

**VICTOR PEREIRA ROCHETTI**

Caracterização química e papel biológico de  
glucosilceramidas do fungo *Scedosporium aurantiacum*



**Monografia apresentada ao  
Instituto de Microbiologia Paulo de  
Góes, da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2019**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Eliana Barreto Bergter e coorientação de Rodrigo Rollin Pinheiro

## FICHA CATALOGRÁFICA

R677c Rochetti, Victor Pereira  
Caracterização química e papel biológico de  
glucosilceramidas do fungo *Scedosporium aurantiacum*  
/ Victor Pereira Rochetti. -- Rio de Janeiro, 2019.  
72 f.

Orientador: Eliana Barreto Bergter.  
Coorientador: Rodrigo Rollin Pinheiro .  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. *Scedosporium*. 2. Glucosilceramidas. 3.  
Crescimento fúngico. 4. Biofilme . I. Barreto  
Bergter, Eliana, orient. II. Rollin Pinheiro ,  
Rodrigo, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Victor Pereira Rochetti**  
 DRE: 116049403

BANCA EXAMINADORA: Profa. Celuta Sales Alviano (Presidente)  
 Profa. Sonia Rozental  
 Profa. Rosa Maria Tavares Haido  
 Profa. Daniela Sales Alviano (Suplente)

Título da Monografia: **“Caracterização química e o papel biológico de  
 glucosilceramidas do fungo *Scedosporium aurantiacum*”**

Local: Sala de reunião do Departamento de Microbiologia Geral / CCS / UFRJ  
 Data e hora de início: 04 de dezembro de 2019 às 14:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 04 de dezembro de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>Celuta Sales Alviano</u> Profa. Celuta Sales Alviano
<u>10,0</u>	<u>Sônia Rozental</u> Profa. Sônia Rozental
<u>10,0</u>	<u>Rosa Maria Tavares Haido</u> Profa. Rosa Maria Tavares Haido
<u>10,0</u>	<u>Daniela Sales Alviano</u> Profa. Daniela Sales Alviano
Aluno:	<u>Victor Pereira Rochetti</u> Victor Pereira Rochetti
Orientador:	<u>Eliana Barreto Bergter</u> Profa. Eliana Barreto Bergter
Coorientador:	<u>Rodrigo Rollin Pinheiro</u> Dr. Rodrigo Rollin Pinheiro
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico esse trabalho a  
meus pais e meus avós  
que sempre me apoiaram  
incondicionalmente

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram a passar por esse período intenso que é a graduação e sou extremamente grato a todas elas.

Primeiramente agradeço à prof. Eliana por ter sido a pessoa que me deu a primeira oportunidade de entrar em um laboratório e desenvolver um trabalho científico, algo que tanto sonhei. Agradeço não só pelos ensinamentos, mas também por ter me feito sentir parte de uma nova família.

Agradeço muito ao grupo do laboratório da prof. Eliana por terem me recebido tão bem e por todo companheirismo e amizade. Obrigado Mariana Collodetti, Mariana Xisto, Michel, Andressa, Carol, Evely e Yuri. Em especial agradeço meu coorientador Rodrigo, por ter me acompanhado e apoiado tão de perto desde o início, por ter aguentado minhas insistências e por ter se tornado um grande amigo meu. Tenho plena consciência do privilégio que é trabalhar em lugar repleto de pessoas boas que tornam a rotina de trabalho algo prazeroso.

Obrigado aos meus amigos Larissa, Letícia, Matheus, Mariana, Juliana e Beatriz pelos momentos divertidos, pelas ótimas conversas, por todos os trabalhos e apresentações que fizemos juntos, enfim, por todos os altos e baixos que passamos na graduação. Também agradeço muito aos meus amigos da época de escola por terem continuado comigo por tantos anos.

Agradeço em especial meus pais, meus avós, minha tia e meus primos por sempre terem cuidado de mim e me ajudado no que precisei, sem falar do apoio e o imenso incentivo aos meus estudos.

Agradeço às professoras Celuta Alviano, Sonia Rozental, Rosa Haido e Daniela Alviano por terem aceitado participar da banca avaliadora.

Por fim, agradeço a UFRJ e as agências de fomento CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Victor Pereira Rochetti

Caracterização química e papel biológico de glucosilceramidas do fungo *Scedosporium aurantiacum*

Orientador: Eliana Barreto Bergter

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O gênero *Scedosporium* é composto por espécies de fungos filamentosos hialinos isolados de fontes ambientais, como *Scedosporium angustum* e *Scedosporium ellipsoideum*, e de fontes clínicas, como *Scedosporium boydii*, *Scedosporium apiospermum* e *Scedosporium aurantiacum*. As infecções causadas por espécies desse gênero variam desde micoses superficiais, conhecidas como micetomas, até infecções invasivas com colonização dos pulmões e disseminação para outros sítios do hospedeiro, geralmente associadas à algum tipo de imunocomprometimento. Nesse contexto, *S. aurantiacum* tem se destacado como uma das espécies mais virulentas do gênero e, além disso, estudos recentes têm demonstrado que cepas de *S. aurantiacum* diferem quanto ao crescimento, aquisição de nutrientes e virulência. A glucosilceramida (GlcCer) é uma molécula da classe dos esfingolipídeos, encontrada na superfície celular fúngica e está envolvida em diversos processos como crescimento, diferenciação e patogênese de diferentes espécies de fungos. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização química de GlcCer e avaliação de sua importância nos processos de crescimento em dois isolados, um clínico e um ambiental, de *S. aurantiacum*. Através de métodos de extração e purificação de lipídeos, as glucosilceramidas dos dois isolados foram obtidas e a caracterização das estruturas químicas foi realizada por espectrometria de massas. Com as técnicas de ELISA e de imunofluorescência, foi avaliada a exposição de GlcCer em conídios, conídios germinados e conídios tratados com NaOH (para remoção da melanina da superfície celular), além de micélio, e foi observado que a germinação e a ausência de melanina permitem uma maior exposição de GlcCer. A presença do anticorpo anti-GlcCer durante a germinação foi capaz de reduzir a diferenciação dos isolados cultivados na presença de triciclazol (inibidor da síntese de melanina que não afeta viabilidade celular) e de reduzir o tamanho dos tubos germinativos de conídios cultivados com inibidor ou não. Também foi constatado que o anticorpo anti-GlcCer não foi capaz de alterar a susceptibilidade dos isolados a estressores de superfície celular, mas foi capaz de alterar a organização de microdomínios de membrana, avaliado através do uso da filipina (marcador fluorescente que se liga a regiões ricas em ergosterol). Após 24 h de crescimento, *S. aurantiacum* foi capaz de formar biofilme em diversas superfícies e, na presença de anti-GlcCer, foi visto que há uma redução da biomassa e da viabilidade dos biofilmes formados em placas de poliestireno. Foi possível observar há diferença na densidade óptica de crescimento dos isolados depois da retirada de células não aderentes assim como há diferença na contagem de células aderidas na presença de anti-GlcCer, demonstrando que o anticorpo afeta a aderência das células à superfície, etapa essencial para a formação de um biofilme. Os resultados mostraram que a GlcCer possui um papel relevante na biologia do fungo *S. aurantiacum*.

**Palavras-chave:** *Scedosporium*, Glucosilceramidas, Crescimento fúngico, Biofilme

## ABSTRACT

Victor Pereira Rochetti

Caracterização química e papel biológico de glucosilceramidas do fungo *Scedosporium aurantiacum*

Orientador: Eliana Barreto Bergter

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

*Scedosporium* genus is composed by hialine filamentous fungi isolated from environmental sources, such as *Scedosporium angustum* and *Scedosporium ellipsoideum*, and clinical sources, such as *Scedosporium boydii*, *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium aurantiacum*. Infections caused by these species have a wide range of clinical manifestations, from superficial infections, known as mycetoma, to invasive infections with lung colonization and dissemination to other host sites, especially in immunocompromised patients. In this context, *S. aurantiacum* has been revealed as one of the most virulent species in the *Scedosporium* genus and recent studies demonstrated that *S. aurantiacum* strains differ in growth, nutrient acquisition and virulence. Glucosylceramides (GlcCer) are glycosphingolipids found in fungal cell surface and are important to growth, differentiation and pathogenicity processes in different fungal species. The present study aimed to evaluate the chemical structure of GlcCer and its role in growth processes of two *S. aurantiacum* isolates, one clinical and one environmental. Through lipid extraction and purification methods, purified GlcCer from both isolates were obtained and its chemical structure was identified by mass spectrometry. Using ELISA and immunofluorescence techniques, GlcCer surface exposition in conidia, germinated conidia and conidia treated with NaOH, as well as in mycelial forms, was evaluated and it was observed that germination and melanin removal favor GlcCer exposure. Monoclonal antibody anti-GlcCer reduced the morphological transition of the isolates cultivated with tricyclazole (melanin synthesis inhibitor that does not affect cell viability) and reduced germ tube length of conidia cultivated in the presence or absence of tricyclazole. It was also demonstrated that the antibody anti-GlcCer did not affect susceptibility to cell surface damaging agents, but the antibody altered lipid rafts organization, evaluated using filipin (fluorescent stain that binds to ergosterol-rich regions). *S. aurantiacum* is able to form biofilm in different surfaces after 24 h growth and, in the presence of the antibody anti-GlcCer, total biomass and viability were reduced in biofilms formed in polystyrene plates. Differences in the optical density measurement was observed when comparing before and after the removal of nonadherent cells as well a significant difference was observed in adhered cell counting in the presence of anti-GlcCer, revealing that the monoclonal antibody interfere with cell adherence, essential step to biofilm formation. These results highlight the relevance of GlcCer in growth processes of the fungi *S. aurantiacum*.

