

Aspectos gerais da biologia celular de fungos patogênicos



Kelly Ishida

E-mail: ishidakelly@usp.br

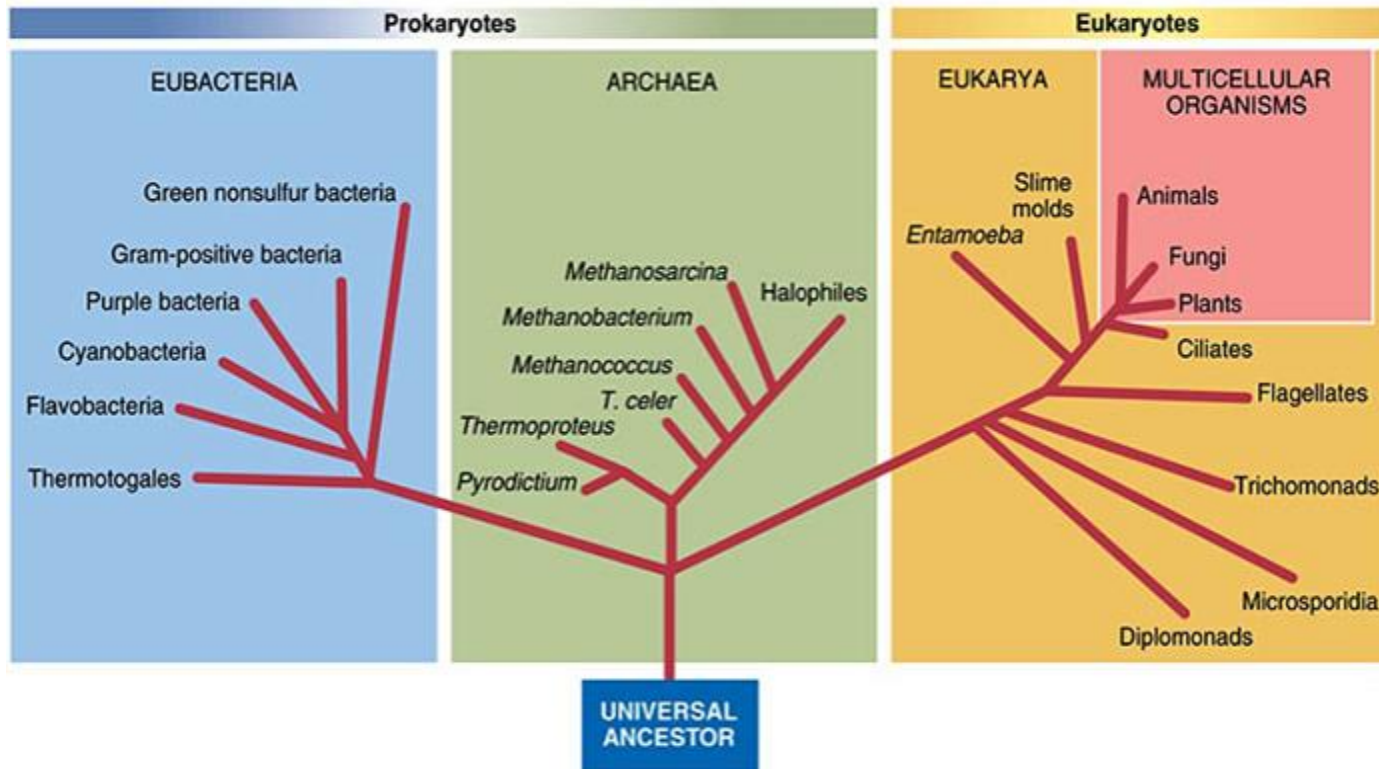


Roteiro

1. Taxonomia de fungos
2. Ciclo de vida (assexuada e sexuada)
Morfologia macro- e microscópica
3. A célula fúngica

Domínio dos seres vivos

Woese e colaboradores (1977) propuseram um novo sistema de classificação baseado, principalmente, em **aspectos evolutivos** (filogenéticos), pela comparação das seqüências de genes que codificam o rRNA de diferentes organismos.



Evidências moleculares tem sugerido uma proximidade filogenética maior dos fungos aos animais que às plantas e aos protozoários.

Evolução e classificação dos fungos

- Domínio: Eucarya
- Reino: Fungi
- Filos:
 - Blastocladiomycota
 - Glomeromycota
 - Chitrydiomycota
 - **Zygomycota**
 - **Ascomycota**
 - **Basidiomycota**

Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature

[Robert Lücking](#), [M. Catherine Aime](#), ... [Conrad L. Schoch](#) 

[+ Show authors](#)

Nature Microbiology **6**, 540–548 (2021) | [Cite this article](#)

3957 Accesses | **24** Citations | **131** Altmetric | [Metrics](#)

 An [Author Correction](#) to this article was published on 27 May 2021

 This article has been [updated](#)

Abstract

The identification and proper naming of microfungi, in particular plant, animal and human pathogens, remains challenging. Molecular identification is becoming the default approach for many fungal groups, and environmental metabarcoding is contributing an increasing amount of sequence data documenting fungal diversity on a global scale. This includes lineages represented only by sequence data. At present, these taxa cannot be formally described under the current nomenclature rules. By considering approaches used in bacterial taxonomy, we propose solutions for the nomenclature of taxa known only from sequences to facilitate consistent reporting and communication in the literature and public sequence repositories.

Taxonomia em constante mudança...

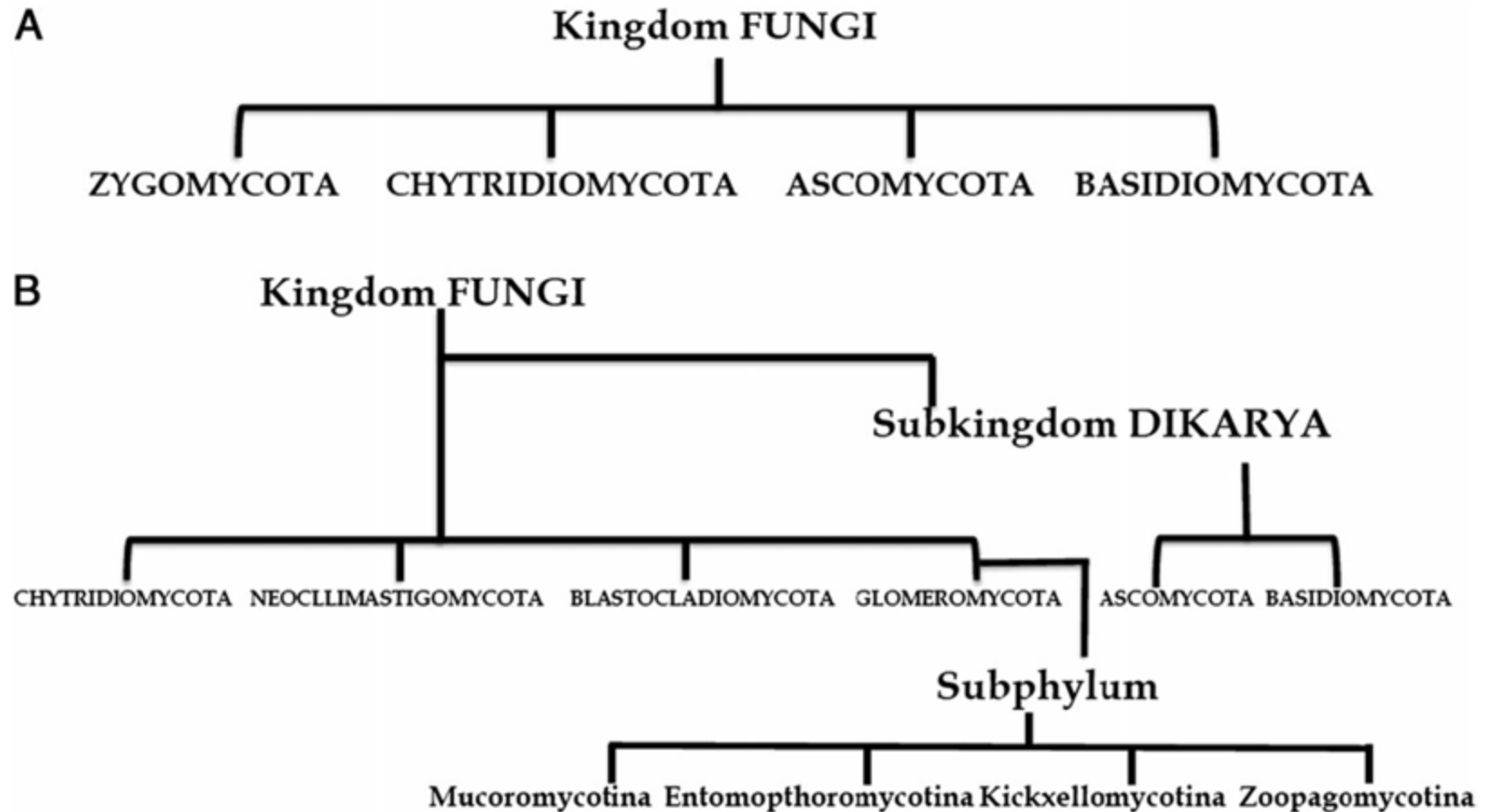


Figure 1. Old (A) and a proposed new (B) classification schemes of the kingdom Fungi.

Kwon-Chung. Clinical Infectious Diseases 2012;54(S1):S8–15.
Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. Biological Reviews 2019; 94:2101–2137.



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Clinical Microbiology Reviews

Clinical Microbiology | Review

Changes in fungal taxonomy: mycological rationale and clinical implications

Andrew M. Borman,^{1,2} Elizabeth M. Johnson^{1,2}

2023

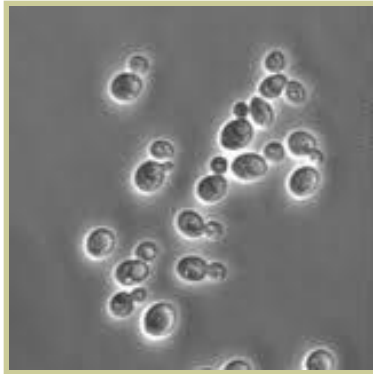
Características gerais dos fungos

- Eucariotos
- Podem se apresentar nas formas de hifa ou levedura
- Não possuem clorofila
- Quimioheterotróficos - necessitam de matéria orgânica para obtenção de energia
- Nutrição por absorção
 - absorvem nutrientes solúveis pela parede celular e membrana plasmática.
- Armazenamento de energia: glicogênio, manitol, trealose e alcoóis

-
- Parede celular de quitina e glucanas
 - A evolução da parede celular rica em quitina foi fundamental para o sucesso e diversidade dos fungos, permitindo que estes organismos resistissem a alterações osmóticas e habitassem os mais distintos ambientes;
 - Na maioria, são seres haplóides
 - As células não possuem centríolos, e sim, centros formadores de microtúbulos
 - Membrana nuclear não se rompe durante a divisão celular, não forma placa de metáfase
 - Pode ter ciclo assexuada e sexuado

Morfologia – organização fúngica

- Unicelulares → fungos leveduriformes

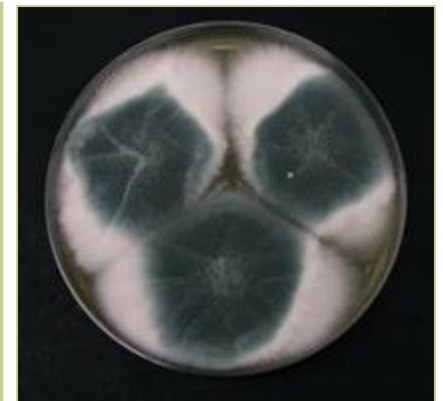


Ex. *Saccharomyces cerevisiae*

- Pluricelulares → fungos filamentosos (“bolor”)

- Hifa – unidade básica do fungo
- Micélio – conjunto de hifas

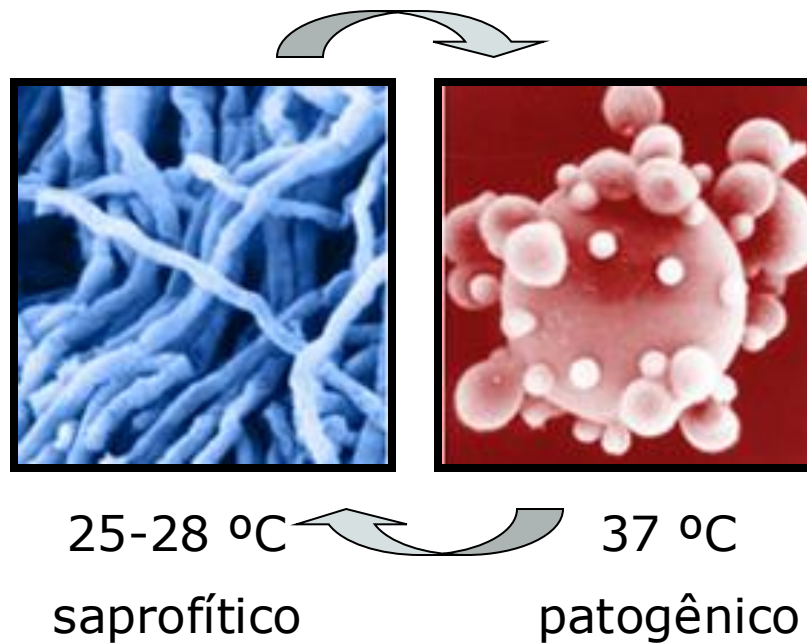
Ex. *Aspergillus fumigatus*



Fungos dimórficos

Capacidade de um fungo em possuir duas formas distintas dependendo das condições ambientais.

Importante na patogênese do fungo.



Fungos Termodimórficos

Paracoccidioides spp.

Sporothrix spp.

Blastomyces dermatitidis

Histoplasma capsulatum

Coccidioides immitis

Coccidioides posadasii

Penicillium marneffei

Leveduras

Característica macroscópica

Coloração e Consistência



FORM



Punctiform



Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle

ELEVATION



Flat



Raised



Convex



Pulvinate



Umbonate

MARGIN



Entire



Undulate



Lobate



Erose



Filamentous

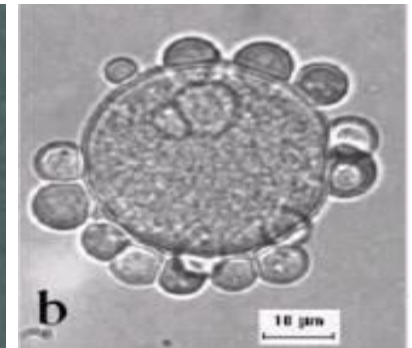
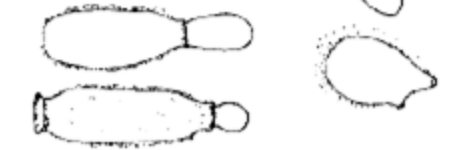
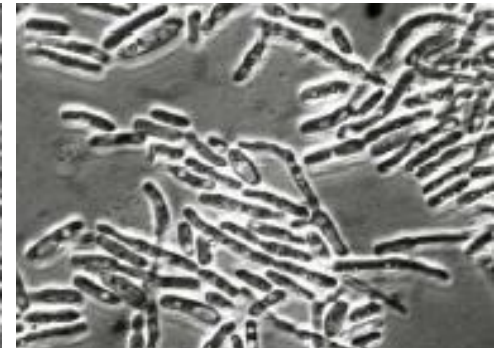
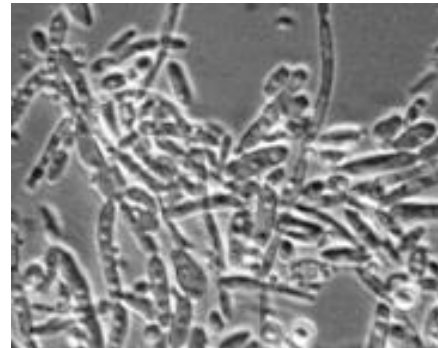
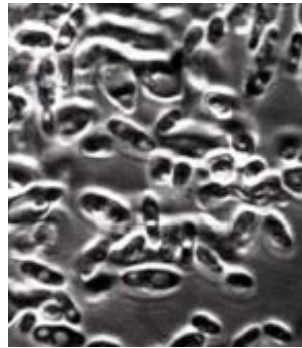


Curled

Forma, superfície, margem, coloração, aspecto (seco, úmido),
Tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

Leveduras

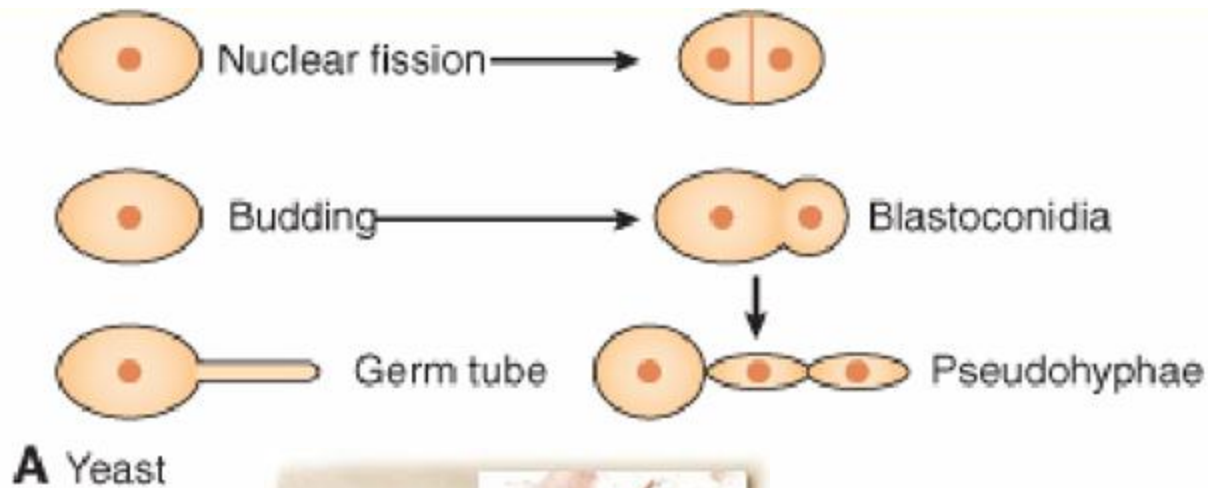
Característica microscópica



Leveduras

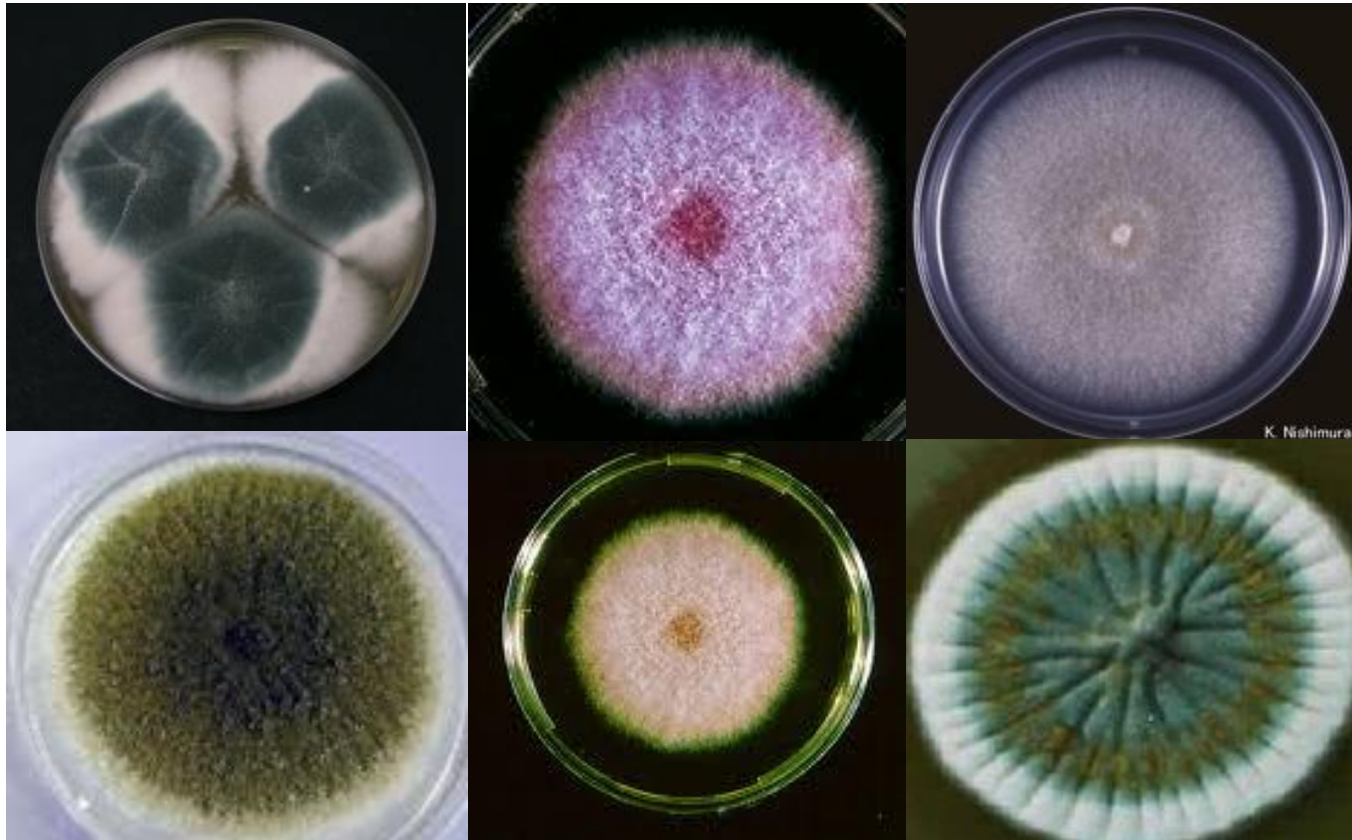
Reprodução assexuada – Formação Blástica

