UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Vesículas extracelulares como reguladores da morfologia de *Candida albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso

Aluno: Carlos Eduardo Capelini Eli Lopes
Orientador: Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida

Ribeirão Preto - SP
2022

CARLOS EDUARDO CAPELINI ELI LOPES

Vesículas extracelulares como reguladores da morfologia de *Candida albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau de Bacharel em Informática Biomédica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Profº. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida

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

Este trabalho foi apresentado e aprovado pela Comissão Coordenadora do Curso deInformática Biomédica em 15/03/2023.

Ribeirão Preto
2022

“Eu acredito no amor. E que só o amor pode salvar o mundo”

- PRINCE, Diana (Mulher Maravilha)

Para todos aqueles que me acompanharam nessa linda jornada.

Obrigado pela companhia, pela ajuda e, principalmente, pelo amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus e todos os seus anjos pela oportunidade de esrever este trabalho e por toda essa incrível jornada que foi a graduação. Agradeço também aos meus pais e família, pois sem vocês eu também não teria conseguido. Obrigado por serem meu apoio por todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Fausto Brunos dos Reis Almeida pela orientação e por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse descobrir um novo mundo pelo qual sou encantado. À Dra. Tamires Bittencourt e às doutorandas Caroline Rezende e Bianca Oliveira (as três meninas super poderosas) pela companhia e imenso apoio neste último ano. Vocês estão sempre comigo em meu coração. Ao Patrick pelas brincadeiras e companhia, além de todo o carinho que tem para comigo. À Aline, Fran e Gabriel pela amizade e companheirismo. Ao Técnico Beto pela paciência em me receber e ensinar os manejos básicos de laboratório, além de sempre estar por perto.

Aos meus amigos da XVII Turma de Informática Biomédica, todos têm um lugar especial em meu coração por toda a companhia que servimos uns aos outros. Saibam que sempre estarei aqui por vocês. Em especial, obrigado ao Doninha, à Bemol e ao Jake por nossa amizade incrível que eu carrego no coração. Obrigado por me mostrarem o que é o companheirismo e por todas as aventuras que vivemos juntos e ainda viveremos.

À Aline e Mila, pela companhia e mútuo apoio nos momentos dificeis, além da amizade linda que criamos que, mesmo sendo abalada, permanece viva em meu coração para todo o sempre.

À todos os meus amigos que fiz ao longo desses quatro anos, obrigado por cruzarem meu caminho. Acredito que o destino colocou cada um em minha caminhada para que possamos crescer de alguma forma. E, por fim, à todos aqueles que não consigo explanar meus sentimentos por conta do limite de linhas, tenham consciência de que sou eternamente grato por fazer parte

de vossas vidas e carregar um pouquinho de vocês dentro de mim. Obrigado por tudo, sempre!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do fluxo de trabalho para a extração e purificação de vesículas extracelulares de C. albicans. Criado em BioRender.com (10/10/2022) 17

Figura 2 - Esquema representativo do fluxo de trabalho para análise metabolômica. Criado em BioRender.com (10/10/2022) 22

Figura 3 - Identificação e perfil de vesículas extracelulares produzidas por *C. albicans* em diferentes condições de cultivo. O eixo das abscissas corresponde ao tamanho em nanômetros e o das coordenadas a concentração de partículas por mililitro. (A) Gráfico representativo da distribuição na condição YPD pH. 7.4. (B) Gráfico representativo da distribuição na condição YPD pH. 6.3. (C) Gráfico representativo da distribuição na condição RPMI suplementado com 1% de Nutridoma. 24

Figura 4 - Microscopia óptica de C. albicans após a estimulação de transição levedura-hifas. (A) Aspectos morfológicos de *C. albicans* na condição YPD 7.4, a 37ºC. (B) Aspectos morfológicos de *C. albicans* na condição RPMI suplementado com 1% de Nutridoma a 37ºC por 4 horas. 25

Figura 5 - Rede molecular dos metabólitos encontrados nas vesículas extracelulares com a legenda fornecida pela ferramenta *MolNetEhancer* com as classes identificadas e a presença de 56 *clusters*. 28

Figura 6 - Rede molecular dos metabólitos detectados nos sobrenadantes das vesículas extracelulares com a legenda fornecida pela ferramenta *MolNetEhancer* com as classes identificadas e a presença de 57 *clusters*. 30

Figura 7 - Diagrama de Venn com os compostos encontrados em cada condição nas vesículas

extracelulares de *C. albicans*. A condição YPD pH 6.3. se refere à condição de levedura; YPD pH 7.4 à condição filamentosa e RPMI + Nutridoma, à condição de pseudo-hifas. 35

Figura 8 - Diagrama de Venn com os compostos encontrados em cada condição no sobrenadantes das vesículas extracelulares de *C. albicans***.** A condição YPD pH 6.3. se refere à condição de levedura; YPD pH 7.4 à condição filamentosa e RPMI + Nutridoma, à condição de pseudo-hifas. 38

Figura 9 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante da condição YPD pH 6.3., condição de levedura. 39

Figura 10 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante da condição YPD pH 7.4., condição filamentosa. 40

Figura 11 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante da condição RPMI + Nutridoma, condição de pseudo-hifas. 41

Figura 12 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante do meio limpo. 42

Figura 13 - Classes enriquecidas dos compostos encontrados nas amostras de vesículas extracelulares. (A) Classes enriquecidas das vesículas extracelulares na condição YPD pH 6.3. versus a condição RPMI + Nutridoma. (B) Classes enriquecidas das vesículas extracelulares na condição YPD pH 7.4. versus a condição RPMI + Nutridoma. 45

Figura 14 - Classes enriquecidas dos compostos encontrados nas amostras do sobrenadante de vesículas extracelulares. (A) Classes enriquecidas dos sobrenadantes das vesículas extracelulares

na condição YPD pH 6.3. versus a condição YPD pH 7.4.. (B) Classes enriquecidas dos sobrenadantes das vesículas extracelulares na condição YPD pH 6.3. versus a condição RPMI + Nutridoma. (C) Classes enriquecidas dos sobrenadantes das vesículas extracelulares na condição YPD pH 7.4. versus a condição RPMI + Nutridoma. 46

Figura 15 – Resultados do PCA das vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo sem versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. 48

Figura 16– Resultados do PLS-DA das vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. 49

Figura 17– Resultados do PCA dos sobrenadantes de vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. 50

Figura 18– Resultados do PLS-DA dos sobrenadantes de vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando

meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. 51

Figura 19 – Resultados do *VIP Score* das amostras. (A) Análise das VEs comparando os meios de cultivo YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise das VEs nos meios de cultivo YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (C) Análise do sobrenadante das VEs comparando os meios de cultivo YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise do sobrenadante das VEs comparando comparando os meios de cultivo YPD no pH 6.3 e pH 7.4. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados no software *MZMine 3.0* 18

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no banco de dados GNPS 19

Tabela 3 - Metabólitos secundários anotados na rede molecular de vesículas extracelulares (Figura 6) 33

Tabela 4 - Metabólitos secundários anotados na rede molecular de sobrenadante de vesículas extracelulares (Figura 7) 37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **11**
1.1. *Candida albicans* 11
1.2. Vesículas Extracelulares Fúngicas 12
1.3. Análises de bioinformática 14
2. JUSTIFICATIVA **15**
3. HIPÓTESE **15**
4. OBJETIVOS **15**
4.1. Objetivos específicos 15
5. MATERIAIS E MÉTODOS **16**
5.1. Linhagem de *C. albicans* e condições de cultivo 16
5.2. Produção e purificação de vesículas extracelulares. 16
5.3. Aspectos morfológicos de *C. Albicans* 17
5.4. Identificação de metabólitos secundários 18
5.4.1. Espectrometria de Massas 18
5.4.2. Análise Metabolômica 19
5.4.3. Enriquecimento de classes químicas 21
5.4.3.1. *MolNetEhancer* 21
5.4.3.2. Pacote *pyClassRich* 22
5.4.4. Análise Estatística 23
6. RESULTADOS **24**
6.1. Identificação de Vesículas Extracelulares de *C. albicans* 24
6.2. Microscopia da morfologia de *C. albicans* 26
6.3. Análise Metabolômica 27
6.4. Enriquecimento de classes químicas 38
6.5. Análise Estatística 42
7. DISCUSSÃO **48**
8. CONCLUSÃO **52**
REFERÊNCIAS **53**

RESUMO

As infecções causadas por *Candida albicans* caracterizam-se pela alta letalidade e elevada incidência mundial, com sua transição morfológica oferecendo vantagens durante diferentes estágios da infecção e na evasão da resposta imune pelo hospedeiro. Vesículas extracelulares (VEs) são estruturas descritas em organismos de todos os reinos. Investigações recentes mostraram que o seu envolvimento em processos metabólicos culminam em alterações de fenótipo de suscetibilidade a antifúngicos e de virulência. Nesse sentido, é concebível que o conteúdo e a mensagem transmitida por VEs de *C. albicans* também possam regular a transição morfológica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento e identificação dos metabólitos presentes nas VEs produzidas por *C. albicans* obtidas em diferentes cultivos, o qual podem ter correlação com a regulação de sua morfologia. Para isso, realizou-se análises de metabólitos para investigar os compostos envolvidos, sendo atestado que os metabólitos 4-benzyl-6-hydroxy-7-methoxy-2-methylisoquinolin-2-ium, Andrimid, 4-{[(1R,5R,6R)-3-{[(1R)-1-carbamoyl-2-phenylethyl]carbamoyl}-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-yl]carbamoyl}piperidin-1-ium, Phytosphingosine, Dihydrosphingosine, 4-Formylphenyl 2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranoside, 1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3β-ol, Ergosterol, Aminonucleoside, Sn-glycero-3-phosphocholine, Methylthioadenosine, Glycocholic acid atuam potencialmente na regulação positiva da transição para hifas, enquanto os compostos Cer (d 18:1/20:0) e Antiarrhythmic peptide possam participar na formação de pseudo-hifas. Por outro lado, os compostos PE(16:1/18:1) e 1,2-Dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine parecem ser importantes para a manutenção do estágio leveduriforme. Ensaios adicionais poderão esclarecer o papel destes metabólitos na transição morfológica.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, infecções fúngicas, candidíase, dimorfismo,

metabólitos secundários, metabolômica, bioinformática.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo comensal, naturalmente associado à microflora humana, sendo encontrado em mucosas, trato digestivo e pele. No entanto, alterações na sua associação com o hospedeiro podem ocorrer devido algumas desordens, principalmente referentes a imunossupressão e mudanças de microbiota. Essas desordens desencadeiam o estágio patogênico que leva a um aumento significativo da proliferação e o desenvolvimento da infecção, conhecida como candidíase (PAPPAS; LIONAKIS; ARENDRUP; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2018). Esse patógeno oportunista pode causar tanto infecções superficiais como infecções invasivas. Estima-se que mais de 750.000 casos de candidíase invasiva ocorram anualmente, com taxa de mortalidade superior a 40% *(GAFFI - https://www.gaffi.org)*.

C. albicans apresenta como característica marcante a capacidade de crescer em diferentes morfologias, seja como estrutura de brotamento unicelular (leveduras) ou como formas filamentosas de hifas e pseudohifas (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). As diferenças entre as formas de pseudo- hifas e hifas são decorrentes da diferente organização de ciclo celular, o que acarreta em aspectos morfológicos distinguíveis entre pseudo-hifas e hifas. Pseudo-hifas apresentam células mais largas, mais curtas e com sítio de contrições nos locais de septação.

A importância da transição levedura-hifa para os diferentes estágios de infecção e para a total virulência do patógeno é bastante disseminada na literatura científica. Dados que são reiterados pelas funções apresentadas pelas hifas, com maiores propriedades de adesão à superfície do hospedeiro e também na penetração do tecido, o que é favorecido pela secreção de proteases aspárticas (Saps 1-6). Além disso, as hifas apresentam mais recursos para captação de ferro e para contrapor o efeito promovido pelo estresse oxidativo de células fagocitárias

(JACOBSEN; WILSON; WÄCHTLER; BRUNKE *et al.*, 2012). O processo de transição leveduras a hifas é um circuito altamente regulado e que ocorre em resposta a uma diversidade de estímulos do meio circundante. Assume-se que a adaptação do crescimento de *C. albicans* no hospedeiro facilite a formação de hifas sob uma variedade de condições ambientais que refletem a diversidade de microambientes encontrados no hospedeiro (SUDBERY, 2011). Deste modo, as hifas se formam em resposta à presença de soro, pH neutro, 5% de CO2 (a pressão parcial de CO2 no sangue) e N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) (MARDON; BALISH; PHILLIPS, 1969; SUDBERY, 2011).

Além disso, um fenômeno conhecido como *quorum sensing* (QS) também controla a formação de hifas e a densidade celular (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012), em que moléculas de QS podem ser encontradas no interior de VEs. Honorato e colaboradores (2021) mostraram o envolvimento de moléculas de QS, como derivados de farnesol e ácidos graxos de cadeia média, em VEs obtidas de uma cultura leveduriforme de *C. albicans* como reguladores potenciais do ciclo celular, formação de biofilme e filamentação. (HONORATO; DEMETRIO; ELLIS; PIFFER *et al.*, 2021). No entanto, essa investigação explorou apenas VEs obtidas de um cultivo predominantemente leveduriforme, sendo provável que esse efeito inibitório de filamentação seja em função do teor dessas VEs e, consequentemente, da mensagem transmitida por sua carga. Dessa forma, um trabalho prévio que visou compreender mais da amplitude do impacto ambiental sobre o teor de VEs foi conduzido em *Histoplasma capsulatum* e mostrou a plasticidade da composição das VEs em decorrência de diferentes fontes de nutrição (CLEARE; ZAMITH; HEYMAN; COUVILLION *et al.*, 2020).

1.2. Vesículas Extracelulares Fúngicas

Vesículas extracelulares (VEs) são descritas em organismos de todos os reinos e são

estruturas compostas por uma bicamada lipídica/proteica. Elas carregam variados tipos de moléculas para o espaço extracelular e têm um importante papel na fisiologia das células e na comunicação celular. Sua carga inclui proteínas, diferentes classes de enzimas, lipídios, pigmentos, polissacarídeos, RNA e DNA (BROWN; WOLF; PRADOS-ROSALES; CASADEVALL, 2015).

Em fungos, a primeira descrição e caracterização de VEs ocorreu em *C. neoformans* há mais de uma década (RODRIGUES; NIMRICHTER; OLIVEIRA; FRASES *et al.*, 2007). Atualmente, VEs de cerca de 20 espécies fúngicas foram caracterizadas, compreendendo as formas leveduriformes das espécies de *H. capsulatum, Sporothrix schenckii, C. parapsilosis, Saccharomyces cerevisiae, Malassezia sympodialis, P. brasiliensis, C. albicans, Pichia fermentans, C. gattii*, *S. brasiliensis, P. lutzii,* and *Exophiala dermatitidis* (ALBUQUERQUE; NAKAYASU; RODRIGUES; FRASES *et al.*, 2008; BIELSKA; SISQUELLA; ALDEIEG; BIRCH *et al.*, 2018; DINIZ; CANDURI, 2017; GALDIERO; SALVATORE; MAIONE; DE ALTERIIS *et al.*, 2021; GEHRMANN; QAZI; JOHANSSON; HULTENBY *et al.*, 2011; IKEDA; DE ALMEIDA; JANNUZZI; CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2018; LAVRIN; KONTE; KOSTANJŠEK; SITAR *et al.*, 2020; LEONE; BELLANI; MUCCIFORA; GIORGETTI *et al.*, 2018; OLIVEIRA; NAKAYASU; JOFFE; GUIMARÃES *et al.*, 2010; PERES DA SILVA; LONGO; CUNHA; SOBREIRA *et al.*, 2019; VALLEJO; MATSUO; GANIKO; MEDEIROS *et al.*, 2011; VARGAS; ROCHA; OLIVEIRA; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015) e os fungos filamentosos, incluindo *Alternaria infectoria, Trichophyton interdigitale*, *Rhizopus delemar, Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum, Trichoderma reesei*, *Aspergillus fumigatus*, e *Aspergillus flavus* (BITENCOURT; REZENDE; QUARESEMIN; MORENO *et al.*, 2018; BLEACKLEY; SAMUEL; GARCIA-CERON; MCKENNA *et al.*, 2019; BRAUER; PESSONI; BITENCOURT; DE PAULA *et al.*, 2020; DE PAULA; ANTONIÊTO; NOGUEIRA;

RIBEIRO *et al.*, 2019; LIU; BRUNI; TAYLOR; ZHANG *et al.*, 2018; SILVA; PRADOS-ROSALES; ESPADAS-MORENO; WOLF *et al.*, 2014; SOUZA; BALTAZAR; CARREGAL; GOUVEIA-EUFRASIO *et al.*, 2019).

Apesar do grande número de estudos sobre a composição e potencial imunomodulador da VEs fúngicas, existe pouca informação disponível sobre seus papéis na interação célula-célula e sobre a amplitude dos mecanismos mediados pelas VEs durante a interação patógeno-hospedeiro.

1.3. Análises de bioinformática

Com o avanço da tecnologia e o advento da era do sequenciamento, uma nova ciência foi necessária para que a análise de dados em larga escala fosse realizada de forma adequada. Com isso, há o surgimento da bioinformática e as ciências "ômicas", caracterizando-se como uma área interdisciplinar entre biologia, estatística e computação visando o desenvolvimento de ferramentas e a análise de dados biológicos (DINIZ; CANDURI, 2017).

As ciências ômicas se resumem em aplicações para trabalhar com dados em larga escala e a metabolômica se caracteriza como o estudo dos metabólitos com objetivo principal de reunir o máximo de compostos encontrados no objeto de estudo. Entretanto, muitos desses ainda não são catalogados ou conhecidos devido a heterogeneidade e diversidade de tais moléculas, causando limitações científicas. A metabolômica pode ser dividida em duas formas de análise: alvo e global. A análise alvo tem seu uso concreto em hipóteses envolvendo um grupo de metabólitos específico ou alguma via. Por outro lado, a análise global ajuda na geração de hipóteses por se tratar da análise do maior número de metabólitos possíveis de diferentes classes químicas com principal objetivo de encontrar a diversidade no organismo de estudo (BELINATO; BAZIOLI; SUSSULINI; AUGUSTO *et al.*, 2019; GALDIERO; SALVATORE; MAIONE; DE ALTERIIS *et*

al., 2021).

Por sua vez, metabólitos secundários foram descritos pela primeira vez em 1891 por Kossel (KOSSEL, 1891) sendo definidos como compostos opostos aos metabólitos primários e pouco abundantes. Entretanto, com a evolução de diferentes técnicas, foi possível isolar tais substâncias e descobrir suas influências no organismo em diferentes interações com o ambiente. Por fim, os metabólitos secundários podem ser vistos como possíveis biomarcadores e responsáveis pela sobrevivência das espécies, especialmente plantas, por ajudar na defesa e influenciar em atividades biológicas como, por exemplo, características de odor ou sabor (FUMAGALI; GONÇALVES; MACHADO; VIDOTI *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que metabólitos secundários podem exercer papeis cruciais em diversos mecanismos biológicos, este trabalho visa identificar os metabólitos presentes em VEs produzidas por *C. albicans* sob diferentes condições morfológicas. Os resultados podem auxiliar na identificação de pontos de vulnerabilidade e nortear novas estratégias terapêuticas que podem neutralizar as mensagens adaptativas mediadas pelas VEs e contribuir para o desenvolvimento de terapias antifúngicas mais efetivas.