**Keywords:** *Scedosporium*, Glucosylceramides, Fungal growth, Biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cleistotécio de <i>Scedosporium boydii</i> .....	15
<b>Figura 2:</b> Morfologia de diferentes cepas de <i>Scedosporium aurantiacum</i> .....	15
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática dos ciclos de infecções por <i>Scedosporium</i> spp. ....	16
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo da parede celular de <i>Scedosporium</i> .....	24
<b>Figura 5:</b> Estrutura de glucosilceramidas encontradas em mamíferos e em fungos .....	28
<b>Figura 6:</b> Esquema geral da extração e purificação glucosilceramidas encontradas em fungos .....	34
<b>Figura 7:</b> Caracterização química de glucosilceramidas de <i>S. aurantiacum</i> . ....	40
<b>Figura 8:</b> Reatividade do anticorpo monoclonal anti-GlcCer com células de <i>S. aurantiacum</i> .....	41
<b>Figura 9:</b> Análise por microscopia de imunofluorescência da reatividade do anticorpo anti-GlcCer com conídios e micélio de <i>S. aurantiacum</i> .....	42
<b>Figura 10:</b> Taxa de germinação de conídios de <i>S. aurantiacum</i> .....	44
<b>Figura 11:</b> Medida dos tubos germinativos (em $\mu\text{m}$ ) de <i>S. aurantiacum</i> .....	45
<b>Figura 12:</b> Susceptibilidade de <i>S. aurantiacum</i> aos estressores de superfície.....	46
<b>Figura 13:</b> Organização dos microdomínios de membrana de <i>S. aurantiacum</i> .....	47
<b>Figura 14:</b> Formação de biofilme de <i>S. aurantiacum</i> .....	48
<b>Figura 15:</b> Densidade ótica do crescimento (660 nm) antes e depois da retirada de células não aderentes de <i>S. aurantiacum</i> .....	49
<b>Figura 16:</b> Adesão de conídios de <i>S. aurantiacum</i> após 6 h de crescimento na presença de anti-GlcCer .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês acquired immunodeficiency syndrome

BSA – soro albumina bovina, do inglês bovine serum albumin

CD – grupamento de diferenciação, do inglês cluster of differentiation

DHN – 1,8-dihidroxinaftaleno

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês enzyme linked immunosorbent assay

GM-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos, do inglês granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GlcCer – glucosilceramida

Hep2 – linhagem de células tumorais derivada de carcinoma de laringe humana

HIV – vírus da imunodeficiência humana, do inglês human immunodeficiency virus

IgG – imunoglobulina G

IL – interleucina

Myd88 – resposta primária de diferenciação mieloide, do inglês myeloid differentiation primary response

PBS – solução de tampão fosfato, do inglês phosphate-buffered saline

PRM – peptidoramnanana

SNC – sistema nervoso central

TFA – ácido trifluoroacético, do inglês trifluoroacetic acid

TH – linfócito T auxiliador, do inglês T helper lymphocytes

TLR – receptor do tipo Toll, do inglês Toll-like receptor

TNF – fator de necrose tumoral, do inglês tumor necrosis factor

XTT - 2,3-Bis-(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Fungos: de microrganismos ambientais a patógenos</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2. Taxonomia, morfologia e ecologia de <i>Scedosporium</i> spp.</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3. Manifestações clínicas e epidemiologia das infecções por <i>Scedosporium</i> spp.</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4. Diagnóstico e tratamento de infecções por <i>Scedosporium</i> spp.</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5. <i>Scedosporium aurantiacum</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.6. Parede celular fúngica</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7. Glucosilceramidas</b> .....	<b>26</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>31</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1. Microrganismos e condições de cultivo</b> .....	<b>32</b>
4.1.1. Microrganismos.....	32
4.1.2. Obtenção de conídios.....	32
<b>4.2. Extração e análise química e estrutural de glucosilceramidas</b> .....	<b>32</b>
4.2.1. Obtenção de massa celular.....	32
4.2.2. Extração e purificação de glicoesfingolípídeos.....	33
4.2.2 Análise da composição monossacarídica .....	33
4.2.3 Espectrometria de massas (ESI-MS) de glucosilceramidas.....	34
<b>4.3. Reatividade do anticorpo anti-GlcCer com as células de <i>S. aurantiacum</i></b> .....	<b>35</b>
4.3.1. Testes imunoenzimáticos .....	35
4.3.2. Microscopia de Imunofluorescência.....	35
<b>4.4. Ensaio de germinação na presença do anticorpo anti-GlcCer</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5. Susceptibilidade a estressores de membrana na presença do anticorpo anti-GlcCer</b> .....	<b>36</b>
<b>4.6. Marcação das células com filipina para evidenciação de microdomínios de membrana na presença do anticorpo anti-GlcCer</b> .....	<b>37</b>
<b>4.7. Ensaio de formação de biofilme na presença do anticorpo anti-GlcCer</b> .....	<b>37</b>

4.8. Ensaios de adesão de biofilme e conídios germinados na presença do anticorpo anti-GlcCer .....	38
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1. Caracterização estrutural de glucosilceramidas de <i>S. aurantiacum</i> .....	39
5.2. Reatividade do anticorpo anti-GlcCer com células de <i>S. aurantiacum</i> ao longo do processo germinativo.....	41
5.3. Influência do anticorpo anti-GlcCer no processo germinativo de <i>S. aurantiacum</i> .....	43
5.4. Susceptibilidade das células de <i>S. aurantiacum</i> a estressores de superfície na presença do anticorpo anti-GlcCer.....	45
5.5. Organização de microdomínios de membrana de <i>S. aurantiacum</i> na presença do anticorpo anti-GlcCer .....	46
5.6. Influência do anticorpo anti-GlcCer no processo de formação de biofilme de <i>S. aurantiacum</i> .....	48
5.7. Influência do anticorpo anti-GlcCer na adesão das células de <i>S. aurantiacum</i> a superfície de poliestireno.....	48
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fungos: de microrganismos ambientais a patógenos

Fungos são organismos eucariotos heterotróficos que possuem a capacidade de ocupar os mais diversos ambientes. Eles podem ser uni ou multicelulares e também apresentam, baseados em sua divisão celular e crescimento, duas morfologias principais: leveduriforme e filamentosa. Fungos leveduriformes são menores, unicelulares, possuem, em geral, forma arredondada e se multiplicam por fissão ou brotamento. Fungos filamentosos crescem a partir de extensões apicais de suas células, formando filamentos chamados de hifas e o conjunto de hifas, resultado do contínuo crescimento fúngico, forma uma rede complexa chamada de micélio (Powers-Fletcher *et al.*, 2016).

Ao longo da evolução, os fungos desenvolveram diferentes maneiras de se relacionar com outros seres vivos, que incluem simbiose (fungos adquirem nutrientes ao mesmo tempo em que oferecem vantagens ao hospedeiro), biotrofia (nutrientes são adquiridos do tecido do hospedeiro podendo ser necessário à evasão das defesas do hospedeiro), necrotrofia (os tecidos do hospedeiro são mortos para que haja a aquisição de nutrientes) e saprotrofia (nutrientes são adquiridos de matéria orgânica já morta) (Paszkowski, 2006; Mandyam e Jumpponen, 2015).

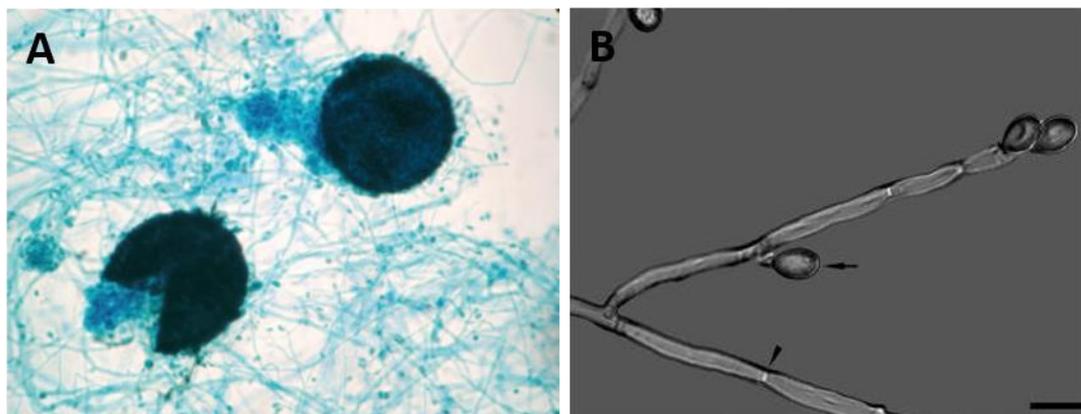
Existem cerca de 1,5 a 5 milhões de espécies de fungos, sendo apenas algumas centenas destas capazes de causar doença em humanos (Heath *et al.*, 2005). Somente esta seleta minoria de espécies consegue atender os quatro critérios para o estabelecimento de uma infecção: crescer a 37°C ou mais; ultrapassar as barreiras naturais do hospedeiro e penetrar nos tecidos; absorver nutrientes a partir dos tecidos; e evadir/suportar o sistema imune do hospedeiro. Alguns destes fungos desenvolveram mecanismos que são capazes de confrontar a imunidade de humanos saudáveis, sendo eles considerados patógenos primários como *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. No entanto, outros fungos como os dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scedosporium* têm os seres humanos como hospedeiros incidentais, causando infecção em um contexto de imunocomprometimento e sendo considerados patógenos oportunistas (Köhler *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, a quantidade de pessoas com algum tipo de imunocomprometimento vem aumentando constantemente. Isso é devido tanto a avanços da medicina que afetam o normal funcionamento do sistema imune (quimioterapia, transplante de órgãos e uso de imunomoduladores, por exemplo), quanto a doenças que ganharam grande relevância clínica e que também afetam a imunidade, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), doenças hematológicas e diversas imunodeficiências. Com este fenômeno, o número de casos de infecções fúngicas vem crescendo, chegando a alcançar taxas de mortalidade maiores que 50% em pacientes suscetíveis (Pappas, 2010; Brown *et al.*, 2012).