Brotamento / fissão binária



Fungos Filamentosos

Característica macroscópica

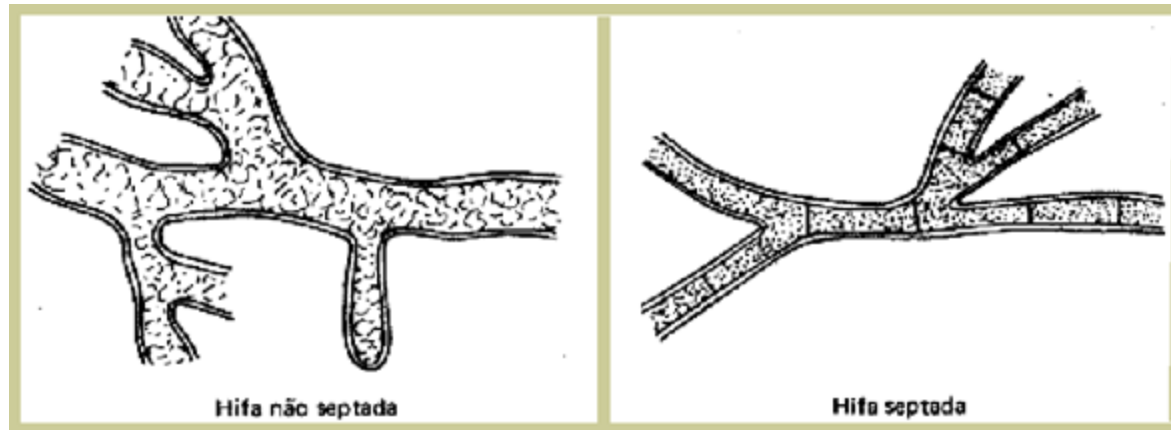


Forma, superfície, margem, coloração verso e reverso, aspecto (seco, úmido), tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

Fungos Filamentosos

Característica microscópica

- Hifa
 - Micélio (conjunto de hifa)
- Vegetativo**
Reprodutivo

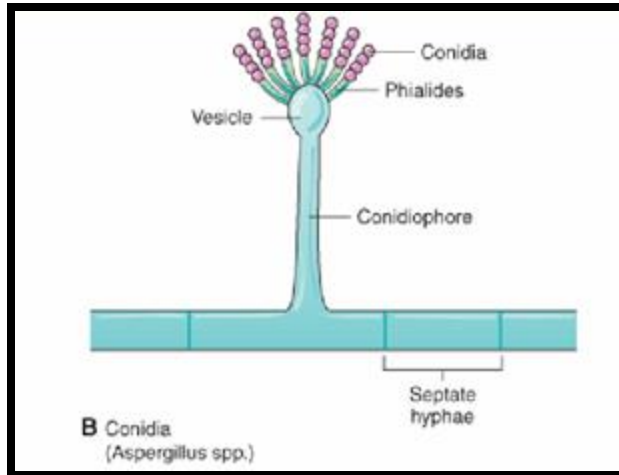


- Não-septadas /Contínuas
- Septadas/cenocíticas
- Hialino X Demáceo
- Espessa X Delgada

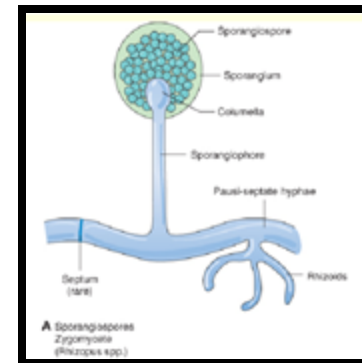
Fungos Filamentosos

Reprodução assexuada – Micélio reprodutivo

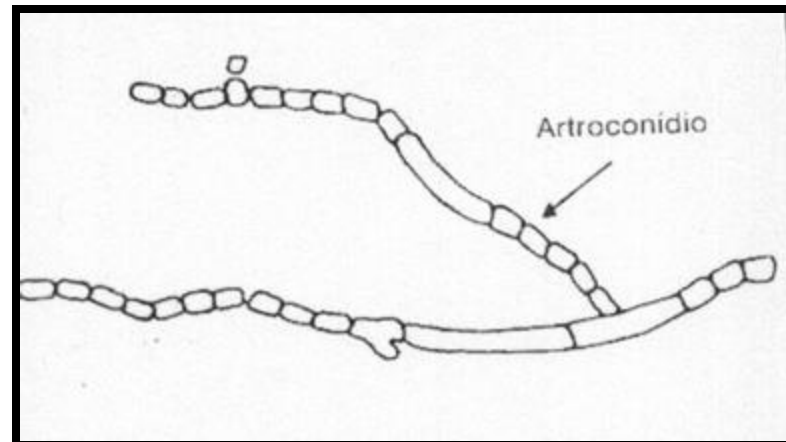
- Formação Blástica



- Formação de Esporângios

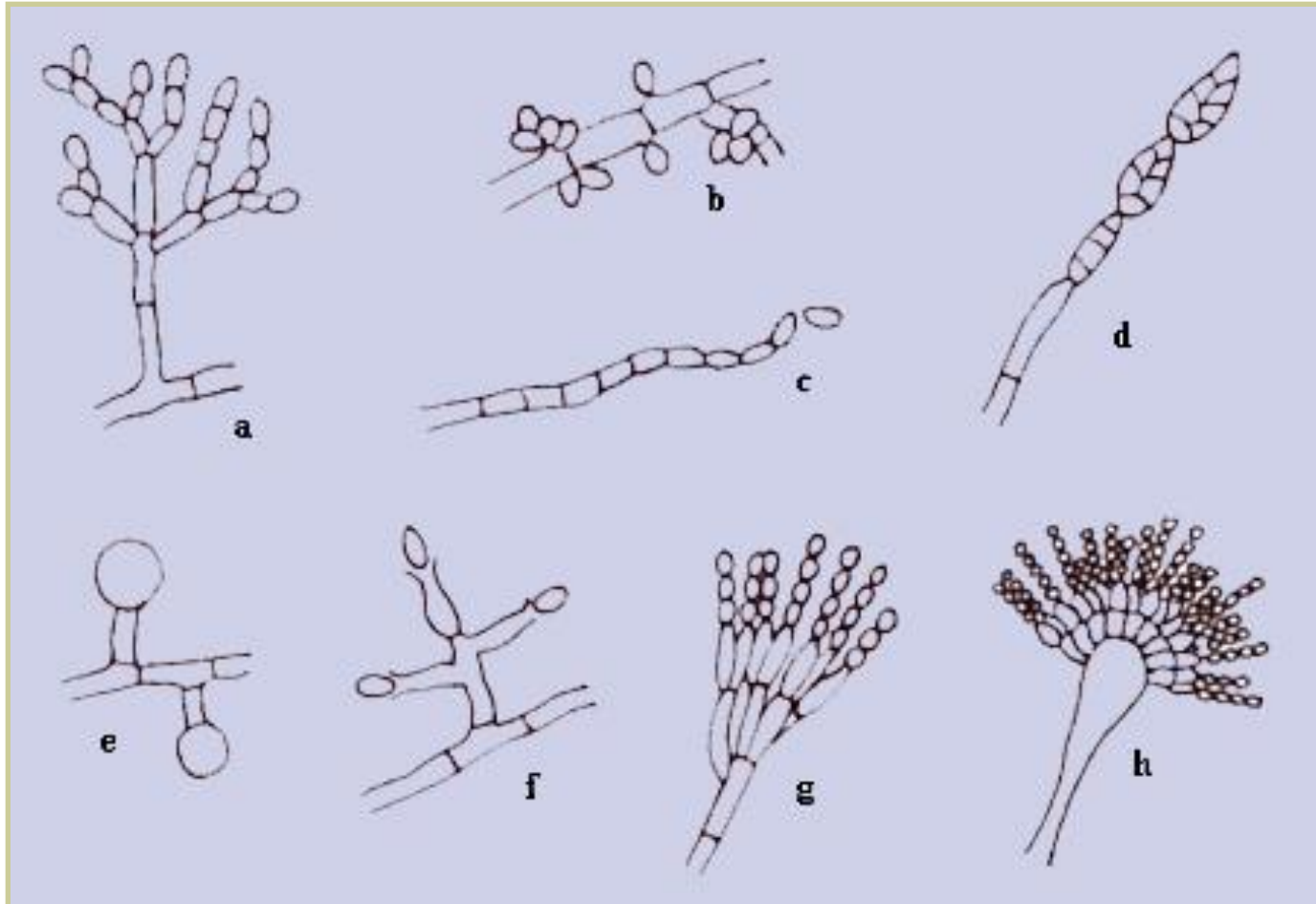


- Formação Tálica
Artroconídios

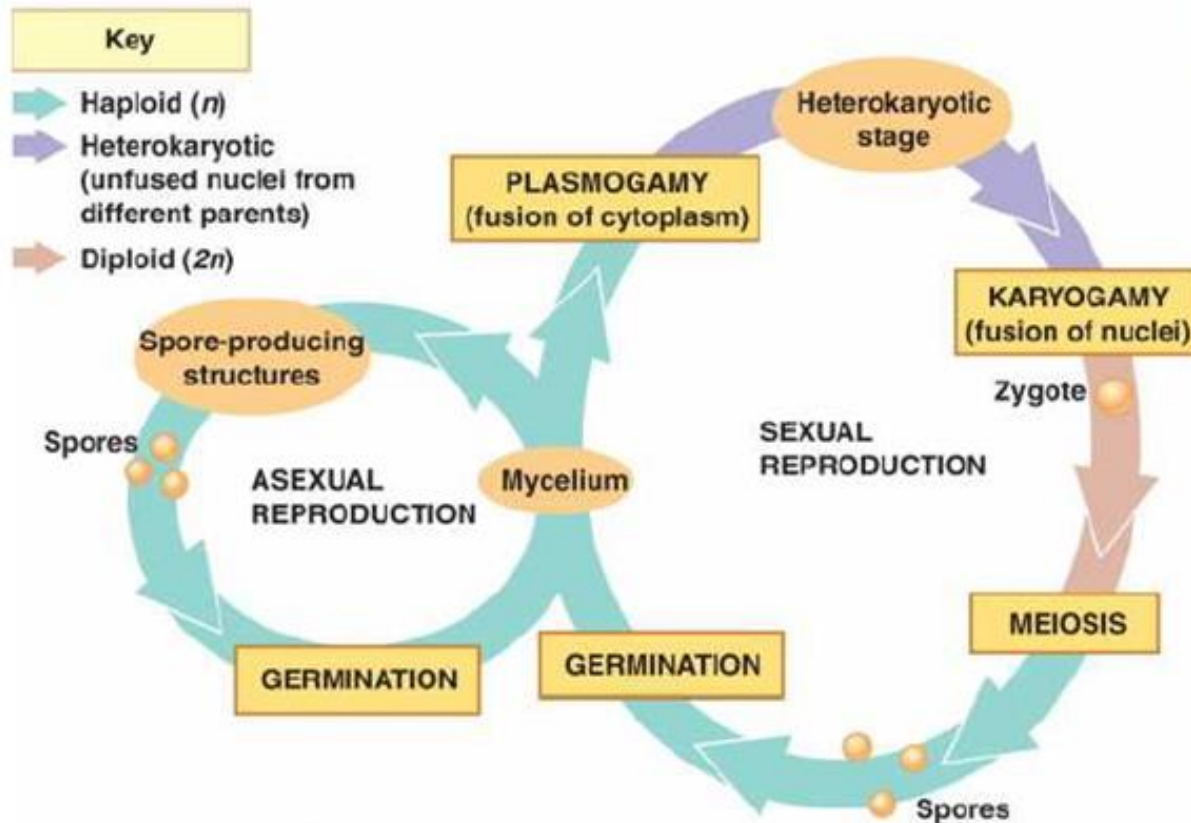


Fungos Filamentosos

Exemplos de Estruturas de reprodução assexuada



Ciclo de vida dos fungos simplificado



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

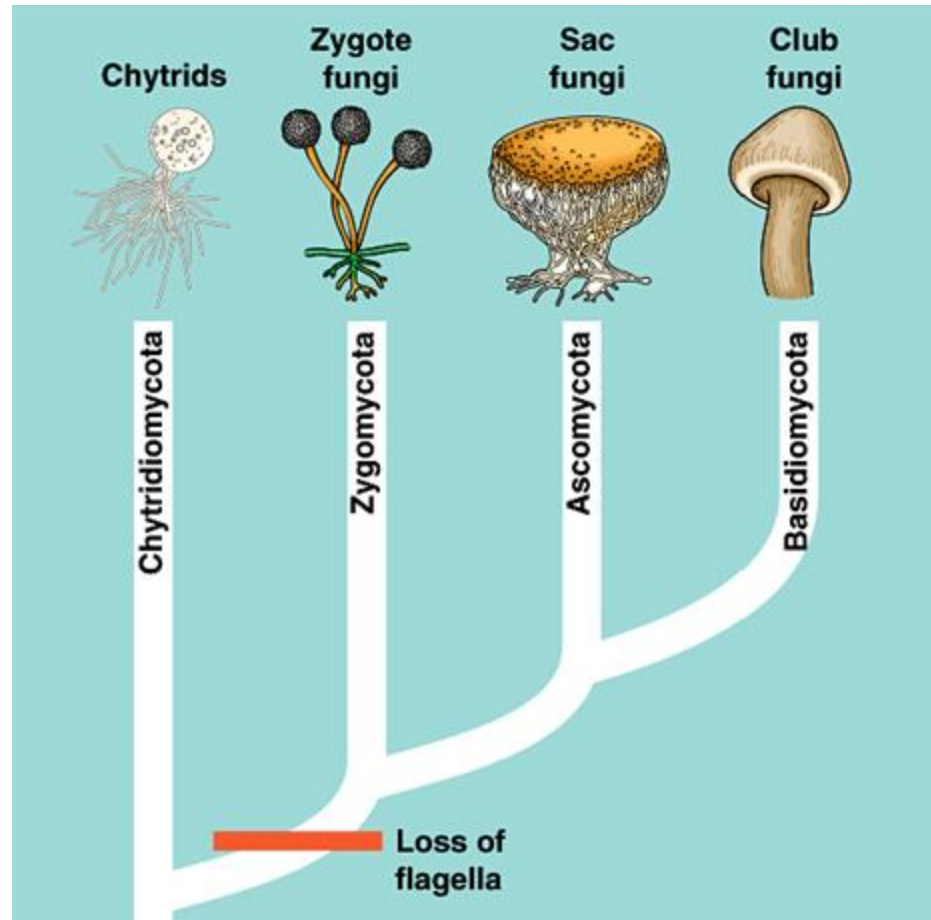
<http://apbiosemonefinalreview.pbworks.com/w/page/11980956/Fungi->

Reprodução sexuada

- Os fungos podem ser:
 - *Homotáticos* (forma auto-fértil)
 - *Heterotáticos* - em que a reprodução é regulada por genes específicos de 2 “mating type” (tipos sexuais) distintos.
- Reprodução sexuada dos fungos envolve 3 eventos, nem sempre sequenciais de imediato:
 - Plasmogamia (eventual situação *Dikarion*)
 - Cariogamia
 - Meiose

Morfologia

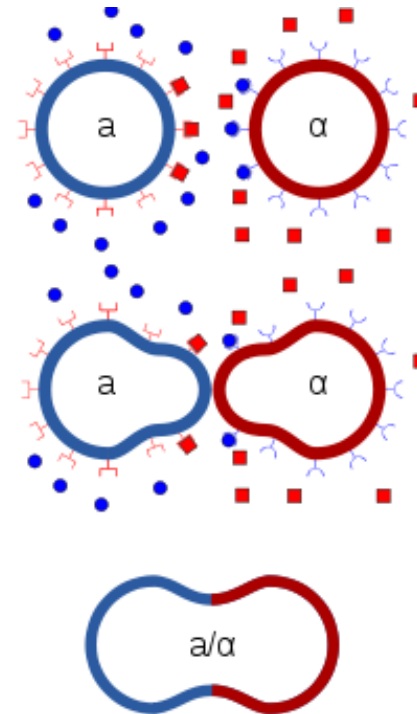
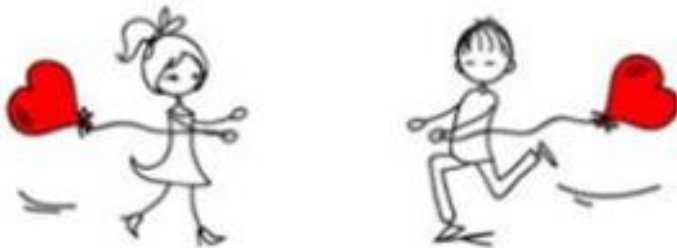
Reprodução sexuada



Ex.: Ascomycota

Ascósporos – Ascos - Ascocarpo

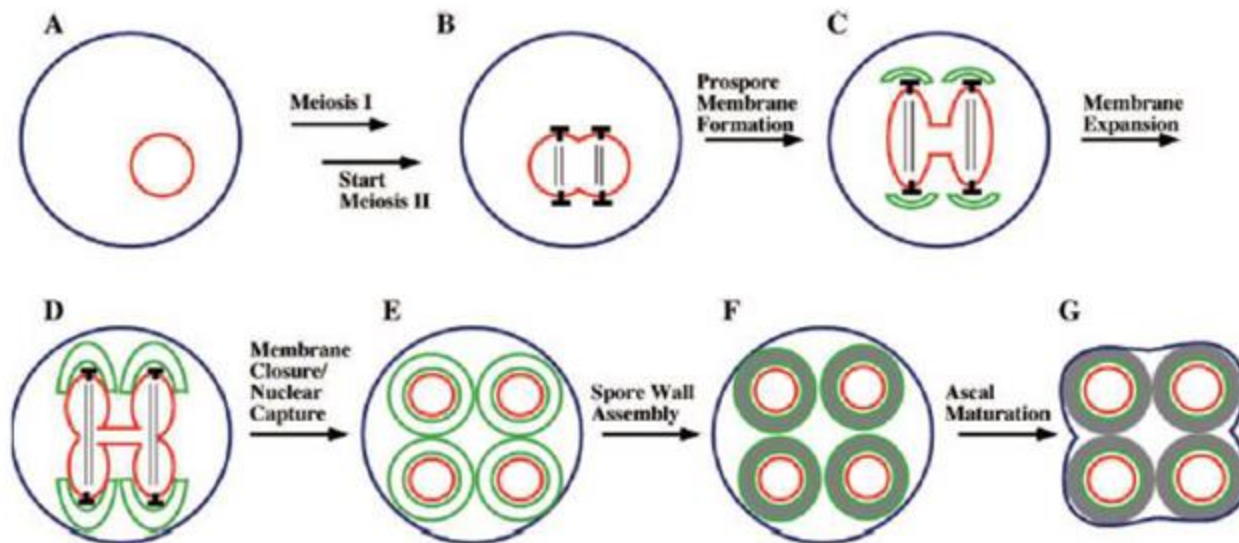
- Homotáticos e heterotáticos
- Possuem 2 tipos sexuais (a e α)
- Feromônios – fator α e a
- Plasmogamia, situação *dikarion*, Cariogamia, Meiose



