complexo. A Doa4, proteína que interage com Bro1, também pode desempenhar funções mediante interação com Vps20. Richter e colaboradores (2013), demonstraram que mutantes de *S. cerevisiae* para domínios de interação com Doa4 causou inibição na deubiquitinação, quando combinada com a deleção do gene Bro1 [155]. Já Snf7 interage com Vps24 e, conforme mencionado anteriormente, Snf7 também recruta a proteína adaptadora Bro1, que estabiliza os filamentos de Snf7 e recruta a enzima deubiquitinante Doa4 [132]. Foi demonstrado que alterações na expressão de Snf7 resulta na formação de estruturas endossomais desorganizadas e com alterações na distribuição da carga vesicular [156]. Além disso, Sciskala e Kölling (2013) também demonstraram que uma mutação na α -hélice de Snf7

prejudica a interação com Bro1, demonstrando que esta é indispensável para a função dos MVBs. Adicionalmente, foi observado que estes mutantes apresentaram um defeito na dissociação do complexo [157]. Vps24 interage com Snf7 e recruta Vps2, completando a montagem do complexo ESCRT-III. Vps2 possui a função de recrutar o último complexo, o Vps4. Visto que Vps4 não é recrutado para o endossomo sem ESCRT-III, Vps2 é considerada, então, essencial nesse processo [158].

Finalmente, analisamos a expressão gênica das proteínas do complexo Vps4, constituído pelas subunidades Vps4, Vps60 e Vta1. Observamos que AFUA_3G09360 (*VPS4*) aumentou gradualmente sua expressão nos tempos de 24 e 48 horas. Uma vez recrutado, Vps4 se liga ao seu co-fator, Vta1, formando um complexo Vps4-Vta1, com atividade ATPásica. Vps4 investe a energia da hidrólise de ATP para desmontar o complexo ESCRT-III, e assim recicla suas subunidades de volta ao citoplasma [143]. Além disso, o Vta1 também interage com outras proteínas que atuam no estágio tardio da via do MVB, como a proteína acessória Vps60. A hidrólise de ATP representa um passo irreversível na via de MVB, portanto a regulação da atividade da ATPase de Vps4 é crítica para o funcionamento adequado da reação de classificação de MVB. Após a conclusão da desmontagem do ESCRT-III, o complexo Vps4 também se dissocia. Como tal, o complexo Vps4 termina cada rodada de classificação de carga MVB e formação de vesículas [159]. AFUA_1G05910 (*VTA1*) reduziu significativamente sua expressão em 48 horas de cultura. Este dado corrobora com os demais fenótipos observados, onde observa-se uma redução na expressão de algumas proteínas no tempo de 48 horas ou retorno para sua produção basal.

Conforme exposto na parte introdutória deste capítulo, Zarnowski e colaboradores (2019) demonstraram que a ativação do complexo ESCRT é essencial para a produção normal de VEs em *C. albicans*. Mutações provocadas em diferentes genes do complexo resultaram em uma redução na formação de biofilme, processo mediado pela liberação de VEs, e um aumento da sensibilidade ao antifúngico fluconazol. Logo, estes resultados indicam que VEs *C. albicans* têm um papel fundamental na produção de matriz extracelular e resistência a medicamentos para biofilme, e que a liberação normal destas VEs depende do funcionamento coordenado de proteínas do complexo ESCRT [144].

A montagem dos complexos ESCRT é hoje considerada um mecanismo conservado entre células de mamíferos e leveduras. Nós observamos um aumento na expressão gênica destas proteínas em culturas de *A. fumigatus*. Neste sentido, nossos dados sugerem que essas proteínas estejam envolvidas na secreção de VEs por este fungo. Para melhor compreender o papel desta maquinaria, investigações futuras, com a utilização de mutantes, poderão elucidar o impacto destas proteínas ESCRT na produção de vesículas por *A. fumigatus*.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho isolamos, pela primeira vez, VEs produzidas pelo fungo *A. fumigatus*. Demonstramos que as VEs de *A. fumigatus* podem variar de diâmetro dependendo do tempo de cultura do fungo. A variação das distribuições de tamanhos pode sugerir diferentes vias de biogênese, possivelmente mediadas por proteínas ESCRT, envolvidas na liberação destas vesículas. As VEs de *A. fumigatus* possuem diversas proteínas com importantes funções na fisiologia e virulência do fungo. Mais ainda, as VEs de *A. fumigatus* são biologicamente ativas na sensibilização de células, *in vitro* e *in vivo*, capazes de impactar na montagem da resposta imune durante exposição ao fungo e melhorar os mecanismos de depuração contra este microrganismo.