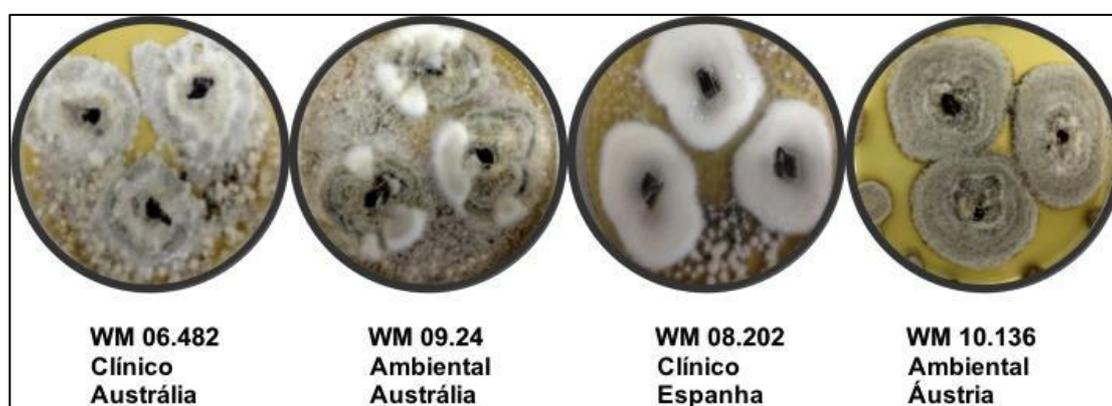
## 1.2. Taxonomia, morfologia e ecologia de *Scedosporium* spp.

O gênero *Scedosporium* pertence ao domínio Eukarya, filo Ascomycota, classe Euascomycetes, ordem Microascales e família Microascaceae. São reconhecidas 10 espécies distintas: *Scedosporium aurantiacum*, *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. dehoogii*, *S. minutisporum*, *S. ellipsoideum*, *S. angustum*, *S. fusoidium* e *S. desertorum*. Atualmente o gênero está classificado no complexo *Scedosporium/Lomentospora*, em que é incluída a espécie *Lomentospora prolificans*, antes chamada *Scedosporium prolificans* (Cortez *et al.*, 2008; Rougeron *et al.*, 2017; Ramirez-Garcia *et al.*, 2017).

O gênero *Scedosporium* agrupa fungos filamentosos que possuem estágios sexuado e assexuado. O estágio sexuado é marcado pela presença de cleistotécio, corpos de frutificação esféricos fechados que englobam ascos (células sexuais em forma de “saco” onde os ascósporos são formados) em seu interior (**Figura 1A**). Quando o cleistotécio é rompido, os ascósporos (esporos sexuais haploides) são liberados. Já o estágio assexuado, o mais comum de ser encontrado na natureza e nas amostras clínicas, é caracterizado pela presença de hifas cilíndricas, septadas e hialinas de onde emergem os conídios (esporos mitóticos) unicelulares geralmente ovais, podendo ser mais ou menos alongados (**Figura 1B**). No âmbito macroscópico, espécies de *Scedosporium* formam colônias densas e algodonosas com colorações que variam de brancas a acinzentadas (**Figura 2**) (Cortez *et al.*, 2008; Lupertlop, 2018).



**Figura 1:** Cleistotécio de *Scedosporium boydii* (A). Hifa hialina septada (cabeça de seta) com ramificação em ângulo agudo e conídios (seta) ovais nas extremidades (B) (Cortez *et al.*, 2008).



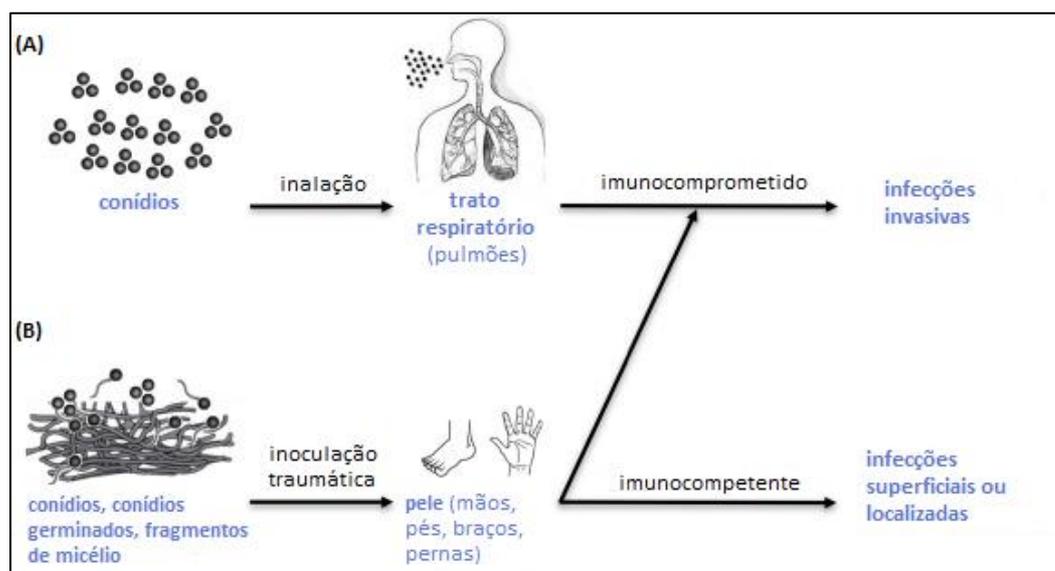
**Figura 2:** Morfologia de colônias de diferentes cepas de *Scedosporium aurantiacum* provenientes da coleção Wieland Meyer (WM) (adaptado de Kaur *et al.*, 2015).

Espécies do gênero *Scedosporium* são considerados, como a maioria dos fungos, saprófitas do solo e já foram isoladas dos mais variados ambientes como solos de plantações agrícolas, de parques urbanos e de áreas de recreação infantil (De Hoog *et al.*, 1994; Kaltseis *et al.*, 2009). Também já foram encontradas espécies de *Scedosporium* em estrume de gado, em solos contaminados com petróleo e em águas poluídas (April *et al.*, 1998; Buzina *et al.*, 2006). Estudos que descrevem a ecologia do gênero *Scedosporium* sugerem que sua presença na água e no solo está relacionada ao impacto causado por seres humanos, sendo isto devido à capacidade desses fungos crescerem em altas concentrações de nitrogênio, alta pressão de oxigênio, alta salinidade e alta pressão osmótica (Cortez *et al.*, 2008). Na Áustria, Holanda e França, foram isoladas espécies de *Scedosporium* a partir de solo de áreas agrícolas e urbanas, mas não de áreas naturais e de florestas. Padrões de distribuição de espécies de *Scedosporium* no ambiente demonstram diferenças regionais significativas. *S.*

*apiospermum* é a espécie de *Scedosporium* mais isolada em solos da Áustria, Holanda e Tailândia. *S. dehoogii* está mais presente nas amostras de solo da França e *S. aurantiacum* é predominante na Austrália (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010; Rougeron *et al.*, 2015; Wongsuk *et al.*, 2017).

### 1.3. Manifestações clínicas e epidemiologia das infecções por *Scedosporium* spp.

Espécies do gênero *Scedosporium* vêm se destacando como patógenos oportunistas emergentes, devido ao significativo aumento nos últimos anos do número de casos de infecções relacionados a essas espécies. A scedosporiose possui uma variedade de manifestações clínicas, podendo ser transmitida através de inoculação traumática de conídios e fragmentos de micélio, que permite a infecção em imunocompetentes, ou inalação de conídios, causando infecção principalmente em imunocomprometidos (**Figura 3**) (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).



**Figura 3:** Representação esquemática dos ciclos de infecções por *Scedosporium* spp., podendo ser via inalação de conídios (A), que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, ou via inoculação traumática (B), que pode acometer tanto indivíduos imunocompetentes quanto imunocomprometidos (adaptado de Santos *et al.*, 2019).