Levedura

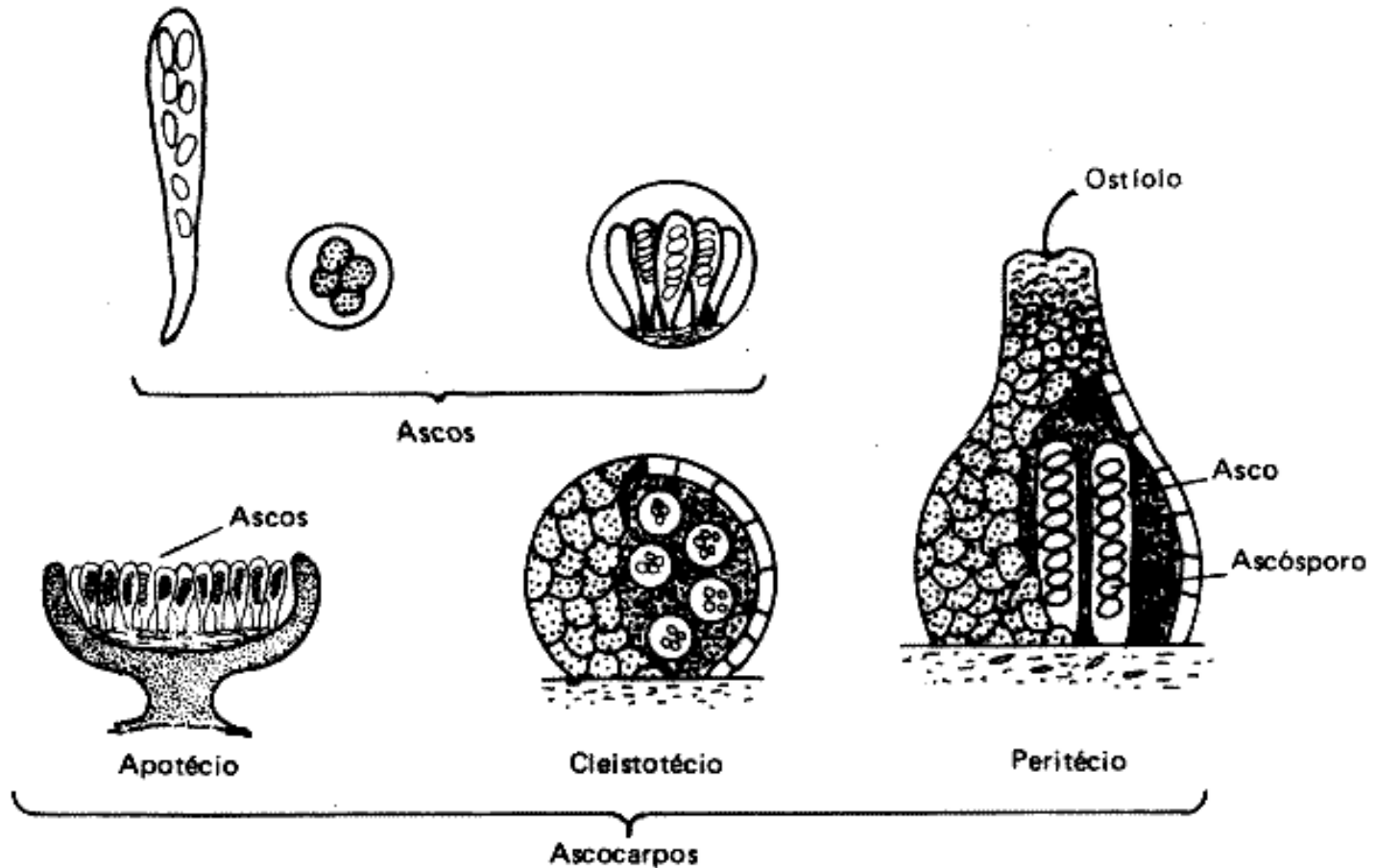
Saccharomyces cerevisiae

- Formação de Ascus e Ascosporos



MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS,
Dec. 2005, p. 565–584 Vol. 69, No. 4

Tipos de Ascos e Ascocarpos

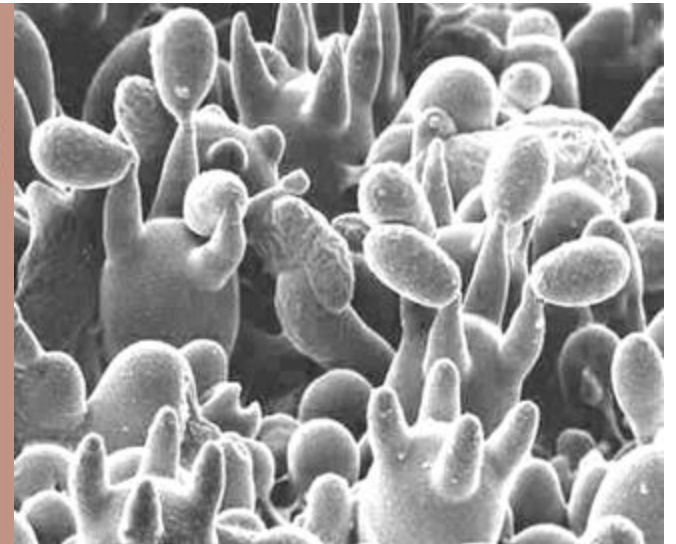
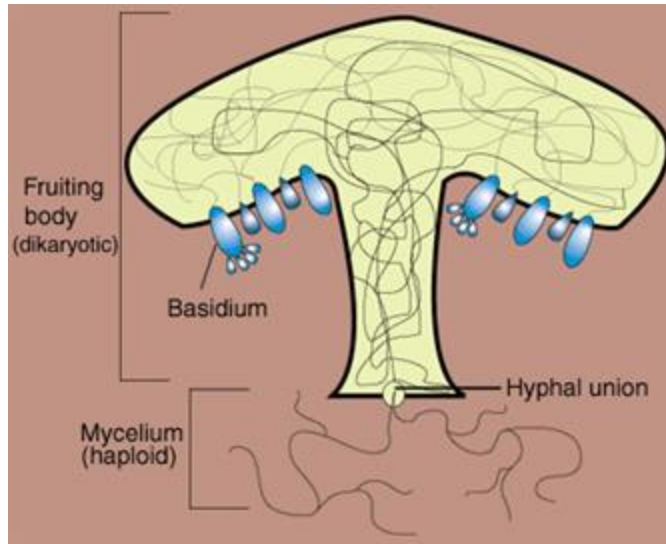


Basidiomycota

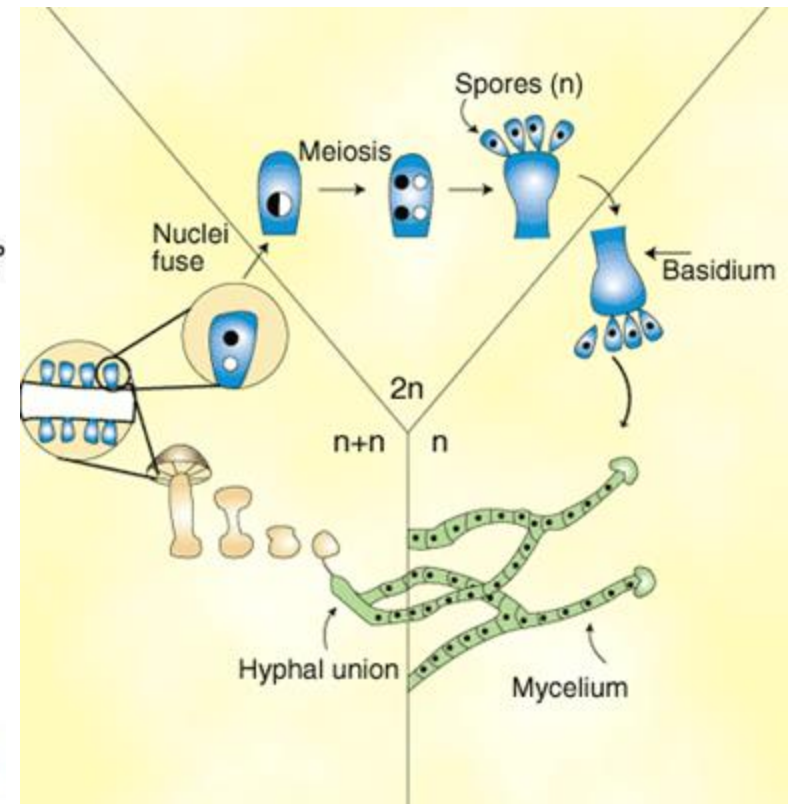
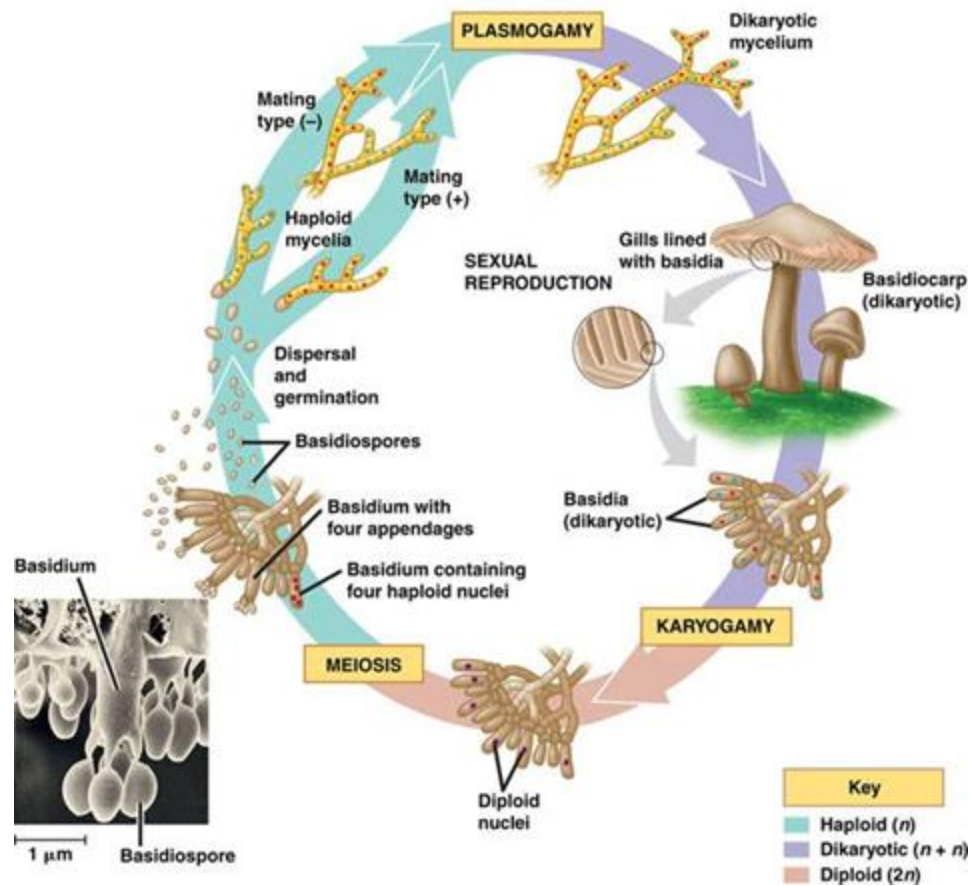
Reprodução sexuada - Basidiósporos

A maioria é heterotática

Plasmogamia, situação de *dikarion*, Cariogamia, Meiose



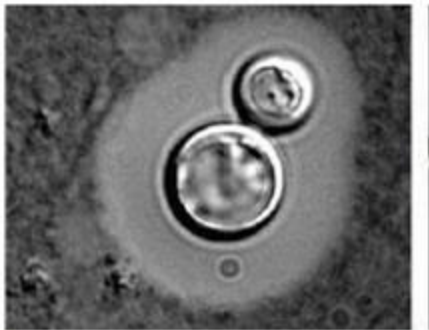
Micélio Septado



Peculiaridade da Taxonomia de Fungos

- 2 nomes para a mesma espécie de acordo com a fase do ciclo sexual.

Fase anamórfico
(assexuada)



Cryptococcus neoformans
Cryptococcus gattii

Fase teleomórfico
(sexuada)



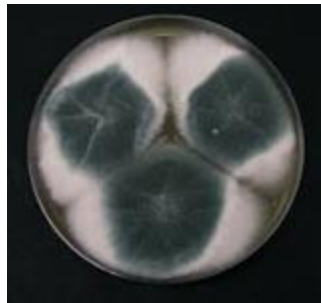
Filobasidiella neoformans
Filobasidiella bacillispora

One fungus = one name

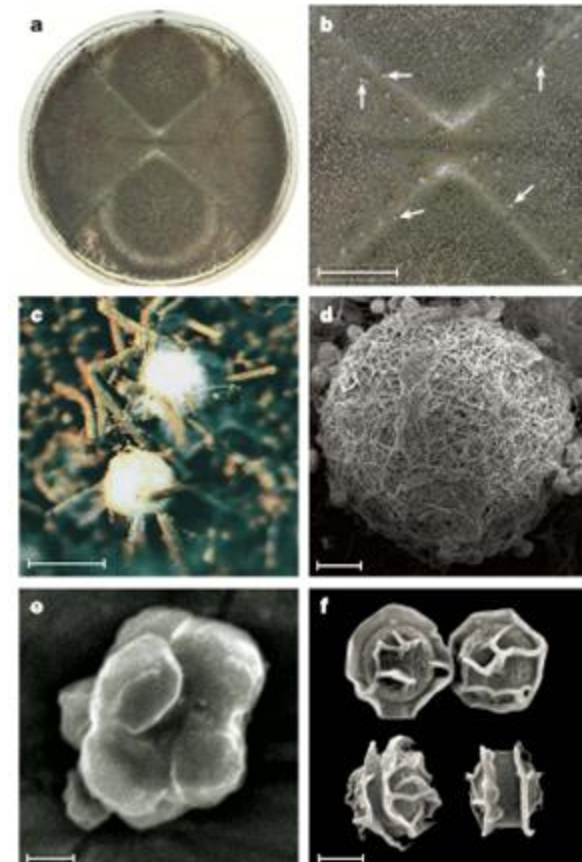
Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*

Céline M. O'Gorman^{1,2}, Hubert T. Fuller¹ & Paul S. Dyer²

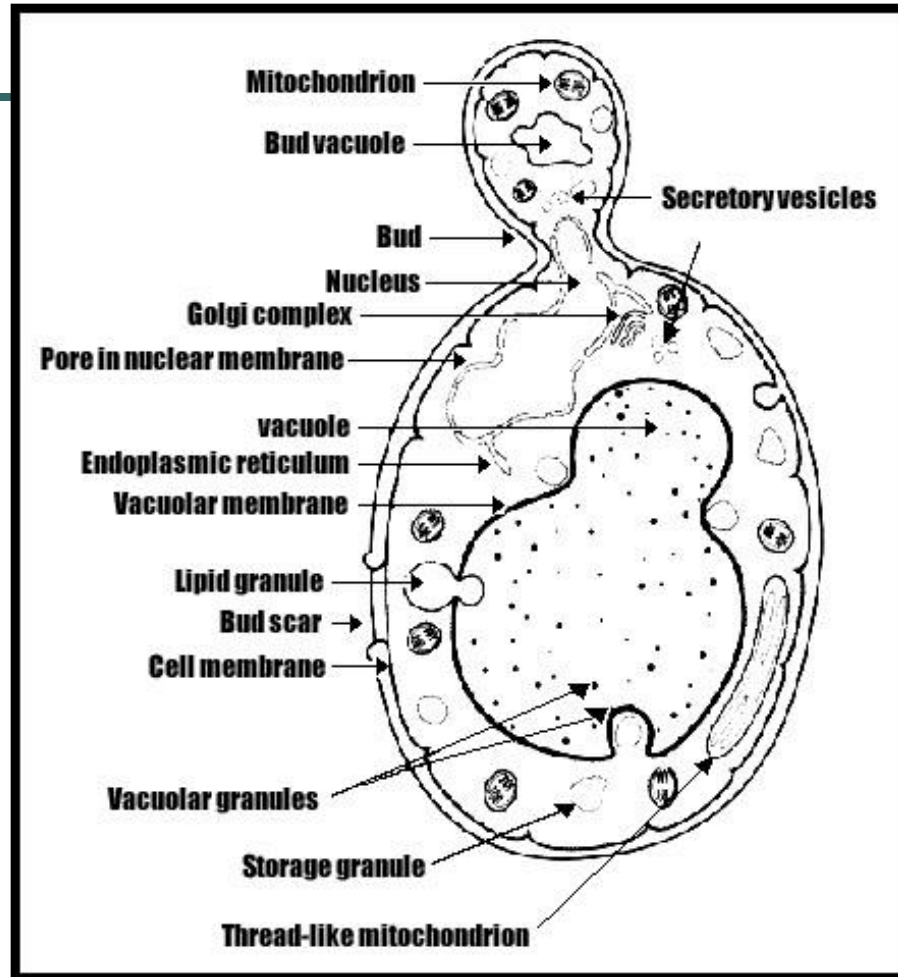
Aspergillus fumigatus



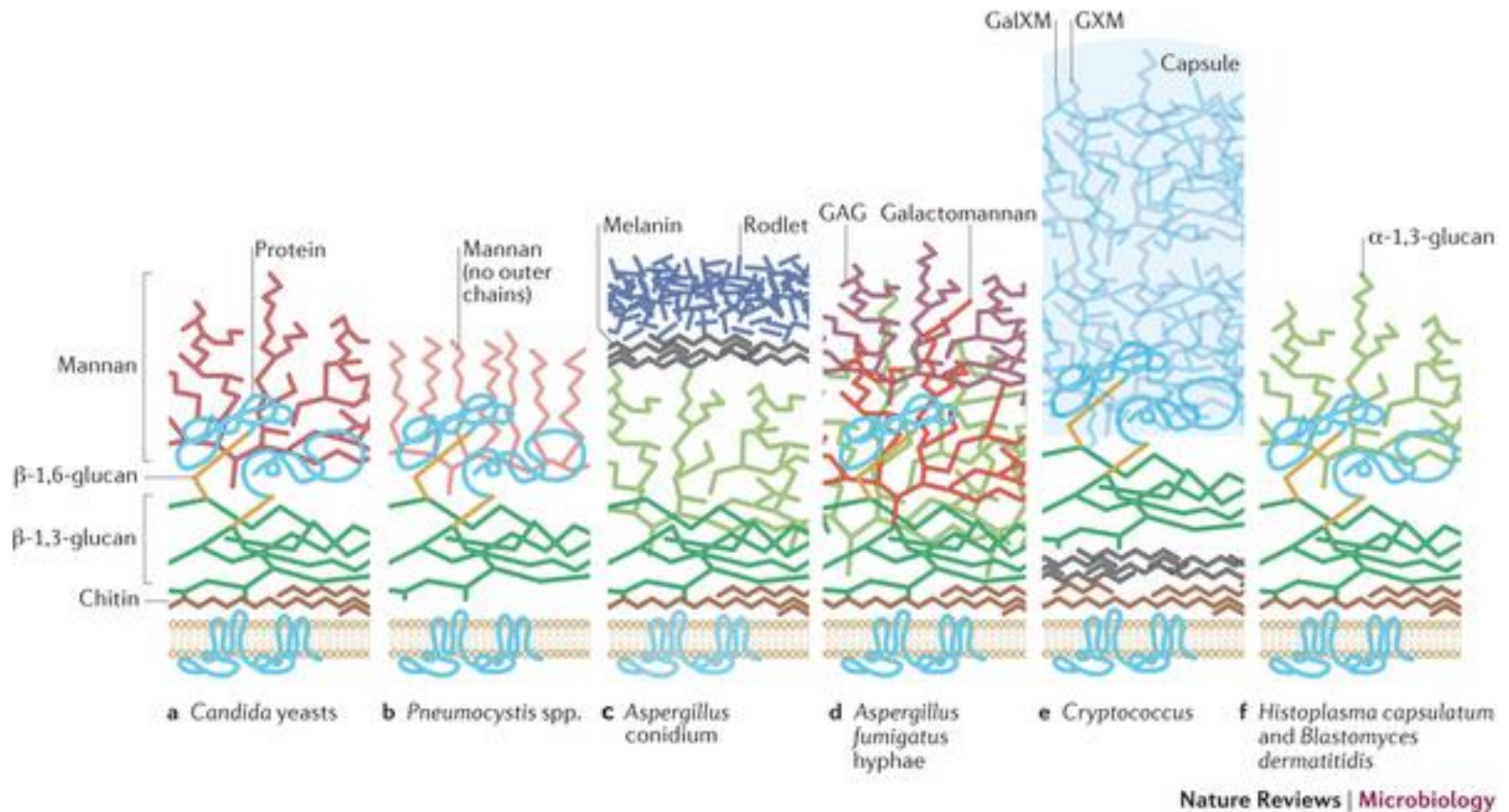
Neosartorya fumigata



A célula fúngica

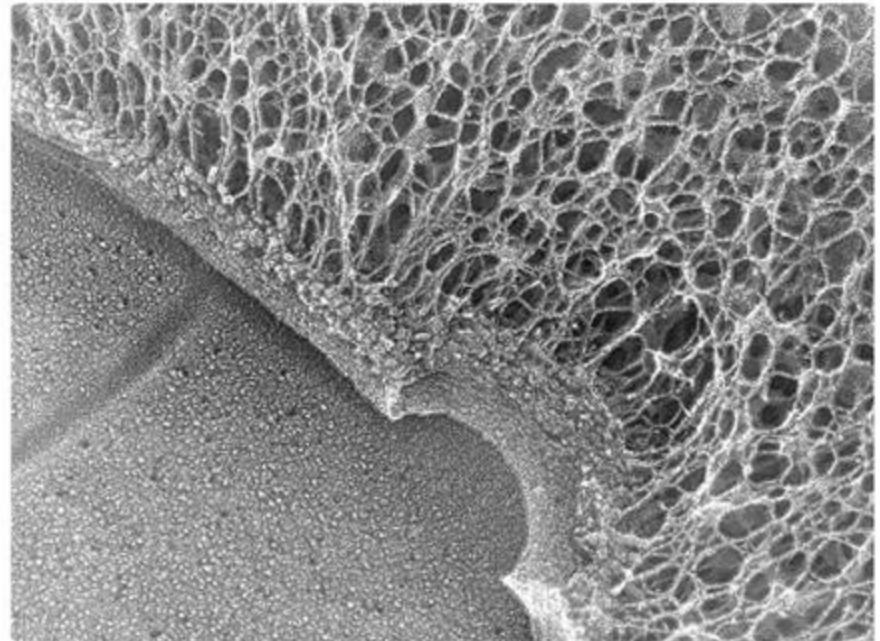
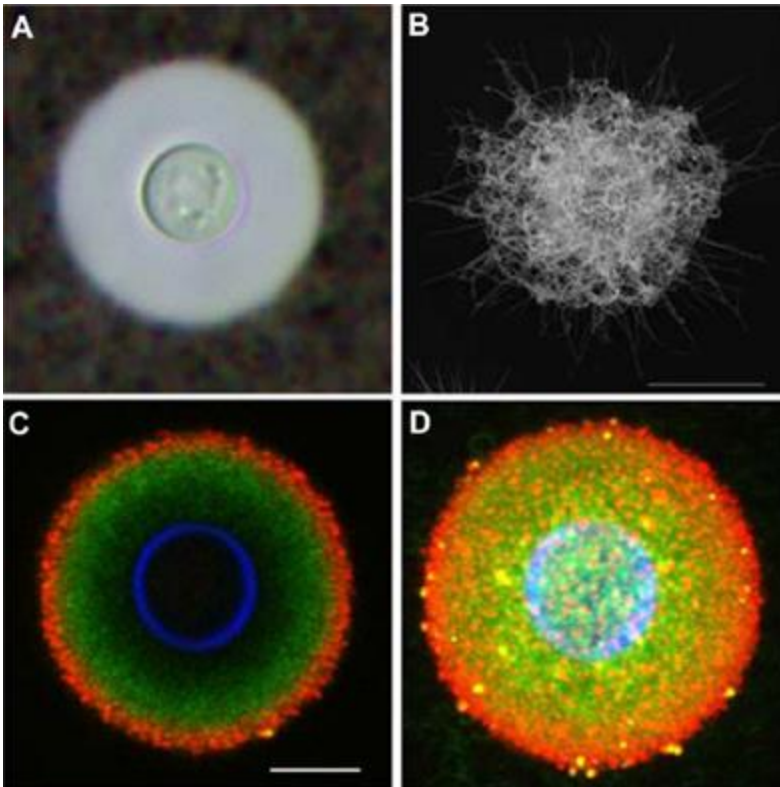