3. HIPÓTESE

VEs de *C. albicans* podem desempenhar papéis importantes na regulação morfológica e, dessa forma, identificarmos novos alvos terapeûticos.

4. OBJETIVOS

Identificar os metabólitos secundários contidos nas vesículas extracelulares de *C. albicans* obtidas em diferentes cultivos na transição leveduras-hifas.

4.1. Objetivos específicos

1) Cultivar *C. albicans* (ATTC-64548) e rastrear condições de cultivo ideais para a indução da transição levedura-hifa;

2) Isolar VEs de cultivos pré-definidos de *C. albicans* referentes a condição de transição de levedura-hifas e do crescimento em forma leveduriforme (controle);

3) Avaliar o perfil das VEs obtidas das duas condições de cultivo e estimar a concentração em aparelho *Nanosight*;

4) Identificação de metabólitos secundários das VEs por meio de análises metabolômicas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Linhagem de *C. albicans* e condições de cultivo

Candida albicans (ATTC-64548) foi cultivada em meio Sabouraud (Oxoid) a 30ºC por 72h. Em seguida, o pré-inóculo foi realizado em meio YPD [YPD: 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 2% (m/v) dextrose, pH 6,3], seguido por incubação a 30ºC por 12-16h com agitação. Após a incubação, as culturas de *C. albicans* tiveram suas concentrações ajustadas e foram inoculadas em diferentes meios de cultivo, como meio YPD (pH 6,3), YPD (pH 7,4), RPMI com 1% de Nutridoma (*Roche Applied Science*). Diferentes temperaturas também foram avaliadas, como 30ºC ou 37ºC. Após definir o meio de cultivo utilizado para induzir a transição de leveduras a hifas, diferentes tempos de incubação foram avaliados, tais como 30min, 2h e 4h. Após a definição do tempo e do meio de cultivo, as VEs foram isoladas de duas condições, uma que promova a transição levedura-hifas e outra que mantenha as células em estágio

leveduriforme (controle).

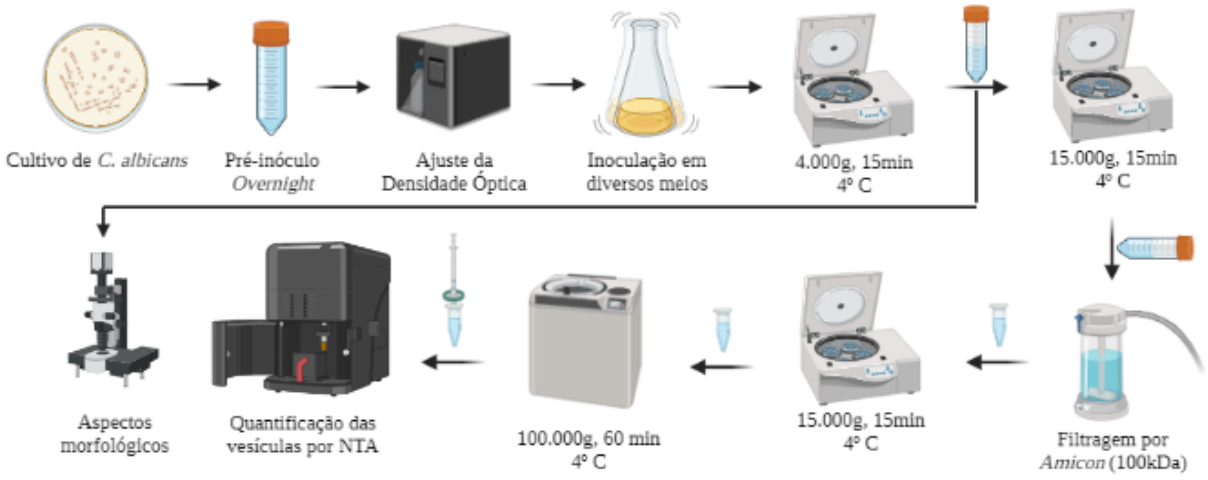
5.2. Produção e purificação de vesículas extracelulares.

As VEs foram isoladas como descrito previamente (ZHAO; BLEACKLEY; CHISANGA; GANGODA *et al.*, 2019), com algumas modificações, conforme mostrado esquematicamente na Figura 1. Os inóculos de *C. albicans* foram adicionados em condições adequadas para a transição levedura-hifas. Após o cultivo, as células fúngicas foram separadas do sobrenadante da cultura por centrifugação a 4.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 15.000 x g por 15 min a 4°C para remoção de partículas menores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi concentrado através do sistema de ultrafiltração, utilizando o sistema *Amicon* (100 kDa) e submetido a uma centrifugação a 15.000 x g por 15 min a 4°C. Posteriormente, o concentrado foi ultracentrifugado a 60000 rpm, durante 1h a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido ressuspendido em água nuclease free (*Sigma Alreich*).

Para a caracterização do tamanho e concentração das VEs obtidas foi utilizado o analisador de nanopartículas *NanoSight NS300* (*Malvern Instruments, Malvern, UK*), como descrito previamente por (BITENCOURT; REZENDE; QUARESEMIN; MORENO *et al.*, 2018).

5.3. Aspectos morfológicos de *C. Albicans*

Os aspectos morfológicos foram avaliados através de microscopia, em microscópio Zeiss Observer Z.1 acoplado ao programa de captura de imagens AxioVision SE64.



5.4. Identificação de metabólitos secundários

As vesículas extracelulares fúngicas obtidas em cada condição, filamentação e controle, foram submetidas à análise de espectrometria de massas para a identificação do conteúdo de metabólitos secundários juntamente com amostras de seus respectivos sobrenadantes. Comparações foram realizadas entre as amostras (YPD e RPMI com Nutridoma), conforme ilustrado na Figura 2, a fim de determinar metabólitos secundários exclusivos ou em comum entre as vesículas em diferentes condições e seus respectivos sobrenadantes. O grupo controle foi o meio YPD pH. 6.3.

5.4.1. Espectrometria de Massas

As amostras foram submetidas a solubilização, ultrassonificação e filtragem, sendo posteriormente eluídas em metanol e submetidas a um cromatógrafo líquido *Nexera* (Shimadzu) acoplada a espectrômetro de massas QqTOF-MS (Bruker). A fase estacionária utilizada foi a coluna BEH C8 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm, Waters, Milford, MA). Deu-se início ao gradiente com 5% da fase móvel B, composta por 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), mantido por 5min e obtendo um aumento linear para 40% de B em 10 min e até 45% em 12 min. Por fim, a

fase móvel foi alterada para 5% da fase móvel B em 2 min e mantida por mais 2 min. O tempo otimizado de execução foi de 24 min.

A análise por espectrometria de massas (MS) foi realizada no modo negativo, em modo *full scan* com varredura de *m/z* 100 a 1000 Da. O espectro de fragmentação era adquirido dos cinco íons mais intensos por *scan*.

5.4.2. Análise Metabolômica

A análise de dados tem início com a conversão e pré-processamento dos mesmos, onde serão filtrados tendo em consideração critérios de inclusão que são variáveis a partir do instrumento de cromatografia utilizado. Os dados obtidos do espectrômetro de massas foram convertidos para o formato *.mzXML* com o software *MSConvert* (CHAMBERS; MACLEAN; BURKE; AMODEI *et al.*, 2012). O pré-processamento foi feito com o auxílio do software *MZMine 3.0* (PLUSKAL; CASTILLO; VILLAR-BRIONES; ORESIC, 2010) que permite a integração dos picos cromatográficos, gerado pelo espectrômetro de massas, com os dados de fragmentação das moléculas que os compõem, além de realizar a deconvolução cromatográfica, ação necessária para que os picos coeluidos sobrepostos sejam separados. Os principais parâmetros utilizados são descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados no software *MZMine 3.0*

Parâmetro	Valor utilizado
Noise Level	1.0E5

Método utilizado para construção dos cromatogramas	ADAP Chromatogram builder
Tolerância de *m/z*	0.001
Tempo de retenção	0.1

Após o pré-processamento, é gerado o arquivo *.mgf*, que contém os dados de fragmentação dos picos selecionados na etapa anterior, e o arquivo *.csv*, que carrega os dados quantitativos. Ambos têm como função compor a base de dados para o pareamento espectral que permitirá a construção de redes moleculares, etapa que agrupa os espectros de acordo com sua similaridade, gerando um conjunto de diferentes clusters que terão em comum a similaridade espectral, caracterizando suas moléculas.

As redes moleculares supracitadas foram feitas com o auxílio do banco de dados Global *Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) (WANG; CARVER; PHELAN; SANCHEZ *et al.*, 2016), um banco de dados público que conta com um repositório de milhares de espectros, utilizando as ferramentas *Molecular Network* e *Feature-Based Moleuclar Networking* (FBMN) (NOTHIAS; PETRAS; SCHMID; DÜHRKOP *et al.*, 2020) com os seguintes parâmetros:

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no banco de dados GNPS

Parâmetro	Valor utilizado

Tolerância de íon precursor para rede molecular	0.2
Tolerância de íon fragmento para rede molecular	0.1
Tolerância de íon precursor para análise de rede	2.0
Tolerância de massa de íon fragmento para análise de rede molecular	0.5

Os parâmetros de tolerância de íon estão ligados com a tolerância de massa e a quanto o íon fragmento pode ter seu valor de massa por carga (*m/z*) deslocado dos valores esperados. As redes moleculares puderam ser visualizadas e analisadas com a ajuda do software *CytoScape* (SHANNON; MARKIEL; OZIER; BALIGA *et al.*, 2003).

5.4.3. Enriquecimento de classes químicas

O enriquecimento de classes químicas foi feito com duas ferramentas: o *MolNetEhancer*, nativo do GNPS, e o pacote *pyClassRich*, algoritmo criado pelo Laboratório de Quimiobiologia Computacional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

5.4.3.1. *MolNetEhancer*

O *MolNetEhancer* se classifica como uma *pipeline* disponível em pacotes das linguagens de programação Python e R, além de estar disponível na interface do banco de dados GNPS. Tal

ferramenta atua como um classificador de classes químicas a fim de incrementar as informações estruturais já obtidas (ERNST; KANG; CARABALLO-RODRÍGUEZ; NOTHIAS *et al.*, 2019; PILON; VIEIRA; AMARAL; MONTEIRO *et al.*, 2021).

Para isso, o *MolNetEhancer* utiliza:

(i) As anotações de estruturas químicas fornecidas pelo pareamento espectral com o Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS);

(ii) Predição *in silico* com o Network Annotation Propagation (NAP);

(iii) Classificação automatizada através do *ClassyFire,* um algoritmo que utiliza estruturas químicas e outras informações para atribuição dos compostos em uma escala taxonômica (DJOUMBOU FEUNANG; EISNER; KNOX; CHEPELEV et al., 2016);

(iv) Saídas do MS2LDA, ferramenta que pode decompor os dados de fragmentação e descobrir subestruturas presentes no espectro (WANDY; ZHU; VAN DER HOOFT; DALY *et al.*, 2017).

Com isso, o fluxo de trabalho gera uma rede de saída onde cada *cluster* pode ter uma classe e subclasse química identificada por diferentes cores.

5.4.3.2. Pacote *pyClassRich*

O *pyClassRich* é um algoritmo desenvolvido pelo Laboratório de Quimiobiologia Computacional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. A análise de enriquecimento de classes químicas feita pelo *pyClassRich* tem como objetivo verificar se um conjunto de metabólitos apresentou mudanças em sua abundância relativa que se correlaciona com as mudanças de meio de cultivo. Para isso ele utiliza:

(i) As anotações de estruturas químicas fornecidas pelo pareamento espectral com o

Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) e a predição *in silico* com o *Network Annotation Propagation* (NAP);

(ii) Teste de média entre grupos tendo como base de dados os parâmetros quantitativos oferecidos pelo *Feature-based Molecular Network* (FBMN).

No pacote, as análises de t-test, bem como de *fold-change* foram realizadas para cada classe de compostos de modo a avaliar o grau e a significância estatística das diferenças observadas entre as diferentes formas de cultivo. Um esquema geral do fluxo de trabalho para a análise de metabólitos secundários produzidos pelas VEs encontra-se apresentado na Figura 2.

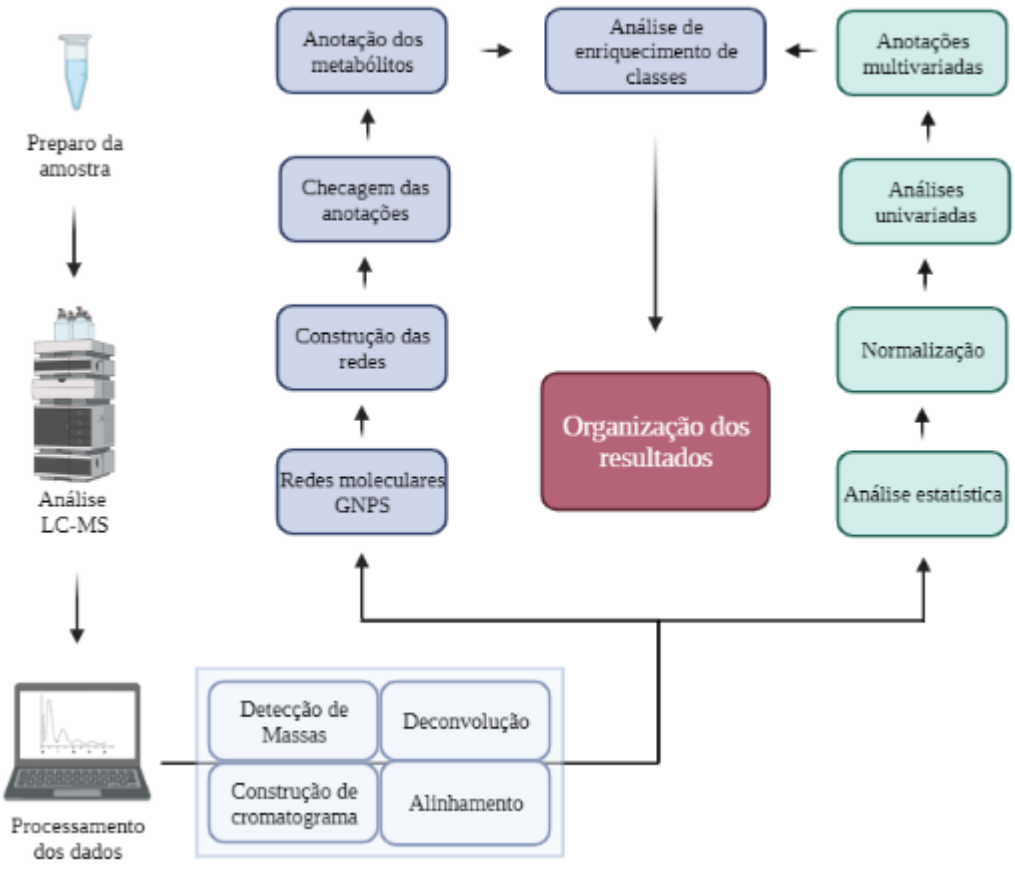


Figura 2 - Esquema representativo do fluxo de trabalho para análise metabolômica. Criado em BioRender.com (10/10/2022)

5.4.4. Análise Estatística

A análise estatística foi feita com o *MetaboAnalyst 5.0* (PANG; CHONG; ZHOU; DE LIMA MORAIS *et al.*, 2021), uma ferramenta on-line para a análise e interpretação estatística de dados metabolômicos. Com ele, foram feitas Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). A principal diferença entre o PCA e o PLS-DA é dada pela sua forma de supervisão; o primeiro é um método não supervisionado e o segundo, um método supervisionado. O PCA detecta as variâncias nos dados por cada componente principal. Por sua vez, o PLS-DA recebe dados de identificação das amostras permitindo uma classificação entre elas (GRANDIZOLI; UBER; CARRENHO; KREUGER *et al.*, 2011).

6. RESULTADOS

6.1. Identificação de Vesículas Extracelulares de *C. albicans*

A identificação e caracterização de VEs produzidas por *C. albicans* foi realizada através da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) por meio do aparelho *NanoSight NS300* (*Malvern Instruments, Malvern, UK*). O meio de cultura YPD, no pH. 6.3, apresentou concentração de $2{,}85x10^{10}$ partículas por mililitro com tamanho entre 114 e 547 nm; no pH. 7,4 o meio YPD apresentou concentração de $2{,}0x10^{10}$ partículas por mililitro com tamanho entre 72 e 335 nm; e por sua vez, o meio RPMI suplementado com Nutridoma apresentou $3{,}72x10^{10}$ partículas por mililitro com tamanho entre 156 e 389 nm (Figura 3).

Com isso, podemos concluir que as populações de vesículas tiveram um tamanho médio de 150 nm e concentração de $2{,}86x10^{10}$ partículas por mililitro.

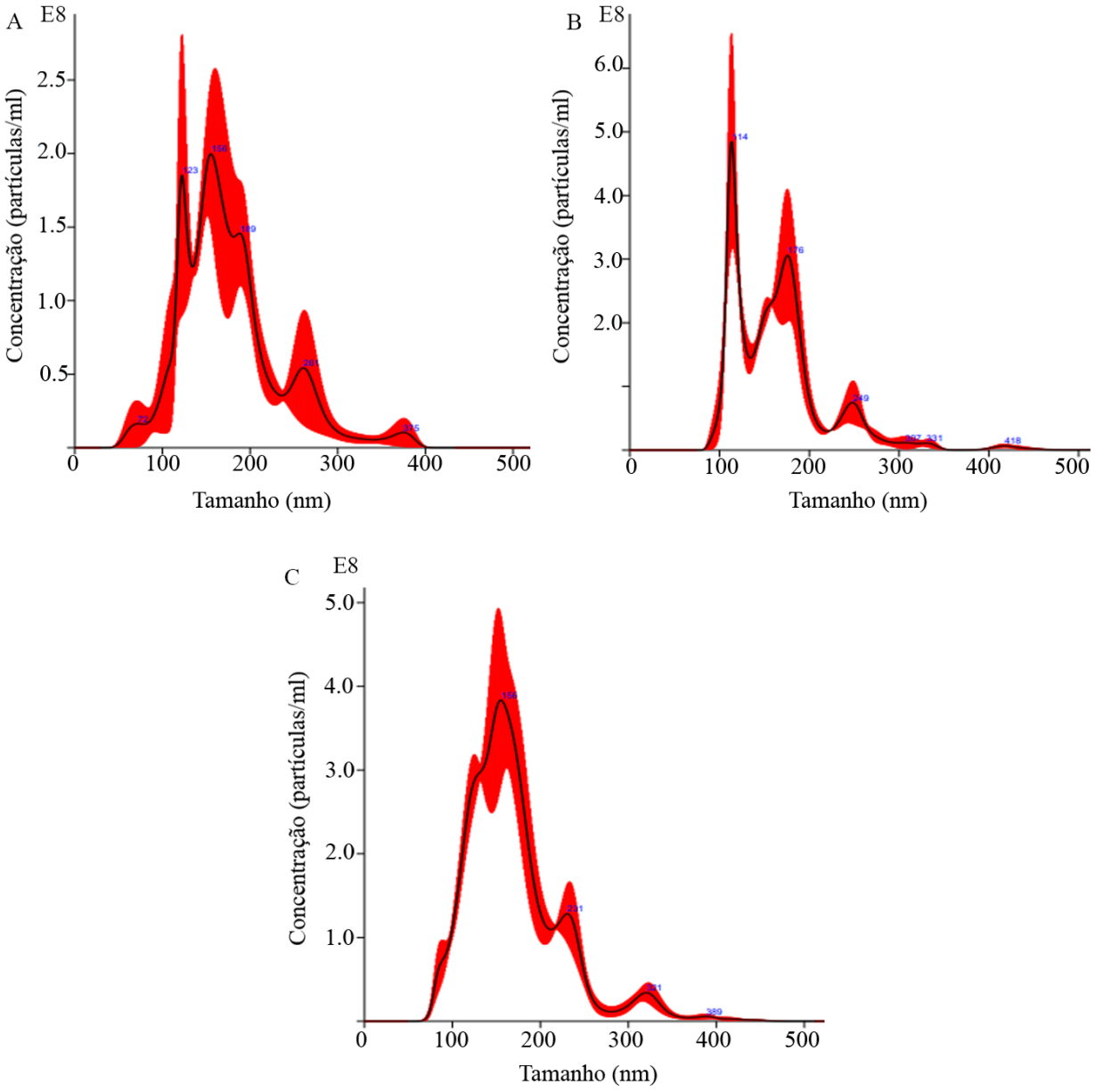


Figura 3 - Identificação e perfil de vesículas extracelulares produzidas por *C. albicans* em diferentes condições de cultivo. O eixo das abscissas corresponde ao tamanho em nanômetros e o das coordenadas a concentração de partículas por mililitro. (A) Gráfico representativo da distribuição na condição YPD pH. 7.4. (B) Gráfico representativo da distribuição na condição YPD pH. 6.3. (C) Gráfico representativo da distribuição na condição RPMI suplementado com 1% de Nutridoma.

