

Biologia dos Fungos – Guia de aula

Slide 1 → Os Fungos formam um grupo de seres vivos extremamente heterogêneo e são muito pouco estudados. Estima-se que existam mais de 5.000.000 de espécies dentro do Reino dos Fungos, mas somente 2% delas (100.000) estão descritas.

Slide 2 → Eles se apresentam sob diferentes manifestações morfológicas e são reconhecidos pela maioria das pessoas: o bolor do pão, a folha em decomposição, cogumelos. Entretanto no canto inferior direito estão mostradas colônias de **leveduras**, passíveis de observação somente em meio de cultura de laboratório.

Slides 3 a 9 → Esses slides mostram imagens de fungos na natureza e os seus corpos de frutificação característicos. É interessante notar pelas imagens que uma vez um substrato é tomado por um fungo ele se torna dominante no local, por exemplo um tronco de árvore no slide 9 está sendo colonizado por Basidiomicetos do tipo Brackets (colchetes) . Imagina-se portanto que o fungo que lá está , protege o seu substrato contra competidores. Como uma espécie de fungo consegue fazer isso?

Slide 10 → Há muito se sabe da importância crucial que os fungos tem na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes. Chama a atenção o papel desempenhado por eles na metabolização de cadeias carbônicas extremamente complexas como da lignina, e da hemicelulose. Dentre as divisões fúngicas os basidiomicetos e os ascomicetos são os mais competentes nesses processos – muito dos fungos mostrados nos slides anteriores (3 a 9) são basidiomicetos.

Slide 11 → A heterogenidade do Reino do Fungos é exemplificada com o “humongous fungus” ou o fungo gigante, considerado o maior ser vivo do planeta, vivendo em uma área de que cobre grandes florestas do estado do Oregon nos EUA. Assim, dentro do Reino dos Fungos temos seres unicelulares microscópicos como as leveduras, e seres gigantes como o humongous fungus.

Slide 13 → Nessa régua de tamanho exemplifica-se a diversidade de tamanhos dos fungos. Leveduras unicelulares com 6µm de tamanho e fungos gigantes com 37 hectares de área.

Slide 14 → Para fins didáticos podemos dividir os fungos em dois grandes tipos essenciais: Os macroscópicos – representados principalmente pelos cogumelos – e os microscópicos formados por bolores e leveduras. Os bolores são possíveis de serem identificados na natureza em

compostos em decomposição formando colônias filamentosas. As leveduras são mais facilmente identificadas de forma isolada em laboratório formando colônias cremosas

Slide 15 → Os fungos variam muito com respeito ao seu metabolismo, e isso é refletido na velocidade de crescimento que podem estabelecer. Na figura à esquerda está mostrado uma placa de cultura contendo um fungo do gênero *Rhizopus*, esse fungo cresce rapidamente em cultura, com um aspecto de algodão que lota a placa de petri em poucos dias. À direita, por outro lado, o fungo *Histoplasma capsulatum* cresce lentamente, de forma aveludada, com a colônia atingido seu estágio maduro após meses de cultivo.

Slide 17 → Os bolores são formados por **hifas**, a um conjunto de hifas se dá o nome de **Micélio**. O micélio pode ser especializado no crescimento e sustentação do fungo sendo chamado de **micélio vegetativo**, ou na sua reprodução, recebendo o nome de **micélio reprodutivo**. As hifas que formam o micélio podem ou não possuir septos dependendo da divisão fúngica. No quadro “A” é mostrado hifas septadas, em “B” não septadas, ou cenocíticas e em “C” hifas cumprindo um papel reprodutivo, ao se quebrarem em pedaços menores, podem ser mais facilmente dispersos por vias de dispersão (ar, água, outros seres vivos).

Slide 18 → Assim, os **bolores** são organismos **pluricelulares** enquanto as **leveduras** são **unicelulares**. Em determinadas situações ambientais as leveduras podem assumir um crescimento pseudo-filamentoso, no qual no processo de divisão celular as células filhas não se soltam da célula mãe. Diferentemente da forma filamentosa dos bolores, na **pseudo-filamentosa** é possível identificar unidades celulares ao longo do organismo.

Slide 19 → Alguns fungos são capazes de produzir melanina, o acúmulo desse metabólito leva ao escurecimento dos corpos de frutificação levando a coloração escura de suas hifas.