O envoltório



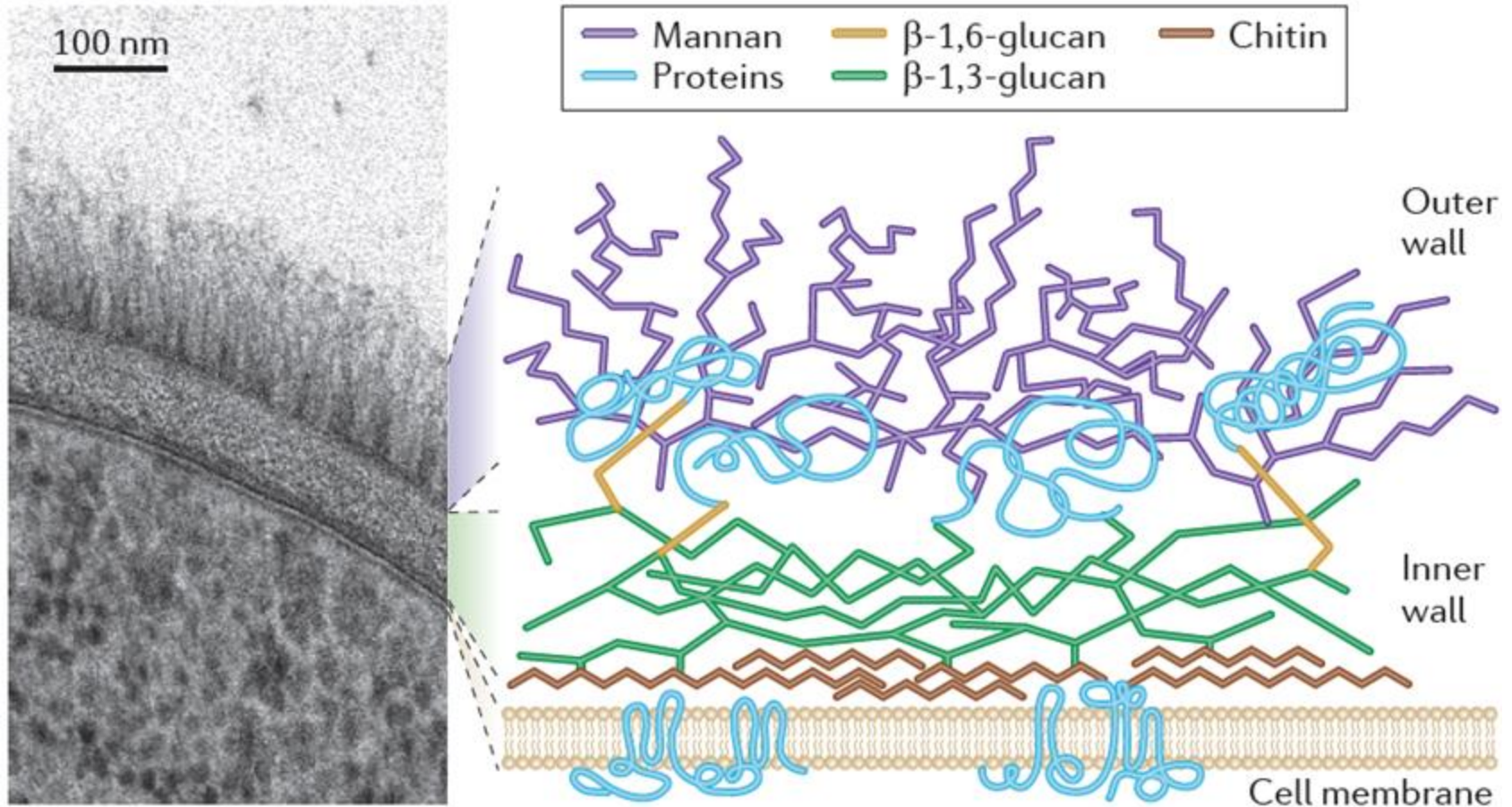
Erwig & Gow. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. Nature Reviews Microbiology 14, 163–176 (2016).

Cápsula polissacarídica – GXM GalXM



Cápsula polissacarídica de *C. neoformans* se liga a $\alpha(1,3)$ glucana

Parede celular

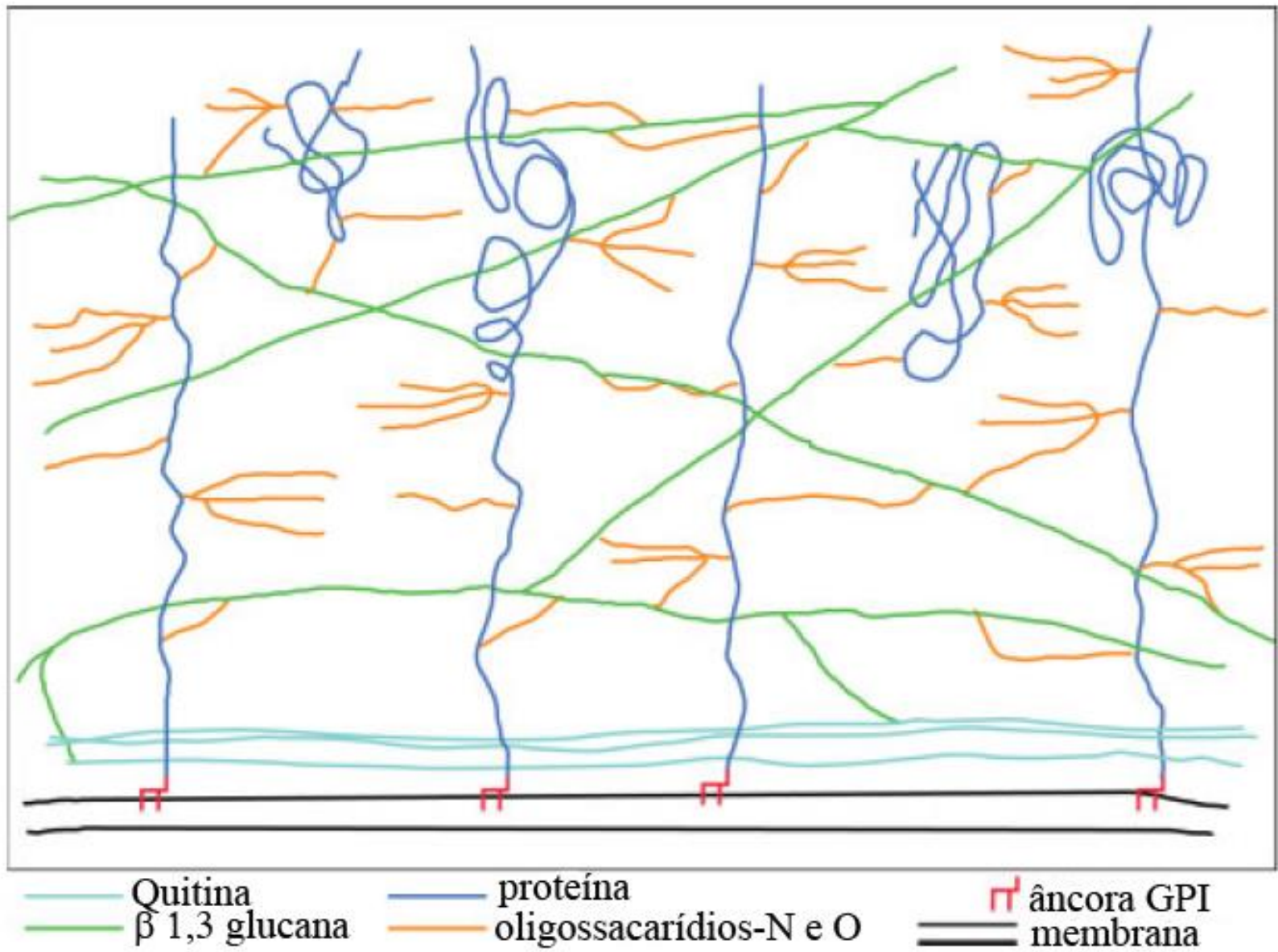


Quitina: 1 – 2%

Glucana: 50 – 60%

Proteína: 30 – 50%

} peso seco da parede

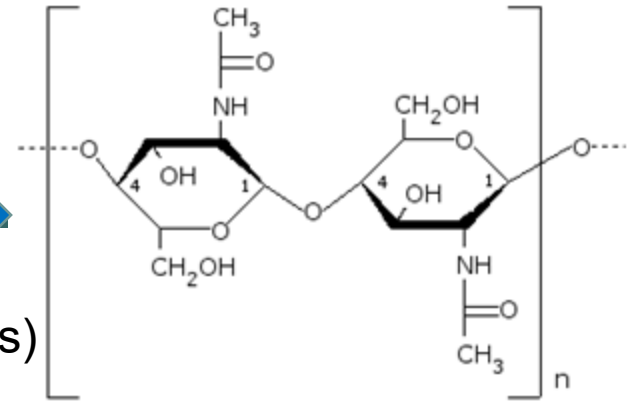


Síntese de quitina

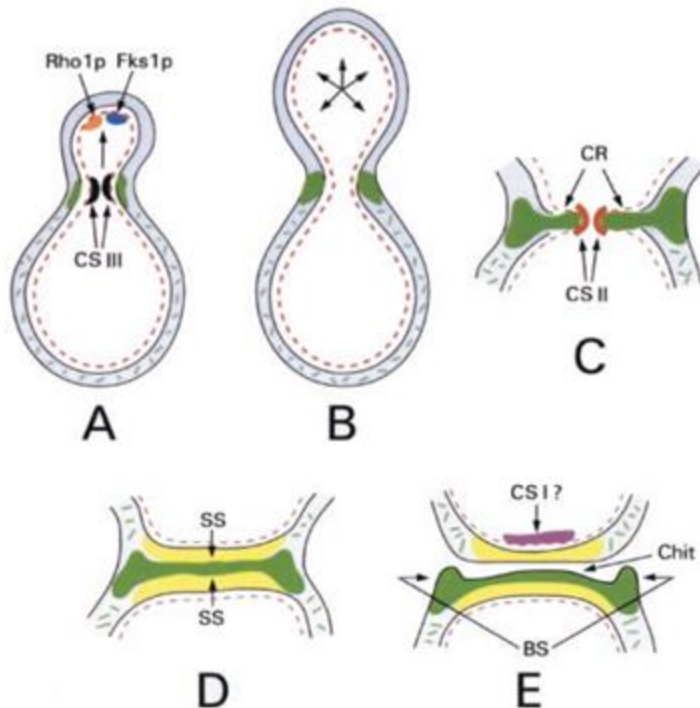
N-acetilglucosamina

UDP

Quitina sintase (Chs)



Quitina (β1,4)

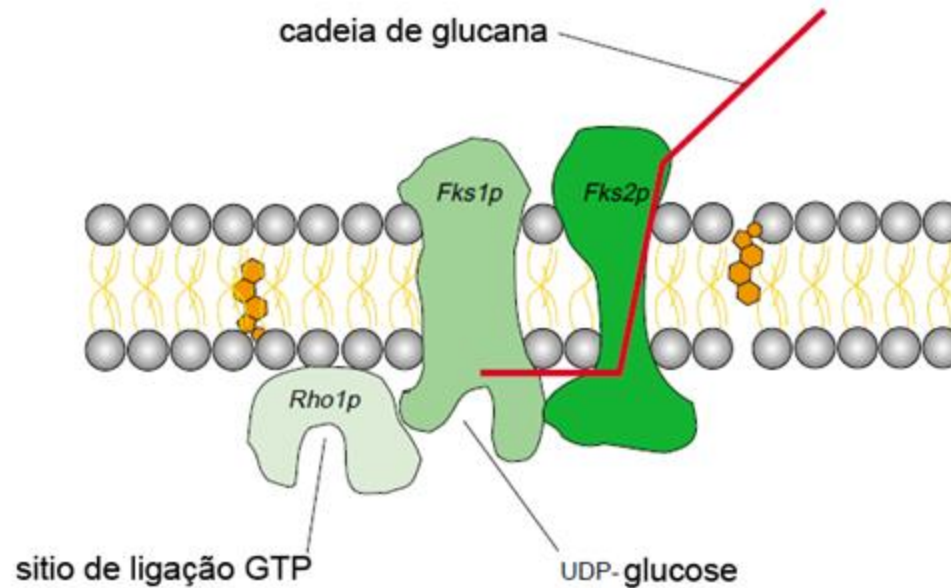


Chs1 – reparo da parede celular e citocinese

Chs2 – formação do septo

Chs3 – responsável pela síntese de 80-90% de quitina de parede celular

Síntese de glucana



β 1,3 glucana – 65-90%

β 1,6

β 1,4

α 1,3

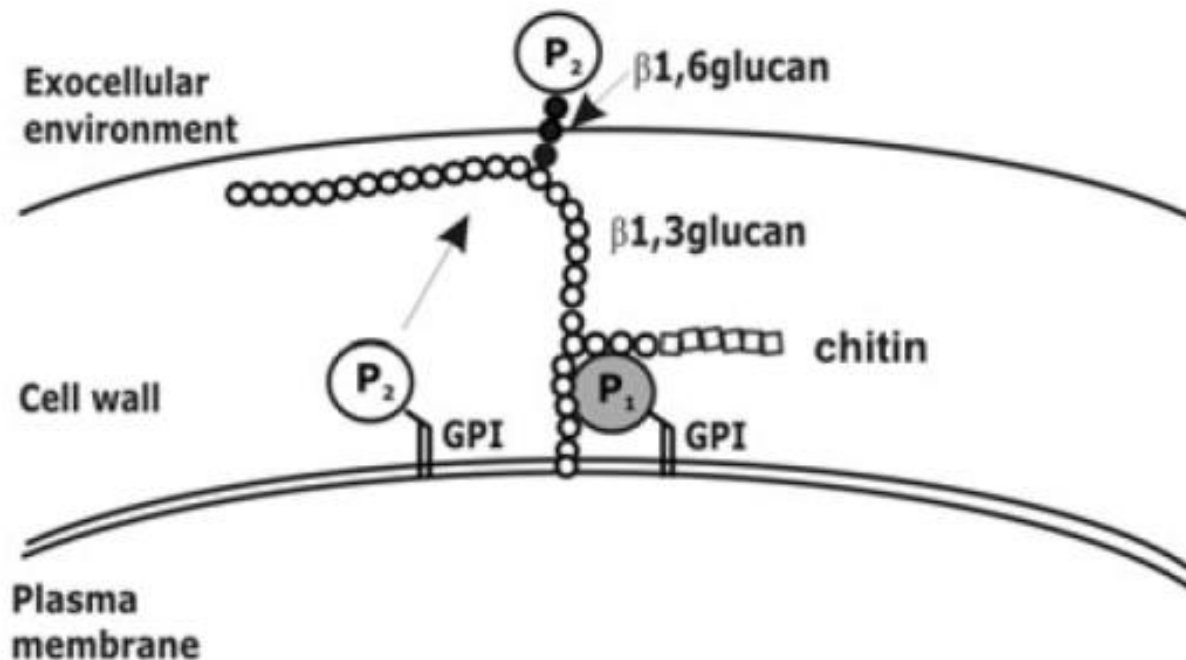
α 1,4

Se ligam a cadeia β
1,3 glucana

Glicoproteínas

Leveduras: 30-50%

Filamentosos: 20-30%



GPI = glicosil fosfatidil inositol (fosfoglicerídio ligado na porção C-terminal de uma proteica na reação pós-transcricional)

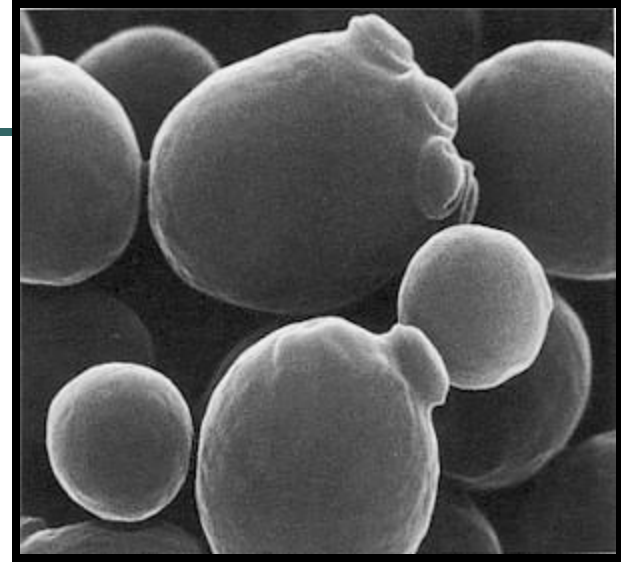
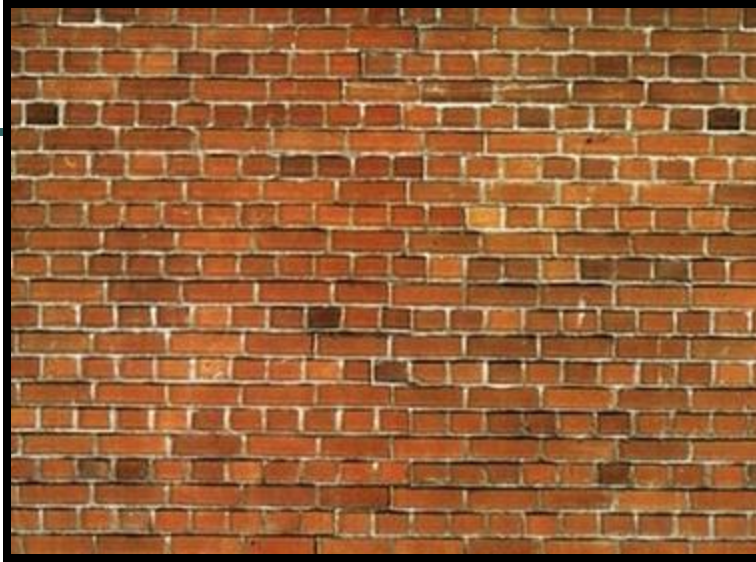
Proteínas ➡ Funções celulares