Neste sentido, nossos resultados nos permitem concluir que *A. fumigatus* produz VEs a partir de mecanismos ativos que envolvem a via ESCRT e que possuem um potencial em sensibilizar células do sistema imune e modular a resposta destas células na presença do patógeno.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados gerados neste trabalho nos permitem sugerir que VEs de *A. fumigatus* são liberadas, também, a partir da via de ativação de complexos ESCRT. Para tanto, será necessário a construção de mutantes de proteínas ESCRT, objetivando compreender o real papel das vias ESCRT em *A. fumigatus*.

Ainda mais, nossos resultados sugerem que VEs de *A. fumigatus* apresentam um potencial profilático. Para tanto, ainda serão necessários:

- Investigar os mecanismos efetores de fagócitos, como a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a preservação do parênquima pulmonar, por histologia;
- Avaliar capacidade de depuração fúngica;
- Acompanhar a sobrevivência dos animais infectados;
- Instigar a produção de IgG pelos animais imunizados;
- Acessar a ativação de linfócitos T *helper*, objetivando compreender o principal tipo de resposta envolvida;
- Caracterizar como as VEs atuam na modulação do inflamassoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Nilsen-Hamilton M, Hamilton RT. Secreted Proteins, Intercellular Communication, and the Mitogenic Response. *Cell Biol Int Rep* 1982; 6: 815–836.
- [2] Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Rep* 2014; 47: 531–539.
- [3] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, et al. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13: 620–630.
- [4] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200: 373–383.
- [5] Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1–30.
- [6] Iraci N, Leonardi T, Gessler F, et al. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1–32.
- [7] Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and their Physiological Functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 14: 1–60.
- [8] Bishop D, Work E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *Biochem J* 1965; 96: 567–576.
- [9] Knox K., Vesk M, Work E. Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine- Limited Culture of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1966; 92: 1206–1217.
- [10] Dorward DW, Garon CF. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1960–1962.
- [11] Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005; 19: 2645–2655.
- [12] Kulp A, Kuehn M. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 163–184.
- [13] Beveridge TJ. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. 1999; 181: 4725–4733.
- [14] Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 2012; 80: 1948–1957.
- [15] Marsollier L, Brodin P, Jackson M, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog* 2007; 3: 0582–0594.
- [16] Prados-Rosales R, Baena A, Martinez LR, et al. Mycobacteria release active membrane

- vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 1471–1483.
- [17] Lee EY, Choi DY, Kim DK, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* 2009; 9: 5425–5436.
- [18] Liu Y, Defourny KAY, Smid EJ, et al. Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and disease. *Front Microbiol* 2018; 9: 1–8.
- [19] Balsalobre C, Silván JM, Berglund S, et al. Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2006; 59: 99–112.
- [20] Gurung M, Moon DC, Choi CW, et al. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One* 2011; 6: 1–8.
- [21] Codemo M, Muschiol S, Iovino F, et al. Immunomodulatory effects of pneumococcal extracellular vesicles on cellular and humoral host defenses. *MBio* 2018; 9: 1–15.
- [22] Acevedo R, Fernández S, Zayas C, et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front Immunol* 2014; 5: 1–6.
- [23] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin and of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes Recycling. *J Cell Biol* 1983; 97: 329–339.
- [24] Pan B-T, Johnstone R. Fate of the Transferrin Receptor during Maturation of Sheep Reticulocytes In Vitro: Selective Externalization of the Receptor. *Cell* 1983; 33: 967–977.
- [25] Harding C V., Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: Looking back three decades and into the future. *J Cell Biol* 2013; 200: 367–371.
- [26] Metcalf D, Isaacs AM. The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 1469–1473.
- [27] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255–289.
- [28] Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, et al. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* 2015; 16: 24–43.
- [29] Raposo G, Nijman H., Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183: 1161–1172.
- [30] Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med* 1998; 4: 594–600.
- [31] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 581–593.
- [32] Simons M, Raposo G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 575–581.