Slide 20 → Classificação dos Fungos – O termo monofilético em filogenia se refere ao conjunto de espécies que possui uma ancestralidade comum compartilhado por todos do grupo, mas não compartilhada por outras espécies fora do grupo. Assim, aceita-se que os **fungos verdadeiros** (Eumicetos) possuem um ancestral comum que define o Reino Fungi. Alguns organismos chamados de fungos em compêndios de Micologia não pertencem ao Reino Fungi e por isso são chamados de Oomicetos (fungos falsos).

Slide 21 → Em 1969 foi proposta a divisão do mundo vivo em cinco reinos: Animal, Vegetal, Monera (procariotos), Fungi e Protistas. Hoje, os reinos Protistas e Monera não são considerados monofiléticos.

Slide 22 → Representa uma célula fúngica e algumas diferenças que existem entre as células dos animais com a dos fungos, como, por exemplo, a existência de uma **parede celular** constituída basicamente por açúcares como a quitina e β -glucanas que envolvem a célula sendo essencial para a sobrevivência do fungo.

Slide 23 → O que define um Fungo? Ou melhor perguntando, quais as características em comum compartilhada entre todas as espécies do Reino Fungi? A parede celular com quitina e β -glucanos sem dúvida é um diferencial dos fungos. Mas não é só isso, bioquimicamente temos a capacidade que os fungos tem de produzir seus aminoácidos essenciais a partir de um precursor, o ácido aminoadípico. As plantas também são capazes de produzir todos os aminoácidos, entretanto isso é feito através de uma rota bioquímica diferente da encontrada nos fungos.

Slide 24 → A árvore filogenética representa eventos que devem ter ocorrido ao longo da evolução. Primeiramente, nota-se características que aproximam Fungos e Animais e os distanciam das plantas: **Síntese de Quitina**; uso de **Glicogênio** como açúcar de reserva; e variações no **código genético mitocondrial**, por exemplo UGA que no código genético universal é codificado como códon de parada, nas mitocôndrias dos fungos e dos animais é decodificado como Triptofano. As diferenças que levam a separação dos Fungos dos Animais são essencialmente as citadas no slide anterior : **Síntese de aminoácidos essenciais** como Lisina a partir do ácido aminoadípico; formação de parede celular. Tem-se então quatro divisões fúngicas mostradas na árvore: Chitridiomycetos, Zigomicetos, Ascomycetos e Basidiomycetos. As divisões dos Chitridiomycetos e Zigomicetos são consideradas, hoje em dia artificiais, pois na realidade elas se desdobram em muitas outras. Para simplificar , pode-se dizer que os **Chitridiomycetos** são os fungos que possuem um estágio de desenvolvimento que depende de ambiente aquático, pois produzem células móveis. Isto é, é o único grupo de fungos capaz de **produzir flagelos** em sua células e portanto se movimentar. No decorrer da evolução, houve a perda dos centríolos, organelas celulares responsáveis pela organização de cílios e flagelos, assim a partir do surgimento dos Zigomicetos não haveria mais essa característica. Os **Zigomicetos** possuem micélio cenocítico, ou seja, **hifas sem septos**, e o surgimento de septação os diferencia das divisões consideradas naturais, os Ascomycetos e os Basidiomycetos. A diferença essencial entre essas duas divisões se dá no processo de divisão celular por meiose. Nos **Ascomycetos**, após a meiose os **esporos são mantidos em um saco**, isto é, em um asco, daí o nome Ascomyceto.

Enquanto nos **Basidiomicetos**, a meiose ocorre a partir de células posicionadas no topo do basídio , e os esporos produzidos, ou **basidiósporos estão imediatamente expostos no ambiente**.

Slide 25 → Os fungos podem se **reproduzir** de três formas. Além das formas **Sexuada** e **Assexuada**, naturalmente reconhecida em outros seres vivos, também há a forma **Parassexuada** que mistura características das duas anteriores e somente é possível de ser observada em laboratório sob constante seleção.

Slides 26 a 28 → Apresentam formas reprodução assexuada. No primeiro slide a partir da simples fragmentação de hifas – os pequenos elementos híficos recebem o nome de **artroconídios** e podem ser dispersos conforme já mostrado no slide 17. No slide 27 uma microscopia de alta resolução do corpo de frutificação do fungo do gênero *Aspergillus*. Ou seja, num corpo de frutificação há uma grande especialização para a reprodução, a hifa se diferencia em uma vesícula que sustenta o corpo e dela partem células especializadas (fiálides) especializadas na produção de esporos (conídios) arredondados, rugosos e espiculados. Esse esporos são altamente especializados para serem dispersos pelo ar (fungos anemófilos) a rugosidade é derivada do grau de dessecação permitindo suportar a falta de água por longos períodos, a espículas ajudam na aerodinâmica e na fixação em um novo substrato. No slide 28 há as definições de estruturas especializadas de reprodução como **Conídios e Esporangiósporos**. Os esporangiósporos são típicos da divisão Zigomicota.