Enzimas
associadas a
parede celular
(WAEs)

Síntese e remodelagem
de parede celular
Quitinases, glucanases,
peptídeos,

Proteínas
estruturais
(pequenas e com
domínio funcional)

Migração celular,
adesão, biofilme
“Fusão e mating”



~~Exoesqueleto inerte~~

Estrutura dinâmica

Proteção celular
Manutenção da forma

Remodelagem da parede celular:

Crescimento da célula

Brotamento

Ramificação da hifa

Trânsito de moléculas

Trafego de vesículas

Proteção contra choques osmóticos, raios UV, enzimas

Interações da parede com o meio

Importante no estabelecimento da infecção (adesão)

Composição da parede celular é dependente de:

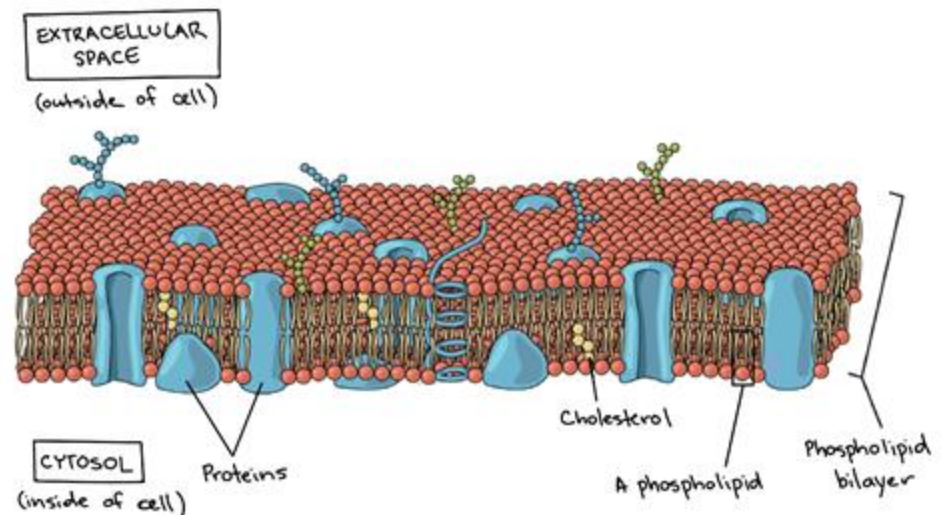


Membrana citoplasmática

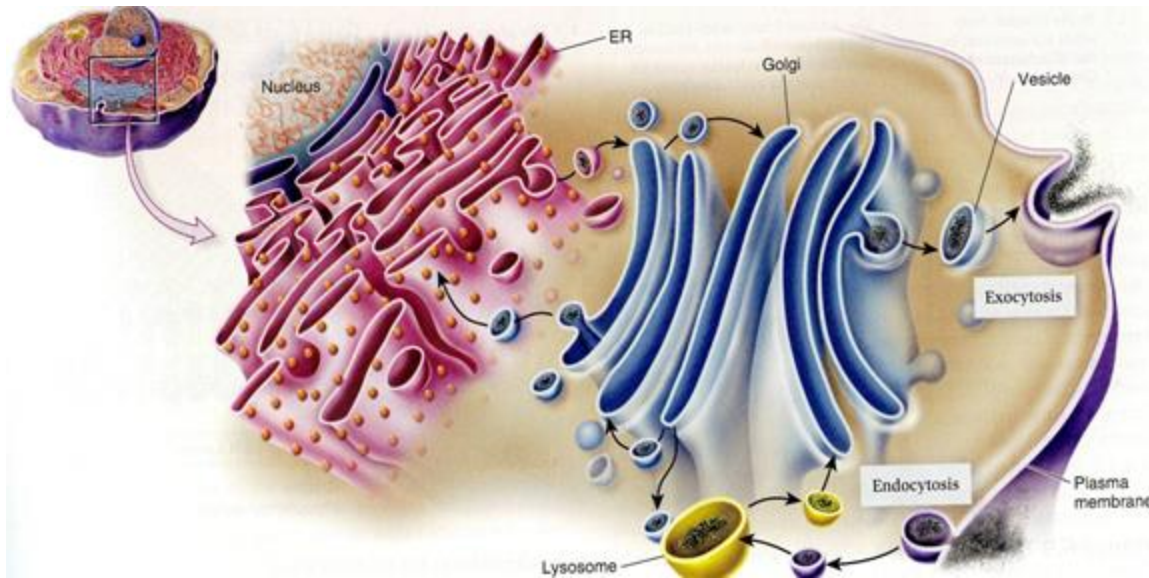
- Bicamada lipídica com proteínas transmembranas associadas,
- Controla entrada de nutrientes/substâncias (permeabilidade seletiva)
- Ancoram importantes enzimas: glucana sintase e quitina sintase
- Transdução de sinais do meio externo para a célula

Ergosterol como principal esterol de membrana de fungos

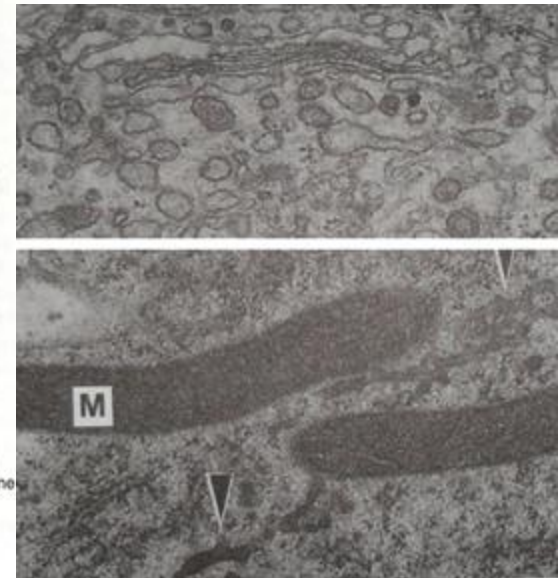
Vital para a sobrevivência dos fungos – principal alvo dos agentes antifúngicos



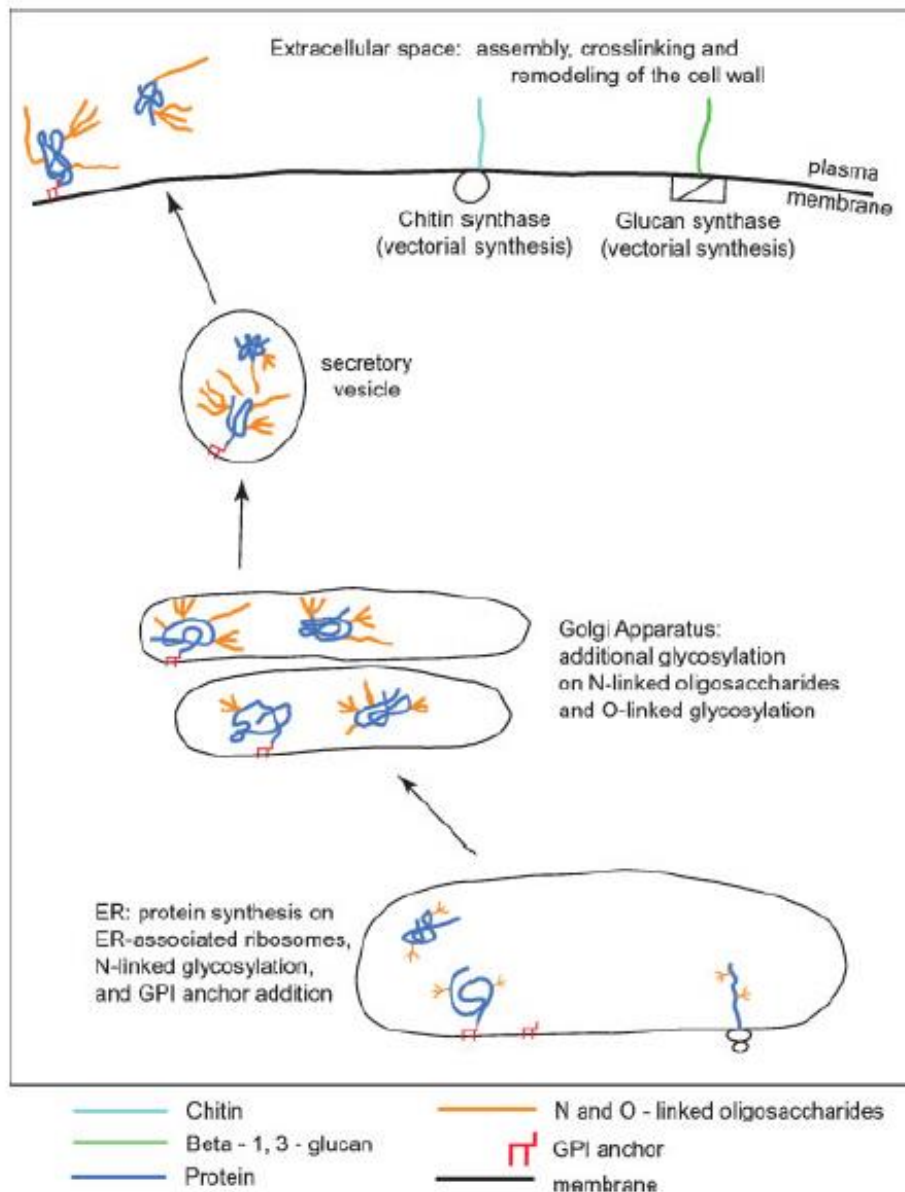
Sistema secretório – Retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi (CG) e vesículas (v)



CG mamífero



CG Fungo



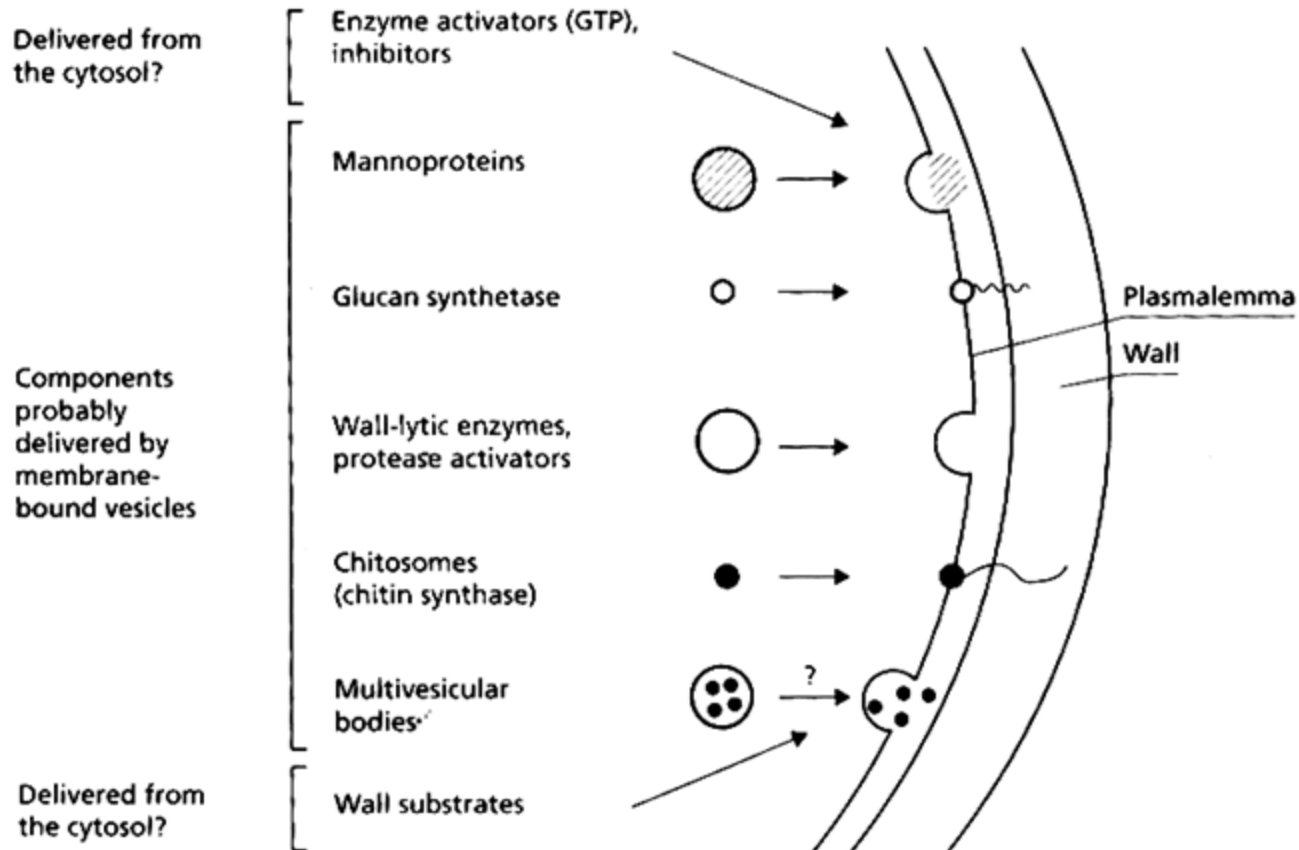
Sistema secretório

Ex. síntese das enzimas responsáveis para síntese de parede celular de fungo

Bowman SM & Free SJ.
BioEssays, 28: 799-808, 2006.

Mecanismos de secreção

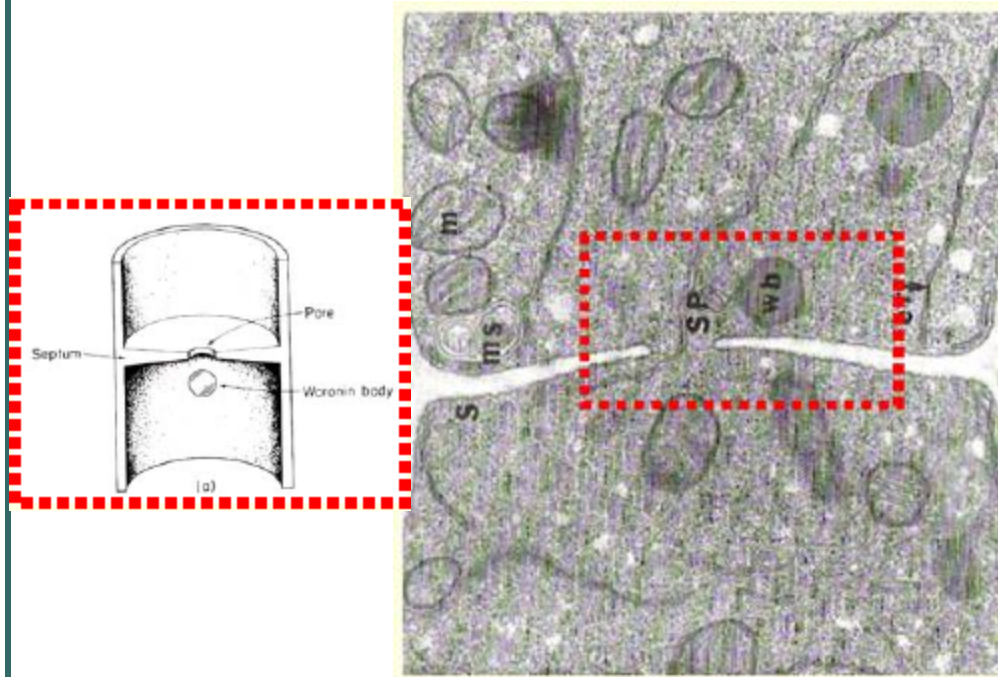
Ex. pectinases, celulasas, proteinases, quitina sintase, glucana sintase e outras proteínas



Tipos de Poros - fungos septados

Ascomicetos

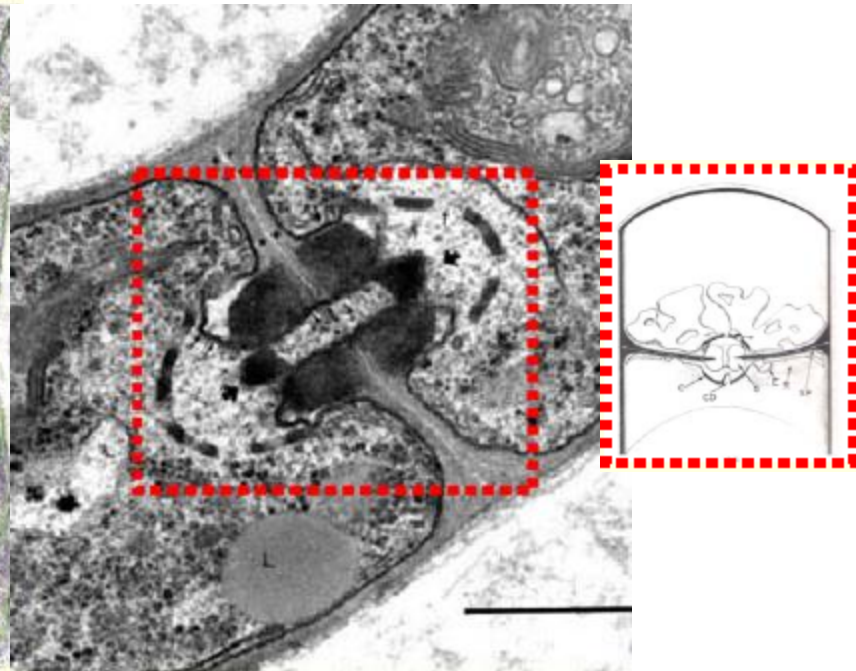
Poros simples/corpos de woronin



Diâmetro: 50-500 nm

Basidiomicetos

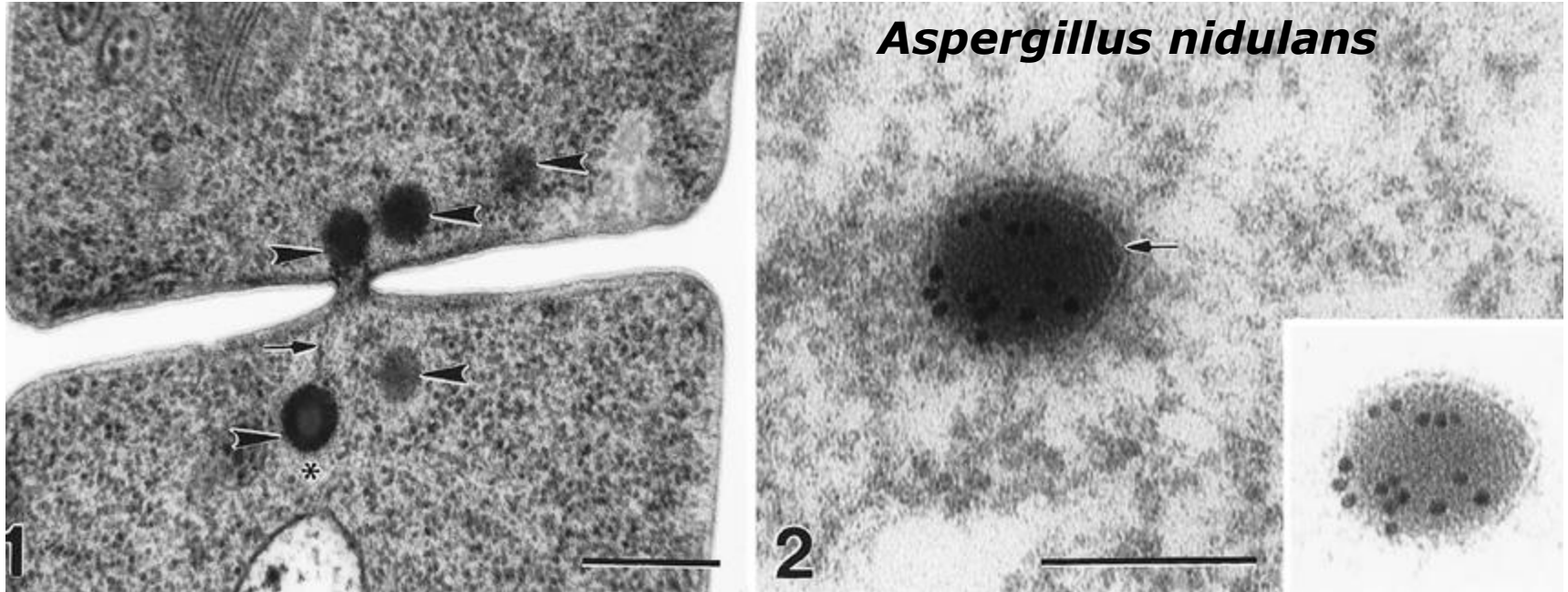
Doliporos/parentossomos



Diâmetro: 100-150 nm

Septo - Ascomycota

Poros simples/corpos de wöronin



- Diâmetro: 0,05-0,5 μm ,
- Permite a passagem de substâncias/organelas/núcleo de um citoplasma para outra célula
- corpo de wöronin – derivado do peroxissomo (Gene : HEX1)
- Mutante não possui corpo de wöronin, morte na ruptura do micélio
- Quando uma hifa é danificada, o corpo de wöronin sela o poro, impedindo que a hifa adjacente seja danificada