6.2. Microscopia da morfologia de *C. albicans*

As imagens que atestam os aspectos morfológicos foram obtidas conforme descrito em 5.4. em parceria com a Profª Maria Helena de Souza Goldman, docente da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Conforme descrito anteriormente, a formação de hifas ocorre em resposta à diversos fatores, como a temperatura e pH neutro, além de certas fontes de carbono e aminoácidos (KADOSH, 2016). Conforme demonstrado na Figura 4, a condição RPMI suplementado com Nutridoma diminui a produção de levedura-hifas, produzindo principalmente pseudo-hifas. Por outro lado, a condição YPD pH 7.4 a 37ºC apresentou hifas completamente desenvolvidas e ramificadas. Portanto, constatou-se que o suplemento de Nutridoma ao meio RPMI é mais efetivo na formação de pseudo-hifas enquanto o meio YPD pH 7.4 é mais efeito para a filamentação, de forma que a comparação do conteúdo das VEs de ambos pode ser interessante no rastreamento de compostos correlacionados com cada um desses processos.

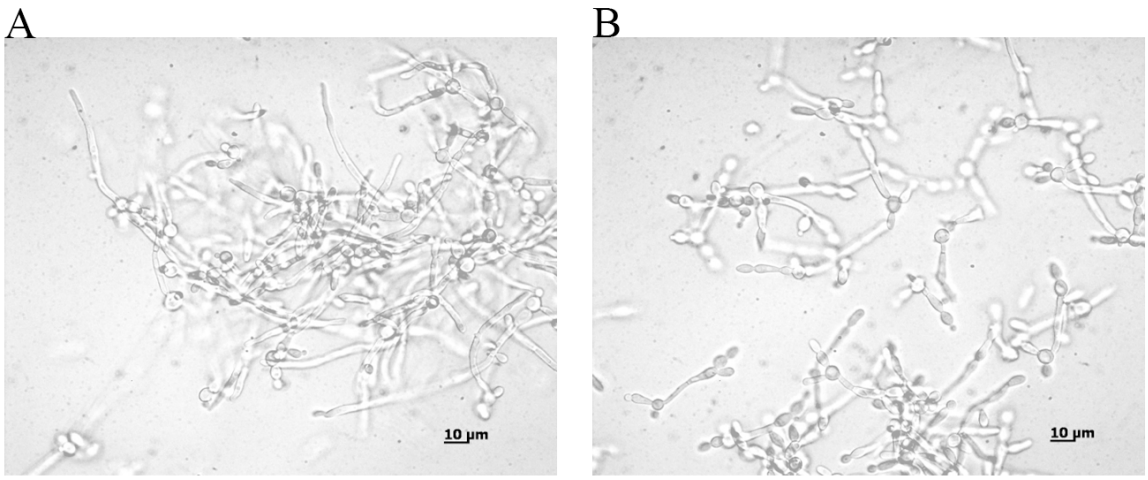


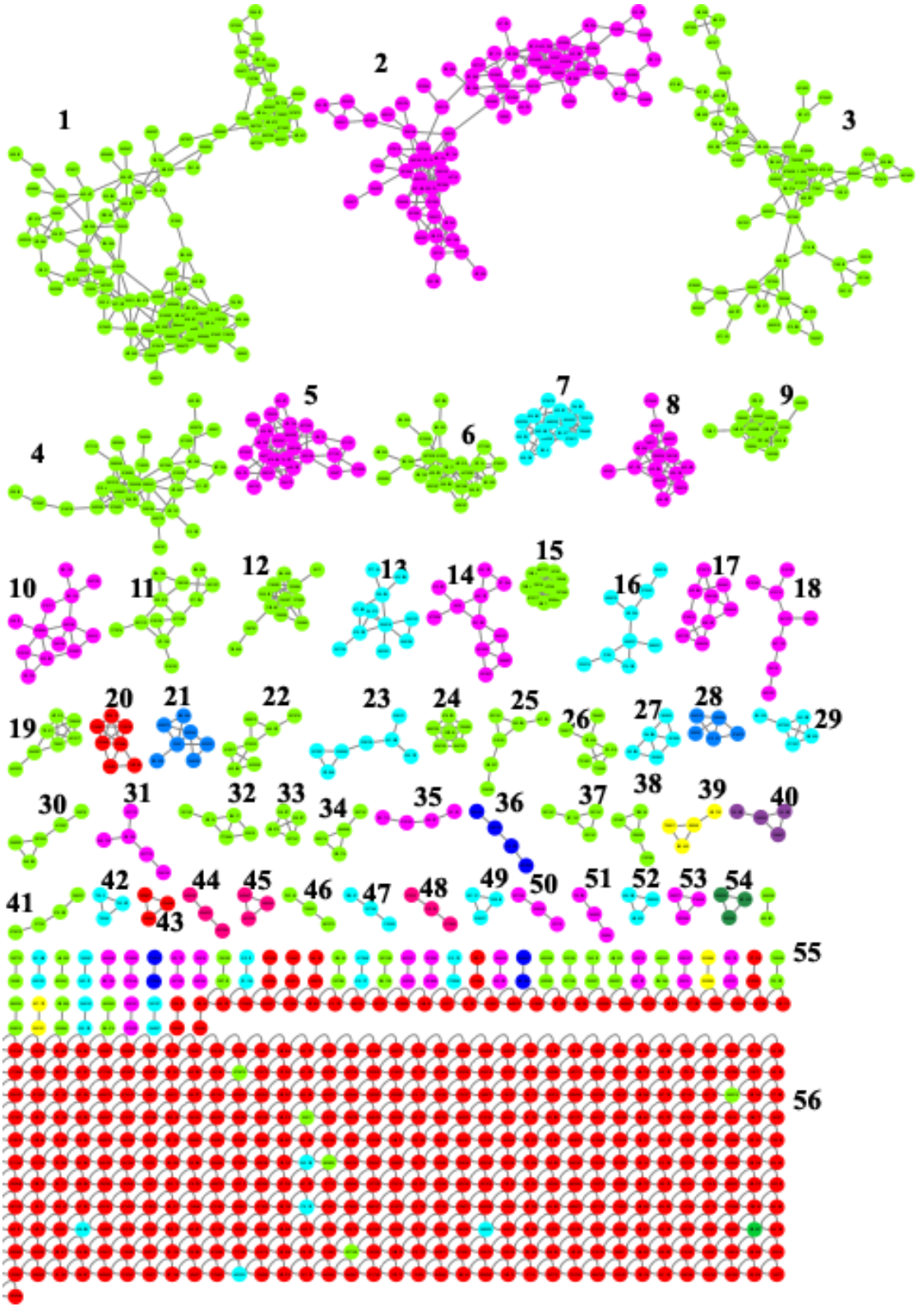
Figura 4 - Microscopia óptica de *C. albicans* após a estimulação de transição levedura-hifas. (A) Aspectos morfológicos de *C. albicans* na condição YPD 7.4, a 37ºC. (B)

Aspectos morfológicos de *C. albicans* na condição RPMI suplementado com 1% de Nutridoma a 37ºC por 4 horas.

6.3. Análise Metabolômica

O banco de dados GNPS forneceu uma rede molecular – tanto para a análise das vesículas quanto para os sobrenadantes - com diversos clusters permitindo a visualização de agrupamentos de metabólitos semelhantes entre si. Cada nodo representa um metabólito identificado e, quanto maior ele for, maior a intensidade encontrada. As arestas, por sua vez, indicam a semelhança entre os espectros identificados.

As cores foram fornecidas pela ferramenta *MolNetEhancer*, usado para enriquecimento de classes como descrito na seção 5.4.3.1. e, para fins didáticos, os clusters foram numerados de acordo com a disposição nas Figuras 6 e 7.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

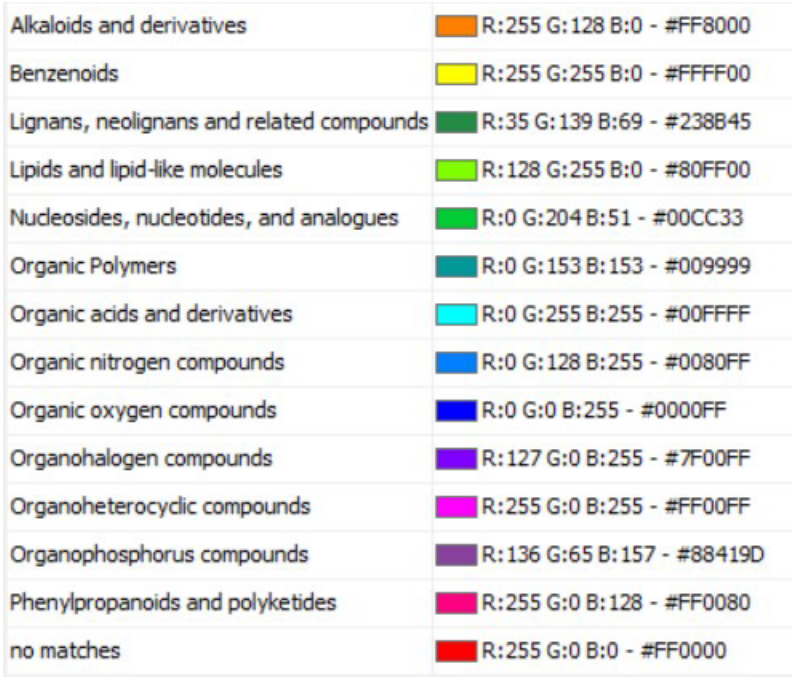
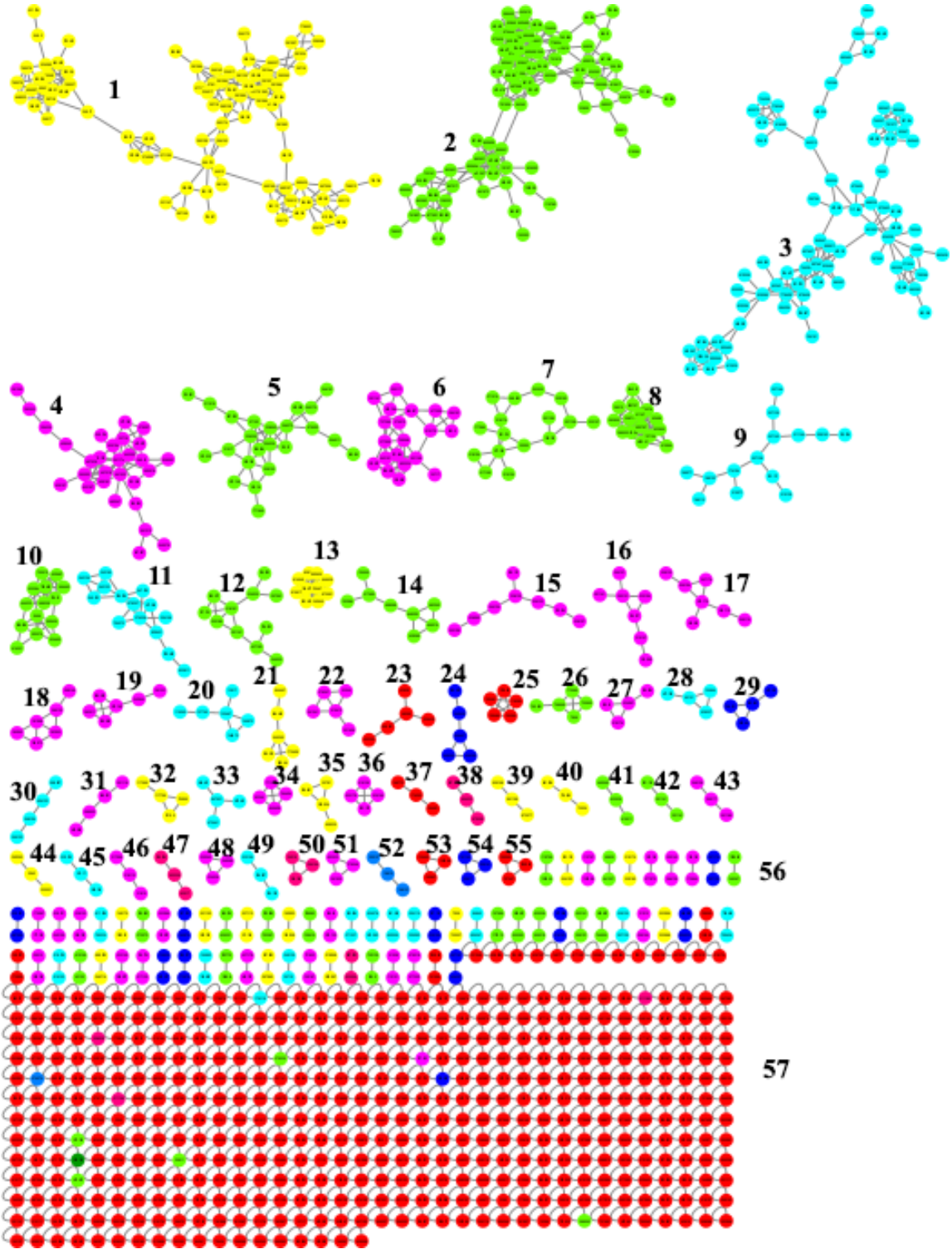


Figura 5 - Rede molecular dos metabólitos encontrados nas vesículas extracelulares com a legenda fornecida pela ferramenta *MolNetEhancer* com as classes identificadas e a presença de 56 *clusters*.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

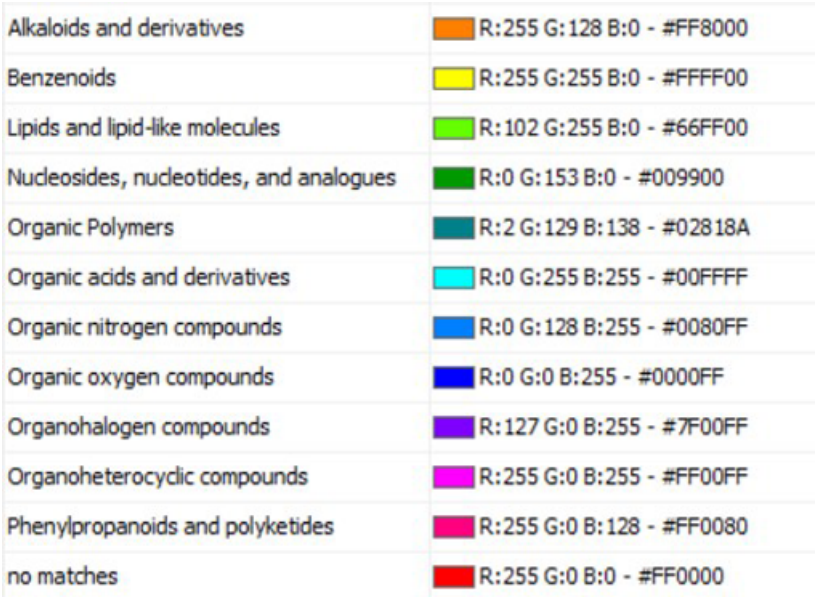


Figura 6 - Rede molecular dos metabólitos detectados nos sobrenadantes das vesículas extracelulares com a legenda fornecida pela ferramenta *MolNetEhancer* com as classes identificadas e a presença de 57 *clusters*.

As redes moleculares podem apresentar algumas limitações como, por exemplo, nodos podem não estar anotados no mesmo interferindo que nodos do mesmo cluster sejam estruturalmente semelhantes, bem como o método escolhido de espectrometria de massas que pode influenciar na detecção de espectros de determinadas classes Diante disso, a identificação dos metabólitos foi feita a partir do pareamento espectral de espécies já anotadas e disponíveis em bancos de dados públicos (WANG; CARVER; PHELAN; SANCHEZ *et al.*, 2016). e/ou via predição de *in silico* (DA SILVA; WANG; NOTHIAS; VAN DER HOOFT *et al.*, 2018) para que seja possível responder a pergunta biológica proposta pelo projeto.

As tabelas 3 e 4 mostram a presença do metabólito em determinada condição e os sinais positivos e negativos indicam sua abundância. Um sinal positivo significa que há a presença daquele composto no meio em questão de forma total ou parcial. Dois sinais positivos indicam que outras condições estão presentes, mas aquela em específica se mostra mais abundante em

relação às outras. Por fim, o sinal negativo demonstra a ausência do metabólito em determinada condição.

Podemos observar nas vesículas extracelulares (Tabela 3) que os compostos 3 (PE(16:1/18:1) e 12 (1,2-Dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) aparecem apenas na condição YPD pH 6.3, quando o organismo está em sua forma de levedura. Por outro lado os compostos 21 (SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE) e 23 (Methylthioadenosine) se encontram apenas na condição YPD pH 7.4, quando o organismo está em sua transição morfológica de levedura-hifa. Por fim, os compostos 2 (Cer (d 18:1/20:0)), 6 (Antiarrhythmic peptide) e 22 (Sorbitan monostearate) encontraram-se apenas na condição RPMI suplementado com Nutridoma, onde observamos a transição morfológica com a formação de pseudo-hifas - conforme descrito na seção 6.2. - sendo sugerida a participação de tais compostos na ação.