- [33] Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, et al. Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. *J Immunol Res* 2015; 2015: 1–14.
- [34] Cruz FF, Borg ZD, Goodwin M, et al. Systemic Administration of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Extracellular Vesicles Ameliorates *Aspergillus* Hyphal Extract-Induced Allergic Airway Inflammation in Immunocompetent Mice. *Stem Cells Transl Med* 2015; 4: 1302–1316.
- [35] Latifkar A, Cerione RA, Antonyak MA. Probing the mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and function in cancer. *Biochem Soc Trans* 2018; 46: 1137–1146.
- [36] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 619–624.
- [37] Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, et al. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun* 2017; 8: 1–15.
- [38] Shi M, Sheng L, Stewart T, et al. New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Prog Neurobiol*; 175. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2019.01.005.
- [39] Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 2011; 46: 409–418.
- [40] Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, et al. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect* 2012; 14: 1465–1474.
- [41] Montaner S, Galiano A, Trelis M, et al. The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Front Immunol* 2014; 5: 1–8.
- [42] Marcilla A, Martin-Jaular L, Trelis M, et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J Extracell Vesicles* 2014; 3: 1–15.
- [43] Marti M, Johnson PJ. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. *Curr Opin Microbiol* 2016; 32: 66–70.
- [44] Campos FM., Franklin B., Teixeira-Carvalho A, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J* 2010; 9: 1–8.
- [45] Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, et al. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *J Infect Dis* 2011; 203: 700–706.
- [46] Aline F, Bout D, Amigorena S, et al. *Toxoplasma gondii* Antigen-Pulsed-Dendritic Cell-Derived Exosomes Induce a Protective Immune Response Against *T. gondii* Infection. *Infect Immun* 2004; 72: 4127–4137.
- [47] Silverman JM, Clos J, Horakova E, et al. *Leishmania* Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. *J*

- Immunol* 2010; 185: 5011–5022.
- [48] Silverman JM, Reiner NE. Leishmania Exosomes Deliver Preemptive Strikes to Create an Environment Permissive for Early Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 1: 1–8.
- [49] Gaur P, Chaturvedi A. Mining SNPs in extracellular vesicular transcriptome of *Trypanosoma cruzi*: a step closer to early diagnosis of neglected Chagas disease. *PeerJ* 2016; 1–16.
- [50] Pawliczek T, Crump CM. Herpes Simplex Virus Type 1 Production Requires a Functional ESCRT-III Complex but Is Independent of TSG101 and ALIX Expression. *J Virol* 2009; 83: 11254–11264.
- [51] Rodrigues M, Fan J, Lyon C, et al. Role of extracellular vesicles in viral and bacterial infections: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Theranostics* 2018; 8: 2709–2721.
- [52] Crenshaw BJ, Gu L, Sims B, et al. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol J* 2018; 12: 134–148.
- [53] Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, et al. 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.
- [54] Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 3165–3170.
- [55] Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 58–67.
- [56] Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD, et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* 2010; 78: 1601–1609.
- [57] Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, et al. 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.
- [58] Gehrman U, Qazi KR, Johansson C, et al. Nanovesicles from *malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses - novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One* 2011; 6: 1–10.
- [59] Vallejo MC, Matsuo AL, Ganiko L, et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly Immunogenic α -galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell* 2011; 10: 343–351.
- [60] Silva BMA, Prados-Rosales R, Espadas-Moreno J, et al. Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med Mycol* 2014; 52: 202–210.

- [61] Ikeda MAK, De Almeida JRF, Jannuzzi GP, et al. Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. *Front Microbiol* 2018; 9: 1–11.
- [62] Bitencourt TA, Rezende CP, Quaresimin NR, et al. Extracellular vesicles from the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. *Front Immunol* 2018; 9: 1–9.
- [63] Guimarães AJ, Nakayasu ES, Sobreira TJP, et al. *Histoplasma capsulatum* Heat-Shock 60 Orchestrates the Adaptation of the Fungus to Temperature Stress. *PLoS One* 2011; 6: 1–12.
- [64] Baltazar L., Nakayasu ES, Sobreira TJ, et al. Antibody Binding Alters the Characteristics and Contents of Extracellular Vesicles Released by *Histoplasma capsulatum*. *mSphere* 2016; 1: 1–17.
- [65] Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res* 2015; 14: 142–153.
- [66] Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2015; 17: 389–407.
- [67] Silva TA, Roque-Barreira MC, Casadevall A, et al. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep* 2016; 6: 1–10.
- [68] Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS, et al. Characterization of yeast extracellular vesicles: Evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One* 2010; 5: 1–13.
- [69] Silva RP, Puccia R, Rodrigues ML, et al. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci Rep* 2015; 5: 1–12.
- [70] Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310–350.
- [71] Van De Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15: 661–674.
- [72] Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 447–465.
- [73] Kim JY. Human fungal pathogens: Why should we learn? *J Microbiol* 2016; 54: 145–148.
- [74] Bernard M, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 2001; 39: 9–17.
- [75] Rementeria A, Ludwig A, Bel A, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 1–23.