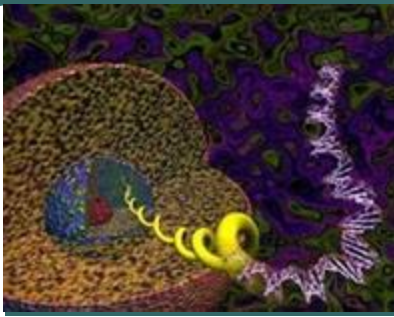
Septo - Basidiomycota

DOLIPORO/Parentossomos (RE)

- Diâmetro: 100-150 nm
- Passagem somente de substâncias/vesículas de um citoplasma para o outro
- É complexo:
 - poro circundado por 2 orlas composto por glucana anamorfo,
 - parentossomo (RE)– que impede o trânsito de organelas



Agaricus bisporus

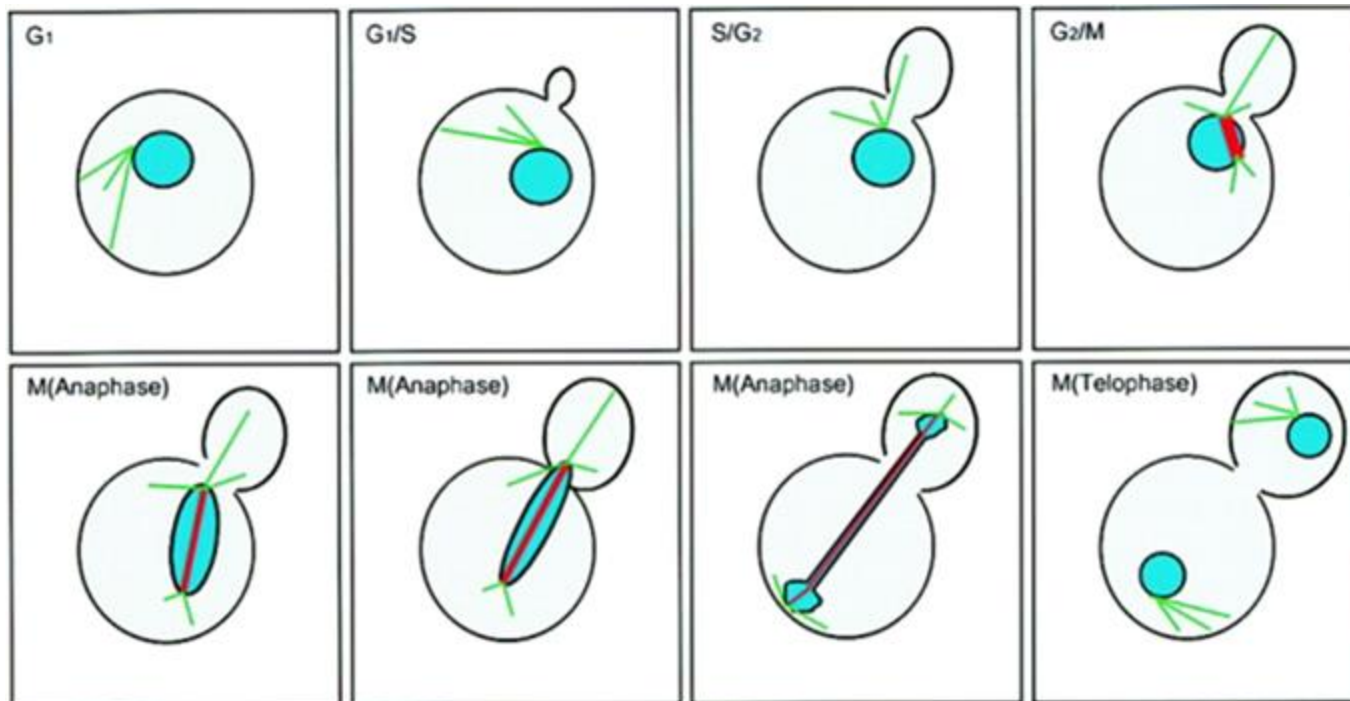


Núcleo

- 1-2 μm diâmetro
- Dupla membrana nuclear – eucariotos
- Núcleo e nucléolos não desaparecem durante a divisão celular, para evitar que o material genético se espalhe pelo citoplasma, já que o fungo pode possuir outro núcleo
- Não está certo de que há uma placa de metáfase, o que há são **centros organizadores de microtúbulos**, para a separação dos cromossomos:
 - Ascomicetos – anel ou disco
 - Basidiomicetos – 2 glóbulos terminais conectados por uma ponte

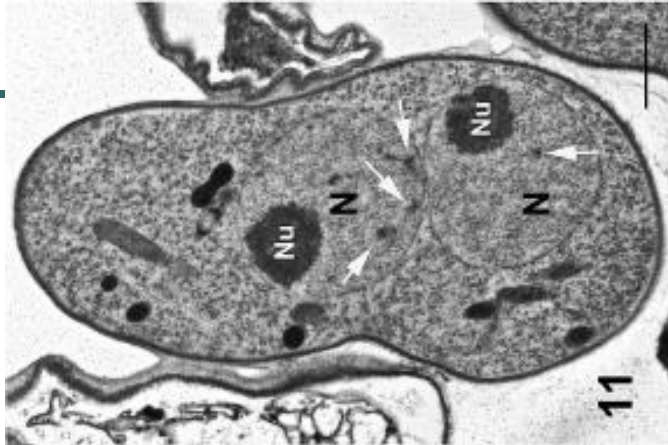
Divisão do núcleo em leveduras (Ex. Ascomiceto)

- 1. Membrana nuclear não se desfaz
 - 2. Microtúbulos astrais - Deslocamento do núcleo
-
- 3. “Spindle Pole Body” (SPB) (centros organizadores de microtúbulos) – separação dos cromossomos
 - 4. Não forma placa de metáfase



Divisão do núcleo

Basideo de *Auriscalpium vulgare*



Metáfase I

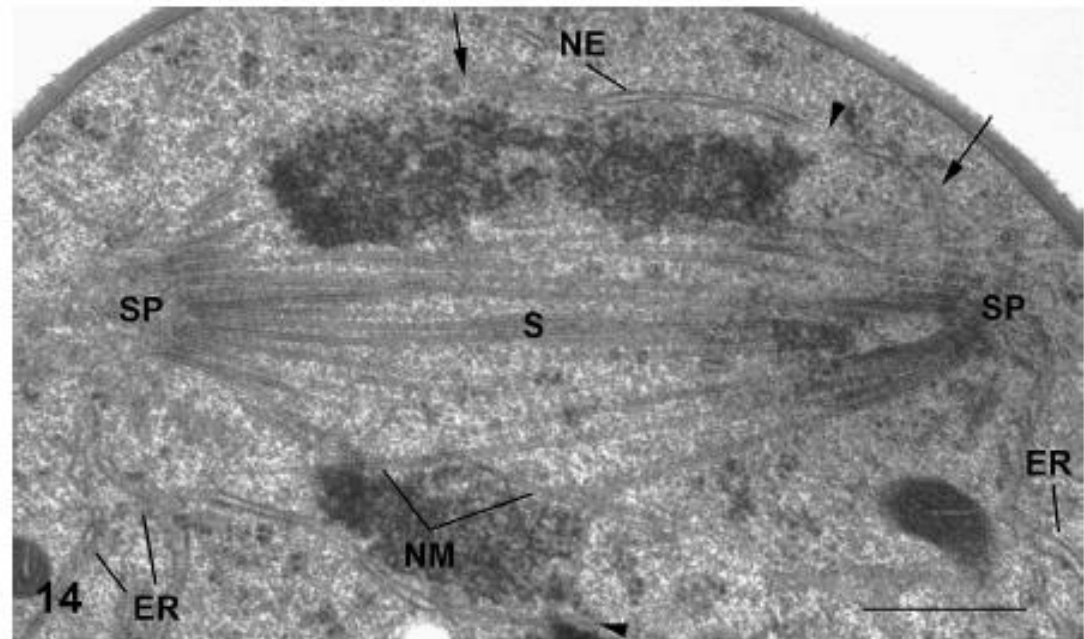
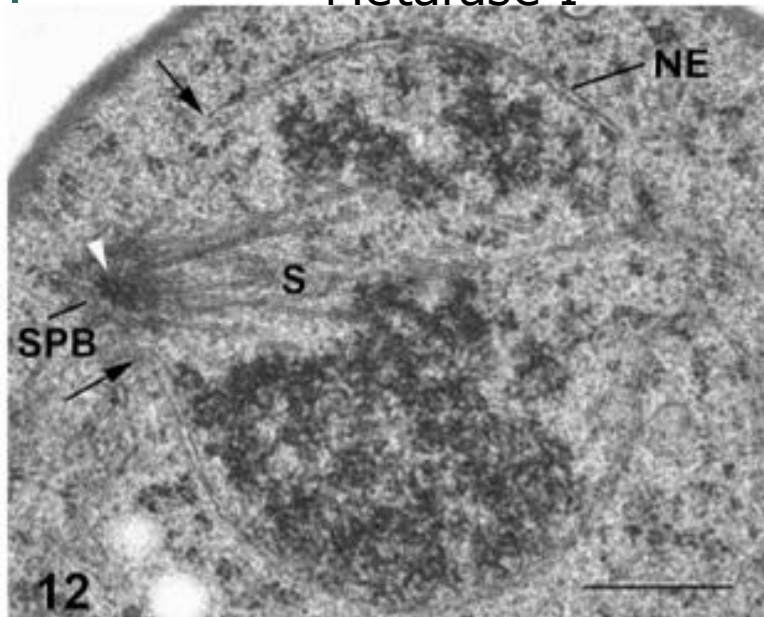
SPB = SP – “spindle pole body” ou
placa mitótica

S – fuso mitótico

NE – envelope nuclear

ER – retículo endoplasmático

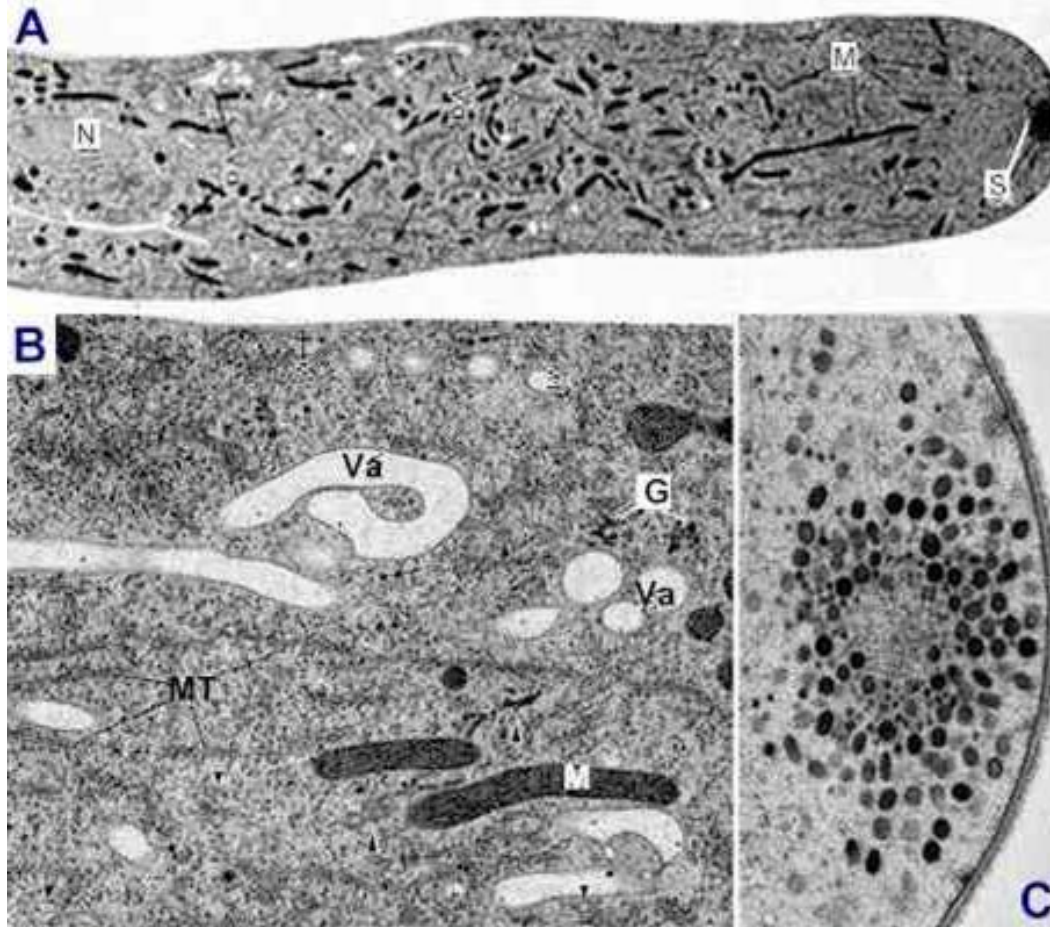
NM – microtúbulos



Meta-anáfase I

Spitzenkörper

Corpo apical



Sclerotium rolfsii, (MET substituição à frio)
(Roberson & Fuller, 1988).

Fig. A. Extremidade da hifa com **Spitzenkörper** (S).

Fig. B. Parte madura da hifa - Presença de mitocôndrias (M), vacúolos tubulares (Va), complexo de Golgi (G) e microtúbulos (MT).

Fig. C **Spitzenkörper**

-
- É o centro organizador da extensão da hifa e responsável pela morfogênese
 - Quando o crescimento é cessado, a estrutura desaparece
 - É variável entre as espécies. Ascomicetos e Basidiomicetos são evidentes
 - Uma organela constituída por vários tipos de vesículas, microfilamentos, microtúbulos e ribossomos
 - Vesículas podem conter constituintes da membrana plasmática e da parede celular, substâncias que serão secretadas
 - Faz parte dos processos de Exocitose e Endocitose
 - Spitzenkörper apical – crescimento do micélio
 - Spitzenkörper satélite – ramificação do micélio

FUNGOS PATOGÊNICOS DE INTERESSE MÉDICO E VETERINÁRIO

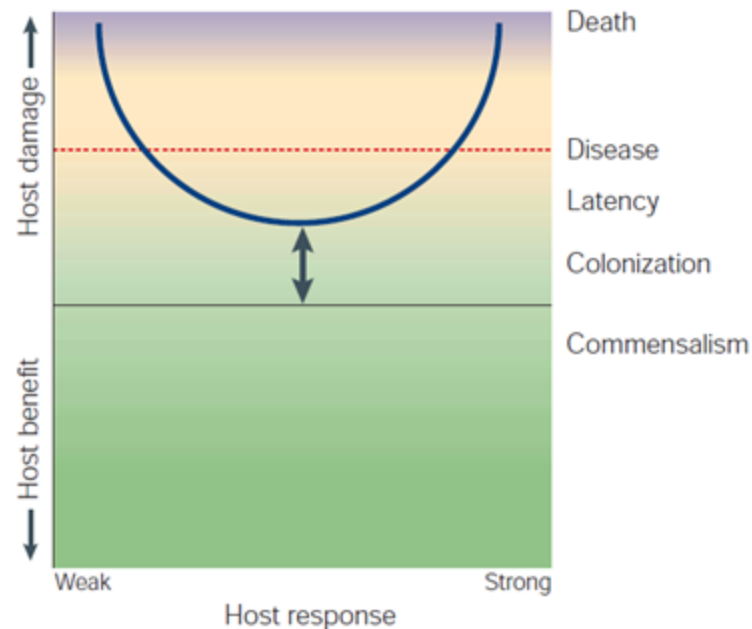
Table 3. WHO fungal priority pathogens list

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

CURVA GERAL DE DANO-RESPOSTA DA PATOGÊNESE

Box 1 | Basic tenets of the damage-response framework

- Microbial pathogenesis is an outcome of an interaction between a host and a microorganism.
- The host-relevant outcome of the host–microorganism interaction is determined by the amount of damage to the host.
- Host damage can result from microbial factors and/or the host response.



Casadevall & Pirofski. Nature Reviews Microbiology, 1:17-24, 2004.

Alguns fatores de virulência de fungos

- **Dimorfismo fúngico**
- Biofilme
- Aderência (glicoproteínas/proteínas de superfície)
- Produção de enzimas: proteinases, fosfolipases, lipases, esterases, hemolisinas, urease, e outras
- Sideróforos
- Toxinas
- Termotolerância
- Cápsula polissacarídica
- Produção de melanina
- Mecanismos de evasão do sistema imunológico

FATORES DE VIRULÊNCIA

Postulado de Koch – Versão Molecular

REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES • VOL. 10, SUPPLEMENT 2 • JULY-AUGUST 1988
© 1988 by The University of Chicago. All rights reserved. 0162-0886/88/1004-0051\$02.00

Molecular Koch's Postulates Applied to Microbial Pathogenicity

Stanley Falkow

*From the Department of Microbiology, and Immunology,
Stanford University, Stanford, California*

1. Os genes envolvidos na virulência são encontrados em microrganismo patogênico ou são ausentes ou inativos em não-patogênicos.
2. Perda funcional desses genes resulta na geração de microrganismos avirulentos.
3. A introdução de tais genes leva a recuperação da virulência.
4. Os genes são expressos durante a infecção.

O que induz o dimorfismo?

Box 2 | Morphology-inducing conditions

Yeast cells

- Cell density $>10^6$ cells ml^{-1}
- Growth below 30°C
- pH 4.0

Pseudohyphae

- pH 6.0, 35°C
- Nitrogen-limited growth on solid medium (SLAD)

Hyphae

- Serum, $>34^\circ\text{C}$
- Lees medium, 37°C
- pH 7.0, 37°C

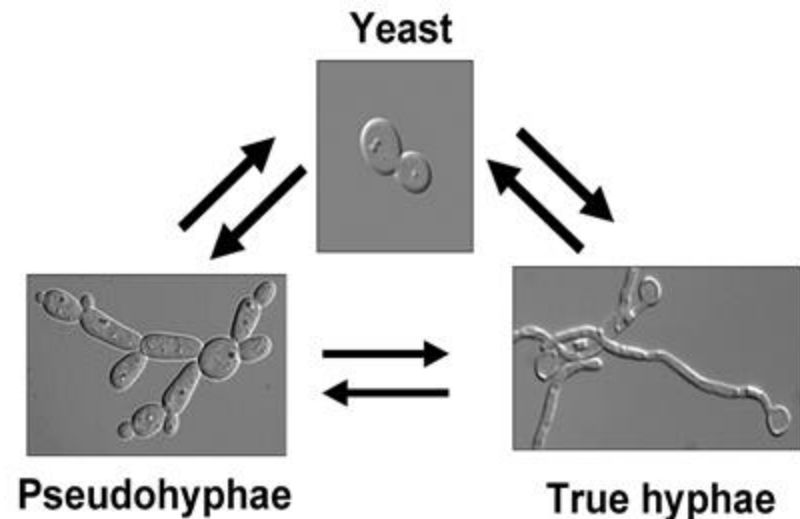
Other filament-inducing conditions

- Spider medium
- Engulfment by macrophages
- Mouse kidneys
- Growth in agar matrix
- Iron deprivation
- Anoxia
- *n*-acetyl glucosamine



Condições ambientais

Candida albicans



Berman & Sudbery. Nature Reviews Genetics, 3:918-930, 2002.

Table 1. Examples of morphology-dependent activities of *Candida albicans* during infection.