Os compostos 4 (Andrimid), 8 (Dihydrosphingosine), 19 (Aminonucleoside) e 24 (Glycocholic acid) se encontram presentes tanto na condição YPD pH 6.3 quanto na condição YPD pH 7.4. em abundâncias semelhantes, sugerindo que não estejam associados ao processo de filamentação, mas são inerentes ao metabolismo e fisiologia de *C. albicans*. Por sua vez, os compostos 1 (4-benzyl-6-hydroxy-7-methoxy-2-methylisoquinolin-2-ium), 13 (PC(16:0/18:1)), 16 (Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3β-ol) se encontram maior abundância no meio YPD pH 7.4. e também é encontrado nas outras condições, sugerindo a ampliação de sua produção durante a transição morfológica.

O composto 5 (4-{[(1R,5R,6R)-3-{[(1R)-1-carbamoyl-2-phenylethyl]carbamoyl}-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-yl]carbamoyl}piperidin-1-ium) foi encontrado em abundânca semelhante no meio RPMI+Nutridoma e YPD pH 7.4. sugerindo fortemente sua participação na transição morfológica. O composto 7 (Phytosphingosine) tem maior abundância na condição YPD pH 7.4.,

mas está presente também em RPMI+Nutridoma podendo ter participação semelhante ao composto 5 assim como o composto 11 (1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) que segue o mesmo perfil do composto 7, mas estando presente também no meio limpo.

O composto 9 (Austinoneol) se encontra em todas as condições, mas com maior abundância em RPMI + Nutridoma. Por outro lado, o composto 14 (Sorbitol) também se encontra em todas as condições, mas com sua abundância diminui na condição RPMI + Nutridoma. É possível que tais compostos estejam associados à formação de pseudo-hifas, mas principalmente que são compostos relacionados à manutenção do metabolismo e fisiologia de *C. albicans*.

O composto 10 (2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranoside) se encontra em maior abundância no YPD pH 7.4., mas também está presente no meio no pH 6.3.. O composto 17 (Ergosterol) segue o mesmo perfil do anterior, mas também está presente no meio de cultura limpo. Tais compostos são passíveis de hipóteses onde são capazes de resistir à transição morfológica e aumentar sua produção na mesma.

Os compostos 15 (1-hexadecyl-2-amino-2-deoxy-sn-glycerol) e 20 (Sorbitan monostearate) se encontram em maior abundância no meio YPD pH 6.3., mas também são encontrados nas condições YPD pH 7.4. e RPMI + Nutridoma, sugerindo que ele tem sua produção diminuída com a transição morfológica. Uma especulação sobre a produção desses metabólitos é se seriam importantes para a manutenção do estado leveduriforme e se inibiriam a transição.

Por fim, podemos observar que todos os compostos apresentados na intersecção entre as condições YPD pH 6.3. e pH 7.4. (Figura 7 e Tabela 3) estão presentes em maior abundância na condição YPD pH 7.4., se tornando assim, importantes compostos para o estudo visto que é passível a sugestão de que tais moléculas participam intrinsecamente da transição morfológica.

Por fim, o composto 18 (Fructoselysine) se encontra em maior abundância no meio RPMI+Nutridoma, mas está presente nos outros, segurindo a sua participação como regulador de pseudo-hifas.

Tabela 3 - Metabólitos secundários anotados na rede molecular de vesículas extracelulares (Figura 6)

Os compostos em itálico e sombreados se caracterizam como a intersecção entre as condições de YPD pH 6.3. e pH 7.4., conforme indicado pelo Diagrama de Venn (Figura 7).

N°	***Cluster***	***Nome***	***m/z***	***Presença***			
				YPD pH 6.3	*YPD pH 7.4*	*R+N*	*Meio*
1	2	4-benzyl-6-hydroxy-7-methoxy-2-methylisoquinolin-2-ium	281.142	+	++	+	-
2	4	Cer (d 18:1/20:0)	592.566	-	-	+	-
3	4	PE(16:1/18:1)	716.522	+	-	-	-
4	6	Andrimid	480.251	++	++	-	-
5	*8*	*4-{[(1R,5R,6R)-3-{[(1R)-1-carbamoyl-2-phenylethyl]carbamoyl}-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-yl]carbamoyl}piperidin-1-ium*	*432.238*	-	++	++	-
6	14	Antiarrhythmic peptide	493,2	-	-	++	-
7	*16*	*Phytosphingosine*	*318.3*	-	++	+	-
8	21	Dihydrosphingosine	302.305	++	++	-	-
9	22	Austinoneol	415.211	+	+	++	+
10	23	4-Formylphenyl 2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranoside	326.1235	+	++	-	-
11	*26*	*1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*	*786.601*	-	++	+	+
12	26	1,2-Dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	730.538	+	-	-	-
13	26	PC(16:0/18:1)	760.617	+	++	+	+
14	27	Sorbitol	183.053	++	++	+	++
15	27	1-hexadecyl-2-amino-2-deoxy-sn-glycerol	316.32	++	+	+	-
16	41	Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3β-ol	395.331	+	++	+	-
17	41	Ergosterol	379.336	+	++	-	+
18	56	Fructoselysine	309.157	+	+	++	-
19	56	Aminonucleoside	295.15	++	++	-	-
20	56	Sorbitan monostearate	430.393	++	+	+	-
21	57	Sn-Glycero-3-Phosphocholine	258.1102	+	++	-	-

22	57	Arginine	175.119	+	+	++	-
23	57	Methylthioadenosine	298.097	+	++	-	-
24	57	Glycocholic acid	466.316	++	++	-	-

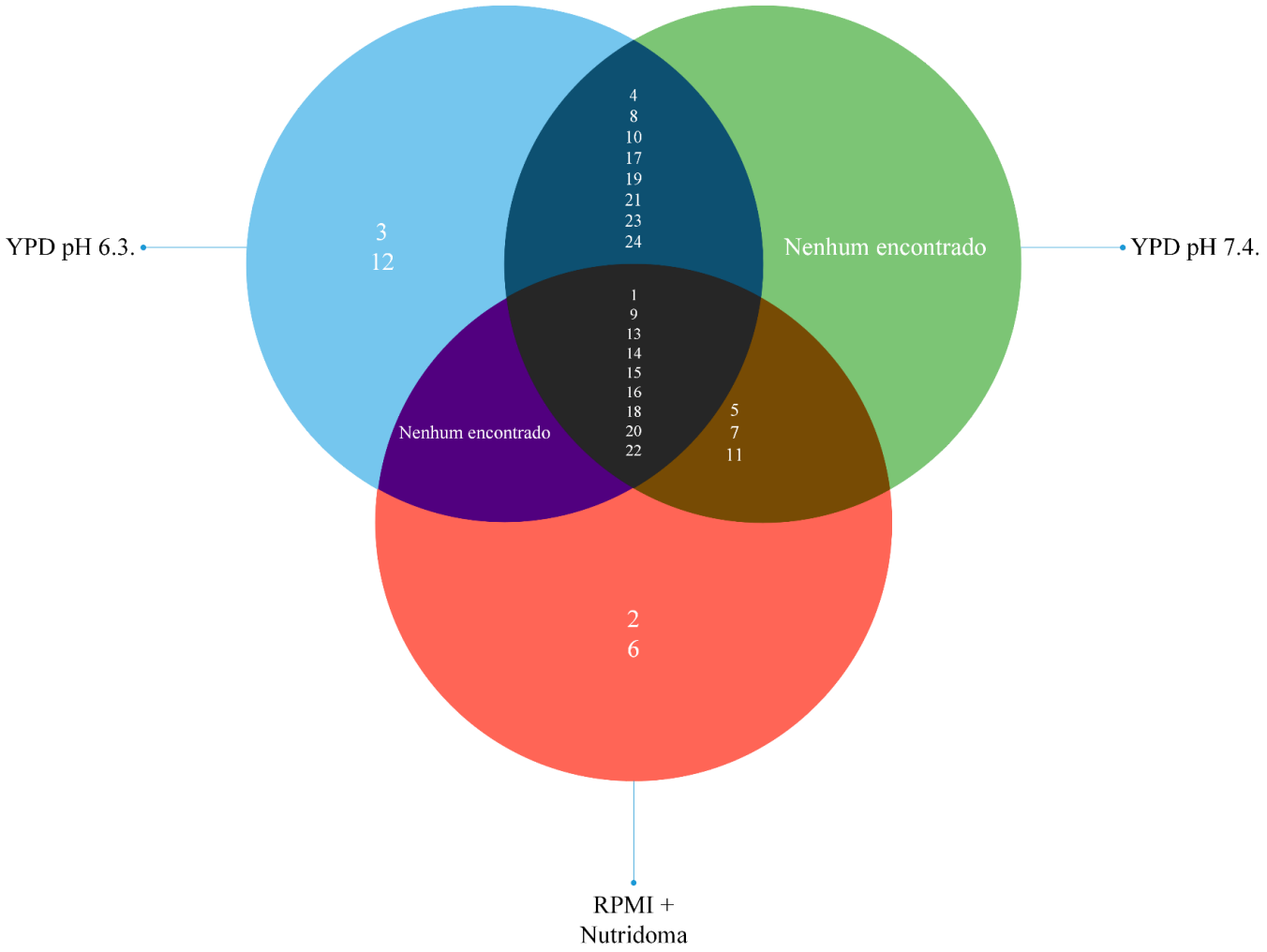


Figura 7 - Diagrama de Venn com os compostos encontrados em cada condição nas vesículas extracelulares de *C. albicans*. A condição YPD pH 6.3. se refere à condição de levedura; YPD pH 7.4 à condição filamentosa e RPMI + Nutridoma, à condição

de pseudo-hifas.

Para o sobrenadantes (Tabela 4) e com a ajuda do seu Diagrama de Venn (Figura 8), podemos observar que o composto 14 (3-(1-oxo-7-(3-phenylthioureido)octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-4-yl)-N-phenylpropanamide) está presente nas condições YPD pH 7.4 e RPMI + Nutridoma em alta abundância, sugerindo fortemente seu envolvimento na transição morfológica até mesmo por nenhum composto se apresentar exclusivamente nas condições supracitadas.

Por outro lado, muitos compostos se apresentam na intersecção entre o meio YPD pH 6.3. e pH 7.4., tais como: composto 2 (Myricetin 3-digalactoside), 3 (3S,3aR,6R,6aS)-6-[(cyclohexylcarbamoyl)oxy]-hexahydrofuro[3,2-b]furan-3-aminium), 4 (Glycocholic acid), 7 1-octadecenoyl-2-tetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 9 (Methylthioadenosine), 11 (9E,12E)-15-((1-carboxy-2-hydroxyethyl)amino)-15-oxopentadeca-9,12-dienoic acid), 15 (Sn-glycero-3-phosphocholine), 17 (Ergosterol) e 18 (Aminonucleoside). A presenca em ambas as condições sugere a importância desses compostos para o metabolismo e fisiologia de *C. albicans*. Todos os compostos citados se apresentam em maior abundância na condição YPD pH 7.4. ou divididos com a condição YPD pH 6.3., apenas o composto 7 que tem uma maior abundância no meio de cultivo, sugerindo assim, a sua intrínseca participação na transição morfológica.

Quando comparamos a presença de compostos concomitante entre a vesícula e seu respectivo sobrenadante (Figuras 9, 10, 11 e 12), é passível da hipótese de que as moléculas encontradas em suas intersecções estejam sendo produzidas para serem carregadas por VEs, mas também sendo secretados no meio extracelular.

Tabela 4 - Metabólitos secundários anotados na rede molecular de sobrenadante de vesículas extracelulares (Figura 7)

Os compostos em itálico e sombreados se caracterizam como a intersecção entre as condições de YPD pH 6.3. e pH 7.4., conforme indicado pelo Diagrama de Venn (Figura 7).

Nº	***Cluster***	***Nome***	***m/z***	***Presença***			
				YPD pH 6.3	*YPD pH 7.4*	*R+N*	*Meio*
1	1	Podototarin	610.184	++	+	+	+
2	*1*	*Myricetin 3-digalactoside*	*280.138*	+	++	-	+
3	*1*	*(3S,3aR,6R,6aS)-6-[(cyclohexylcarbamoyl)oxy]-hexahydrofuro[3,2-b]furan-3-aminium*	*294.154*	++	++	-	-
4	*14*	*Glycocholic acid*	*466.316*	++	++	-	-
5	18	Sorbitol	183.053	++	+	+	++
6	26	1-hexadecanoyl-2-octadecadienoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	758.569	++	-	-	++
7	*26*	*1-octadecenoyl-2-tetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*	*735.223*	+	+	-	++
8	26	1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	786.6	++	-	-	-
9	*30*	*Methylthioadenosine*	*298.097*	+	++	-	-
10	41	Austinoneol	415.211	++	++	++	+
11	*50*	*(9E,12E)-15-((1-carboxy-2-hydroxyethyl)amino)-15-oxopentadeca-9,12-dienoic acid*	*394.164*	+	++	-	-
12	56	1,2-dioctadecenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	744.554	++	-	-	+
13	56	Fructoselysine	309.158	+	+	++	-
14	56	3-(1-oxo-7-(3-phenylthioureido)octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-4-yl)-N-phenylpropanamide	437.178	-	++	++	-
15	*57*	*Sn-glycero-3-phosphocholine*	*258.11*	+	++	-	-
16	57	Arginine	175.119	+	+	++	-
17	*57*	*Ergosterol*	*379.336*	++	++	-	++
18	*57*	*Aminonucleoside*	*186.089*	+	++	-	+

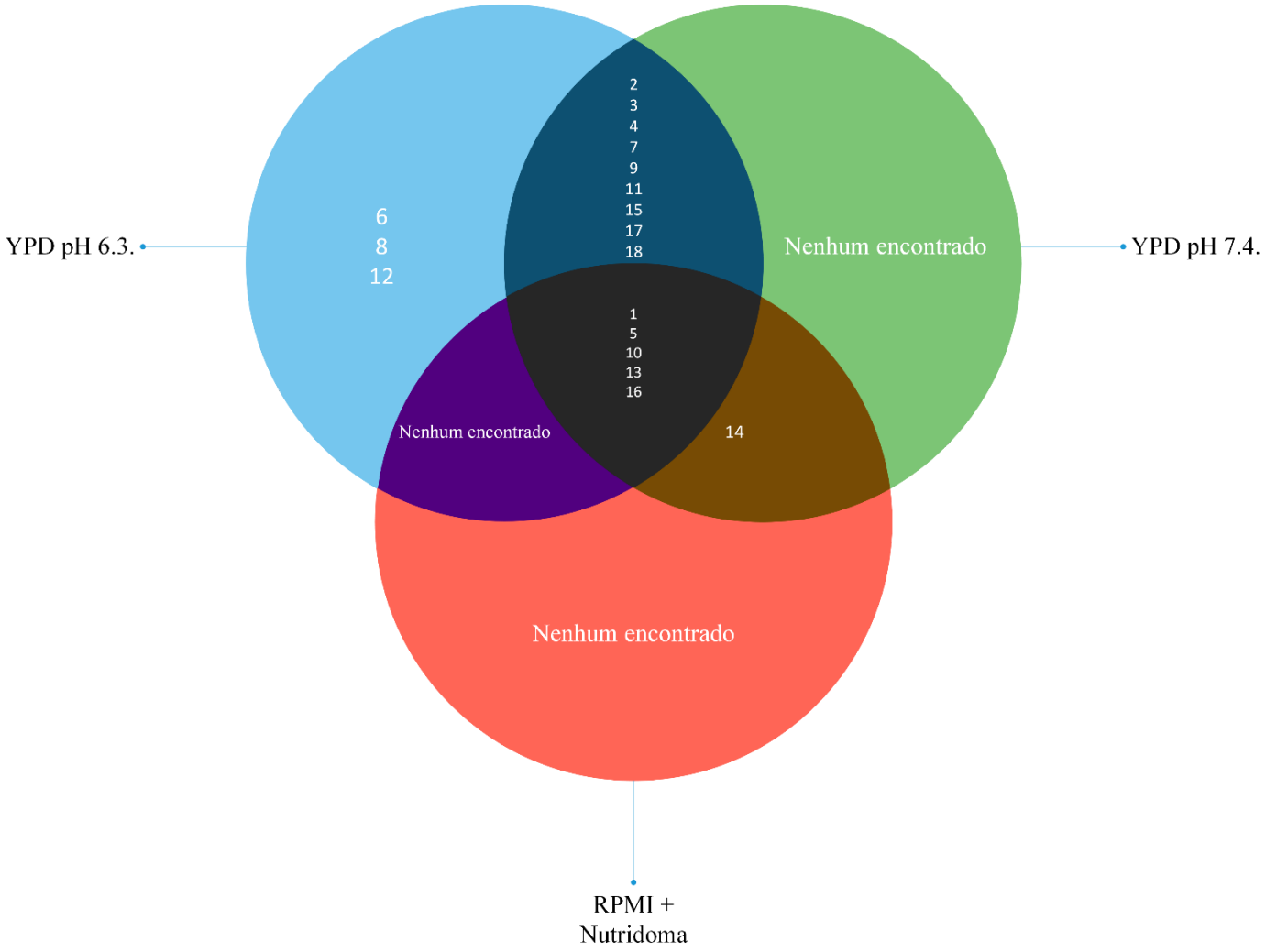


Figura 8 - Diagrama de Venn com os compostos encontrados em cada condição no sobrenadantes das vesículas extracelulares

de *C. albicans*. A condição YPD pH 6.3. se refere à condição de levedura; YPD pH 7.4 à condição filamentosa e RPMI + Nutridoma, à condição de pseudo-hifas.

