O PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA PATOGENICIDADE DO *FONSECAEA MONOPHORA*: COMPARAÇÃO ENTRE ISOLADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIRULÊNCIA

Mariana Rodrigues Ribeiro[1]; Vícthor Gomes de Sousa[1]; Larissa Fernandes Matos[2]; Getúlio Pereira de Oliveira Junior[3]; Rosiane Andrade da Costa[3]; Luz Rocio Chamorro Correa[3]; Maria Sueli Soares Felipe[3]; Rosângela Vieira de Andrade[3]

[1]Biomedicina/Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília;

[2]Faculdade de Ciências e Tecnologias em Saúde - Universidade de Brasília;

[3]Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: mariana.ribeiro2023@a.ucb.br; victhor.sousa@a.ucb.br; larissaf@unb.br; getulio.junior@a.ucb.br; rosiane.costa@ucb.br; luz.correa@ucb.br; msueli@p.ucb.br; rosangelav@p.ucb.br

RESUMO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea crônica e negligenciada, associada principalmente a fungos demáceos do gênero *Fonsecaea*. As vesículas extracelulares (EVs) participam da comunicação entre fungos e hospedeiros e podem transportar moléculas relacionadas à virulência. Este estudo teve como objetivo caracterizar EVs e investigar diferenças entre isolados fúngicos com diferentes graus de virulência. Devido à dificuldade de obtenção da espécie inicialmente prevista, foram utilizados os isolados ABMT e LCDF de *Fonsecaea monophora*, classificados como de maior e menor virulência, respectivamente. As EVs foram obtidas por centrifugação diferencial e cromatografia de exclusão por tamanho e caracterizadas por nanocitometria, SDS-PAGE, marcação com MemGlow 488, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão. Foram observadas partículas na ordem de 10^{11} partículas/mL, com diâmetros médios entre 132 e 137 nm, sem diferenças estatisticamente significativas. Os resultados indicam a presença de EVs nos dois isolados e diferenças fenotípicas preliminares.

Palavras-chave: Cromoblastomicose; *Fonsecaea* spp.; Vesículas Extracelulares.

INTRODUÇÃO

Entre as doenças tropicais negligenciadas, há a cromoblastomicose, uma micose subcutânea crônica causada principalmente por fungos demáceos dimórficos. Esses fungos, encontrados no ambiente em sua forma micelial, são capazes de se transformar em células muriformes quando estão dentro do hospedeiro. Tal dimorfismo consiste em uma forma de resistência e adaptação ao corpo do hospedeiro, protegendo o patógeno do sistema imune, assim como a melanina produzida por esses fungos, a qual está relacionada à proteção contra condições adversas e mecanismos de defesa do hospedeiro, contribuindo para sua persistência no organismo (Popovic *et al*., 2026; Xin *et al*., 2025). A doença apresenta evolução prolongada e dificuldades terapêuticas, constituindo um importante problema de saúde pública em áreas endêmicas (Popovic *et al*., 2026).

Entre os agentes associados à doença encontra-se *Fonsecaea monophora*, espécie que apresenta relevância clínica e pode estar relacionada a manifestações de maior gravidade, como infecções que podem afetar também o sistema nervoso central (Smith *et al*., 2026). A compreensão

dos mecanismos envolvidos na patogenicidade desses fungos permanece limitada, sendo necessária a investigação de fatores que possam contribuir para diferentes graus de virulência.

As vesículas extracelulares (EVs) são estruturas delimitadas por bicamada lipídica capazes de transportar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outras moléculas biologicamente ativas. Em fungos, essas estruturas podem participar da comunicação celular, da interação com o hospedeiro e do transporte de componentes associados à virulência (Mota *et al*., 2026). Estudos realizados com *Fonsecaea* demonstraram que as EVs podem apresentar características distintas de acordo com as condições de crescimento e o grau de patogenicidade, além de interagirem com células do sistema imune, como macrófagos (Las-Casas *et al*., 2022; Rodrigues *et al*., 2025).

Nesse contexto, a caracterização das EVs produzidas por isolados com diferentes graus de virulência pode contribuir para a compreensão da interação fungo-hospedeiro e para a identificação de componentes com potencial como marcadores moleculares relacionados à cromoblastomicose.

OBJETIVO

Caracterizar e comparar as vesículas extracelulares produzidas por fungos do gênero *Fonsecaea*, buscando identificar características associadas à virulência e potenciais marcadores moleculares relacionados à cromoblastomicose.

MÉTODO

Inicialmente, o projeto previa a utilização de *F. pedrosoi*. Entretanto, devido à dificuldade de obtenção do isolado dessa espécie, foram utilizados dois isolados de *F. monophora*: ABMT, de maior virulência e LCDF, de menor virulência. Os isolados foram inicialmente cultivados em meio caldo de batata para obtenção de conídios, os quais foram posteriormente contados em câmara de Neubauer e inoculados em meio Sabouraud, sob condições controladas de temperatura e agitação. A partir disso, foram obtidos inóculos padronizados da forma micelial dos fungos. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica, utilizando meio não inoculado como controle negativo.