Como os fungos podem adentrar o hospedeiro de diversas formas, as barreiras epiteliais, o sistema mucociliar e as células do sistema imune possuem papel essencial na resposta contra a invasão desses patógenos. Os componentes da parede celular fúngica são reconhecidos por receptores na superfície de células do sistema imune,

como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, sendo esse reconhecimento essencial para a ativação das células tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo. Já foi descrito que receptores do tipo Toll e dectina-1 são determinantes para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, como peptidoramnomanas, ramnomanas e glucanas, levando a produção de citocinas como interferon- $\gamma$  e GM-CSF que aumentam a atividade de fagócitos contra espécies de *Scedosporium* (Gil-Lamaignere *et al.*, 2005; Bittencourt *et al.*, 2006; Lamaris *et al.*, 2008; Brakhage *et al.*, 2010). Além disso, respostas de células T helper (TH) 1, TH 2 e TH 17 possuem atividades importantes em resposta às infecções fúngicas (Wüthrich *et al.*, 2012).

Após a inoculação traumática, manifestações na pele podem evoluir para um eumicetoma, infecção cutânea ou subcutânea crônica causada por fungos verdadeiros. Esta infecção pode causar profunda incapacidade e deformação dos membros afetados, geralmente os inferiores. O eumicetoma costuma ser mais comum em homens do que em mulheres devido a maior exposição em atividades de campo e, conseqüentemente, a acidentes nessas atividades. Casos de eumicetoma relacionados com scedosporiose já foram reportados na Europa, nos Estados Unidos e no Brasil, tendo como agentes etiológicos *S. apiospermum* ou *S. boydii* (Cortez *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013). Outras infecções localizadas relacionadas a *Scedosporium* incluem artrite, osteomielite e ceratite que geralmente ocorrem após inoculação traumática ou procedimentos cirúrgicos. Estas manifestações podem ser apresentadas em imunocompetentes ou como complicações após imunocomprometimento (Kaliyamurthy e Thomas, 2013; Bernhardt *et al.*, 2015).

Infecções disseminadas geralmente ocorrem em pacientes com algum tipo de imunocomprometimento, como aqueles com a AIDS, câncer, doenças hematológicas, transplantados ou que estão submetidos a tratamentos com imunossuppressores (Marr e Panackal, 2004; Musk *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008). Isto ocorre devido a capacidade dos fungos desse gênero invadirem a corrente sanguínea e se reproduzirem nos tecidos, aliado a incapacidade do sistema imune desses pacientes de controlar a infecção. Manifestações clínicas incluem febre, dispneia, infiltrado pulmonar e sintomas de meningoencefalite, podendo evoluir para o envolvimento de múltiplos órgãos (Castiglioni *et al.*, 2002; Husain *et al.*, 2005). A manifestação mais grave de infecção disseminada causada por *Scedosporium* é a infecção do sistema

nervoso central (SNC), que inclui sintomas de meningite e o aparecimento de abscessos cerebrais. Geralmente, a infecção do SNC é decorrente de uma complicação de infecção disseminada em imunocomprometidos, mas já foi associada a episódios de aspiração de água contaminada em imunocompetentes, o que envolve a inalação de conídios de *Scedosporium* e a conseguinte disseminação a partir dos pulmões (Berenguer *et al.*, 1989; Katragkou *et al.*, 2007).

Espécies de *Scedosporium* são capazes de colonizar as vias aéreas de pacientes com fibrose cística, iniciando na adolescência, podendo se tornar uma colonização crônica. A fibrose cística é causada pela mutação no gene para a proteína reguladora da condutância transmembrana na fibrose cística (CFTR), que resulta na retenção de muco e deixa os pulmões vulneráveis para o estabelecimento de infecções. Pacientes com a doença geralmente são acometidos primeiramente por infecções bacterianas e, após antibioticoterapia, é observado um aumento do crescimento de fungos nas vias aéreas. A colonização por *Scedosporium* contribui para uma reação inflamatória que pode levar progressivamente para a deterioração das funções pulmonares. Manifestações incluem bronquite e micose broncopulmonar alérgica observadas em pacientes com fibrose cística colonizados por *Scedosporium* (Cimon *et al.*, 1995; Engel *et al.*, 2018). A prevalência de isolamento de *Scedosporium* a partir de pacientes com fibrose cística depende da localização geográfica e condições predisponentes do hospedeiro, variando entre 3,1% e 25% dos isolamentos, podendo ser considerado o segundo ou terceiro gênero de fungos filamentosos mais isolados de pacientes com esta condição. *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* destacam-se por serem as espécies de *Scedosporium* mais isoladas na Alemanha, França e Austrália, respectivamente (Cimon *et al.*, 2000; Blyth *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2011; Sedlacek *et al.*, 2015; Engel *et al.*, 2018; Schwarz *et al.*, 2018).

Em estudos realizados nos Estados Unidos, foi constatado que espécies de *Scedosporium* são os agentes etiológicos de pelo menos 25% das infecções por fungos filamentosos que não são do gênero *Aspergillus* em pacientes que receberam algum tipo de transplante (órgãos ou medula óssea) (Husain *et al.*, 2005). Em uma revisão de 22 casos de scedosporiose em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) realizada por Tammer e colaboradores, em 2011, observou-se a ocorrência de infecções invasivas por *Scedosporium* em 54,5% dos pacientes e a taxa de mortalidade foi de 75%. Foi descrito por Katragkou e colaboradores, em 2007,

casos (entre 1950 e 2006) de infecção por *S. apiospermum* em indivíduos que aspiraram água contaminada e foi constatado que a disseminação para o SNC ocorreu em 91% dos casos com a taxa de mortalidade de 70%. Após a reidentificação de espécies de *Scedosporium* isoladas após casos de aspiração de água contaminada, além de *S. apiospermum* foram identificadas *S. boydii* e *S. aurantiacum*, sendo esta última uma espécie reportada em um sobrevivente de um tsunami no Japão em 2011 (Katragkou *et al.*, 2007; Tintelnot *et al.*, 2008; Tammer *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2013).

Oliveira e colaboradores revisaram 15 casos de scedosporiose reportados no Brasil de 1982 a 2013. A manifestação clínica mais relatada foi a presença de massa fúngica na cavidade pulmonar (bola fúngica), especialmente em pacientes já tiveram tuberculose, seguido de infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos. Dos 10 casos de scedosporiose em que foram relatadas doenças associadas, 5 resultaram na morte dos pacientes (Oliveira *et al.*, 2013). Em 2004, foi relatado no Brasil pela primeira vez uma morte por scedosporiose com o acometimento do SNC após aspiração de água poluída (Kowacs *et al.*, 2004). Em outro trabalho que revisou 21 casos de micetoma na cidade do Rio de Janeiro de 1991 a 2014, *S. apiospermum* foi isolado em 3 dos 8 casos de eumicetoma (causado por fungos verdadeiros) que obtiveram cultura inicial positiva, no resto dos casos isolou-se *Madurella mycetomatis*, *Acremonium* spp. e outros fungos filamentosos que não foram identificados (Sampaio *et al.*, 2017).

#### **1.4. Diagnóstico e tratamento de infecções por *Scedosporium* spp.**

O diagnóstico da scedosporiose é constituído na detecção do patógeno através do uso de diversas abordagens, como exame microscópico direto, cultivo, análise histológica de biópsias e métodos moleculares. O diagnóstico preciso desses fungos é complexo devido a semelhança de manifestações clínicas e aspectos histopatológicos com aspergilose, fusariose e outras hialohifomicoses (Walts, 2001). Os elementos que podem auxiliar no diagnóstico histopatológico da scedosporiose são a observação de padrões irregulares de ramificações de hifas, formação de conídios nos vasos sanguíneos e nos tecidos (Kimura *et al.*, 2010). Novas formas de detecção de *Scedosporium* foram desenvolvidas como o meio Scedo-Select III que permite o crescimento de espécies como *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. aurantiacum*, *S.*

*minutispora* e *S. dehoogii* e tem em sua composição 4-hidroxibenzoato como fonte de carbono, sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, dicloran e benomyl (fungicidas aos quais fungos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Penicillium* são sensíveis) (Pham *et al.*, 2015). Além disso, Harun e colaboradores desenvolveram um ensaio multiplex PCR para detectar espécies de *Scedosporium* em amostras clínicas de pacientes com fibrose cística (Harun *et al.*, 2011).

O tratamento da scedosporiose é uma tarefa difícil, pois os fungos do gênero *Scedosporium* possuem uma alta taxa de resistência a antifúngicos de diversas classes. Dentre as drogas disponíveis na clínica, voriconazol é a mais eficiente contra espécies de *Scedosporium*, sendo a primeira droga de escolha para o tratamento de scedosporiose. Apesar de ser bem tolerado pelos pacientes e alcançar o SNC em quantidades razoáveis, voriconazol interage negativamente com imunossupressores e quimioterápicos (Gilgado *et al.*, 2006; Tortorano *et al.*, 2014).

Devido a todas essas dificuldades, novas estratégias de tratamento estão em estudo. Já foi visto que a combinação de antifúngicos utilizados na clínica possui potencial para o tratamento da scedosporiose, como por exemplo: agentes azólicos e equinocandinas possuem efeito sinérgico em *S. apiospermum* assim como a combinação de micafungina e posaconazol possui efeito em *S. apiospermum* e *S. boydii*. Novas drogas antifúngicas desenvolvidas também estão sendo estudadas e possuem efeito *in vitro* em isolados clínicos de *Scedosporium*, como o F901318, que inibe a enzima diidroorotato desidrogenase (participante da biossíntese de pirimidina) e E1210, que inibe a acilação de glicofosfatidilinositol fúngico (glicolípido presente na membrana plasmática) (Cuenca-Estrella *et al.*, 2008).