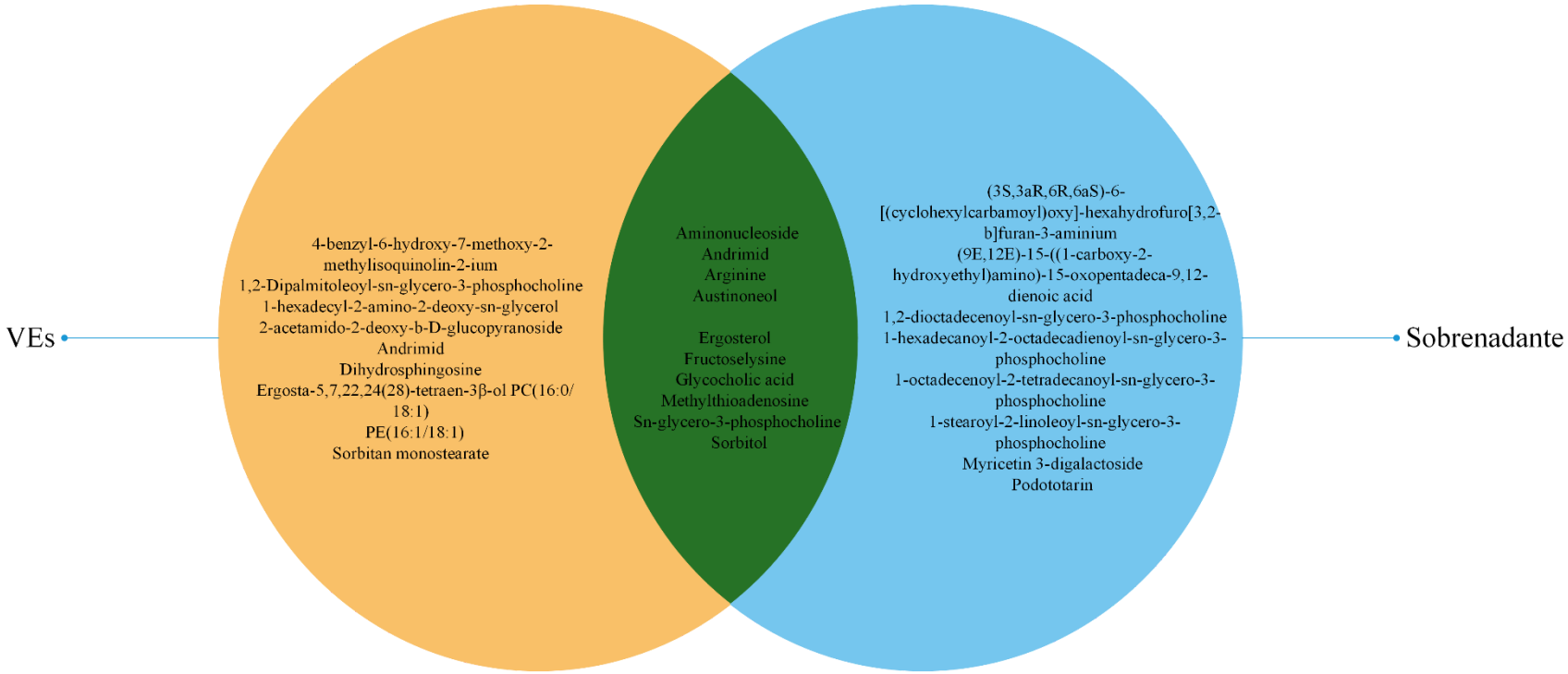


Figura 9 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante da condição YPD pH 6.3, condição de levedura.

Figura 10 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante da condição YPD pH 7.4., condição filamentosa.

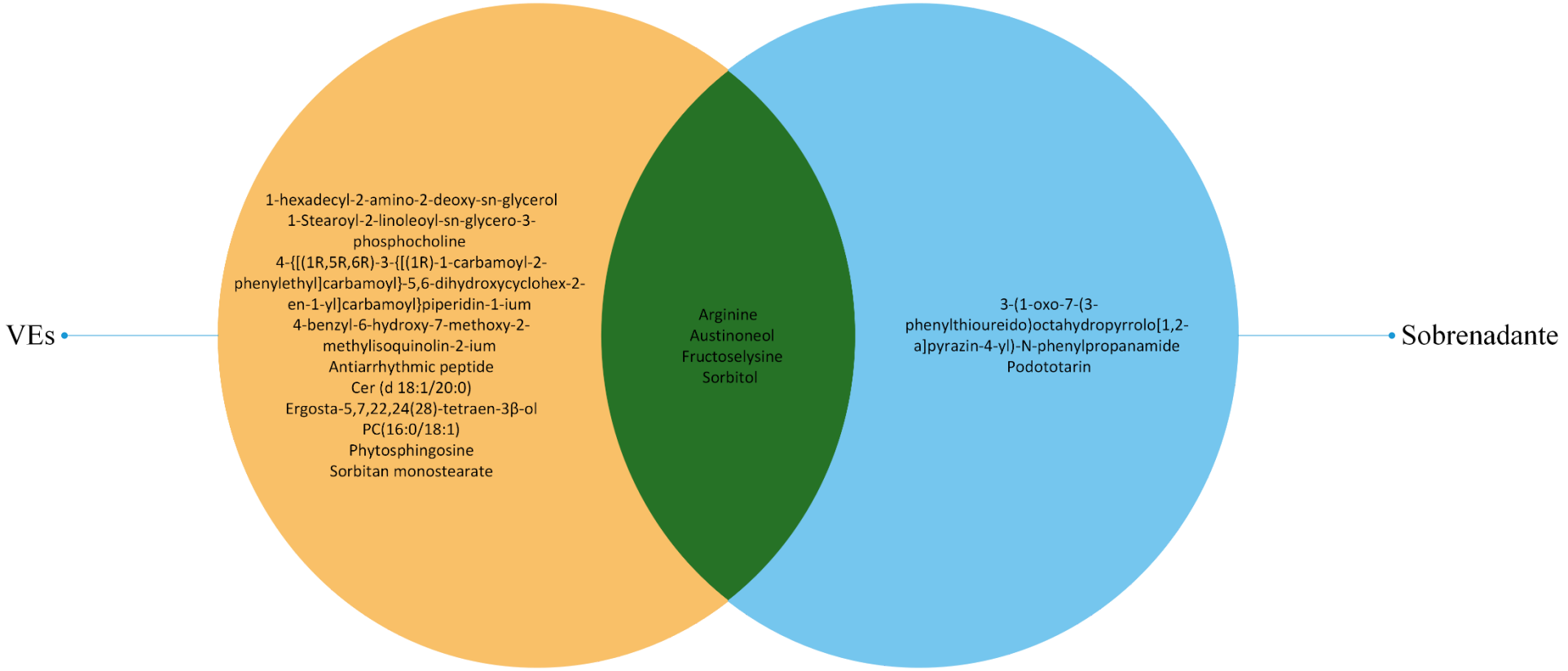


Figura 11 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante da condição RPMI + Nutridoma, condição de pseudo-hifas.

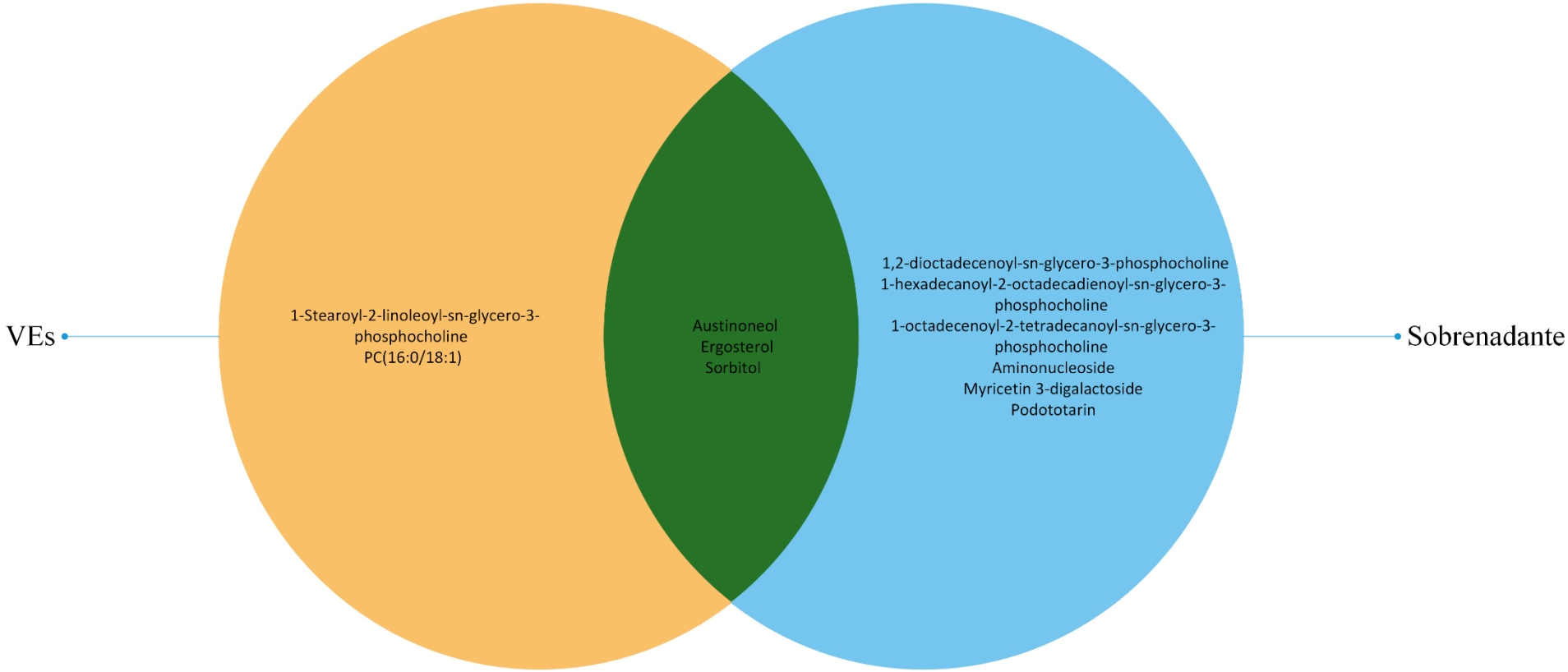


Figura 12 - Comparação entre os compostos das vesículas extracelulares e seu respectivo sobrenadante do meio limpo.

6.4. Enriquecimento de classes químicas

O *MolNetEhancer* foi usado para a classificação dos *clusters* como visto nas Figuras 5, 6 e 7. Entretanto, para uma melhor análise e sensibilidade, os dados deste estudo também foram submetidos ao pacote *pyClassRich* conforme descrito na seção 5.4.3.2.. A análise é feita de forma univariada, ou seja, um grupo com o outro conforme constar nos títulos das próximas figuras, os *impact plots*.

Os gráficos a seguir têm em seu eixo das abscissas a mediana de logP que fornece uma aproximação da lipofilicidade da classe de compostos. Quanto mais à direita, mais lipofílica a classe se apresenta. No eixo das coordenadas há o valor de -log(p value), referente à significância estatística: quanto mais alto o valor, maior a diferença estatisticamente significativa da determinada classe. Ao mesmo tempo, o *heatmap* à direita trata da quantidade de compostos de dada classe quando comparamos os grupos de interesse: a cor azul se diz respeito ao segundo grupo e a cor vermelha, ao primeiro seguindo o título de cada gráfico. Por fim, o diâmetro do nodo é diretamente proporcional à quantidade de compostos contidas na classe química apresentada por ele.

A análise entre o grupo de VEs na condição YPD pH 6.3 e pH 7.4 não foi possível ser realizada pois não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa para que o gráfico fosse gerado. Isso pode ser hipotetizado como uma homogeneidade entre os grupos visto que ambas as condições se dão no mesmo meio de cultivo. Pode-se observar também que a análise dos sobrenadantes do mesmo grupo se mostra muito rasa e com total predominância para a condição no pH 7.4.

Também pode ser verificada a existência de compostos da classe de ácidos carboxílicos, corroborando com Honorato e colaboradores (HONORATO; DEMETRIO; ELLIS; PIFFER *et al.*, 2021) e seus derivados (compostos orgânicos que apresentam o grupo funcional carboxila em

sua estrutura) em todas as condições, sendo a única classe com uma alta relevância estatística, sugerindo assim sua importância para que o microrganismo sobreviva e consiga realizar suas funções vitais.

Entretanto, podemos observar a heterogeneidade de classes em todas as condições, mas com a prevalência da classe de benzenos (hidrocarbonetos aromáticos), organo-oxigenados (compostos orgânicos contendo pelo menos uma ligação carbono-oxigênio) e glicolipídeos (compostos fundamentais para a formação de membrana, armazenamento de energia e sinalização intracelular). No caso da última classe, deve ser levada em consideração a estrutura das vesículas novamente, visto que alterações no meio de cultivo podem alterar a carga e estrutura das vesículas extracelulares e, com isso, influenciar na comunicação intra e interespecífica.

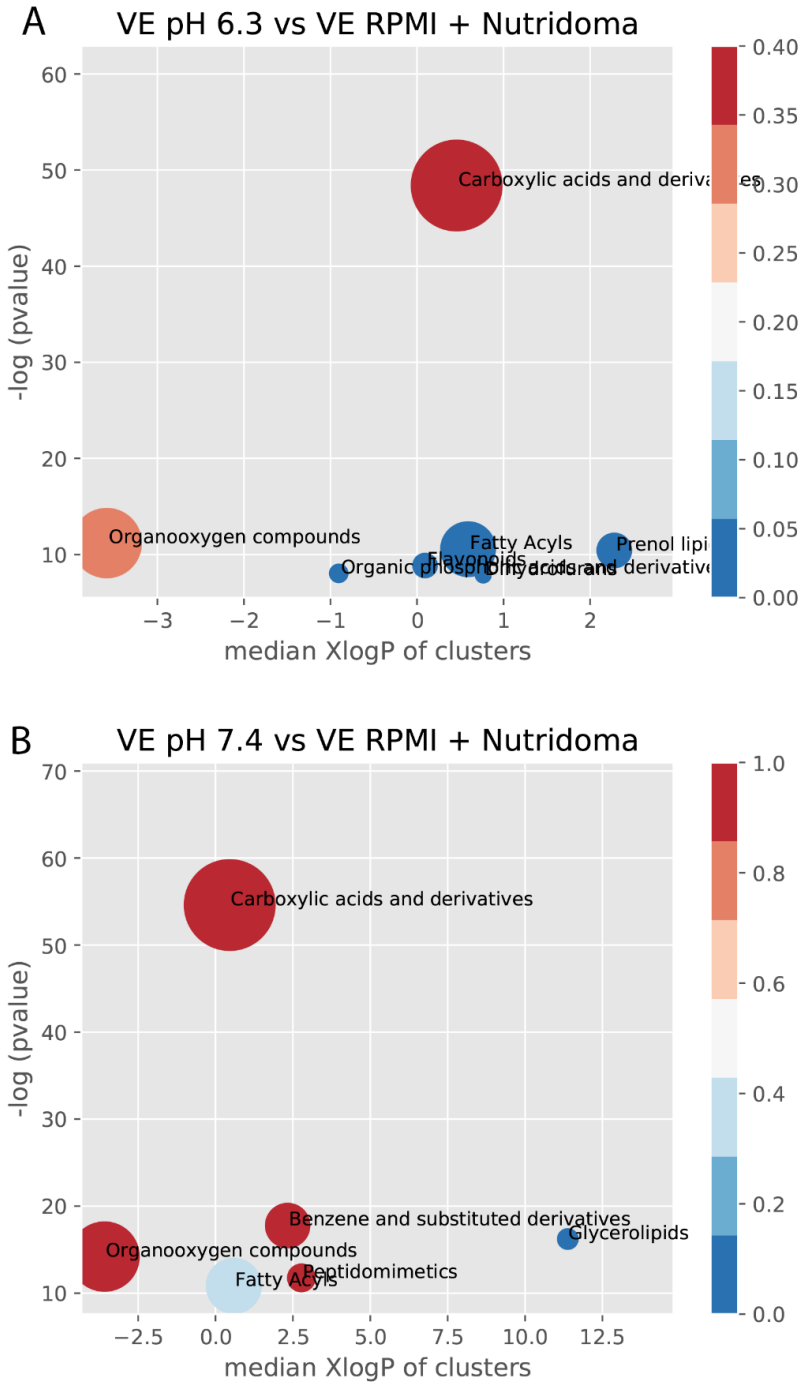


Figura 13 - Classes enriquecidas dos compostos encontrados nas amostras de vesículas extracelulares. (A) Classes enriquecidas das vesículas extracelulares na condição YPD pH 6.3. versus a condição RPMI + Nutridoma. (B) Classes enriquecidas das vesículas

extracelulares na condição YPD pH 7.4. versus a condição RPMI + Nutridoma.

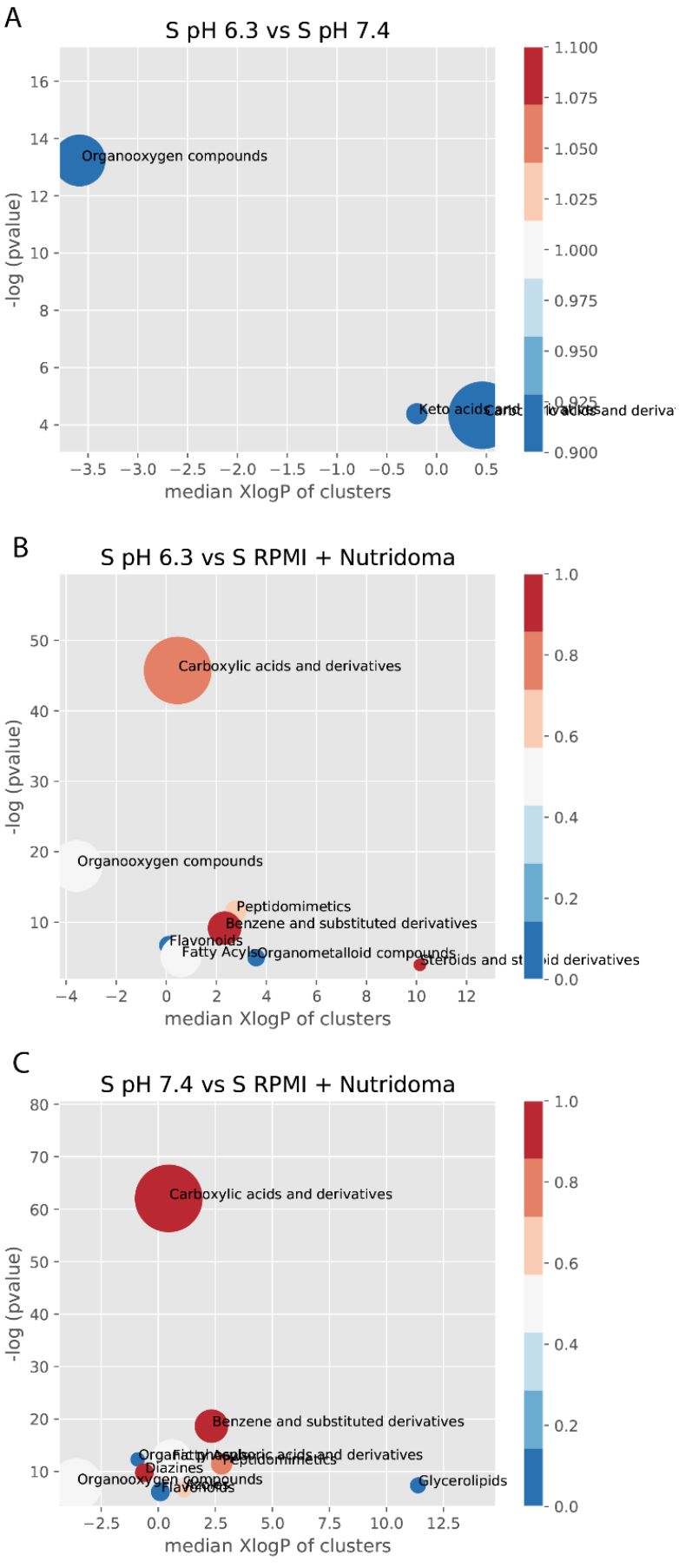

A
S pH 6.3 vs S pH 7.4
Organooxygen compounds
Keto acids and
and derivatives
-log (pvalue)
median XlogP of clusters
1.100
1.075
1.050
1.025
1.000
0.975
0.950
0.925
0.900
B
S pH 6.3 vs S RPMI + Nutridoma
Carboxylic acids and derivatives
Organooxygen compounds
Peptidomimetics
Benzene and substituted derivatives
Flavonoids
Fatty Acyls
Organometalloid compounds
Steroids and st
id derivatives
-log (pvalue)
median XlogP of clusters
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C
S pH 7.4 vs S RPMI + Nutridoma
Carboxylic acids and derivatives
Benzene and substituted derivatives
Diazines
Peptidomimetics
Organooxygen compounds
Glycerolipids
-log (pvalue)
median XlogP of clusters
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

Figura 14 - Classes enriquecidas dos compostos encontrados nas amostras do sobrenadante de vesículas extracelulares. (A) Classes enriquecidas dos sobrenadantes das vesículas extracelulares na condição YPD pH 6.3. versus a condição YPD pH 7.4.. (B) Classes enriquecidas dos sobrenadantes das vesículas extracelulares na condição YPD pH 6.3. versus a condição RPMI + Nutridoma. (C) Classes enriquecidas dos sobrenadantes das vesículas extracelulares na condição YPD pH 7.4. versus a condição RPMI + Nutridoma.