Slide 30 → Como os fungos se **nutrem**: Através da matéria orgânica em decomposição , a esse processo se dá o nome de **saprotitismo**; ou através de interações ecológicas com outros seres vivos (Mutualismo, Comensalismo, Parasitismo e até Predação)

Slide 32 → Estrutura da parede celular em um conídio dormente – os açúcares estão fortemente compactados para evitar a perda de água , e abaixo em uma hifa em sua região apical, os açúcares estão mais desorganizados , coerentemente com uma região em crescimento.

Slide 33 → A metabolização dos substratos pelos fungos normalmente começa acontecer de forma extra-corpórea a partir da secreção de enzimas que transformam o substratos em moléculas solúveis e menores. A figura mostra uma hifa secretando enzimas que liberam substratos menores que também devem ser protegidos de competidores que possam estar no microambiente como outros fungos (leveduras) e bactérias. Para realizar essa proteção contra competidores eles

podem secretar toxinas: antibióticos (Penicilina), antifúngicos (Griseofulvina), e micotoxinas (Aflotoxina)

Slide 34 e 35 → A alta secreção de enzimas celulóticas por alguns fungos aumentam seu interesse econômico/biotecnológicos e são usados como fontes para produção dessas enzima em larga escala.

Slide 36 → **Antibióticos e Antifúngicos** produzidos por fungos que acabaram beneficiando a nossa espécie.

Slide 37 → Embora haja preferência por fontes de carbono dentro do Reino Fungi, pode-se dizer que a **Glicose é a fonte preferencial** ou universal. No caso de *Saccharomyces cerevisiae* presente na fermentação do caldo de cana nas usinas de açúcar e álcool, há a secreção de uma enzima a invertase que quebra a Sacarose em Glicose + Frutose que são mais facilmente absorvidas pela célula.

Slide 38 → Outro nutriente essencial para os microorganismos é o Nitrogênio. Não é possível encontrar na natureza uma **fonte de nitrogênio que seja universal** para todos os fungos. Há os que metabolizam sais de amônia, outros preferem nitritos e nitratos, uréia , ou mesmo nitrogênio atmosférico. No laboratório usa-se peptona como fonte de nitrogênio. A peptona é obtida a partir da hidrólise de proteínas da carne e do leite gerando pequenos aminoácidos que acabam suprimindo toda necessidade de nitrogênio da cultura. Outros micronutrientes como vitaminas e metais também devem ser disponibilizados para o cultivo dos fungos.

Slide 39 e 40 → A principal via de dispersão dos fungos ocorre através das correntes de ar. No **ambiente externo** , junto a vegetação, por exemplo, é natural que haja **maior diversidade de esporos** fúngicos (slide 39) enquanto em um **ambiente fechado** (slide 40) a diversidade deve ser menor, mas em alguns casos **pode haver um excesso de um dado tipo de esporo** que esteja muito frequente no local, por exemplo, o fungo pode estar presente no filtro do ar-condicionado e seus esporos sendo dispersos constantemente pelo local. O método da fita adesiva mostrado nos dois slides permite uma verificação rápida dos propágulos fúngicos presentes.

Slides 41 a 45 → Exemplificam as relações ecológicas que os fungos estabelecem. Há os fungos **parasitas** que **causam doenças** nos animais e plantas por exemplo. Para exercer o parasitismo eles devem ter capacidade de infectar e se espalhar no hospedeiro. Essa capacidade depende basicamente da sua **virulência** (características particulares favoráveis a infecção) e do estado de

defesa do hospedeiro (indivíduos imunodeprimidos são mais facilmente acometidos). Uma estratégia de virulência utilizada por alguns fungos é o **dimorfismo térmico**. O mesmo organismo se manifesta na forma de bolor na temperatura ambiente (~25°C) e na forma de levedura na temperatura do hospedeiro (37°C).

No slide 42 está exemplificado o caso da *Candida albicans* que é um componente da microbiota normal da maioria da população vivendo assim em vida comensal. Entretanto, em algumas situações fisiológicas a *Candida albicans* passa a invadir tecidos da pele e da mucosa causando candidíase e entrando em vida parasitária. Quando em vida comensal ela se divide por brotamento simples, se há um sinal ambiental favorável ela muda de comportamento e passa a **pseudo-filamentar** (quadro à direita) que é a forma infecciosa.