### **1.5. *Scedosporium aurantiacum***

A emergência de infecções causadas por *Scedosporium aurantiacum* foi reconhecida primeiramente por Heath e colaboradores, em 2009, onde foram descritos casos de scedosporiose relacionados com *S. aurantiacum* em pacientes imunocomprometidos ou com algum outro fator predisponente na Austrália. Com isso, despertou-se o interesse quanto a potencial virulência dessa espécie e consequentemente, diversos estudos têm sido feitos para caracterizar esse patógeno emergente (Heath *et al.*, 2009).

Em um estudo que utilizou modelo murino, foi observada taxa de mortalidade de 100% em camundongos imunocomprometidos infectados por *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. dehoogii* e *S. aurantiacum*, mas a última foi a única espécie a ter taxa de mortalidade de 80% em camundongos imunocompetentes (Gilgado *et al.*, 2009). Cepas de *S. aurantiacum* foram consideradas tão virulentas quanto as de *Lomentospora prolificans* (anteriormente conhecido como *Scedosporium prolificans*), outra espécie relacionada com infecções em humanos (Ortoneda *et al.*, 2002; Harun *et al.*, 2010). Foi observado tanto em modelo murino quanto em modelo em *Galleria mellonella* que a virulência de *S. aurantiacum* é cepa-específica e independe da origem de isolamento, cepas ambientais podem ser altamente virulentas e cepas clínicas podem ter menor virulência (Harun *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2015).

A capacidade de conídios germinarem em condições de estresse oxidativo é determinante para o progresso da infecção e envolve a resistência à resposta imune do hospedeiro. Em um estudo que avaliou a capacidade germinativa de conídios de *Scedosporium* em estresse oxidativo, observou-se que os isolados ambientais das espécies de *Scedosporium* são mais capazes de germinar nessas condições do que isolados clínicos. Dentre esses isolados ambientais, o isolado de *S. aurantiacum* demonstrou ser o mais tolerante (Staerck *et al.*, 2018).

A formação de biofilmes, comunidades complexas de células microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e envoltas por uma matriz extracelular, é um fenômeno que chama a atenção pois confere aos agentes infecciosos diversos aspectos que permitem o estabelecimento de infecções graves, como a proteção contra o sistema imune, resistência a drogas antimicrobianas, aumento de virulência e cooperação metabólica (Davies, 2003; Cos *et al.*, 2010). Em biofilmes formados por fungos filamentosos, é necessário a combinação de mecanismos físicos e biológicos que incluem a adesão de conídios a superfícies diversas, a germinação desses conídios, formação de hifas e produção de matriz extracelular pelas células fúngicas (Ramage *et al.*, 2009; Loussert *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que fungos do gênero *Scedosporium* são capazes de formar biofilmes em diferentes superfícies (poliestireno, cateter venoso central e em cultura de células epiteliais pulmonares) e que o processo os torna menos suscetíveis ao tratamento com drogas antifúngicas. Nesses estudos, foi mostrado que *S. aurantiacum* é capaz de formar um biofilme robusto rapidamente e que isto possivelmente está relacionado a sua alta virulência

quando comparada com as outras espécies de *Scedosporium* (Mello *et al.*, 2016; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2017).

Em análises metabólicas, foi demonstrado que cepas de *S. aurantiacum* utilizam substratos de maneiras distintas. Diferente de cepas com baixa virulência, cepas com alta virulência não eram capazes de assimilar sacarose, mas estas eram as únicas capazes de assimilar D-turanose. Essas diferenças metabólicas servem como indício para uma provável diversidade genômica significativa entre cepas e, com isso, a detecção daquelas com alta virulência pode ser possível (Kaur *et al.*, 2015).

Han e colaboradores, em 2017, compararam proteases secretadas da cepa clínica altamente virulenta WM 06.482 com as da cepa ambiental WM 10.136 e observaram a atividade de proteases semelhantes à elastase apenas na cepa altamente virulenta. Já foi demonstrado que, no contexto da aspergilose, a atividade de elastase está relacionada a aspectos importantes na patogenicidade fúngica, como penetração em tecidos pulmonares e deterioração de funções respiratórias (Robinson *et al.*, 1990; Kolattukudy *et al.*, 1993). Existem diversas evidências que apoiam a hipótese de proteases secretadas serem fatores de virulência, como já foi bem estabelecido em *Aspergillus fumigatus*, e isso inclui a identificação dessas enzimas em outras espécies de *Aspergillus* e em espécies de *Scedosporium* associadas a infecções em pacientes com fibrose cística (da Silva *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2009; Ramirez-Garcia *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017).

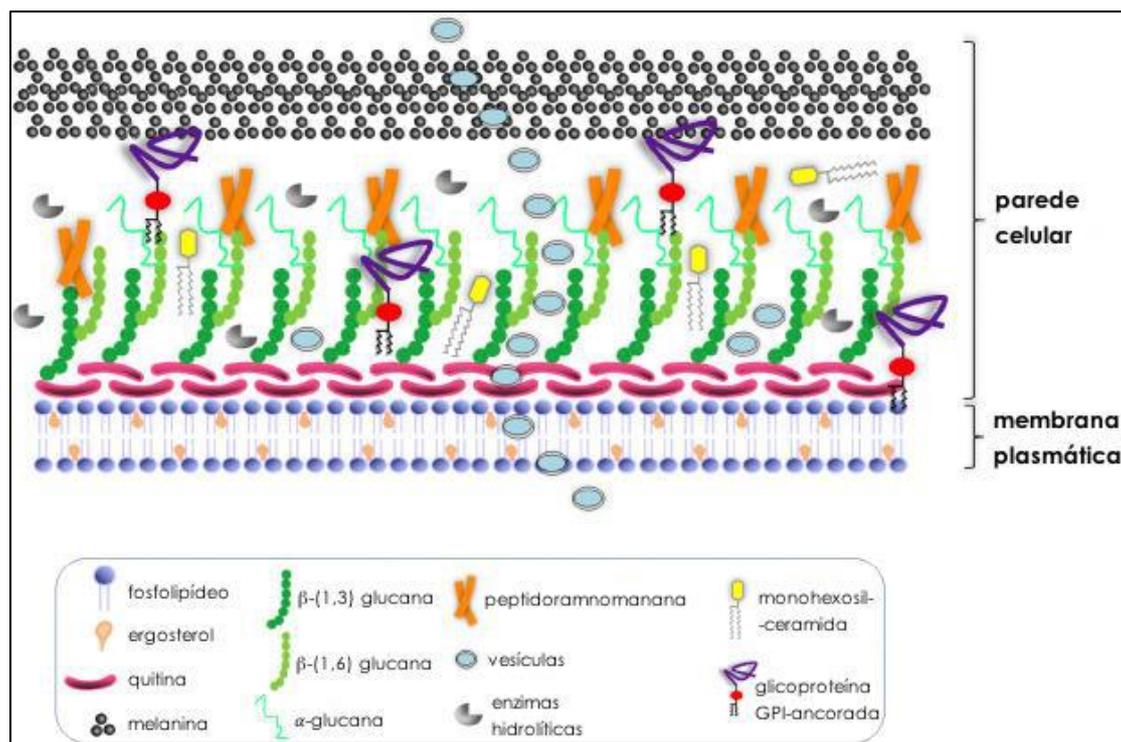
### **1.6. Parede celular fúngica**

A parede celular é uma estrutura dinâmica essencial para viabilidade, morfogênese e patogênese dos fungos. A parede é considerada uma estrutura de grande diversidade fenotípica e alta plasticidade, está em constante contato com ambiente e, conseqüentemente, sua composição é altamente regulada em resposta às condições ambientais. Em patógenos, as moléculas da parede são fundamentais para induzir e também para evitar a resposta imune do hospedeiro. Nesse sentido, a parede celular (estrutura que não está presente nas células de mamíferos) é de extrema importância pois é fonte de antígenos para diagnóstico e alvos para terapia antifúngica (Coronado *et al.*, 2007; Erwig e Gow, 2016; Gow *et al.*, 2017).

Em geral, a parede celular fúngica é composta majoritariamente por polissacarídeos e possui camadas distintas, onde a mais interna contém componentes relativamente mais conservados e a mais externa tem uma composição mais heterogênea e espécie-específica. A maioria dos fungos possui uma camada comum mais interna de  $\beta$ -(1,3)-glucana,  $\beta$ -(1,6)-glucana ramificadas e quitina, formando um exoesqueleto que resiste às pressões hidrostáticas internas da célula. As grandes diferenças residem nos componentes que são ligados à essas moléculas, presentes nas camadas mais externas. A superfície de *Candida albicans*, por exemplo, possui um alto teor de proteínas manosiladas ligadas a glicofosfatidilinositol, que por sua vez está conectado à camada de glucanas e quitina. Já *Histoplasma capsulatum* possui uma camada externa composta de  $\alpha$ -(1,3)-glucana ligada às camadas internas (Latgé, 2007; Rappleye *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2008).