6.5. Análise Estatística

A Análise de Componentes Principais mostrou que as classes estudadas conseguiram ser separadas, entretanto todas as classes ficaram dentro do cluster do meio YPD pH 6.3, condição usada como controle. Isso mostra que todas as amostras apresentam compostos intrinsecamente associados à fisiologia de *C. albicans*, independentemente de regulação ou sinalização morfológica (Figuras 8 e 10).

A análise PLS-DA gerou melhores resultados, visto a diferença entre seu tipo de aprendizado, e foi possível constatar que há diferenças entre as amostras (Figura 9 e 11). É importante observar os valores de R2 e Q2 que explicam, respectivamente, a variância explicada como uma qualidade de ajuste e a qualidade da previsão como um indicador de variação de previsão. Nas análises feitas, tanto para VEs quanto para seus sobrenadantes, obteve-se um baixo valor de Q2 e para a acurácia, problema provavelmente causado por conta do número de réplicas utilizadas no estudo.

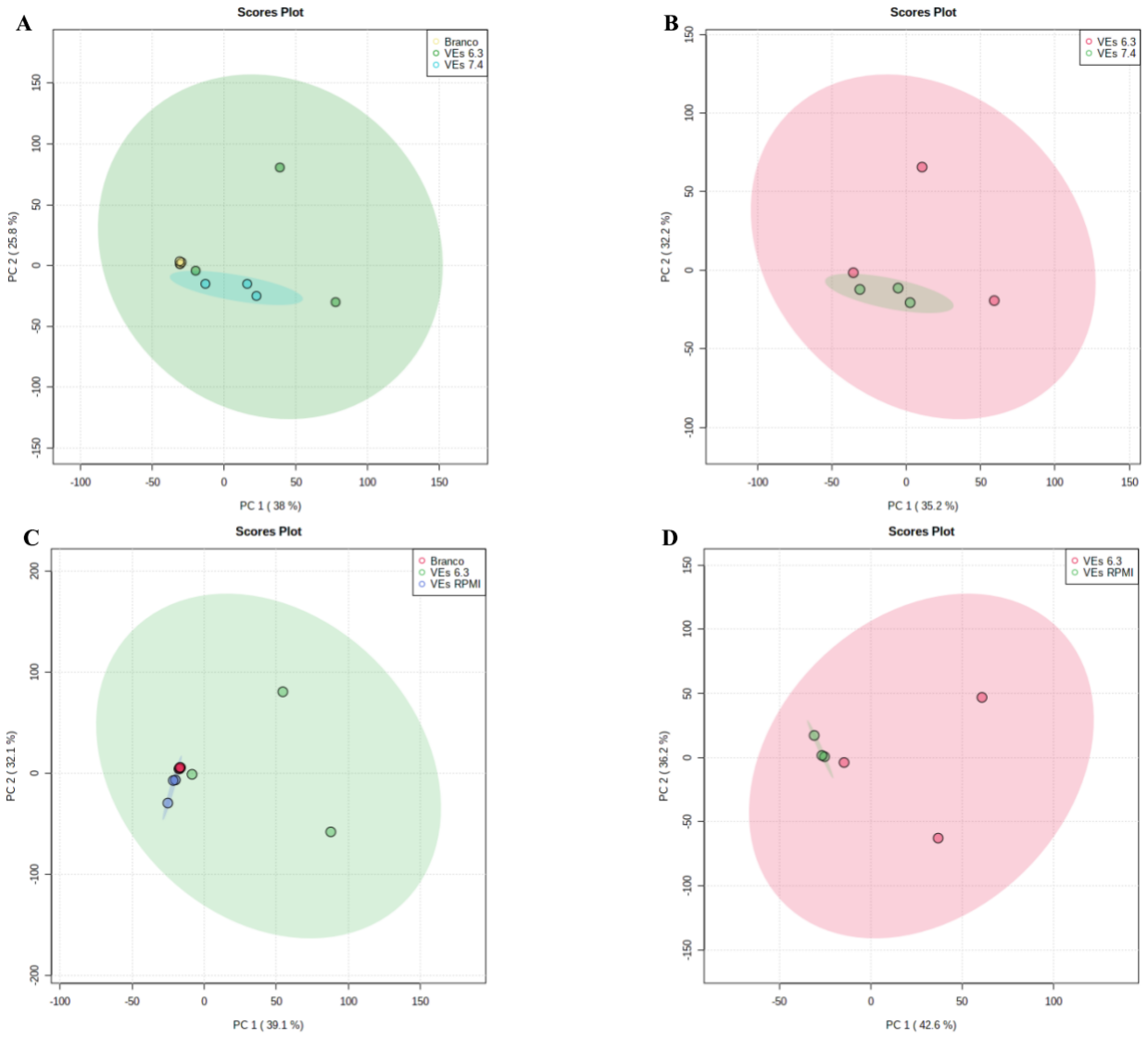


Figura 15 – Resultados do PCA das vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo sem versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma.

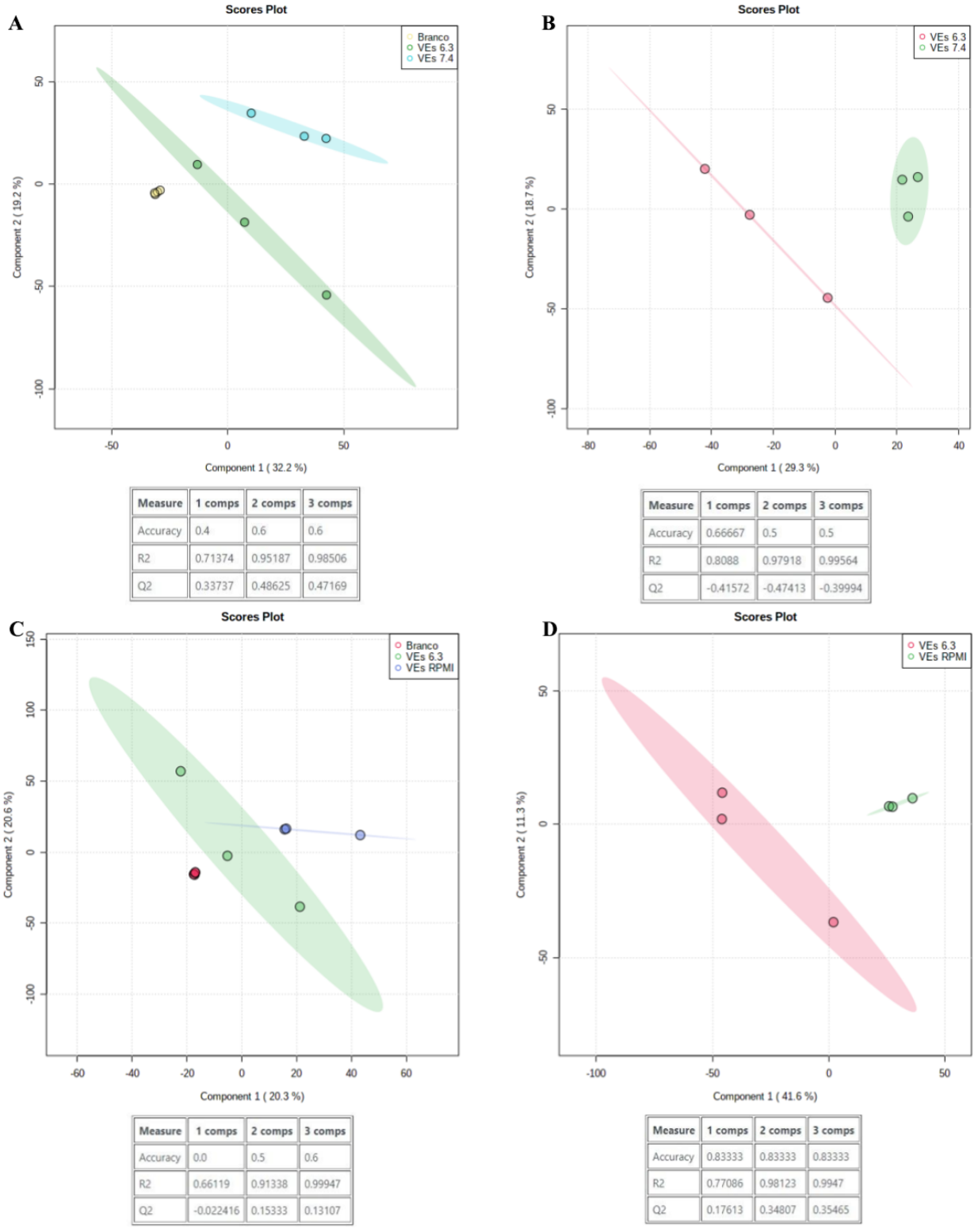


Figura 16– Resultados do PLS-DA das vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise

comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma.

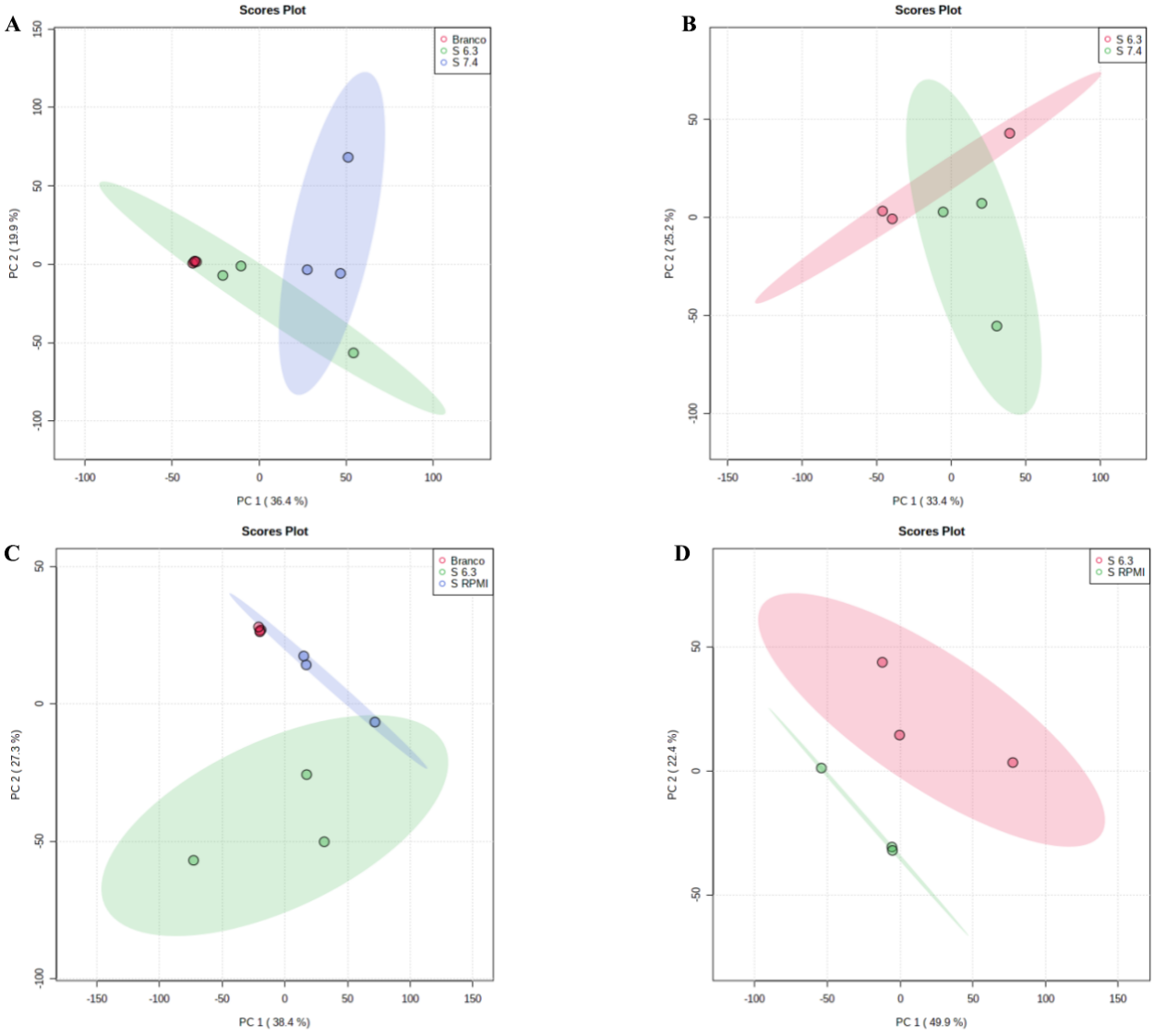
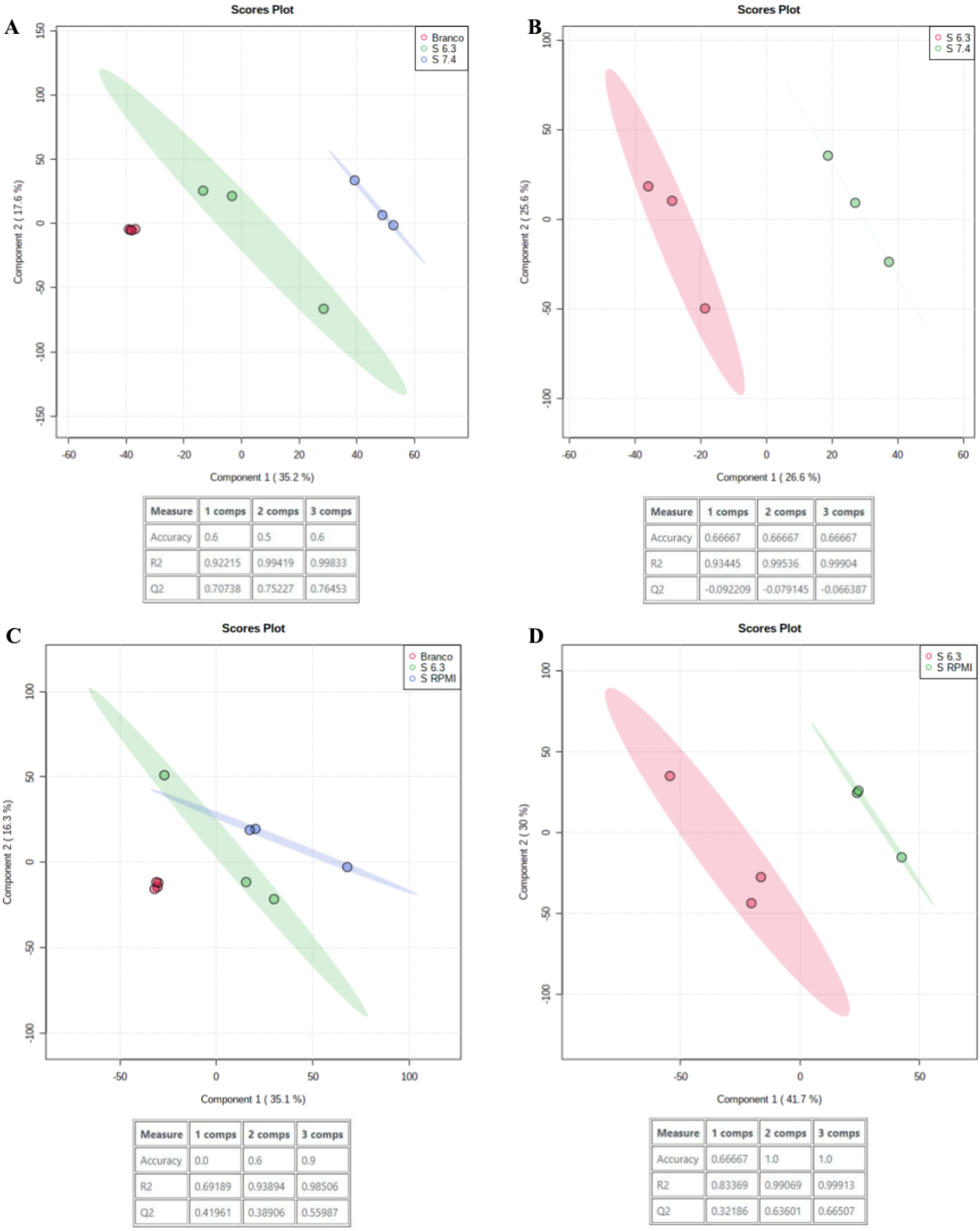


Figura 17– Resultados do PCA dos sobrenadantes de vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma.



Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.6	0.5	0.6
R2	0.92215	0.99419	0.99833
Q2	0.70738	0.75227	0.76453

Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.66667	0.66667	0.66667
R2	0.93445	0.99536	0.99904
Q2	-0.092209	-0.079145	-0.066387

Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.0	0.6	0.9
R2	0.69189	0.93894	0.98506
Q2	0.41961	0.38906	0.55987

Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.66667	1.0	1.0
R2	0.83369	0.99069	0.99913
Q2	0.32186	0.63601	0.66507

Figura 18– Resultados do PLS-DA dos sobrenadantes de vesículas extracelulares. (A) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4.

(B) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (C) Análise comparando meios de cultivo versus amostras de VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise comparando apenas VEs no meio YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma.

O *VIP Score* (Figura 12) é uma informação dada pelo PLS-DA e se caracteriza como uma classificação de metabólitos diferenciais onde podemos observar suas intensidades, sendo importante para identificar compostos significativos para responder a uma pergunta biológica. Os números de cada linha se referem às *features*, ou seja, números que servem como uma espécie de identificação no banco de dados que cada composto recebe.