- [76] Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 163–176.
- [77] Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 2005; 97: 1316–1329.
- [78] Weber DJ, Peppercorn A, Miller MB, et al. Preventing healthcare-associated *Aspergillus* infections: Review of recent CDC/HICPAC recommendations. *Med Mycol* 2009; 47: 199–209.
- [79] Tekaiia F, Latge JP. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 385–392.
- [80] Lee MJ, Sheppard DC. Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Microbiol* 2016; 54: 232–242.
- [81] Walsh TJ, Anaissie E., Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 327–360.
- [82] Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11: 272–279.
- [83] Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1068–1076.
- [84] Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis* 2016; 62: 362–368.
- [85] Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* 2010; 47: 117–126.
- [86] Park HS, Yu JH. Developmental regulators in *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol* 2016; 54: 223–231.
- [87] Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, et al. *Aspergillus fumigatus*-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *J Biol Chem* 2008; 283: 30513–30521.
- [88] Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, et al. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol* 2009; 58: 174–179.
- [89] Muller WA. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet Pathol* 2013; 50: 7–22.
- [90] Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 159–175.
- [91] Boxer L, Dale DC. Neutropenia: Causes and consequences. *Semin Hematol* 2002; 39: 75–81.

- [92] Segal BBH. Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation. *Oncologist* 2007; 12: 7–13.
- [93] Gazendam R., van Hamme J., Tool AT., et al. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J Immunol* 2017; 196: 1272–1283.
- [94] Margalit A, Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol Rev* 2015; 39: 670–687.
- [95] Mircescu M., Lipuma L, van Rooijen N, et al. Essential Role for Neutrophils but not Alveolar Macrophages at Early Time Points following *Aspergillus fumigatus* Infection. *Infect Dis Soc Am* 2009; 200: 647–656.
- [96] Cramer R., Rivera A, Hohl TM. Immune response against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned? *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 315–322.
- [97] Murdock BJ, Falkowski NR, Shreiner AB, et al. Interleukin-17 drives pulmonary eosinophilia following repeated exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 2012; 80: 1424–1436.
- [98] Sales-Campos H, Tonani L, Cardoso CRB, et al. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *Biomed Res Int*; 2013. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1155/2013/693023.
- [99] Becker KL, Gresnigt MS, Smeekens SP, et al. Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 423–437.
- [100] Zelante T, Bozza S, de Luca A, et al. Th17 cells in the setting of *Aspergillus* infection and pathology. *Med Mycol* 2009; 47: 162–169.
- [101] Beck O, Topp M., Koehl U, et al. Generation of highly purified and functionally active human TH1 cells against *Aspergillus fumigatus* Olaf. *Blood* 2006; 107: 2562–2570.
- [102] Perruccio K, Topini F, Tosti A, et al. Differences in *Aspergillus*-specific immune recovery between T-cell-replete and T-cell-depleted hematopoietic transplants. *Eur J Haematol* 2015; 95: 551–557.
- [103] Cenci E, Perito S, Enssle KH, et al. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1997; 65: 564–570.
- [104] Feldmesser M. Role of neutrophils in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 2006; 74: 6514–6516.
- [105] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005; 438: 1151–1156.
- [106] Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 155–182.

- [107] Champer J, Ito JI, Clemons K V., et al. Proteomic Analysis of Pathogenic Fungi Reveals Highly Expressed Conserved Cell Wall Proteins. *J Fungi* 2016; 2: 1–19.
- [108] Edgar JR. Q & A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol* 2016; 14: 1–7.
- [109] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 213–228.
- [110] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 2019; 21: 9–17.
- [111] Kuipers ME, Hokke CH, Smits HH, et al. Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: An overview. *Front Microbiol* 2018; 9: 1–13.
- [112] Deo P, Chow SH, Hay ID, et al. Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis. *PLoS Pathog* 2018; 14: 1–30.
- [113] Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A, et al. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci Rep* 2015; 5: 1–18.
- [114] Choi SJ, Kim MH, Jeon J, et al. Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity. *PLoS One* 2015; 10: 1–17.
- [115] Muralinath M, Kuehn MJ, Roland KL, et al. Immunization with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-Derived Outer Membrane Vesicles Delivering the Pneumococcal Protein PspA Confers Protection against Challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2011; 79: 887–894.
- [116] Wong SH, Lennon DR, Jackson CM, et al. Immunogenicity and tolerability in infants of a New Zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 385–390.
- [117] Nasser S, Gurusamy M, Jung B, et al. Kinin B1 receptor antagonist BI113823 reduces acute lung injury. *Crit Care Med* 2015; 43: e499–e507.
- [118] Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 1985; 83: 209–215.
- [119] Cassini-Vieira P, Moreira C., Silva M., et al. Estimation of Wound Tissue Neutrophil and Macrophage Accumulation by Measuring Myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) Activities. *bio-protocol* 2015; 5: 1–7.
- [120] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis. 2009; 10: 1–12.
- [121] Casadevall A, Pirofski L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *J*