A parede celular também é descrita como fundamental para determinar as formas complexas das células fúngicas, ou seja, sua morfogênese e diferenciação celular (Gow *et al.*, 2017). Neste contexto, *Aspergillus fumigatus* se tornou um modelo para o estudo da função da parede celular no crescimento de fungos filamentosos. Modificações importantes acontecem na estrutura e composição da parede durante a transição morfológica de conídio para hifa. Por exemplo, no início da transição, ocorre um aumento de tamanho do conídio resultado da entrada de água e acúmulo de glicerol, a partir daí, ocorre o início do crescimento polarizado para a formação de um tubo germinativo. Neste processo, há a perda de camadas compostas de hidrofobinas e melanina aliada a consequente maior exposição de moléculas como  $\alpha$ -(1,3)-glucana e glicosaminoglicanas (GAG) que transformam um conídio hidrofóbico em um conídio hidrofílico com mais propriedades aderentes (Fontaine *et al.*, 2010; Gravelat *et al.*, 2013; Latgé e Beauvais, 2014; Latgé *et al.*, 2017).

Alguns componentes importantes da parede celular de *Scedosporium* já foram identificados, purificados e caracterizados bioquimicamente, incluindo peptidoramnomanas (PRMs),  $\alpha$ -glucanas, melanina e glucosilceramidas (ou monohexosilceramidas) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Esquema representativo da parede celular de *Scedosporium* contendo componentes caracterizados em espécies de *Scedosporium* e baseado em modelos de outros fungos filamentosos como *Aspergillus*. (Mello *et al.*, 2019).

As peptidoramnomanas são glicoconjugados complexos constituídos por uma cadeia peptídica com glicanas *O* e *N*-ligadas. Os estudos relacionados a essa molécula demonstram sua importância em processos de interação com hospedeiro e virulência de fungos do complexo *Scedosporium/Lomentospora* (Pinto *et al.*, 2001). A pré-incubação de células HEp2 com a PRM purificada ou com anticorpos policlonais anti-PRM reduz a adesão e endocitose de *S. boydii*, sugerindo uma competição por receptores na superfície das células HEp2 (Pinto *et al.*, 2004). Já foi descrito que ramnomanas de *P. boydii* são reconhecidas por TLR4, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Figueiredo *et al.*, 2012). Nesse contexto, a *O*-glicosilação é essencial para a adesão do fungo à célula hospedeira, assim como é para a indução de resposta imune. Oligossacarídeos *O*-ligados inibem a adesão de *S. boydii* à células HEp2 e PRMs de-*O*-glicosiladas não afetam a fagocitose de *L. prolificans* por macrófagos (Pinto *et al.*, 2005; Gorin *et al.*, 2010). Também foi demonstrado que anticorpos monoclonais anti-PRM aumentam a germinação, reduzem a fagocitose por macrófagos J774.16 e aumentam a virulência de *S. apiospermum* em modelo murino,

revelando o envolvimento da PRM no processo de patogênese fúngica (Lopes *et al.*, 2010).

As  $\alpha$ -glucanas da parede celular de *S. boydii* já foram caracterizadas e também se demonstrou que esta é uma molécula relevante no estímulo da resposta imune do hospedeiro. O pré-tratamento de macrófagos peritoneais com  $\alpha$ -glucanas purificadas diminui a taxa de fagocitose, além de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e a sinalização mediada por TLR2, CD14 e MyD88 (Bittencourt *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2012; Lackner e Guarro, 2013) .

A melanina é um pigmento que está associado ao aumento da tolerância ao “burst” oxidativo em espécies do gênero *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Sporothrix shenckii* (Wang e Casadevall, 1994; Nosanchuk e Casadevall, 2003; Cunha *et al.*, 2010). Em um estudo que utilizou *L. prolificans* com genes de enzimas da biossíntese de DHN-melanina silenciados, foi visto que conídios sem melanina se tornaram mais suscetíveis a raios ultravioletas e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ensaios de sobrevivência de conídios (Al-Laaiby *et al.*, 2016). Em um outro estudo que observou as modificações da parede celular durante a maturação de conídios de *S. boydii*, foi visto que na ausência de melanina há um aumento na marcação de glicoconjugados contendo manose (moléculas envolvidas no reconhecimento imune). Neste trabalho, sugeriu-se que, durante a maturação de conídios, esses glicoconjugados são mascarados progressivamente com polimerização de melanina, um composto comumente relacionado a processos de evasão do sistema imune (Nosanchuk e Casadevall, 2003; Ghamrawi *et al.*, 2014).

O estudo da composição da parede celular pode revelar, como já mencionado, antígenos para diagnóstico e alvos para terapia antifúngica. Além disso, pode auxiliar no melhor entendimento da patogênese dos fungos e da interação parasita-hospedeiro. As glucosilceramidas, também presentes na parede celular de *Scedosporium spp.*, serão discutidas na sessão a seguir.

## 1.7. Glucosilceramidas

Os esfingolipídeos estão presentes em células eucarióticas, como em plantas, mamíferos e fungos. Existem dois grupos principais descritos em células fúngicas: inositolfosforilceramidas (IPCs) e hexosilceramidas, como glucosilceramidas (GlcCer) e galactosilceramidas (GalCer) (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016).

A glucosilceramida (GlcCer) é considerada o principal glicoesfingolipídeo neutro sintetizada pela maioria dos fungos patogênicos. É constituída de uma cadeia principal de esfingosina (9-metil-4,8-esfingodienina), ligada por uma ligação amídica a um ácido graxo (ácido 2-hidroxi octadecanóico ou 2-hidroxi hexadecanóico) e a uma glucose (Barreto-Bergter *et al.*, 2004). Apesar de estar presente em fungos e mamíferos, a estrutura molecular de GlcCer é distinta entre esses organismos. Além disso, em células de mamíferos, GlcCer e GalCer são utilizadas para a síntese de outros esfingolipídeos complexos, enquanto que em fungos essas moléculas são consideradas a etapa final da síntese, sendo encontradas na membrana e na parede celular fúngica (Fernandes *et al.*, 2018). Análises da estrutura de GlcCer em fungos revelaram um caráter conservado dessas moléculas, em especial na cadeia principal de esfingosina, mas algumas diferenças são encontradas no tamanho e grau de insaturação da cadeia de ácido graxo (Barreto-Bergter *et al.*, 2004, 2011).

Além de constituintes da superfície celular de fungos, os esfingolipídeos podem se agrupar com esteróis em microdomínios de membrana também chamados de “lipid rafts”. Esta estrutura organizada possui um papel importante no estabelecimento do crescimento polarizado observado em fungos filamentosos. Este tipo de crescimento envolve a extensão apical das células fúngicas, onde acumulam-se vesículas contendo precursores para a síntese de parede celular na ponta da hifa em crescimento. Em *Aspergillus nidulans*, os microdomínios são observados nas pontas das hifas e a inibição da síntese de esfingolipídeos prejudica o estabelecimento da polaridade da célula e impede a ramificação das hifas durante a germinação (Cheng *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2007).

Análises por imunofluorescência demonstram que GlcCer é detectada na superfície de conídios e hifas de *S. boydii*. (Pinto *et al.*, 2002; Calixto *et al.*, 2015). Em *Fonsecaea pedrosoi*, a melanina presente em corpos escleróticos é um fator que parece dificultar o reconhecimento de GlcCer por anticorpos anti-GlcCer (Nimrichter

*et al.*, 2004). Em outro estudo em *L. prolificans*, a GlcCer é detectada em hifas, em conídios após 6 horas de incubação a 37°C (nos estágios iniciais da germinação) e em conídios tratados com NaOH 1M (que retira moléculas solúveis em meio alcalino, como a melanina) (Xisto *et al.*, 2019). Estas observações sugerem uma exposição diferenciada de GlcCer de acordo com a fase morfológica do fungo e também o envolvimento de componentes mais externos da parede celular, como a melanina, no mascaramento dessa molécula na superfície de conídios.

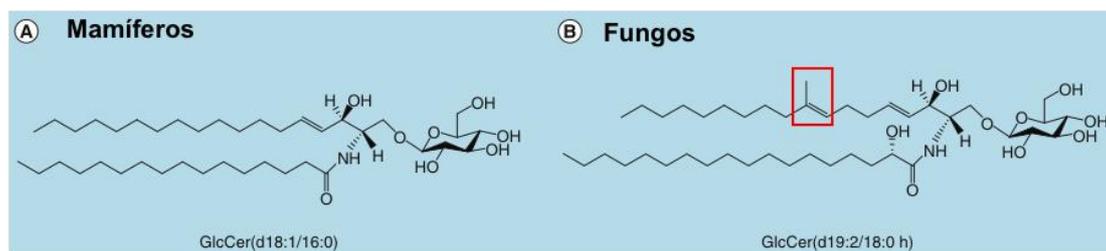
A GlcCer também tem sido descrita como uma molécula importante na patogênese fúngica. Mutantes de *Cryptococcus neoformans* com o gene da GlcCer sintase deletado, são avirulentos em modelo murino de infecção. A deleção deste gene também resultou em uma significativa redução do crescimento de *C. neoformans* em condições importantes para o estabelecimento de infecção em um hospedeiro (pH neutro ou alcalino, 5% CO<sub>2</sub> e 37°C) (Rittershaus *et al.*, 2006). Em *Candida albicans*, a deleção de genes da síntese de GlcCer resultou numa redução da transição morfológica de leveduras para hifa e também provocou desestabilidade na membrana celular, demonstrada por uma maior susceptibilidade a agentes como SDS e fluconazol (Oura *et al.*, 2008, 2010). Em um trabalho com *Aspergillus nidulans*, diversos tipos de mutantes já foram desenvolvidos para o estudo de GlcCer, como cepas incapazes de sintetizar GlcCer, de adicionar o grupamento açúcar, o grupamento metil e a insaturação no carbono 8. Estes apresentaram deficiência de crescimento, desorganização de microdomínios de membrana e redução de virulência em modelo de infecção utilizando *Galleria mellonella* (Fernandes *et al.*, 2016). A adição do grupamento metil e a instauração no carbono 8 também se demonstrou essencial para a virulência de *C. neoformans* em modelo murino de infecção, assim como resultou numa maior susceptibilidade à estressores de membrana e à ação de macrófagos (Raj *et al.*, 2017). Estes dados sugerem que estruturas específicas encontradas na molécula de GlcCer são importantes para a patogênese e diferenciação celular de diversos fungos (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016).