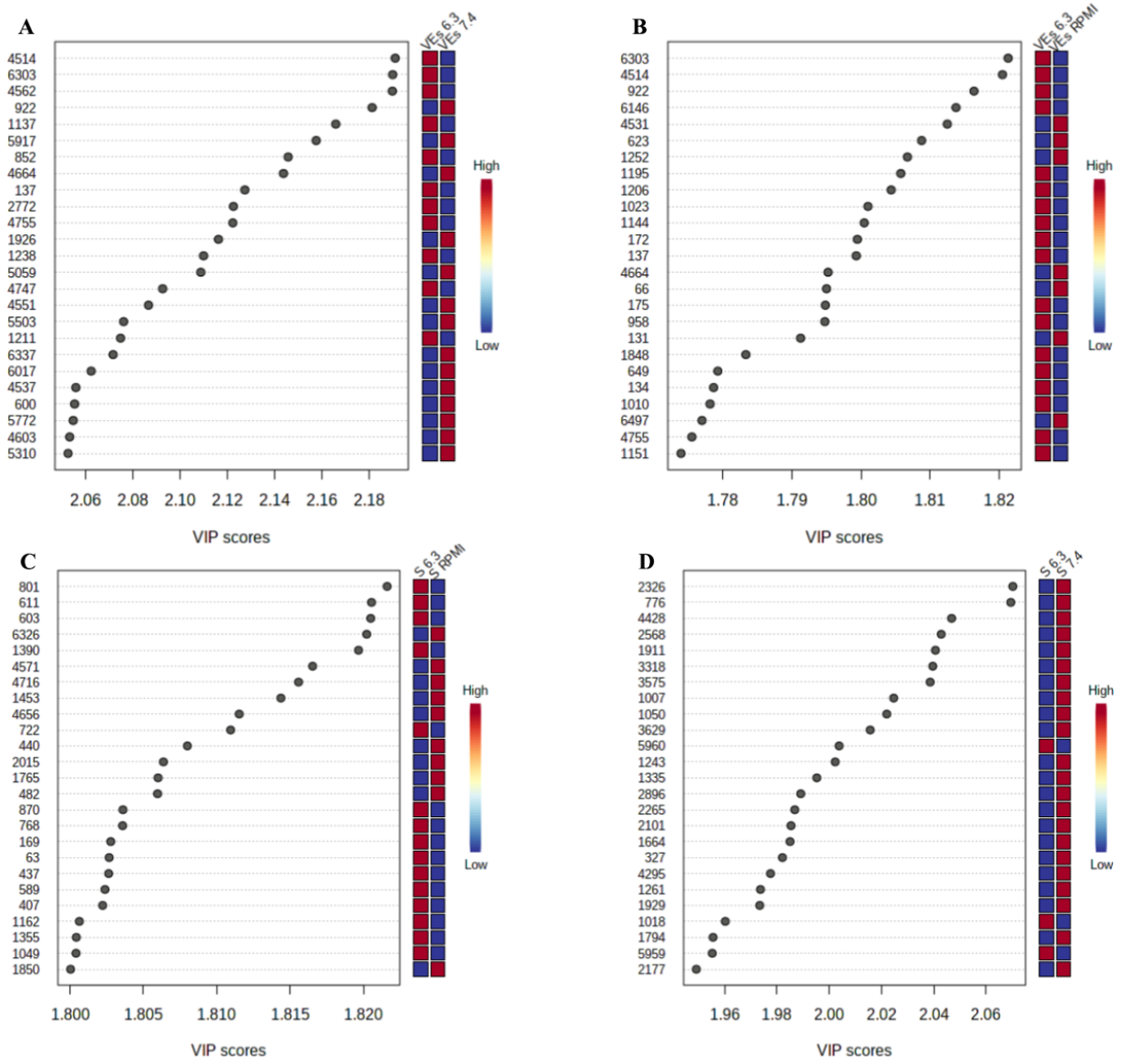


Figura 19 – Resultados do *VIP Score* das amostras. (A) Análise das VEs comparando os meios de cultivo YPD no pH 6.3 e pH 7.4. (B) Análise das VEs nos meios de cultivo YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (C) Análise do sobrenadante das VEs comparando os meios de cultivo YPD no pH 6.3 e RPMI + Nutridoma. (D) Análise do sobrenadante das VEs comparando comparando os meios de cultivo YPD no pH 6.3 e pH 7.4.

7. DISCUSSÃO

Conforme descrito previamente, o meio de cultivo pode influenciar no conteúdo das vesículas extracelulares (CLEARE; ZAMITH; HEYMAN; COUVILLION *et al.*, 2020) e, consequentemente os diferentes metabólitos presentes nas VEs podem influenciar na regulação da transição de levedura para a formação de hifas (HONORATO; DE ARAUJO; ELLIS; PIFFER *et al.*, 2022), o que pode resultar na maior resistência contra as defesas impostas pelo hospedeiro, favorecer a disseminação da infecção e ampliar a colonização em diferentes sítios. A presença de biofilme, por exemplo, é um fator que pode aumentar a mortalidade, além de dificultar o tratamento fúngico que hoje é considerado o terceiro patógeno comumente isolado de pacientes hospitalizados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos (PEREIRA; DOS SANTOS FONTENELLE; DE BRITO; DE MORAIS, 2021).

Neste trabalho, nosso intuito foi verificar a diferença na produção de metabólitos secundários nos diferentes meios de cultivo que propiciam a transição levedura-hifas, incluindo condições amplamente difundidas por atuarem neste circuito de sinalização celular (como o estímulo fornecido pelo pH 7,4 e pela temperatura de 37ºC) e um substituinte do Soro Bovino Fetal, o Nutridoma.

O Nutridoma-SP se caracteriza como um substituto bioquímico para o Soro Bovino Fetal (FBS) e já foi usado para cultivo de *Histoplasma capsulatum* em estudo sobre a importância do meio de cultivo sobre os nutrientes liberados em vesículas através de abordagens multi-ômicas, encontrando resultados como, por exemplo, a alta produção de lisofosfolipídeos, onde sugere-se que a lise dos fosfolipídeos ocorre em fase anterior à montagem das vesículas (CLEARE; ZAMITH; HEYMAN; COUVILLION *et al.*, 2020). Entretanto, podemos observar que o meio RPMI suplementado com Nutridoma teve uma maior concentração de vesículas produzidas em comparação com o meio controle (YPD pH 6.3.) e o meio que induz formação de levedura-hifa

(YPD pH 7.4.). No entanto, esta mesma condição apresentou predominantemente a formação de pseudo-hifas no tempo avaliado. Constituindo, portanto, uma condição interessante para avaliar a produção de metabólitos secundários para esse estágio de desenvolvimento.

A transição morfológica também pode ser mediada diante sinalizações celulares, como a presença de RNAs que podem estar contidos em vesículas e desempenham um papel importante na regulação gênica, visto que podem silenciar genes do hospedeiro a fim de favorecer o processo infeccioso como, por exemplo, RNAs longos não-codificadores que foram identificados em vesículas e estão envolvidos em vias de sinalização que regulam a morfologia celular. Com isso, pode-se afirmar que as vesículas são importantes ferramentas para a determinação da patofisiologia da infecção fúngica, entretanto este é um campo que requer maiores investigações sobre quais mecanismos são responsáveis por determinar seu conteúdo, principalmente sobre a presença de RNAs de diferentes classes (BITENCOURT; PESSONI; OLIVEIRA; ALVES *et al.*, 2022).

Como visto no Diagrama de Venn (Figura 7),os compostos 5, 7 e 11 se encontram na intersecção entre as condições YPD pH 7.4. e RPMI + Nutridoma, sugerindo a sua participação na formação da filamentação. Os compostos 3 e 12 se encontram exclusivamente na condição YPD pH 6.3., onde hipotetiza-se que são participantes da manutenção do estágio leveduriforme. E, por fim, os compostos 1, 4, 8, 10, 16, 17, 19, 21, 23 e 24 se encontram na interseção entre as condições YPD pH 6.3. e pH 7.4. sendo sugestivas as suas participações na manutenção da fisiologia de *C. albicans*.

Os compostos 1 (4-benzyl-6-hydroxy-7-methoxy-2-methylisoquinolin-2-ium) e 5 (4-{[(1R,5R,6R)-3-{[(1R)-1-carbamoyl-2-phenylethyl]carbamoyl}-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-yl]carbamoyl}piperidin-1-ium) não foram encontrados na literatura pois tais moléculas não estão anotadas, podendo ter um perfil espectral bem semelhante à outro já presente no banco de

dados, ou seja, os compostos supracitados podem não ter sido totalmente elucidados em sua estrutura e caracterização biológica, indicando uma possívle exploração em trabalhos futuros.

O composto 7 (Phytosphingosine), quando adicionado externamente, induz uma ação candidicida acreditando que sua ação se mediasse na indução de apoptose independente de caspase, porém um trabalho prévio verificou que a molécula pode atuar sobre a membrana plasmática, interferindo na permeabilização e causando um desequilíbrio osmótico, mas também pode ser capaz de reverter a insensibilidade induzida por azida à histatina 5, uma proteína antimicrobiana (VEERMAN; VALENTIJN-BENZ; VAN'T HOF; NAZMI *et al.*, 2010). Tal composto foi encontrado em maior abundância na condição YPD pH 7.4. e, conforme mostrado na microscopia óptica, se caracteriza como o cenário onde há uma maior filamentação. Analogamente, o composto 8 (Dihydrosphingosine) tem propriedades semelhantes ao anterior. Seus derivados são capazes de induzir estresse oxidativo em *C. albicans* (THEVISSEN; HILLAERT; MEERT; CHOW et al., 2008). Cepas mutantes de *C. albicans* mais susceptíveis ao fluconazol apresentam um acúmulo de Dihydrosphingosine e uma diminuição em sua liberação (ZHANG; MIAO; LI; ZHANG *et al.*, 2015). Portanto, pode ser sugerido que a presença de Phytosphingosine e Dihydrosphingosine nas vesículas extracelulares se apresenta como uma forma de defesa corroborando com a sua ausência dentre os compostos identificados nos sobrenadantes.

O composto 11 (1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) se caracteriza como uma fosfatidilcolina, ou seja, um glicerofosfolipídeo constituído por um grupo de ácido graxo, fosfato e colina. Segundo o PubChem (CID 6441487), o composto é um produto natural encontrado na bactéria *Streptomyces roseicolatus*, isolada pela primeira vez em solos de campos de algodão na China (ZHANG; LIU; WANG; XIA *et al.*, 2020) , na planta *Vitis vinifera*, conhecida como uva para vinho e no inseto *Drosophila melanogaster*, mais conhecida como

mosca-da-fruta ou mosca-do-vinagre, que é um organismo modelo para estudos genéticos. Vale destacar a importância de compostos lipídicos para a formação estrutural das VEs e, os dados aqui obtidos, sugerem que diferenças nos meios de cultivo podem influenciar a carga lipídica/estrutural das vesículas extracelulares.

A Andrimid (Composto 4) se caracteriza como um antibiótico, produzido pela bactéria marinha *Vibrio coralliilyticus*, atuando como um bloqueador de uma reação de transferência de carboxila em bactérias que acarreta na inibição da biossíntese de ácidos graxos (BUIJS; ISBRANDT; ZHANG; LARSEN *et al.*, 2020; LIU; FORTIN; WALSH, 2008). Tal composto já foi usado para elucidação de novos antibióticos e produtos naturais devido à sua propriedade de ativar vias biossintéticas que normalmente não são expressas (MATILLA; DADDAOUA; CHINI; MOREL *et al.*, 2018), entretanto organismos produtores de Andrimid podem codificar moléculas que resistam à ação do antibiótico, garantindo a sua biossíntese novamente(LIU; FORTIN; WALSH, 2008).

O composto 10 (4-Formylphenyl 2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranoside) é um composto orgânico heterocíclico, mas sem correspondências na literatura. Entretanto, a parte 2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranoside atua como uma saponina triterpenoide isolada de frutos de *Acacia auriculiformis* A.Cunn. ex Benth. (RANGRA; SAMANTA; PRADHAN, 2019). Saponinas se caracterizam como moléculas de elevada massa molecular com características emulsificantes e detergentes, além de diminuir a tensão superficial da água.

O composto 16 (Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3β-ol) é um precursor do Ergosterol. Em um estudo, identificou-se que a deleção do gene *ERG4* de leveduras acarreta na completa falta de Ergosterol visto que ele codifica uma redutase catalisadora da etapa final da síntese da biomolécula. Mutantes deste gene também são susceptíveis à Brefeldina A, molécula atuante sobre o Complexo de Golgi. Através de análises de microscopia de fluorescência, foi constatada

que esta redutase está presente no retículo endoplasmático, ou seja, comprovou-se que a biossíntese do Ergosterol é concluída nesta organela e liberada para o seu destino final (ZWEYTICK; HRASTNIK; KOHLWEIN; DAUM, 2000). Ao mesmo tempo, o Ergosterol (Composto 17), que também foi encontrado em VEs, tem um papel fundamental na patogenicidade do microrganismo, seja invasiva ou superficial, visto que os genes de sua biossíntese desempenham um importante papel no estresse celular (STANISZEWSKA, 2020), entretanto pode-se sugerir também que a presença do mesmo seja responsável por diferenciações na estrutura de bicamada lipoproteíca da vesícula extracelular em cada condição encontrada. Assim sendo, análises de dosagem de ergosterol e microscopia eletrônica seriam fundamentais para validar a hipótese.

Segundo o PubChem (CID 1599) , o Aminonucleoside (Composto 19), se caracteriza como um derivado da Puromicina, um antibiótico capaz de causar nefrose, uma disfunção renal. Entretanto, tal antibiótico também é relatado como substância produzida por *Streptomyces alboniger*, sendo indutor de apoptose ao interferir na síntese proteica e, ao mesmo tempo, um possível carcinógeno humano devido à sua ação de inibição (KORRAPATI, 2014). Estudos verificam a participação de inibidores da Puromicina na lesão de podócitos (JIANG; CUI; DING; YANG *et al.*, 2020) a fim de evitar consequências patológicas. Estudos posteriores podem verificar se *C. albicans* é capaz de transformar a molécula de Puromicina ou se é apenas um produtor de Aminonucleoside para a criação de Puromicina. O fato das vesículas carregarem compostos como esse pode conferir vantagens adaptativas na interação com outros microrganismos

Segundo o MedChemExpress (HY-17552), o composto 21 (Sn-glycero-3-phosphocholine) é um precursor na biossíntese de fosfolipídios cerebrais, aumentando a biodisponibilidade de colina no tecido nervoso. Ao mesmo tempo, a

Sn-glycero-3-phosphocholine também foi usada para estabilizar a Desidroepiandrosterona, um hormônio natural com propriedades anticancerígenas que é instável normalmente (KŁOBUCKI; GRUDNIEWSKA; SMUGA; SMUGA *et al.*, 2017).

O Methylthioadenosine (Composto 23) é um nucleosídeo presente em todos os tecidos de mamíferos onde desempenha papéis regulatórios em níveis farmacológicos, como regulação gênica até mesmo apoptose, desempenhando um papel de potencial alvo terapêutico (AVILA; GARCíA-TREVIJANO; LU; CORRALES *et al.*, 2004). Ele também é descrito como um supressor de *Salmonella enterica* , diminuindo seus fatores de virulência ao reduzir sua motilidade e capacidade de invasão celular (BOURGEOIS; ZHOU; THURSTON; GILCHRIST *et al.*, 2018).

Por fim, o composto 24 (Glycocholic acid) é um derivado do Cholic acid. Em estudos *in vitro*, o Glycocholic acid se mostrou um ótimo alvo terapêutico contra infecções fúngicas e fungos com resistência à medicamentos através de ensaios de microcalorimetria e quimiometria (KONG; WANG; XING; XIAO *et al.*, 2011).

Os compostos 2 (Cer (d 18:1/20:0)) e 6 (Antiarrhythmic peptide) foram encontrados exclusivamente nas vesículas extracelulares da condição RPMI + Nutridoma, tornando-se potenciais candidatos que influenciam na formação de pseudo-hifas. Segundo o Human Metabolome Database (HMDB), o composto 2 (HMDB ID: HMDB0004951) é uma ceramida de cadeia longa sendo um subproduto da hidrólise da esfingomielina que pode ser encontrada em muitos tecidos, mas principalmente na epiderme sendo sinais importantes para a indução da apoptose e na biossíntese de glicoesfingolipídeos e gangliosídeos. Por sua vez, o Antiarrhythmic peptide (Composto 6) não foi totalmente especificado pelas análises metabolômicas, mas é sugerida a sua presença onde verificou-se propriedades que atuam na prevenção na arritmia ventricular aguda (NI; RUAN; ZHANG, 2015; SUN; JIANG; ZHAO; HU, 2015).

Paradoxalmente, outros compostos não têm um papel muito claro de sua presença como, por exemplo, o Austinoneol (Composto 9) que foi encontrado tanto nas VEs quanto no sobrenadante de todas as condições e com uma alta relevância significativa segundo o GNPS. Entretanto, ele é citado em apenas um trabalho sobre *Aspergillus sp.*, sendo classificado como um meroterpenóide (WEN; YANG; LIU; LI *et al.*, 2020), um metabólito secundário a partir de um co-substrato terpenoide por mistas vias de biossíntese (NAZIR; SALEEM; TOUSIF; ANWAR *et al.*, 2021). Os meroterpenóides podem ter diversas funções, até propriedades antitumorais, sugerindo seu potencial uso farmacológico (WAN; LI; ZHANG; ZOU *et al.*, 2018).

No sobrenadante podemos observar que alguns compostos são comuns às VEs, provavelmente sendo moléculas produzidas pelo microrganismo e concomitantes carregadas por vesículas extracelulares e também secretadas, sendo importante citar duas delas: o composto 5 (Sorbitol) e 13 (Fructoselysine) onde ambas foram encontradas no sobrenadante de todas as condições. O composto 5 (Sorbitol) se identifica como um protetor osmótico que pode ter interações com a Myricetin alterando a integridade e permeabilidade da membrana plasmática (LEE; KIM, 2022). Ao mesmo tempo, o Sorbitol pode ser usado como um inibidor de biofilme para *C. albicans* e *Streptococcus mutans*, mas com eficácia reduzida na presença de sacarose (CHAN; ELLEPOLA; TRUONG; BALAN *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo o composto 13 (Fructoselysine) já foi encontrado nas plantas *Vitis vinifera* e *Brassica napus*, além do protozoário *Trypanosoma brucei* e da bactéria *Escherichia coli*, sendo um de seus metabólitos produzidos, segundo o PubChem (ID 9839580). É formado pelo aquecimento de produtos alimentícios durante o seu processamento, sendo um composto fundamental para a formação de produtos prejudiciais à saúde humana, visto que pode desencadear diferenças em sua degradação microbiana intestinal aumentando significativamente a produção de butirato (VAN DONGEN; VAN DER ZANDE; BRUYNEEL; VERVOORT *et al.*, 2021). Por fim, o composto 1

(Podototarin) foi encontrado apenas nas amostras de sobrenadantes e é descrito em poucos trabalhos. Em um deles, a Podototarin foi isolada de bagaço de cana-de-açúcar e sua atividade microbiana foi testada contra diversos microrganismos e o uso do extrato foi benéfico na inibição do crescimento de *Streptococcus aureus* (VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ; VALLES-ROSALES; RODRÍGUEZ-URIBE; LAGUNA-CAMACHO *et al.*, 2022)

Pelo enriquecimento de classes, é nítida a presença de muitos compostos da classe de ácidos carboxílicos nas amostras, tanto de VEs quanto de seus sobrenadantes. Com isso, é inegável o fato de que eles podem ter participação na transição morfológica visto que *C. albicans* usa esses compostos para sobreviver em diferentes condições de cultivo (ALVES; SOUSA-SILVA; VIEIRA; SOARES *et al.*, 2020). Podemos observar a presença de glicolipídios em comparações usadas com a condição RPMI + Nutridoma: tais compostos são usados principalmente para a construção de membranas e sinalização celular, sugerindo que, em dado cenário, o microrganismo utiliza das VEs para transportar moléculas a fim de ajudar na sua proliferação.

Como comparação, pode-se observar que o *MolNetEhancer*, um classificador de classes, também obteve resultados semelhantes ao pacote *pyClassRich* como, por exemplo, a presença de benzenóides e alcalóides, atestando a veracidade das informações e ilustrando como cada *cluster* fornecido pelo GNPS se comportou.