- Infect Dis* 2001; 184: 337–344.
- [122] Henson P., Johnston Jr R. Tissue Injury in Inflammation Oxidants, Proteinases, and Cationic Proteins. *J Clin Invest* 1987; 79: 669–674.
- [123] Santana PT, Benjamim CF, Martinez CG, et al. The P2X7 Receptor Contributes to the Development of the Exacerbated Inflammatory Response Associated with Sepsis. *J Innate Immun* 2015; 7: 417–427.
- [124] Malacco NLS de O, Rachid MA, Gurgel IL da S, et al. Eosinophil-Associated Innate IL-17 Response Promotes *Aspergillus fumigatus* Lung Pathology. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 8: 1–13.
- [125] Ward PA. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. *Eur Respir J* 2003; 22: 22s-23s.
- [126] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 2002; 10: 417–426.
- [127] Caffrey AK, Lehmann MM, Zickovich JM, et al. IL-1 α Signaling Is Critical for Leukocyte Recruitment after Pulmonary *Aspergillus fumigatus* Challenge. *PLoS Pathog* 2015; 11: 1–25.
- [128] Cenci E, Mencacci A, Casagrande A, et al. Impaired Antifungal Effector Activity but Not Inflammatory Cell Recruitment in Interleukin-6–Deficient Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Infect Dis* 2001; 184: 610–617.
- [129] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6: 1–16.
- [130] Werner JL, Metz AE, Horn D, et al. Requisite role for the Dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. 2009; 182: 4938–4946.
- [131] Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, et al. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res* 2009; 2: 1–11.
- [132] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT Pathway. *Dev Cell* 2011; 21: 77–91.
- [133] Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; 123: 1603–1611.
- [134] Sezgin E. The mystery of membrane organization: composition, regulation and physiological relevance of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 361–374.
- [135] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010; 78: 838–848.
- [136] Rizzo J, Oliveira DL, Joffe LS, et al. Role of the Apt1 Protein in Polysaccharide Secretion by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2014; 13: 715–726.
- [137] Reis FC., Borges B., Jozefowicz L., 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: 1–15.
- [138] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes : biogenesis , biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 2019; 1–18.
- [139] Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001; 106: 145–155.
- [140] Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, et al. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 2002; 3: 283–289.
- [141] Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, et al. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev Cell* 2002; 3: 271–282.
- [142] Juan T, Fürthauer M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 74: 66–77.
- [143] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012; 22: R116–R120.
- [144] Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, et al. *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biol* 2018; 16: 1–18.
- [145] Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J* 2015; 34: 2398–2407.
- [146] Hu G, Caza M, Cadieux B, et al. *Cryptococcus neoformans* Requires the ESCRT Protein Vps23 for Iron Acquisition from Heme, for Capsule Formation, and for Virulence. *Infect Immun* 2013; 81: 292–302.
- [147] Tang S, Buchkovich NJ, Mike Henne W, et al. ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis. *Elife* 2016; 5: 1–12.
- [148] Prag G, Watson H, Kim YC, et al. The Vps27/Hse1 Complex Is a GAT Domain-Based Scaffold for Ubiquitin-Dependent Sorting. *Dev Cell* 2007; 12: 973–986.
- [149] Ren X, Hurley JH. Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *EMBO J* 2011; 30: 2130–2139.
- [150] Pineda-Molina E, Belrhali H, Piefer AJ, et al. The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic* 2006; 7: 1007–1016.
- [151] Rieder SE, Banta LM, Khreer K, et al. Multilamellar Endosome-like Compartment Accumulates in the Yeast vps28 Vacuolar Protein Sorting Mutant. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 985–999.
- [152] Mageswaran SK, Johnson NK, Odorizzi G, et al. Constitutively active ESCRT-II suppresses the MVB-sorting phenotype of ESCRT-0 and ESCRT-I mutants. *Mol Biol Cell* 2014; 26: 554–568.