Recentemente, demonstrou-se que GlcCer é um potentes indutor de resposta imune. GlcCer purificada de conídios e de micélio de *L. prolificans* foi capaz de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por esplenócitos de camundongos. Essas moléculas foram capazes de recrutar células polimorfonucleadas, células mononucleadas, eosinófilos e macrófagos peritoneais. Além disso, a ativação por

GlcCer induziu o “burst” oxidativo de macrófagos peritoneais, resultando também no aumento da destruição de conídios de *L. prolificans* (Xisto *et al.*, 2019). A administração de GlcCer purificada do fungo não patogênico *Candida utilis* foi proposta como uma estratégia de vacinação para *C. neoformans*. GlcCer administrada via intraperitoneal em camundongos preveniu a disseminação de *C. neoformans* dos pulmões para o cérebro, resultando na sobrevivência de 60% de camundongos, na produção de anticorpos anti-GlcCer e na ausência de dano hepático (Mor *et al.*, 2016).

O uso de anticorpos monoclonais é outra ferramenta utilizada no estudo das funções de GlcCer. A imunização passiva com anticorpos monoclonais gera proteção contra *C. neoformans* em modelo murino de infecção (Rodrigues *et al.*, 2007). Em *F. pedrosoi*, anticorpos anti-GlcCer inibem a diferenciação celular assim como são capazes de opsonizar conídios, aumentando a fagocitose e sua destruição por macrófagos (Nimrichter *et al.*, 2004). Os anticorpos anti-GlcCer também são capazes de reduzir a germinação de *S. apiospermum*, de aumentar a internalização e destruição desse fungo por macrófagos peritoneais e também possui efeito sinérgico com itraconazol *in vitro* (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014).

Como já mencionado, a estrutura de GlcCer em fungos é distinta da encontrada em células de mamíferos, onde a instauração no carbono 8 e a metilação no carbono 9 são características exclusivas de fungos (**Figura 5**). Por esse motivo, e aliado a todos os dados da literatura que apresentam a importância da GlcCer para processos biológicos e patogênese de diversos fungos, essa molécula é considerada um potencial novo alvo para estudos de novas terapias antifúngicas.



**Figura 5:** Estrutura de glucosilceramidas encontradas em (A) mamíferos e em (B) fungos. Em (B), o retângulo destaca a principal diferença estrutural das glucosilceramidas fúngicas em comparação com as de mamíferos, a metilação no carbono 9 e a instauração do carbono 8 da cadeia principal de esfingosina. (adaptado de Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016).

Este trabalho tem como foco elucidar a estrutura química de GlcCer encontradas em *S. aurantiacum*, evidenciar a presença dessa molécula na superfície e sua importância nos processos de crescimento deste fungo filamentoso, desde a transição morfológica de conídios para hifas até a formação de biofilme, utilizando como ferramenta os anticorpos monoclonais anti-GlcCer.

## 2. JUSTIFICATIVA

Como já mencionado, espécies do gênero *Scedosporium* destacam-se como patógenos emergentes. A maior ocorrência de infecções por esses fungos nos últimos anos é principalmente devido ao aumento da quantidade de pessoas com algum tipo de imunocomprometimento, como pacientes com câncer, doenças hematológicas, AIDS, transplantados e tratados com imunossupressores. Esses fungos são capazes de causar diversas manifestações clínicas, desde infecções superficiais a infecções sistêmicas, apresentando uma alta taxa de mortalidade (Cortez *et al.*, 2008; Tammer *et al.*, 2011). Além disso, a scedosporiose possui um diagnóstico difícil, podendo ser facilmente confundida com outras hialohifomicoses, e estratégias de tratamento limitadas, pois espécies de *Scedosporium* são multirresistentes a drogas antifúngicas (Walts, 2001). Neste contexto, *S. aurantiacum* destaca-se como uma espécie altamente virulenta, que germina precocemente e é capaz de formar um biofilme robusto de maneira rápida em diversos materiais de superfície, inclusive em cateteres (Mello *et al.*, 2016; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2017).

Desse modo, torna-se relevante a busca por novos dados que auxiliem no entendimento da biologia e, conseqüentemente, da virulência desse patógeno emergente. Os glicoconjugados da parede celular possuem grande importância para o crescimento e patogênese de *Scedosporium* (Pinto *et al.*, 2008). O estudo dessas moléculas e de suas funções pode ajudar a elucidar como o processo infeccioso e a interação com o hospedeiro se estabelece. Nesse sentido, a glucosilceramida é uma molécula de superfície que possui uma estrutura específica em fungos e que tem um papel de destaque na morfogênese, interação com hospedeiro e virulência em outras espécies de fungos (Barreto-Bergter *et al.*, 2004; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016). Por ser considerada um potencial novo alvo para terapias antifúngicas, o estudo específico da estrutura e o maior entendimento das funções da glucosilceramida são importantes quando se trata de um patógeno multirresistente como *S. aurantiacum*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Caracterizar a estrutura química de glucosilceramidas de isolados de *Scedosporium aurantiacum* (um ambiental e um clínico), avaliar sua exposição na superfície celular e a relevância da molécula em processos de crescimento fúngico.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a estrutura química de glucosilceramidas obtidas de isolados de *S. aurantiacum*;
- Observar a exposição de glucosilceramidas na superfície de isolados *S. aurantiacum* em diferentes estágios de crescimento;
- Avaliar possíveis efeitos do anticorpo monoclonal anti-GlcCer nos processos de germinação e formação de biofilme de isolados de *S. aurantiacum*;
- Avaliar se o anticorpo monoclonal anti-GlcCer afeta a estabilidade da superfície celular e a organização de microdomínios de membrana dos isolados de *S. aurantiacum*;
- Avaliar se o anticorpo monoclonal anti-GlcCer afeta a adesão de conídios e de biofilme dos isolados de *S. aurantiacum*.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Microrganismos e condições de cultivo**

#### 4.1.1. Microrganismos

Neste trabalho foram utilizados dois isolados de *Scedosporium aurantiacum*: *Scedosporium aurantiacum* WM 09.12, isolado de solo na Austrália e *Scedosporium aurantiacum* WM 06.385, isolado de uma amostra clínica de ouvido na Austrália. Os isolados foram gentilmente cedidos pelo professor Wieland Meyer do Sydney Institute for Emerging Infectious Diseases and Biosecurity, The University of Sydney, e pesquisador do Molecular Mycology Research Laboratory, Sydney, Austrália.

#### 4.1.2. Obtenção de conídios

Os conídios dos dois isolados foram obtidos a partir do crescimento em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Modificado, que contém 0,5% de extrato de levedura além da composição típica de ágar Sabouraud (1% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar), incubadas por sete dias à temperatura ambiente. Para a obtenção de conídios viáveis sem melanina, foi adicionado triciclazol (inibidor da síntese de DHN-melanina, que não afeta a viabilidade celular) às placas de Sabouraud Modificado na concentração de 16 µg/ml (Cunha *et al.*, 2005). A superfície do meio foi lavada com PBS estéril e os conídios, removidos com auxílio de uma espátula, foram coletados após filtração em rede com poros de 40 µm (Falcon, Estados Unidos) e centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014).

### **4.2. Extração e análise química e estrutural de glucosilceramidas**

#### 4.2.1. Obtenção de massa celular

Células (micélio) dos dois isolados foram obtidas a partir do crescimento em meio Sabouraud Modificado líquido e mantidas sob agitação à temperatura ambiente. Após sete dias de crescimento, as células foram filtradas, lavadas com água destilada e estocadas a -20°C até serem processadas. O processo foi repetido até a obtenção de 200g de massa celular de cada isolado de *S. aurantiacum*.

#### 4.2.2. Extração e purificação de glicosíngolipídeos

A massa total (200g) de células dos dois isolados obtida durante o período de crescimento foi tratada com clorofórmio/metanol (600 ml) na proporção 2:1 (v:v) por duas horas sob agitação à temperatura ambiente. Após esse tempo, a massa foi filtrada, resultando num filtrado I. O resíduo celular foi tratado com clorofórmio/metanol (600 ml), dessa vez na proporção 1:2 (v:v) sob agitação à temperatura ambiente durante a noite. Após esse período, houve uma nova filtração, gerando um filtrado II. A massa resultante foi estocada à -20 °C.

Os dois filtrados resultantes (I e II) desse processo foram concentrados juntos em rota-evaporador, resultando no extrato lipídico bruto (lipídeos totais). Esse extrato foi fracionado de acordo com Folch, obtendo-se a fase inferior contendo os lipídeos neutros (Folch *et al.*, 1957).