Contudo, também é de grande relevância a observação das limitações deste estudo. Como visto pelos parâmetros do PLS-DA, o baixo número de réplicas biológicas pode ter influenciado para que alguns compostos possivelmente relevantes não tenham sido encontrados além da escolha do tipo de cromatografia acoplada à espectrometria de massas. Além disso, compostos identificados pelo espectrômetro podem não estar anotados ou fornecer estruturas sugeridas pelo banco de dados utilizado (como é o caso dos compostos 11 e 14 encontrados no sobrenadante).

8. CONCLUSÃO

Neste estudo, verificou-se que a mudança de meios de cultivo modificam o crescimento e conteúdo produzido pelas VEs de *C.* albicans, corroborando com estudos anteriores. Através de análises de bioinformática na área de metabolômica, também foi possível identificar compostos de interesse acadêmico como, por exemplo, o Austineol e a Podototarin. Ao mesmo tempo, pode ser observada a presença de compostos que podem estar fortemente associados à filamentação, tais como: 4-benzyl-6-hydroxy-7-methoxy-2-methylisoquinolin-2-ium; Andrimid; 4-{[(1R,5R,6R)-3-{[(1R)-1-carbamoyl-2-phenylethyl]carbamoyl}-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-yl]carbamoyl}piperidin-1-ium; Phytosphingosine; Dihydrosphingosine; 4-Formylphenyl 2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranoside; 1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3β-ol; Ergosterol; Aminonucleoside; Sn-glycero-3-phosphocholine; Methylthioadenosine e Glycocholic acid. Os compostos Cer (d 18:1/20:0) e Antiarrhythmic peptide podem estar associados à formação de pseudo-hifas visto que foram encontrados exclusivamente nas vesículas extracelulares da condição RPMI + Nutridoma. Com isso, a co-ocorrencia de alguns compostos entre espécies diferentes sugere a conservação de alguns processos metabólicos e na produção de metabólitos carregados pelas VEs, possivelmente pela importância que apresentam dentro do contexto metabólico. Portanto, novos estudos com a adição de tais moléculas isoladamente com a espécie de *C. albicans* podem confirmar especificamente quais ações biológicas elas desempenham.

Por fim, pelo enriquecimento de classes, é observável a presença de ácidos carboxílicos em todas as condições estudadas e sua abundância nas amostras, sugerindo a sua íntima participação na transição morfológica e sobrevivência da espécie.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. **Med Mycol**, 50, n. 4, p. 337-345, May 2012.

ALBUQUERQUE, P. C.; NAKAYASU, E. S.; RODRIGUES, M. L.; FRASES, S. *et al.* Vesicular transport in Histoplasma capsulatum: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**, 10, n. 8, p. 1695-1710, Aug 2008.

ALVES, R.; SOUSA-SILVA, M.; VIEIRA, D.; SOARES, P. *et al.* Carboxylic Acid Transporters in Candida Pathogenesis. **mBio**, 11, n. 3, May 12 2020.

AVILA, M. a. A.; GARCíA-TREVIJANO, E. R.; LU, S. C.; CORRALES, F. J. *et al.* Methylthioadenosine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36, n. 11, p. 2125-2130, 2004/11/01/ 2004.

BELINATO, J.; BAZIOLI, J.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F. *et al.* MetabolÔmica Microbiana: InovaÇÕes E AplicaÇÕes. **Química Nova**, 2019.

BIELSKA, E.; SISQUELLA, M. A.; ALDEIEG, M.; BIRCH, C. *et al.* Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen Cryptococcus gattii. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 1556, Apr 19 2018.

BITENCOURT, T. A.; PESSONI, A. M.; OLIVEIRA, B. T. M.; ALVES, L. R. *et al.* The RNA Content of Fungal Extracellular Vesicles: At the "Cutting-Edge" of Pathophysiology Regulation. **Cells**, 11, n. 14, p. 2184, 2022.

BITENCOURT, T. A.; REZENDE, C. P.; QUARESEMIN, N. R.; MORENO, P. *et al.* Extracellular Vesicles From the Dermatophyte Trichophyton interdigitale Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. **Front Immunol**, 9, p. 2343, 2018.

BLEACKLEY, M. R.; SAMUEL, M.; GARCIA-CERON, D.; MCKENNA, J. A. *et al.* Extracellular Vesicles From the Cotton Pathogen Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum Induce a Phytotoxic Response in Plants. **Front Plant Sci**, 10, p. 1610, 2019.

BOURGEOIS, J. S.; ZHOU, D.; THURSTON, T. L. M.; GILCHRIST, J. J. *et al.* Methylthioadenosine Suppresses Salmonella Virulence. **Infect Immun**, 86, n. 9, Sep 2018.

BRAUER, V. S.; PESSONI, A. M.; BITENCOURT, T. A.; DE PAULA, R. G. *et al.* Extracellular Vesicles from Aspergillus flavus Induce M1 Polarization In Vitro. **mSphere**, 5, n. 3, May 6 2020.

BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, 13, n. 10, p. 620-630, 2015/10/01 2015.

BUIJS, Y.; ISBRANDT, T.; ZHANG, S. D.; LARSEN, T. O. *et al.* The Antibiotic Andrimid Produced by Vibrio coralliilyticus Increases Expression of Biosynthetic Gene Clusters and Antibiotic Production in Photobacterium galatheae. **Front Microbiol**, 11, p. 622055, 2020.

CHAMBERS, M. C.; MACLEAN, B.; BURKE, R.; AMODEI, D. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, 30, n. 10, p. 918-920, 2012.

CHAN, A.; ELLEPOLA, K.; TRUONG, T.; BALAN, P. *et al.* Inhibitory effects of xylitol and sorbitol on Streptococcus mutans and Candida albicans biofilms are repressed by the presence of sucrose. **Arch Oral Biol**, 119, p. 104886, Nov 2020.

CLEARE, L. G.; ZAMITH, D.; HEYMAN, H. M.; COUVILLION, S. P. *et al.* Media matters! Alterations in the loading and release of *Histoplasma capsulatum* extracellular vesicles in response to different nutritional milieus. **Cellular Microbiology**, 22, n. 9, 2020.

DA SILVA, R. R.; WANG, M.; NOTHIAS, L.-F.; VAN DER HOOFT, J. J. J. *et al.* Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. **PLOS Computational Biology**, 14, n. 4, p. e1006089, 2018.

DE PAULA, R. G.; ANTONIÊTO, A. C. C.; NOGUEIRA, K. M. V.; RIBEIRO, L. F. C. *et al.* Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus Trichoderma reesei. **Biotechnol Biofuels**, 12, p. 146, 2019.

DINIZ, W. J.; CANDURI, F. REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: an overview and its applications. **Genet Mol Res**, 16, n. 1, Mar 15 2017.

DJOUMBOU FEUNANG, Y.; EISNER, R.; KNOX, C.; CHEPELEV, L. *et al.* ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. **Journal of Cheminformatics**, 8, n. 1, p. 61, 2016/11/04 2016.

ERNST, M.; KANG, K. B.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; NOTHIAS, L.-F. *et al.* MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. **Metabolites**, 9, n. 7, p. 144, 2019.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. d. F. P. S.; VIDOTI, G. J. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALDIERO, E.; SALVATORE, M. M.; MAIONE, A.; DE ALTERIIS, E. *et al.* GC-MS-Based Metabolomics Study of Single- and Dual-Species Biofilms of Candida albicans and Klebsiella pneumoniae. **Int J Mol Sci**, 22, n. 7, Mar 28 2021.

GEHRMANN, U.; QAZI, K. R.; JOHANSSON, C.; HULTENBY, K. *et al.* Nanovesicles from Malassezia sympodialis and Host Exosomes Induce Cytokine Responses – Novel Mechanisms for Host-Microbe Interactions in Atopic Eczema. **PLoS ONE**, 6, n. 7, p. e21480, 2011.

GRANDIZOLI, C. W. P. d. S.; UBER, C. P.; CARRENHO, L. Z. B.; KREUGER, M. R. O. *et al.* Análises quimiométricas pelos métodos de PCA e PLS-DA para diagnóstico de tumores *In*: 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

HONORATO, L.; DEMETRIO, J. F.; ELLIS, C. C.; PIFFER, A. *et al.* Extracellular vesicles regulate yeast growth, biofilm formation, and yeast-to-hypha differentiation in Candida albicans. **bioRxiv**, p. 2021.2001.2021.427696, 2021.

HONORATO, L.; DE ARAUJO, J. F. D.; ELLIS, C. C.; PIFFER, A. C. *et al.* Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in Candida albicans. **mBio**, 13, n. 3, p. e0030122, Jun 28 2022.

IKEDA, M. A. K.; DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; CRONEMBERGER-ANDRADE, A. *et al.* Extracellular Vesicles From Sporothrix brasiliensis Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.

JACOBSEN, I. D.; WILSON, D.; WÄCHTLER, B.; BRUNKE, S. *et al.* Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 10, n. 1, p. 85-93, Jan 2012.

JIANG, L.; CUI, H.; DING, J.; YANG, A. *et al.* Puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury is ameliorated by the Smad3 inhibitor SIS3. **FEBS Open Bio**, 10, n. 8, p. 1601-1611, Aug 2020.

KADOSH, D. Control of Candida albicans morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. **Cell Mol Life Sci**, 73, n. 22, p. 4265-4278, Nov 2016.

KEOUGH, K. M.; PARSONS, C. S. Differential scanning calorimetry of dispersions of products of oxidation of 1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. **Biochem Cell Biol**, 68, n. 1, p. 300-307, Jan 1990.

KŁOBUCKI, M.; GRUDNIEWSKA, A.; SMUGA, D. A.; SMUGA, M. *et al.* Syntheses and antiproliferative activities of novel phosphatidylcholines containing dehydroepiandrosterone moieties. **Steroids**, 118, p. 109-118, Feb 2017.

KONG, W.; WANG, J.; XING, X.; XIAO, X. *et al.* Antifungal evaluation of cholic acid and its derivatives on Candida albicans by microcalorimetry and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, 689, n. 2, p. 250-256, 2011/03/18/ 2011.

KORRAPATI, M. C. Puromycin. *In*: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 1141-1142.

KOSSEL, A. Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. **Du Bois-Reymond's Archiv/Arch Anat Physiol Physiol Abt**, 278, p. 181-186, 1891.

LAVRIN, T.; KONTE, T.; KOSTANJŠEK, R.; SITAR, S. *et al.* The Neurotropic Black Yeast Exophiala dermatitidis Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. **Cells**, 9, n. 4, Apr 14 2020.

LEE, H. S.; KIM, Y. Myricetin Disturbs the Cell Wall Integrity and Increases the Membrane Permeability of Candida albicans. **J Microbiol Biotechnol**, 32, n. 1, p. 37-45, Jan 28 2022.

LEONE, F.; BELLANI, L.; MUCCIFORA, S.; GIORGETTI, L. *et al.* Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast Pichia fermentans. **J Cell Physiol**, 233, n. 4, p. 2759-2767, Apr 2018.

LIU, M.; BRUNI, G. O.; TAYLOR, C. M.; ZHANG, Z. *et al.* Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen Rhizopus delemar. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 5243, Mar 27 2018.

LIU, X.; FORTIN, P. D.; WALSH, C. T. Andrimid producers encode an acetyl-CoA carboxyltransferase subunit resistant to the action of the antibiotic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 36, p. 13321-13326, Sep 9 2008.

MARDON, D.; BALISH, E.; PHILLIPS, A. W. Control of dimorphism in a biochemical variant of Candida albicans. **J Bacteriol**, 100, n. 2, p. 701-707, Nov 1969.

MATILLA, M. A.; DADDAOUA, A.; CHINI, A.; MOREL, B. *et al.* An auxin controls bacterial antibiotics production. **Nucleic Acids Res**, 46, n. 21, p. 11229-11238, Nov 30 2018.

NAZIR, M.; SALEEM, M.; TOUSIF, M. I.; ANWAR, M. A. *et al.* Meroterpenoids: A Comprehensive Update Insight on Structural Diversity and Biology. **Biomolecules**, 11, n. 7, Jun 29 2021.

NI, M.; RUAN, L.; ZHANG, C. Antiarrhythmic peptide AAP10 prevents arrhythmias induced by protein kinase C activation in rabbit left ventricular wedges. **Int Heart J**, 56, n. 2, p. 234-238, 2015.

NOTHIAS, L.-F.; PETRAS, D.; SCHMID, R.; DÜHRKOP, K. *et al.* Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, 17, n. 9, p. 905-908, 2020.

OLIVEIRA, D. L.; NAKAYASU, E. S.; JOFFE, L. S.; GUIMARÃES, A. J. *et al.* Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. **PLoS One**, 5, n. 6, p. e11113, Jun 14 2010.

PANG, Z.; CHONG, J.; ZHOU, G.; DE LIMA MORAIS, D. A. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, 4, n. 1, p. 1-20, 2018-05-11 2018. ReviewPaper.

PEREIRA, R.; DOS SANTOS FONTENELLE, R. O.; DE BRITO, E. H. S.; DE MORAIS, S. M. Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance. **J Appl Microbiol**, 131, n. 1, p. 11-22, Jul 2021.

PERES DA SILVA, R.; LONGO, L. G. V.; CUNHA, J.; SOBREIRA, T. J. P. *et al.* Comparison of the RNA Content of Extracellular Vesicles Derived from Paracoccidioidesbrasiliensis and Paracoccidioides lutzii. **Cells**, 8, n. 7, Jul 23 2019.

PILON, A.; VIEIRA, N.; AMARAL, J.; MONTEIRO, A. *et al.* Redes Moleculares: Uma AnÁlise Sobre AnotaÇÕes E Descoberta De Novos Ativos. **Química Nova**, 2021.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; ORESIC, M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, 11, p. 395, Jul 23 2010.

RANGRA, N.; SAMANTA, S.; PRADHAN, K. A comprehensive review on phytopharmacological investigations of Acacia auriculiformis A.Cunn. ex Benth. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 9, n. 1, p. 1-11, January 1, 2019 2019. Review.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; OLIVEIRA, D. L.; FRASES, S. *et al.* Vesicular polysaccharide export in Cryptococcus neoformans is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryot Cell**, 6, n. 1, p. 48-59, Jan 2007.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, 13, n. 11, p. 2498-2504, Nov 2003.

SILVA, B. M.; PRADOS-ROSALES, R.; ESPADAS-MORENO, J.; WOLF, J. M. *et al.* Characterization of Alternaria infectoria extracellular vesicles. **Med Mycol**, 52, n. 2, p. 202-210, Feb 2014.

SOUZA, J. A. M.; BALTAZAR, L. M.; CARREGAL, V. M.; GOUVEIA-EUFRASIO, L. *et al.* Characterization of Aspergillus fumigatus Extracellular Vesicles and Their Effects on Macrophages and Neutrophils Functions. **Front Microbiol**, 10, p. 2008, 2019.

STANISZEWSKA, M. Virulence Factors in Candida species. **Curr Protein Pept Sci**, 21, n. 3, p. 313-323, 2020.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN. The distinct morphogenic states of Candida albicans. **Trends in microbiology**, 12, n. 7, 2004 Jul 2004.

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

SUN, B.; JIANG, J. F.; ZHAO, C. M.; HU, C. H. Effects of antiarrhythmic peptide 10 on acute ventricular arrhythmia. **Asian Pac J Trop Med**, 8, n. 3, p. 229-233, Mar 2015.

THEVISSEN, K.; HILLAERT, U.; MEERT, E. M.; CHOW, K. K. *et al.* Fungicidal activity of truncated analogues of dihydrosphingosine. **Bioorg Med Chem Lett**, 18, n. 13, p. 3728-3730, Jul 1 2008.

VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GANIKO, L.; MEDEIROS, L. C. *et al.* The pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α-Galactosyl epitopes. **Eukaryot Cell**, 10, n. 3, p. 343-351, Mar 2011.

VAN DONGEN, K. C. W.; VAN DER ZANDE, M.; BRUYNEEL, B.; VERVOORT, J. J. M. *et al.* An in vitro model for microbial fructoselysine degradation shows substantial interindividual differences in metabolic capacities of human fecal slurries. **Toxicol In Vitro**, 72, p. 105078, Apr 2021.

VARGAS, G.; ROCHA, J. D.; OLIVEIRA, D. L.; ALBUQUERQUE, P. C. *et al.* Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by Candida albicans. **Cell Microbiol**, 17, n. 3, p. 389-407, Mar 2015.

VEERMAN, E. C.; VALENTIJN-BENZ, M.; VAN'T HOF, W.; NAZMI, K. *et al.* Phytosphingosine kills Candida albicans by disrupting its cell membrane. **Biol Chem**, 391, n. 1, p. 65-71, Jan 2010.

VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, V.; VALLES-ROSALES, D.; RODRÍGUEZ-URIBE, L.; LAGUNA-CAMACHO, J. R. *et al.* Effect of Different Extraction Methods and Geographical Origins on the Total Phenolic Yield, Composition, and Antimicrobial Activity of Sugarcane Bagasse Extracts. **Front Nutr**, 9, p. 834557, 2022.

WAN, H.; LI, J.; ZHANG, K.; ZOU, X. *et al.* A new meroterpenoid functions as an anti-tumor agent in hepatoma cells by downregulating mTOR activation and inhibiting EMT. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 13152, Sep 3 2018.

WANDY, J.; ZHU, Y.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; DALY, R. *et al.* Ms2lda.org: web-based topic modelling for substructure discovery in mass spectrometry. **Bioinformatics**, 34, n. 2, p. 317-318, 2017.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat Biotechnol**, 34,

n. 8, p. 828-837, Aug 9 2016.

WEN, H.; YANG, X.; LIU, Q.; LI, S. *et al.* Structurally Diverse Meroterpenoids from a Marine-Derived Aspergillus sp. Fungus. **J Nat Prod**, 83, n. 1, p. 99-104, Jan 24 2020.

ZHANG, Q. Y.; LIU, C. F.; WANG, Y.; XIA, Z. F. *et al.* Streptomyces roseicoloratus sp. nov., isolated from cotton soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, 70, n. 2, p. 738-743, Feb 2020.

ZHANG, S. Q.; MIAO, Q.; LI, L. P.; ZHANG, L. L. *et al.* Mutation of G234 amino acid residue in candida albicans drug-resistance-related protein Rta2p is associated with fluconazole resistance and dihydrosphingosine transport. **Virulence**, 6, n. 6, p. 599-607, 2015.

ZHAO, K.; BLEACKLEY, M.; CHISANGA, D.; GANGODA, L. *et al.* Extracellular vesicles secreted by Saccharomyces cerevisiae are involved in cell wall remodelling. **Commun Biol**, 2, p. 305, 2019.

ZHUANG, X.; OU, A.; KLAUDA, J. B. Simulations of simple linoleic acid-containing lipid membranes and models for the soybean plasma membranes. **J Chem Phys**, 146, n. 21, p. 215103, Jun 7 2017.

ZWEYTICK, D.; HRASTNIK, C.; KOHLWEIN, S. D.; DAUM, G. Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, erg4p, from the yeast saccharomyces cerevisiae. **FEBS Lett**, 470, n. 1, p. 83-87, Mar 17 2000.