- [153] Luhtala N, Odorizzi G. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* 2004; 166: 717–729.
- [154] Teo H, Perisic O, González B, et al. ESCRT-II, an Endosome-Associated Complex Required for Protein Sorting: Crystal Structure and Interactions with ESCRT-III and Membranes. *Dev Cell* 2004; 7: 559–569.
- [155] Richter CM, West M, Odorizzi G. Doa4 function in ILV budding is restricted through its interaction with the Vps20 subunit of ESCRT-III. *J Cell Sci* 2013; 126: 1881–1890.
- [156] Teis D, Saksena S, Emr SD. Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Dev Cell* 2008; 15: 578–589.
- [157] Sciskala B, Kölling R. Interaction Maps of the *Saccharomyces cerevisiae* ESCRT-III Protein Snf7. *Eukaryot Cell* 2013; 12: 1538–1546.
- [158] Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, et al. Membrane Scission by the ESCRT-III Complex. *Nature* 2009; 458: 172–177.
- [159] Xiao J, Xia H, Zhou J, et al. Sorting Pathway. *Dev Cell* 2008; 14: 37–49.

ANEXO 1

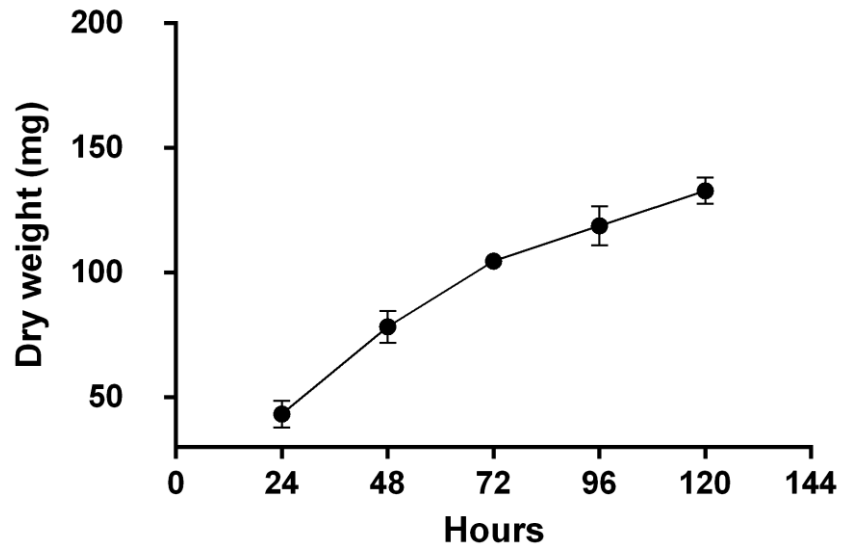


Figure S1. Growth curve of *A. fumigatus* culture. 2×10^8 conidia/L of *A. fumigatus* A1163 were inoculated in 50 mL of complete YG at 37°C and dried fungal mass was analyzed after 24, 48, 72, 96 and 120 hours.

Protein group number	<i>A. fumigatus</i> genome database accession number	Protein name	Localization	Molecular Function	Biological process
1	AFUB_063700	Glutamate dehydrogenase	extracellular region, cytosol, nucleus	oxidoreductase activity	filamentous growth, cellular amino acid metabolic process
2	AFUB_016770	Uncharacterized protein	unknown	hydrolase activity, peptidase activity	proteolysis
3	AFUB_063890	Ecm33	mitochondrion, membrane, cell wall, plasma membrane	unknown	developmental process, cell cycle, response to chemical, sexual sporulation
4	AFUB_096050	Allergen Asp F3 (Peroxiredoxin family protein)	extracellular region, cell wall, peroxisome	oxidoreductase activity	cellular catabolic process, cellular homeostasis, cellular response to oxidative stress, cofactor metabolic process, drug metabolic process, reactive oxygen species metabolic process, regulation of cellular process, response to toxic substance*
5	AFUB_037910	Ubiquitin (UbiC), putative	extracellular region, cytosol, ribosome	structural molecule activity	ribosome biogenesis, organelle organization, cellular protein modification process, translation, RNA metabolic process
6	AFUB_015530	Extracellular cell wall glucanase Crf1/allergen Asp F9	cell wall	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process
7	AFUB_066130	Aminopeptidase	extracellular region, cell wall, peroxisome, mitochondrion, endomembrane system, vacuole	hydrolase activity, peptidase activity	peptide catabolic process, proteolysis*
8	AFUB_094680	FAD/FMN-containing isoamyl alcohol oxidase MreA	unknown	oxidoreductase activity	oxidation-reduction process
9	AFUB_094730	IgE-binding protein, putative	unknown	unknown	unknown