Slide 46 → Resume os aspectos negativos relativos a presença dos fungos, causando doenças nos animais e plantas, levando a deterioração de alimentos, e produção de toxinas.

Slide 47 → Micose é o nome dado as doenças causadas por infecções fúngicas. Embora normalmente relacionamos o termo somente a infecções de pele por serem as mais frequentes, as micoses na realidade são justamente classificadas pela região do corpo afetada. Assim temos as micoses superficiais (efeito estético), micoses cutâneas (geram lesões na epiderme), micoses subcutâneas (invadem camadas inferiores da pele e podem se espalhar pelos sistema linfático), micoses sistêmicas (se desenvolvem nos órgãos internos e são extremamente perigosas apresentando alta morbidade)

Slide 48 → A esquerda micose superficial gerada pela contaminação da pele com uma levedura chamada *Malassezia furfur*, o efeito é simplesmente estético, alterando a deposição de melanina na pele, promove regiões do corpo hipo ou hiperpigmentada. Normalmente acomete mais pessoas com pele oleosa pois a *Malassezia furfur* necessita de lipídio exógeno.

Na direita é mostrada uma micose cutânea – *tinea barbae* - causada por um dermatófito, o *Trichophyton rubrum*. Os dermatófitos são fungos queratinofílicos, parasitando os anexos epidérmicos que contém queratina (pele, pelo, unha, cascos, garras, chifres etc...) com relação ao habitat podem ser classificados como geofílicos, zoofílicos e antropofílicos.

Slide 49 → Os fungos causadores de micose estão no ambiente e são dispersos como os demais fungos da natureza. O esquema representa o ciclo do *Cryptococcus gatti*. Esse fungo é encontrado em cascas de árvore como o Eucalipto e através das correntes de ar pode ser inalado por diversos animais. Uma vez no hospedeiro, e principalmente se ele estiver imunodebilitado, o

fungo pode se alojar no pulmão causando uma pneumonia inicial, para depois se disseminar para os órgãos internos, com um tropismo para o Sistema Nervoso Central onde se alojará na Meninge causando uma meningite criptocócica.

Slide 50 → Um gato e um paciente portador de HIV contaminados com *Cryptococcus* .

Slide 51 → Outro fungo causador de micose sistêmica é o *Histoplasma capsulatum* – já mostrado no slide 15 – é um fungo que tem dimorfismo térmico, ou seja, no ambiente está como bolor e no hospedeiro é uma levedura que parasita internamente células do sistema reticuloendotelial. Assim como o *Cryptococcus* também afeta preferencialmente indivíduos imunodebilitados tendo alta letalidade.

Slide 52 → Alguns ambientes são endêmicos para *Histoplasma capsulatum* sendo comum nos EUA placas sinalizadoras de local contaminado. No Brasil pessoas que visitam cavernas e tratadores de aves em galinheiros estão mais expostos a inalar esse fungo, pois ele prolifera em maior número nas fezes de morcegos e aves.

Slide 53 → Mostra um quadro comum de candidíase (ou sapinho) em recém nascido. O corrimento esbranquiçado nos lábios é indicativo da presença de *Candida*.

Slides 54 a 56 → Doença de pele causada em anfíbios pelo Chytridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis* – a infecção costuma ser letal dada ao papel da pele na respiração desses animais. A dispersão desse fungo pelo globo tem resultado na extinção de um grande número de espécies de anfíbios. Pode-se dizer que esse fungo é, hoje em dia, o maior causador direto da extinção de espécies.

Slides 57 a 59 → Lista alguns fungos utilizados como fonte direta de alimento pelo homem e faz a ressalva para aqueles que são tóxicos como *Amanita muscaria*.

Slides 60 e 61 → A ingestão de fungos tóxicos e suas toxinas pelo homem pode levar a doença denominada Micetismo, que se manifesta por intolerância gastro-intestinal e nervosa (psicoativa como ácido lisérgico). A gastro-intestinal pode levar a óbito por hemorragia interna.

Slide 62 a 64 → Um outro grupo de toxinas fúngicas que podemos ingerir é o das Micotoxinas. Alguns fungos depositam toxinas sobre o alimento como estratégia de proteção. Mas no caso esse alimento pode ser utilizado pelo homem, como amendoim, milho, trigo, sorgo, castanha

etc... As micotoxinas são extremamente tóxicas, tem alto potencial carcinogênico, e podem ser transmitidas ao longo da cadeia alimentar, ou seja, podemos ingerir micotoxinas em derivados do leite, se os animais forem alimentados com ração contaminada. Dá-se o nome de Micotoxicose à contaminação por micotoxinas.