Fungal activity	Morphology		Ref.
	Yeast	Hyphae	
Expression of hyphal-associated genes	Under certain conditions	Per definition	[19,20,26,28]
Adhesion	Moderate	Strong	[40,86]
Invasion			[36,39,40]
• Induced endocytosis	Low	Moderate	
• Active penetration	None	High	
Damage	None	High	[40,86]
Dissemination	Within the bloodstream	Across epithelial barriers; interepithelial	[18,22,36,46]
Iron acquisition via ferritin	Not described	Via Als3	[43]
Escape from phagocytes	Not described	Yes	[19,47,60]

Als3p

adesão, invasão, formação de biofilme e aquisição de ferro

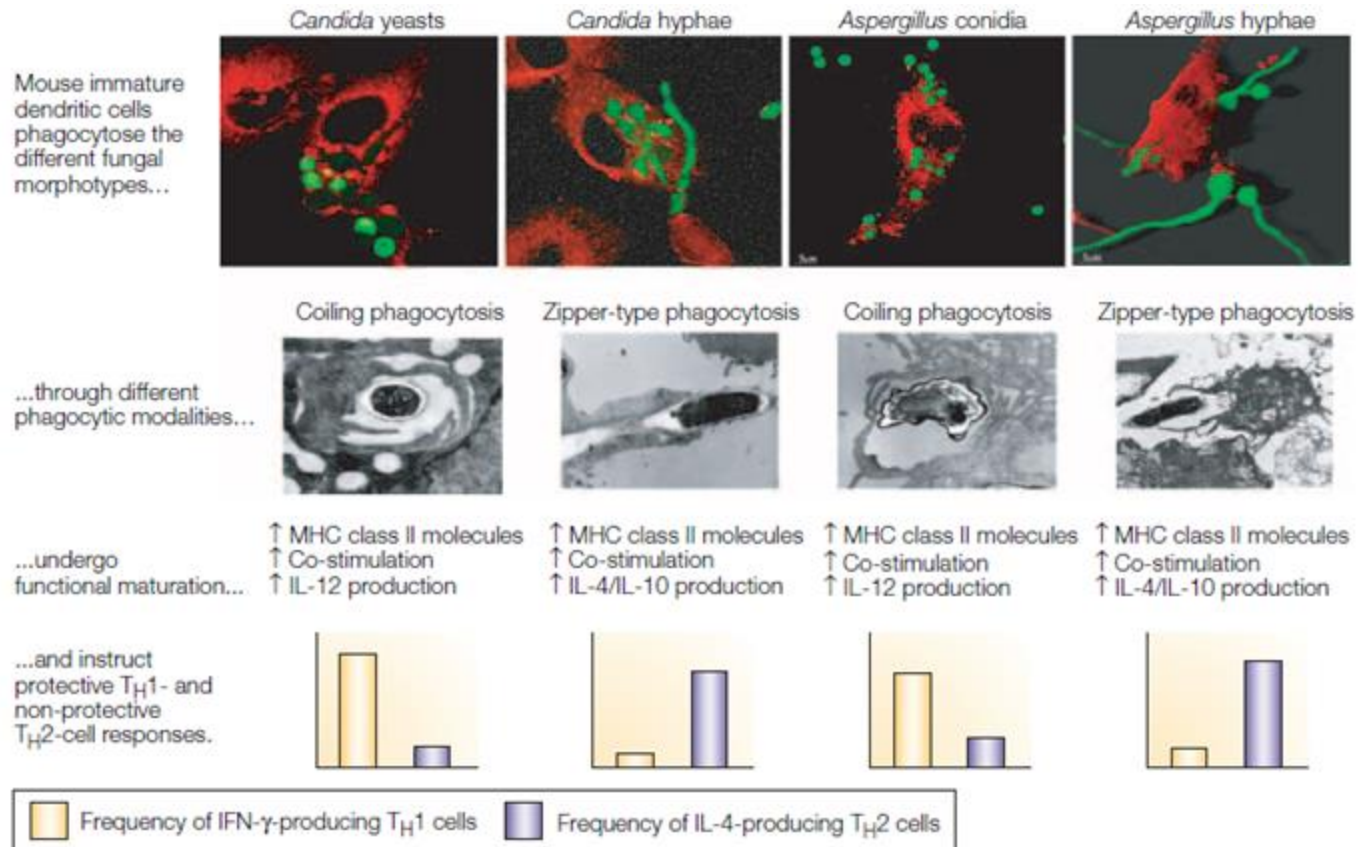
Desenvolvimento de vacinas e anticorpos monoclonais – Estudos clínicos fase 1/2

Vacina NDV-3 – proteína recombinante da porção n-terminal de Als3p

Anticorpos monoclonais – vários!

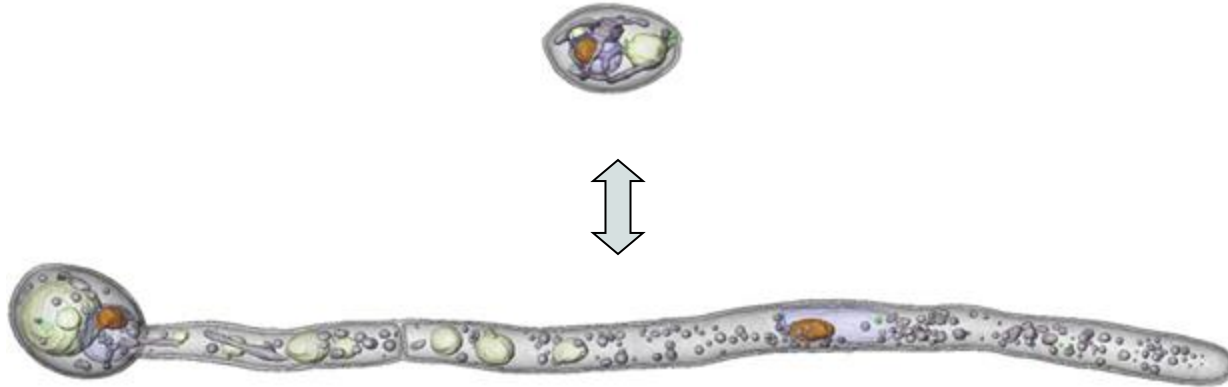
Sui et al. Vaccine 35(43): 5786-5793, 2017.

Sobrevivência intracelular



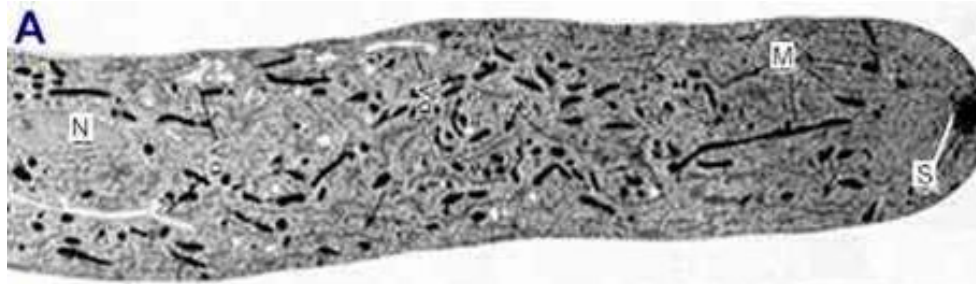
Romani. Nature Reviews Immunology, 4:1-13, 2004.

O que controla o dimorfismo?

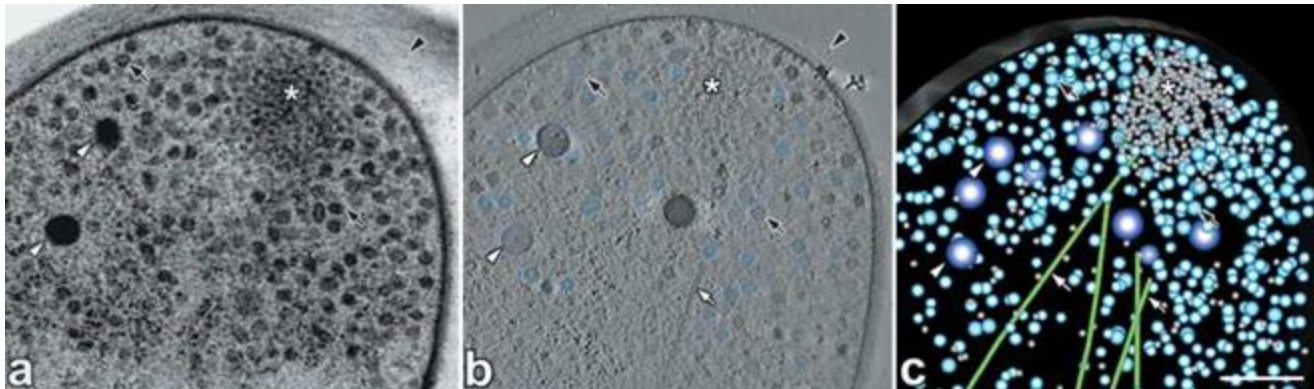


Aspectos celulares

Como ocorre? → Spitzenkörper



<http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/apical.htm>



Corpúsculo de Woronin, Vesículas, Microtúbulos e Spitzenkörper

Hohmann-Marriott et al. *New Phytologist*, **172**: 208–220, 2006.

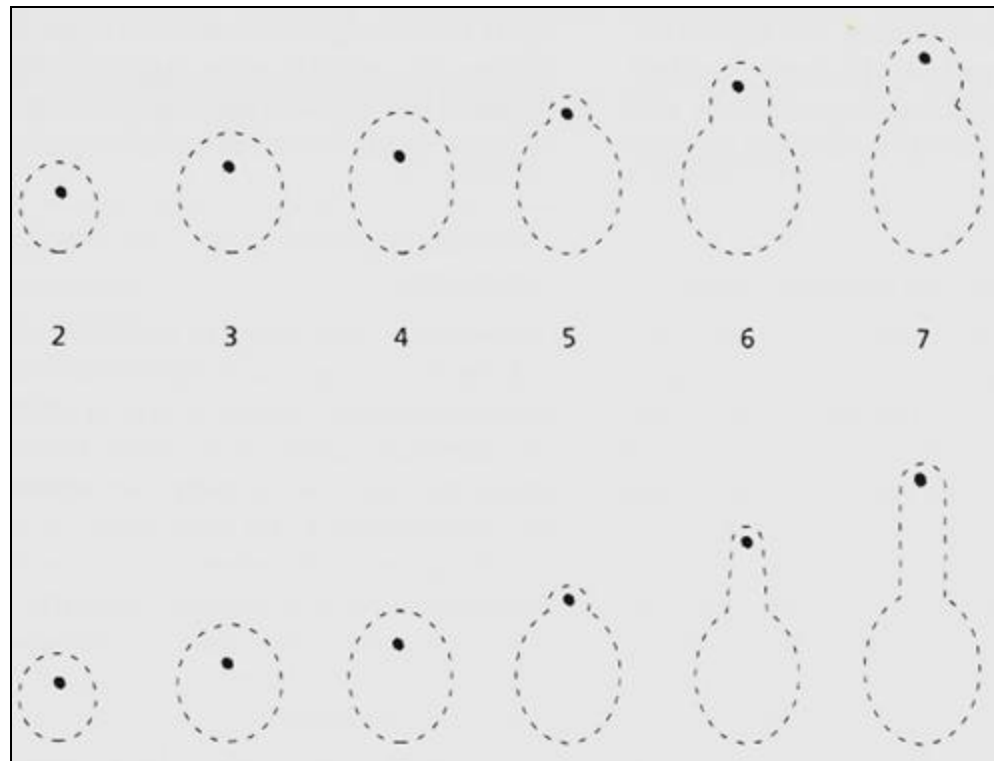
Deslocamento do Spitzenkörper

Se permanece fixado – crescimento celular esférico

Se move lentamente – estrutura elíptica

Se move rapidamente e continuamente – estrutura alongada (hifa)

Taxa de liberação de vesículas - 4 x maior

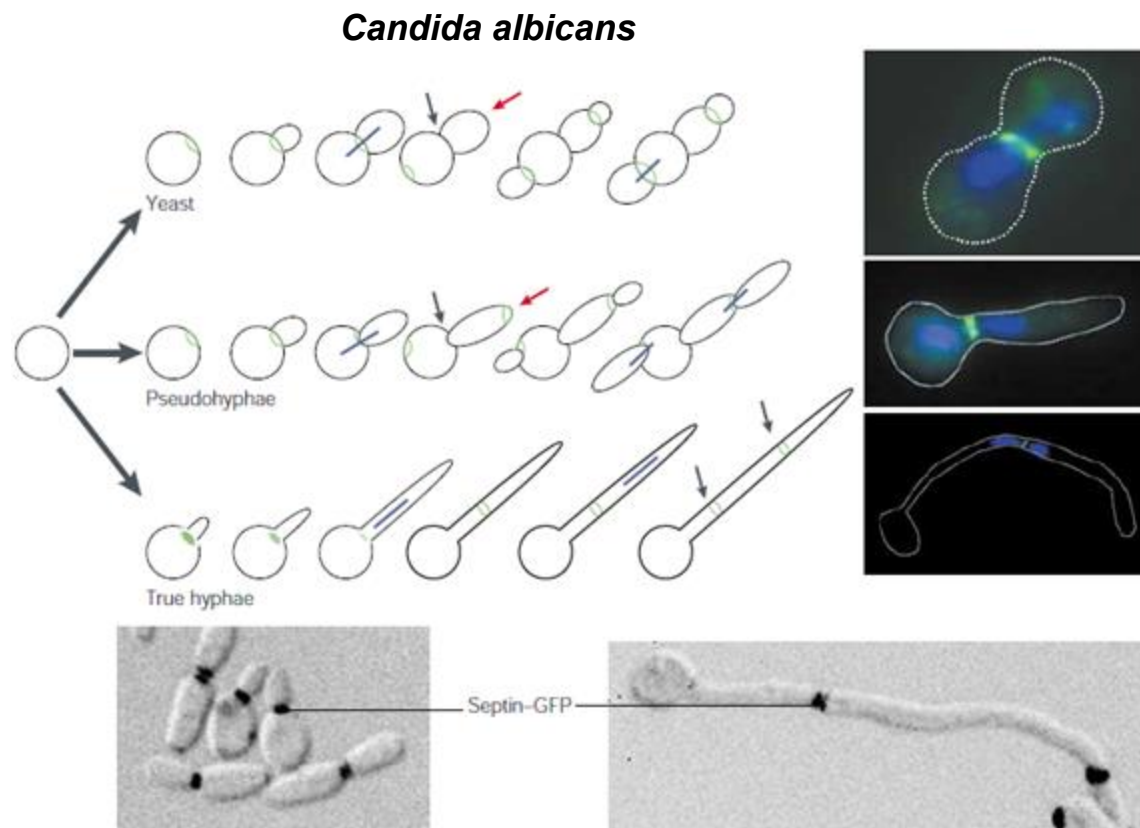


Além do deslocamento do Spitzenkörper... (Grau do crescimento polarizado)

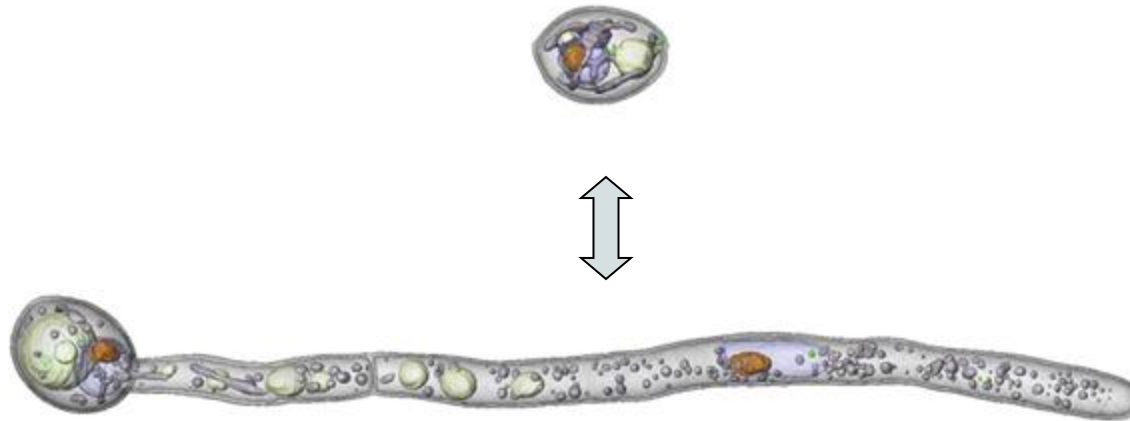
1. Posicionamento do anel de septina

2. Posicionamento do núcleo

3. Habilidade das células filhas em se separar da célula mãe



O que controla o dimorfismo?



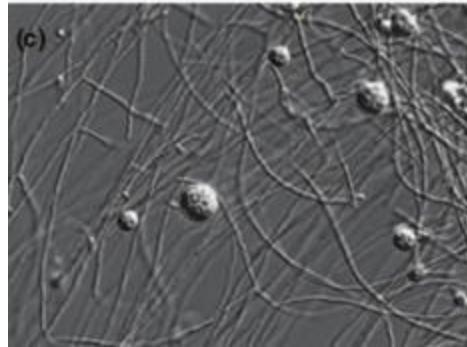
Aspectos Moleculares

Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi

Julie C. Nemecek,¹ Marcel Wüthrich,² Bruce S. Klein^{1,2,3,4*}

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 312 28 APRIL 2006

Histoplasma capsulatum
Blastomyces dermatitidis



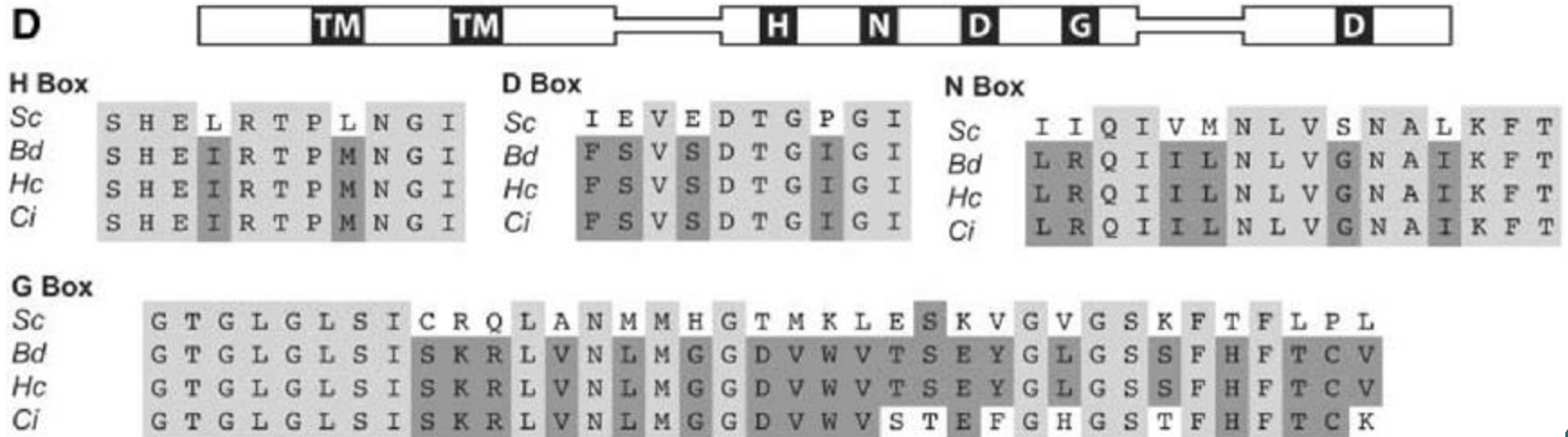
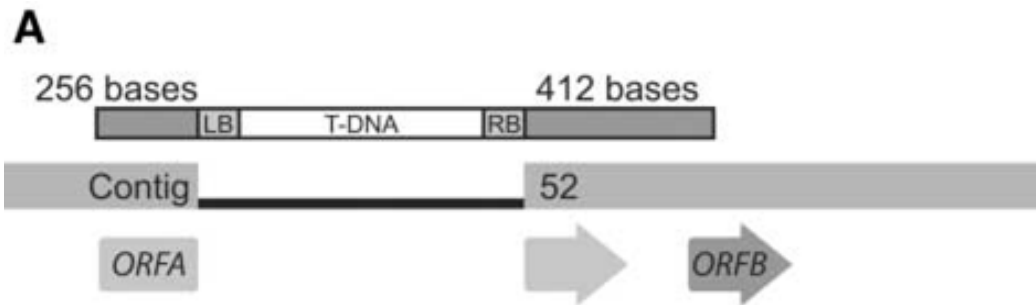
**Histidina kinase
DRK1**