10	AFUB_097210	Carboxypeptidase	extracellular region	peptidase activity, hydrolase activity	protein catabolic process, regulation of biological process, conjugation
11	AFUB_095500	GPI anchored protein, putative	cell wall	unknown	unknown
12	AFUB_005920	Glycogenin	cytoplasm*	transferase activity	carbohydrate metabolic process
13	AFUB_002680	Uncharacterized protein	unknown	unknown Carbohydrate binding	unknown
14	AFUB_099560	Tripeptidyl-peptidase (TppA), putative	unknown	hydrolase activity, peptidase activity	proteolysis
15	AFUB_004489	FG-GAP repeat protein, putative	unknown	unknown	unknown
16	AFUB_045170	Cell wall protein phiA	extracellular region	unknown	developmental process, cell cycle, sexual sporulation
17	AFUB_048140	Extracellular phytase, putative	extracellular region	hydrolase activity, phosphatase activity	unknown
18	AFUB_020900	Allergen Asp F4	extracellular region	IgE binding	unknown
19	AFUB_022370	1,3-beta- glucanosyltransferase gel4	extracellular region, cell wall, membrane, plasma membrane	transferase activity	carbohydrate metabolic process
20	AFUB_052010	Nucleoside diphosphate kinase	extracellular region, cytosol, mitochondrion	transferase activity	response to stress, filamentous growth, cellular protein modification process
21	AFUB_052060	Thioredoxin reductase, putative	extracellular region	oxidoreductase activity	response to chemical, secondary metabolic process, toxin metabolic process
22	AFUB_052270	Class III chitinase ChiA1	extracellular region, cell wall, cellular bud neck*	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process
23	AFUB_050860	Major allergen Asp F1	unknown	hydrolase activity, RNA binding	regulation of biological process

24	AFUB_052690	Molecular chaperone Mod-E/Hsp90	cell wall, cytosol, membrane, plasma membrane	hydrolase activity, protein binding	response to stress, response to chemical, filamentous growth, regulation of biological process, signal transduction, organelle organization, protein folding, DNA metabolic process, pathogenesis
25	AFUB_085650	Endo-chitosanase	unknown	hydrolase activity	unknown
26	AFUB_046050	Alpha,alpha-trehalose glucohydrolase TreA/Ath1	extracellular region, cell wall, vacuole	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process, response to stress, response to chemical
27	AFUB_048180	Probable glucan endo- 1,3-beta-glucosidase eglC	cell surface/cell wall*	hydrolase activity, transferase activity	carbohydrate metabolic process
28	AFUB_047510	Extracellular conserved serine-rich protein	unknown	unknown	unknown
29	AFUB_047560	FAD-dependent oxygenase, putative	extracellular region/cell wall	oxidoreductase activity	secondary metabolic process
30	AFUB_037350	Phosphoglucomutase PgmA	cytosol*	isomerase activity	carbohydrate metabolic process, cellular homeostasis
31	AFUB_050510	BYS1 domain protein, putative	unknown	unknown	unknown
32	AFUB_040810	Aspartyl aminopeptidase	extracellular region, vacuole	hydrolase activity, peptidase activity	response to chemical, protein folding
33	AFUB_010890	1,3-beta- glucanosyltransferase Bgt1	extracellular region, cell wall	hydrolase activity, transferase activity	carbohydrate metabolic process, pathogenesis
34	AFUB_023440	60S ribosomal protein L18	cytosolic large ribosomal subunit*	structural constituent of ribosome*	cytoplasmic translation*