As EVs fúngicas foram obtidas a partir dos sobrenadantes por centrifugações diferenciais, filtração em membrana de 0,22 µm, concentração e cromatografia de exclusão por tamanho em coluna qEV. A concentração e o tamanho das partículas foram avaliados por nanocitometria e qNano. O perfil proteico foi analisado por SDS-PAGE, enquanto a presença de estruturas compatíveis com EVs foi investigada por marcação com MemGlow 488 e microscopia de fluorescência, além de microscopia eletrônica de transmissão.

RESULTADOS

No estudo piloto inicial, realizado antes da padronização do inóculo, o isolado ABMT apresentou maior produção de melanina, com absorbância aproximadamente 1,45 vezes superior à observada para LCDF. Posteriormente, os inóculos foram padronizados a partir da quantificação dos conídios. ABMT apresentou aproximadamente 653 milhões de conídios/mL, enquanto LCDF apresentou aproximadamente 400 milhões de conídios/mL, sendo os volumes ajustados para garantir a utilização da mesma quantidade absoluta de conídios nos experimentos.

Após a padronização, foram detectadas partículas em concentrações da ordem de 10^{11} partículas/mL. Os diâmetros médios observados por nanocitometria variaram aproximadamente entre 132 e 137 nm. Apesar de uma tendência de maior concentração de partículas no isolado ABMT, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os isolados quanto à concentração ou ao tamanho das partículas.

A marcação com MemGlow 488 apresentou baixa porcentagem de eventos positivos, embora a microscopia de fluorescência tenha permitido observar estruturas compatíveis com EVs nos dois isolados. A microscopia eletrônica de transmissão permitiu visualizar estruturas compatíveis com EVs, enquanto a SDS-PAGE revelou padrões proteicos distintos entre os isolados.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram a obtenção de partículas compatíveis com vesículas extracelulares nos isolados ABMT e LCDF de *F. monophora*. A padronização do inóculo permitiu estabelecer condições mais adequadas para a comparação entre os isolados. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas quanto ao tamanho ou à concentração das partículas, foram identificadas diferenças fenotípicas preliminares entre os isolados. A presença de material pigmentado durante a cromatografia e a baixa intensidade de fluorescência indicam a necessidade de otimização das etapas de purificação e caracterização. A continuidade das análises poderá contribuir para determinar diferenças na composição das EVs associadas aos diferentes graus de virulência e avaliar seu potencial como fonte de marcadores relacionados à cromoblastomicose.

REFERÊNCIAS

Las-Casas, L. O., Marina, C. L. F., de Castro, R. J. A., Coelho, L. C., Báo, S. N., de Hoog, G. S., Vicente, V. A., Fernandes, L., & Bocca, A. L. (2022). Pathogenicity and growth conditions modulate Fonsecaea extracellular vesicles' ability to interact with macrophages. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12, 879018. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.879018.

Mota, C., Hwang, H., & Kang, H. A. (2026). Extracellular vesicles in human fungal pathogens: Biogenesis, functions, and translational applications. Journal of Microbiology, 64(7), e2606008. https://doi.org/10.71150/jm.2606008.

Popovic, K., Henao-Martínez, A. F., de Melo Teixeira, M., Amaral de Souza, E. B., Rakotoarisaona, M., & Agudelo Higuita, N. I. (2026). Updates on chromoblastomycosis: Evolving insights in clinical management and therapeutic strategies. Current Fungal Infection Reports, 20, 11. https://doi.org/10.1007/s12281-026-00532-3.

Rodrigues, M. L., Janbon, G., O'Connell, R. J., Chu, T.-T.-H., May, R. C., Jin, H., Reis, F. C. G., Alves, L. R., Puccia, R., Fill, T. P., Rizzo, J., Zamith-Miranda, D., Miranda, K., Gonçalves, T., Ene, I. V., Kabani, M., Anderson, M., Gow, N. A. R., Andes, D. R., ... Nimrichter, L. (2025). Characterizing extracellular vesicles of human fungal pathogens. Nature Microbiology, 10(4), 825–835. https://doi.org/10.1038/s41564-025-01962-4.

Smith, D. J., van Beurden, T., Li, Y., Almeida-Paes, R., Jacomel, B., Vicente, V. A., Lustosa, B. P. R., Walter, T. H., Neto, E. N. M., Hallur, V., Paul, D., Paul, N., Li, R., Lu, S., Kidd, S. E., Bonifaz, A., Samaddar, A., Treviño-Rangel, R. D. J., González, G. M., ... Hagen, F. (2026). Establishment of epidemiological cutoff values against Fonsecaea monophora, an agent of chromoblastomycosis and cerebral phaeohyphomycosis. Journal of Clinical Microbiology, 64(8), e0184625. https://doi.org/10.1128/jcm.01846-25.

Xin, T., Wu, Y., & Zhang, J. (2025). The role of melanin in Fonsecaea monophora pathogenicity: Adhesion, fibroblast interactions, and implications for chromoblastomycosis. Future Microbiology, 20(6), 449–456. https://doi.org/10.1080/17460913.2025.2480973.

Financiamento: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal. Universidade Católica de Brasília.