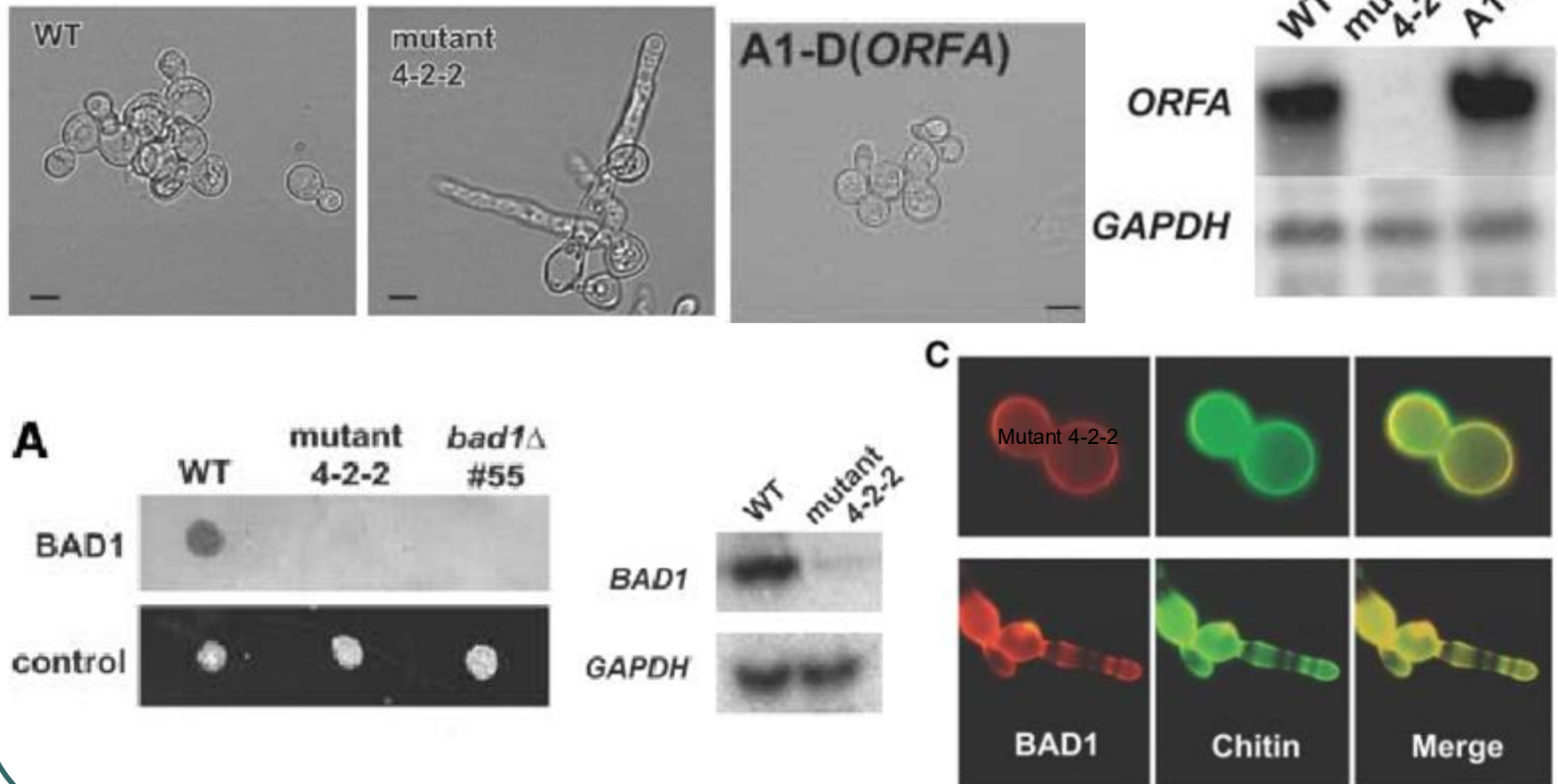
**Integridade de Parede celular
Filamentação
Expressão de genes de virulência**

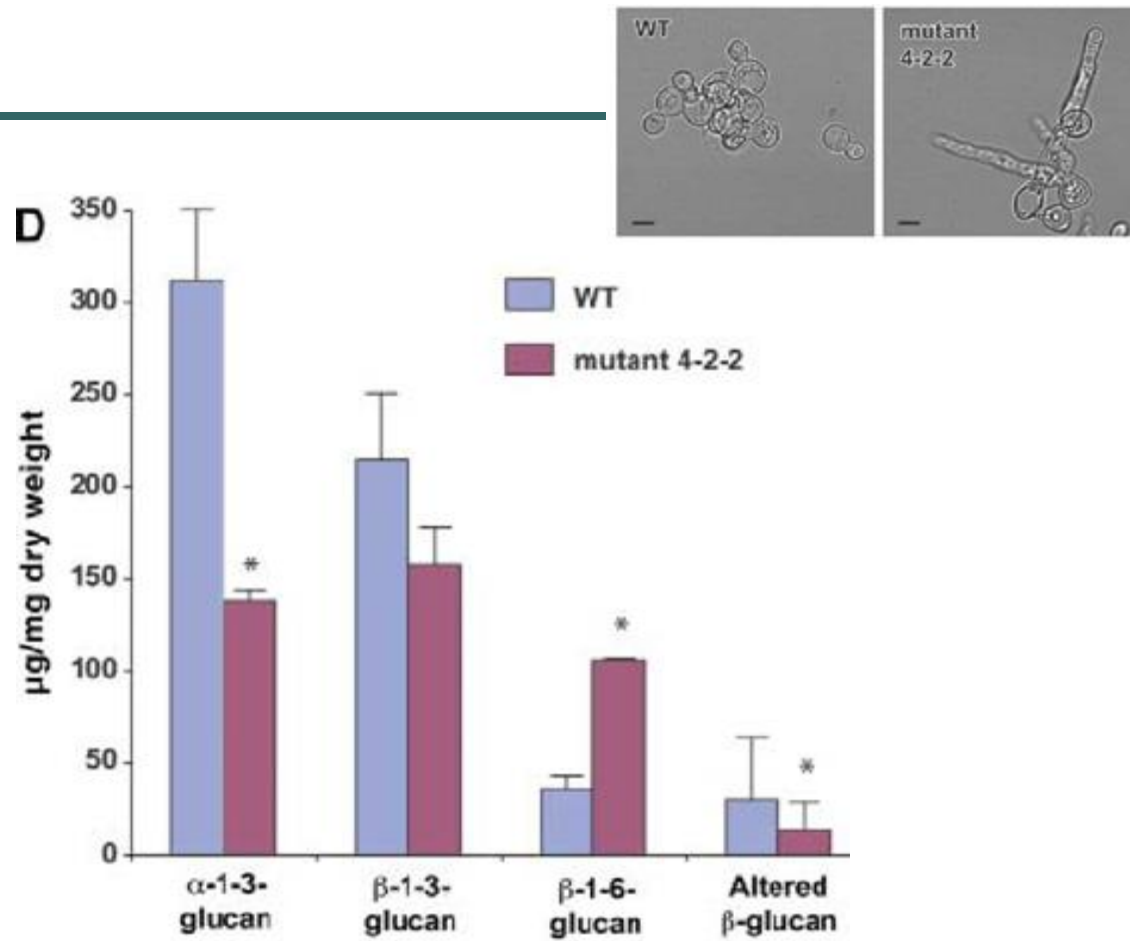
Anita Sil. Current Opinion in Microbiology 2019, 52:151–157

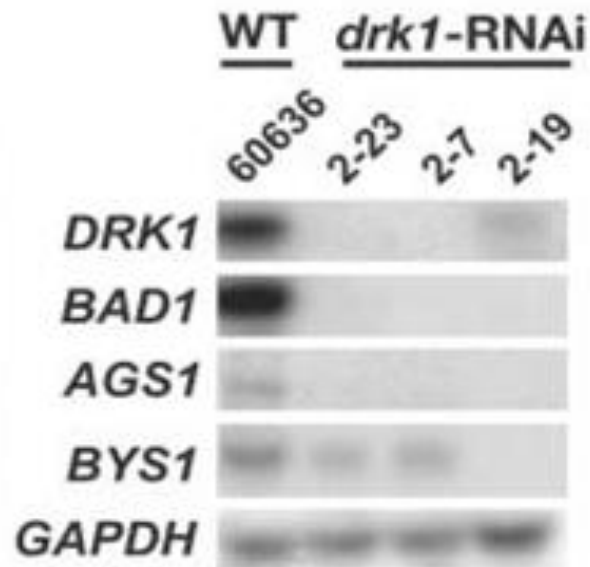
ORFA = gene da histidina kinase (*drk1*)



Blastomyces dermatitidis





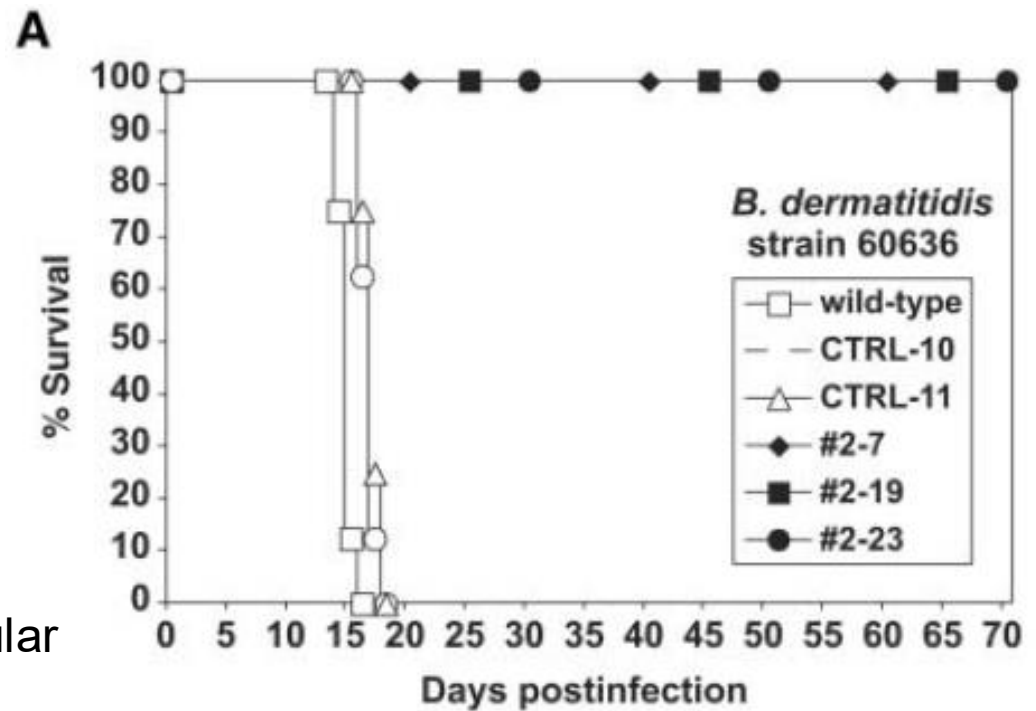


DRK1-histidina kinase

BAD1-proteína de parede celular

AGS1- α -(1,3) glucana sintase

BYS1-função não conhecida

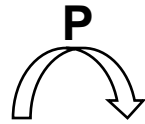


Candida albicans

Histidina kinases também são importantes
para a morfogênese e virulência

	Hybrid- histidine kinases		
	Sln1	Nik1	Chk1
Required for virulence	Yes	Yes	Yes
Sensitive to osmotic stress	Yes	Yes	No
Sensitive to oxidant stress	No	No	Yes

Kruppa & Calderone. FEMS Yeast Research, 6: 149-159, 2006.



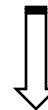
Histidina kinase



Histidina kinase chk1
(*Candida albicans* SC 5314 –
AlphaFold)



Ativação MAPK



Morfogênese
Biossíntese de parede celular
Adaptação osmótica e oxidativa
Fatores de virulência

- Histidina kinase é uma proteína altamente conservada em fungos
-

- São proteínas sensoriais que se autofosforila quando há mudanças ambientais
- As Histidina kinases (a maioria) não são transmembranas (Sln1p em *Candida albicans* é!!)
- Nem toda HK está envolvida na ativação de MAPK
- Aparentemente não se encontra em humanos – novo alvo para estudo de antifúngicos

Li et al. Histidina kinase keep fungi safe and vigorous. Current Opinion in Microbiology, 13: 424-430, 2010.

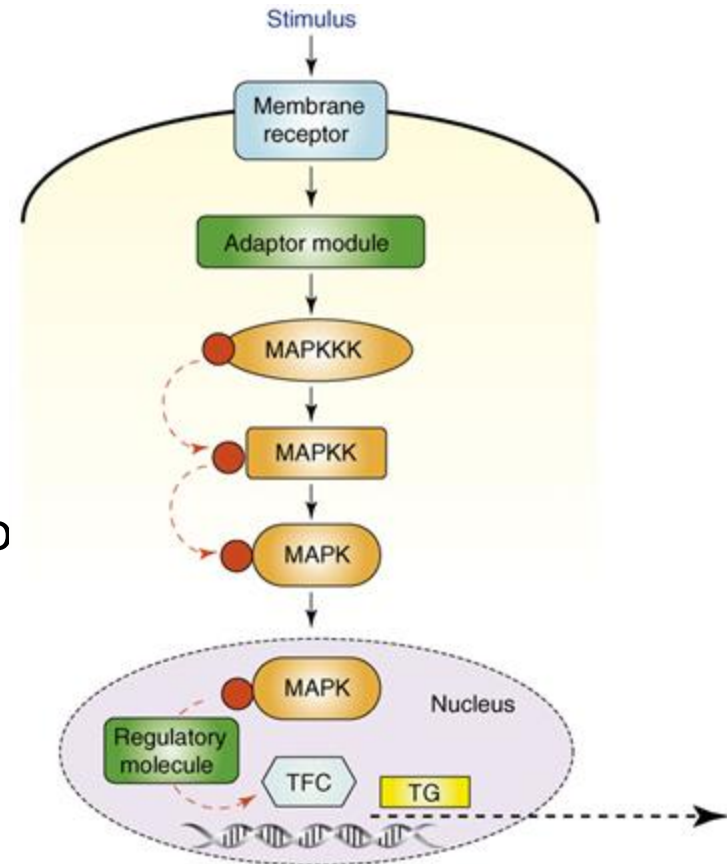
Via da MAP kinase regula a morfogênese e virulência fúngica

Módulo adaptador:

- PAK (quinase ativada p21)
- GTPases

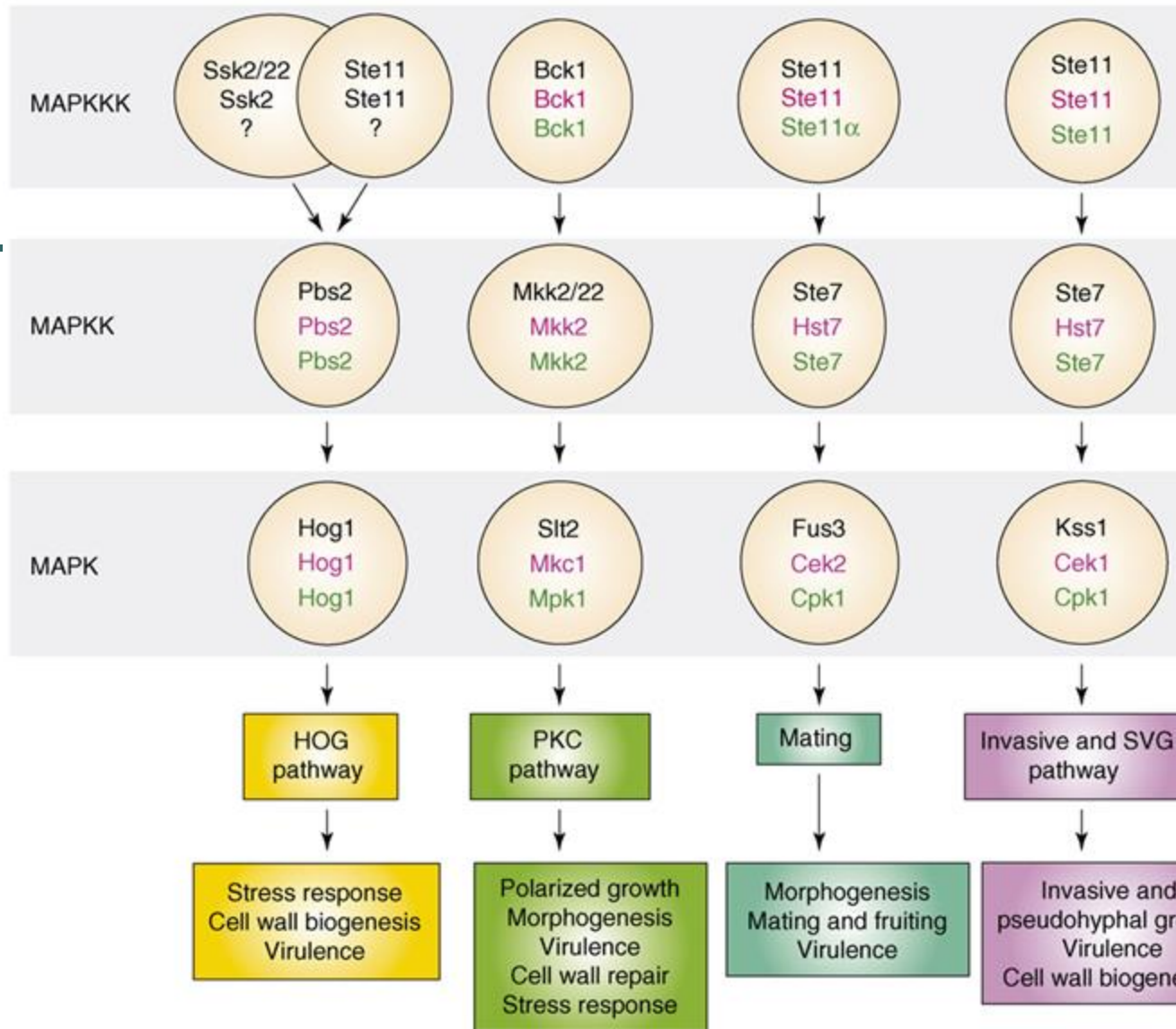
Núcleo

- Fosforilação de fator de transcrição ou molécula reguladora
- Ação no gene alvo



Ramón et al. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. Trends in Microbiology, 15:181-190, 2007.

TRENDS in Microbiology



S. cerevisiae

C. albicans

C. neoformans

TRENDS in Microbiology

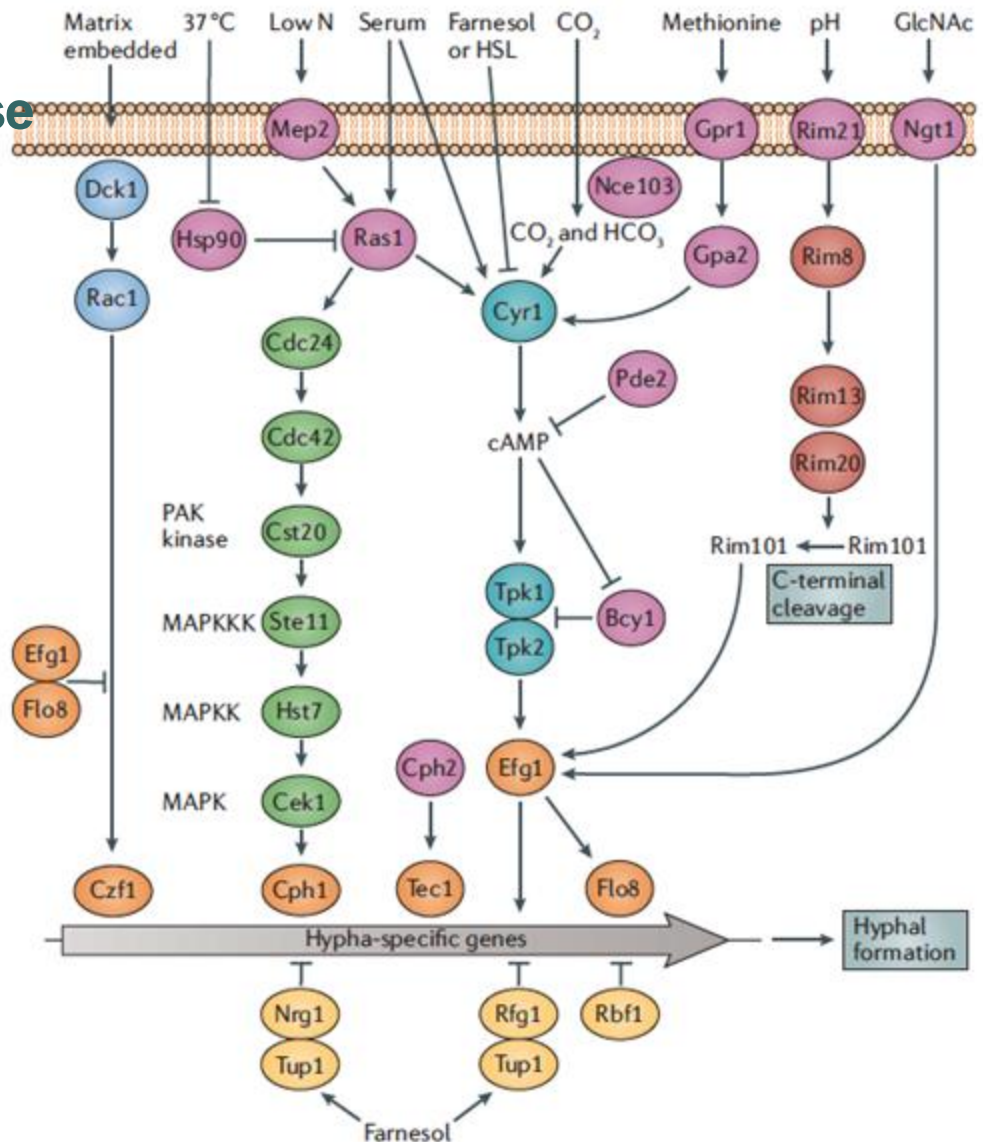
Ramón et al. Trends in Microbiology, 15:181-190, 2007.

Vias de sinalização envolvidas na morfogênese de *C. albicans*

Mutante *CPH1* e *EFG1*
– não filamentam e são
menos virulentos

Envolvimento das duas vias
na morfogênese de *Candida
albicans*

Formação do
biofilme



Sudbery. Nature Reviews Microbiology 9:737-748, 2011.

Referências

- Deacon, J. Fungal Biology. 4th edition, 2009.
- Artigos científicos e *sítes* citados durante a apresentação.

Obrigada!!