35	AFUB_018250	1,3-beta-glucanosyltransferase gel1	extracellular region, cell wall, membrane, plasma membrane	transferase activity	carbohydrate metabolic process, response to chemical, developmental process, response to stress, cell cycle, asexual sporulation, sexual sporulation
36	AFUB_009540	Adenosylhomocysteinase	extracellular region	hydrolase activity	lipid metabolic process, cellular amino acid metabolic process
37	AFUB_066060	GPI anchored cell wall protein, putative	unknown	unknown	unknown
38	AFUB_087520	Isoamyl alcohol oxidase, putative	unknown	oxidoreductase activity	oxidation-reduction process
39	AFUB_006000	40S ribosomal protein S3, putative	extracellular region, cytosol, ribosome	RNA binding, protein binding, structural molecule activity	transport, ribosome biogenesis, translation
40	AFUB_004410	Ubiquitin UbiA, putative	extracellular region, cytosol, ribosome, membrane	structural molecule activity	transport, ribosome biogenesis, translation, organelle organization, cellular protein modification process
41	AFUB_079620	Uncharacterized protein	extracellular region	oxidoreductase activity	oxidation-reduction process
42	AFUB_050490	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	extracellular region, cytosol, membrane, cell wall, peroxisome, mitochondrion, plasma membrane	RNA binding, oxidoreductase activity, protein binding	carbohydrate metabolic process, transport, regulation of biological process, cell adhesion
43	AFUB_023550	Probable Xaa-Pro aminopeptidase pepP	cytoplasm*	peptidase activity, hydrolase activity	cellular process
44	AFUB_005160	Probable NAD(P)H-dependent D-xylose reductase xyl1	extracellular region	RNA binding, oxidoreductase activity	carbohydrate metabolic process, response to stress, response to chemical
45	AFUB_036480	Putative UDP-galactopyranose mutase	extracellular region, cell wall	isomerase activity	carbohydrate metabolic process, filamentous growth
46	AFUB_034560	Uncharacterized protein	unknown	unknown	unknown

47	AFUB_093550	Actin Act1	peroxisome, cytoskeleton, site polarized growth, action cytoskeleton	structural molecule activity*	cell cycle, endocytosis, exocytosis, intracellular protein transport*
48	AFUB_021670	ER Hsp70 chaperone BiP, putative	extracellular region, membrane, nucleus, endoplasmic reticulum, cell cortex, endomembrane system	hydrolase activity, protein binding	transport, regulation of biological process, carbohydrate metabolic process, response to chemical, organelle organization, protein catabolic process, response to stress, signal transduction, conjugation, nucleus organization
49	AFUB_006770	Elongation factor 1-alpha	extracellular region, mitochondrion, membrane, vacuole	hydrolase activity, RNA binding	transport, translation, organelle organization, cytoskeleton organization
50	AFUB_056780	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	extracellular region, cell wall, mitochondrion, cytosol, nucleus	protein binding, oxidoreductase activity	regulation of biological process, response to chemical, response to stress, lipid metabolic process, filamentous growth, developmental process, cellular homeostasis, pathogenesis
51	AFUB_007770	Molecular chaperone Hsp70	extracellular region, cell wall, mitochondrion, membrane, cytosol, nucleus, vacuole, plasma membrane	protein binding, RNA binding	transport, regulation of biological process, response to chemical, organelle organization, protein catabolic process, protein folding
52	AFUB_009760	Phosphoglycerate kinase	extracellular region, cell wall, mitochondrion, membrane, plasma membrane	transferase activity	regulation of biological process, carbohydrate metabolic process
53	AFUB_036860	60S ribosomal protein L22, putative	ribosome	structural molecule activity	translation
54	AFUB_025910	60S acidic ribosomal protein P2/allergen Asp F 8	cytosol, ribosome	structural molecule activity, enzyme regulator activity	regulation of biological process, translation

55	AFUB_017890	Purine nucleoside permease, putative	unknown	transporter activity	transport
56	AFUB_000660	CFEM domain protein	cell wall	unknown	unknown
57	AFUB_089500	Uncharacterized protein	unknown	unknown	unknown
58	AFUB_070900	Uncharacterized protein	unknown	unknown	unknown
59	AFUB_024920	Dipeptidyl-peptidase 5	cytosol, nucleus*	hydrolase activity, peptidase activity	proteolysis
60	AFUB_001190	Ribosomal protein S13p/S18e	extracellular region, ribosome	structural molecule activity, RNA binding	transport, translation, ribosome biogenesis, RNA metabolic process

* represents classification according to, at least, 50% of identity with *Neurospora crassa*, *Sacchamomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe*.

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 255/2018**Título do projeto:** Caracterização Estrutural e Funcional de Vesículas Extracelulares de *Aspergillus fumigatus***Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Frederico Marianetti Soriani**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Biologia Geral**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 03/09/2018. Validade: 03/09/2018 à 02/09/2023 RECOMENDAÇÃO: Prezado pesquisador, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados. O e-mail enviado pelo CONCEA se refere ao credenciamento da CEUA, e não dos biotérios. CIAEP é designado para a CEUA.
Belo Horizonte, 04/09/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br