Slides 65 a 67 → Sumariza alguns efeitos sócio-econômicos benéficos dos fungos para o homem.

Slide 68 a 70 → O uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo da célula eucariótica. Resume-se as vantagens obtidas com esse microrganismo. A manipulação genética de *Saccharomyces cerevisiae* é extremamente favorável. O texto abaixo descreve como se obtêm transformantes genéticos desse microorganismo.

Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* com DNA exógeno.

Eucariotos, particularmente algas e fungos, também possuem plasmídeos na natureza. Os fungos filamentosos apresentam uma grande diversidade de plasmídeos lineares e circulares que habitam principalmente suas mitocôndrias. Já *Saccharomyces cerevisiae* apresentam o chamado plasmídeo 2 μ , que existe na natureza como um círculo de 6300 pares de base, presente com cerca de 50 cópias no núcleo da célula; sua replicação se dá na forma de círculo rolante, permitindo a produção de várias cópias do plasmídeo por ciclo celular.

Os plasmídeos próprios para uso em *S. cerevisiae* são construídos de maneira a permitir também etapas de clonagem e amplificação em *Escherichia coli*, sendo assim chamados de vetores-ponte. A passagem do vetor-ponte por *E. coli* é obrigatória principalmente para obtenção de clones contendo os plasmídeos recombinantes, o que permite seu isolamento em quantidade suficiente para a transformação de *S. cerevisiae*. transformantes para cada um dos organismos.

Os chamados vetores multi-cópias, ou epissomais, de levedura (YEp) possuem como origem de replicação as repetições de 600 pares de bases do plasmídeo 2 μ . Alternativamente, o plasmídeo pode conter uma origem de replicação idêntica à de um cromossomo (sequência ARS) e também uma região centromérica (YCp), o que torna o plasmídeo YCp menos frequente no interior do núcleo, mas com estabilidade maior que os plasmídeos YEp. Há também os vetores ditos integrativos (YIp) que não possuem uma origem de replicação própria de levedura, e como o próprio nome prediz eles devem integrar-se em um dos cromossomos da célula. O processo de integração se baseia na alta capacidade de *S. cerevisiae* realizar recombinação homóloga entre segmentos de DNA cujas extremidades contêm sequências idênticas a um dado locus cromossômico. Assim, o plasmídeo integrativo é linearizado por digestão com enzima de

restrição com sítio em um segmento de DNA que deve ter correspondência de sequência de bases a algum locus cromossômico, e é exatamente nesse locus que ele deve se integrar. Resumindo, temos que: YCp são autônomos, contém uma região centromérica, conferindo estabilidade mitótica de 90% mantendo 1 a 4 cópias por núcleo. YEp são autônomos, menos estáveis que os centroméricos, contêm as origens de replicação do plasmídeo 2μ , levando a um alto número de cópias por célula. YIp não são autônomos, precisam ser integrados no genoma nuclear para se propagarem, o que também garante estabilidade mitótica próxima de 100%, e são integrados em uma única cópia por célula.

A seleção em *S. cerevisiae* baseia-se principalmente na complementação de uma incapacidade nutricional (auxotrofia) da linhagem hospedeira. Assim, linhagens com deficiência para síntese de uracila ou leucina por terem alelos *ura3* e *leu2* inoperantes são complementadas por plasmídeos contendo os alelos ditos selvagens *URA3* e *LEU2*. O processo de seleção dos transformantes é, dessa forma, realizado em meio mínimo de cultura não suplementado com os respectivos nutrientes.

Embora similar ao procedimento bacteriano, a transformação de leveduras requer tratamentos adicionais com sais de lítio e polietileno glicol. Tais diferenças são decorrentes da presença da parede celular de quitina e β -glucanos típica dos fungos, que forma uma barreira para a entrada de DNA exógeno.

A seleção das células transformadas pode ser feita pelo simples critério de crescimento e formação de colônia em meio mínimo seletivo, pois somente as transformadas terão adquiridos alguma capacidade nutricional nova .

Slides 71 a 74 → Apresentam algumas aplicações Biotecnológicas resultantes da modificação genética de *S. cerevisiae* como a produção de fármacos (71), na produção de etanol de segunda geração (aquele obtido do bagaço da cana – 72 e 73) e em processo de biorremediação a partir da recuperação de metais pesados (74)