A glucosilceramida, presente na fase inferior de Folch, foi purificada por métodos cromatográficos, utilizando coluna de sílica-gel 60. Os glicolipídeos foram fracionados nessa coluna através de eluição com clorofórmio, acetona e metanol. Essas três frações foram analisadas por cromatografia de camada fina e a fração onde encontrou-se glucosilceramida foi submetida(s) à uma nova coluna de sílica-gel 60, eluída dessa vez com clorofórmio/metanol em proporções crescentes (100:0, 90:10, 80:20, 50:50 e 0:100). As frações resultantes foram analisadas por cromatografia de camada fina, onde a fração contendo a glucosilceramida mais purificada foi analisada por espectrometria de massas (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014).

A cromatografia em camada fina foi feita utilizando placas de sílica-gel 60 e solvente de corrida clorofórmio / metanol / NH<sub>4</sub>OH 2M (40:10:1 v/v), revelando-se as placas com vapor de iodo e “spray” de orcinol / ácido sulfúrico (da Silva *et al.*, 2004).

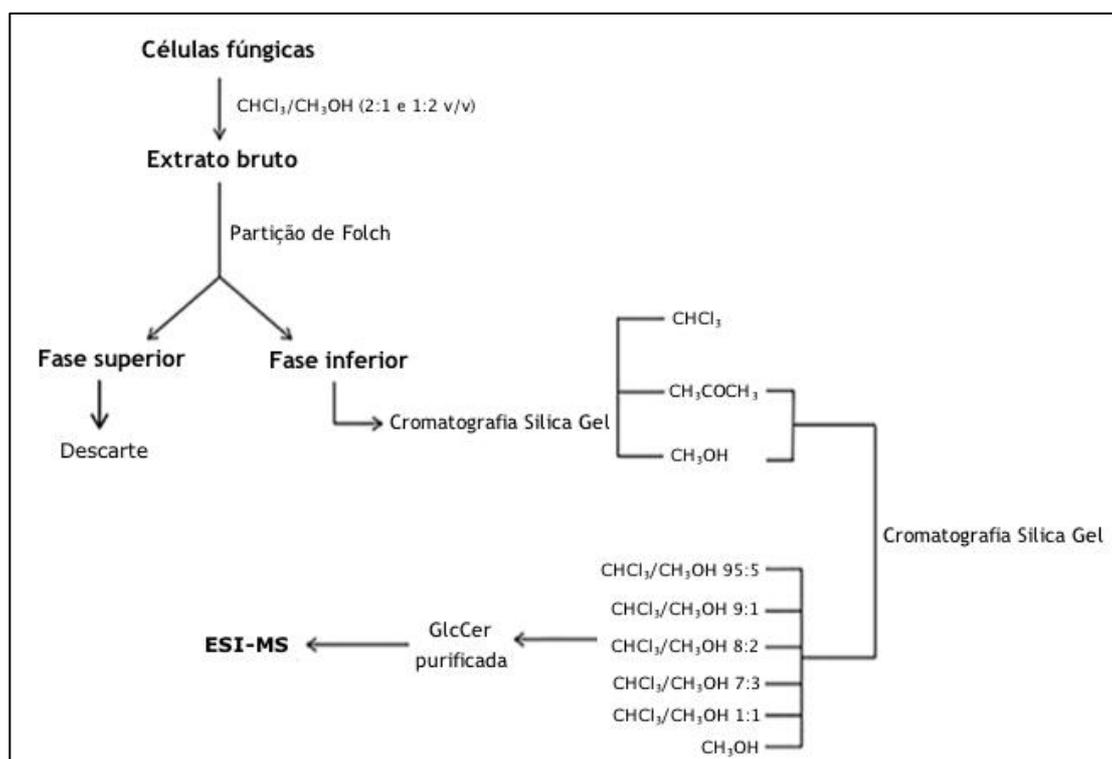
#### 4.2.2 Análise da composição monossacarídica

As glucosilceramidas dos dois isolados fúngicos foram hidrolisadas com ácido trifluoroacético (TFA) 3M a 100°C por 3 h. Para análise da composição de monossacarídeos, amostras foram aplicadas em placas de cromatografia em camada fina de sílica-gel 60. A placa será desenvolvida cinco vezes com o sistema de solventes n-butanol:acetona:água (4:5:1 v/v/v). Uma solução contendo 1 % de manose, galactose, glucose e ramnose foi utilizada como padrão de açúcar.

O sistema revelador foi o orcinol 0,05% (p/v) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10% (v/v), com o desenvolvimento da cor feito por aquecimento da placa em forno a 100°C por cerca de 10 minutos (da Silva *et al.*, 2004).

#### 4.2.3 Espectrometria de massas (ESI-MS) de glucosilceramidas

A análise estrutural das glucosilceramidas purificadas foi feita por espectrometria de massas, utilizando a técnica de ionização do tipo electrospray (ESI-MS) em modo positivo utilizando um espectrômetro ESI-ION TRAP (modelo Amazon SL, Bruker, Alemanha). As amostras (100 µg/ml) isoladas foram analisadas por injeção direta após solubilização em clorofórmio/metanol/água 5:4:1 (v/v) e 1mM de cloreto de lítio. O fluxo foi mantido constante em 3,0 µl/min e a energia do cone e do capilar serão mantidas em 60 V e 2.8 kV respectivamente (de Souza *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Esquema geral da extração e purificação glucosilceramidas encontradas em fungos. CHCl<sub>3</sub>, clorofórmio; CH<sub>3</sub>OH, acetona; CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, metanol (adaptado de Calixto *et al.*, 2015).

### 4.3. Reatividade do anticorpo anti-GlcCer com as células de *S. aurantiacum*

#### 4.3.1. Testes imunoenzimáticos

Os testes imunoenzimáticos foram realizados como descritos por Haido *et al.*, 1998; Leitão *et al.*, 2003 e Pinto *et al.*, 2005, utilizando células dos dois isolados de *S. aurantiacum* como antígenos, com o objetivo de avaliar a reatividade delas com o anticorpo monoclonal anti-GlcCer em diferentes tempos de germinação.

O teste de ELISA foi realizado em placas de microtitulação sensibilizadas com 50 µl contendo  $10^5$  conídios/ml de ambos isolados e incubados por 3, 6 e 18 h à 37 °C para a obtenção de diferentes estágios de germinação. Também foram utilizados conídios tratados e não tratados com NaOH 1M overnight a temperatura ambiente (para uma retirada de melanina e outros componentes solúveis em meio alcalino da superfície celular) e incubados por 1 h a 37°C apenas como etapa de adesão. Foram feitas 3 lavagens com 150 µl de PBS e os sítios inespecíficos foram então bloqueados por incubação com PBS-leite 3% durante a noite em câmara úmida a 4 °C. O anticorpo monoclonal anti-GlcCer foi adicionado aos poços contendo os antígenos em diluição seriada a partir da concentração de 100 µg/ml (volume de 100 µl). Após incubação por 1 h à 37 °C, as placas foram lavadas três vezes com 150 µl de PBS e 100 µl de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:3000 em PBS foram acrescentados aos poços da placa, procedendo-se a incubação como na etapa anterior. A placa foi lavada como anteriormente descrito e 100 µl do substrato enzimático, constituído de 4 mg de ortofenilenodiamina (OPD) em 10 ml de tampão fosfato-citrato pH 5,0 e 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol.) foram adicionados. A reação foi desenvolvida no escuro, à temperatura ambiente após 20 minutos e paralisada após 20 minutos pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M em cada poço. A absorbância foi lida a 490 nm em espectrofotômetro (Bio-Rad, Estados Unidos).

Como controles, foram utilizados os fungos em PBS (sem a adição de nenhum anticorpo) e um controle do anticorpo secundário (sem a adição do anticorpo primário).

#### 4.3.2. Microscopia de Imunofluorescência

A microscopia de imunofluorescência foi realizada como descrito por Xisto *et al.*, 2019, utilizando os isolados de *S. aurantiacum* em diferentes tempos de germinação (0, 3, 6 e 18h) e em conídios tratados ou não com NaOH 1M. As células

foram cultivadas em placas de 24 poços contendo meio RPMI 1640 e com lamínulas de vidro cobertas com poli-L-lisina adicionadas ao fundo dos poços. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão cacodilato. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS para a retirada do fixador e foi feito o bloqueio com 500 µl de PBS-BSA 3% por poço durante a noite a 4°C. Foram realizadas três lavagens com PBS filtrado e o anticorpo monoclonal anti-GlcCer foi adicionado (100 µg/ml) diretamente às lamínulas e estas foram incubadas por 1 h à 37 °C em câmara úmida. Posteriormente, foram realizadas mais três lavagens, adicionado o anticorpo conjugado Alexafluor na diluição 1:200 e a incubação também foi por 1 h à 37 °C. Após este tempo, foram feitas mais três lavagens. Após esses procedimentos, realizou-se a montagem das lâminas, onde as lamínulas foram cobertas na lâmina com 2,5 µl de n-propil-galato. As lâminas foram seladas e a leitura do resultado foi feita em microscópio de fluorescência Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Alemanha).

Lâminas contendo apenas o fungo em PBS e o fungo com anticorpo conjugado Alexafluor serviram como controles.

#### **4.4. Ensaio de germinação na presença do anticorpo anti-GlcCer**

Células ( $10^5$  conídios/ml) dos isolados de *S. aurantiacum* foram incubados por 3 e 6 h em placa de 24 poços contendo meio RPMI 1640, na presença do anticorpo anti-GlcCer (100 µg/ml) e sistema controle contendo IgG irrelevante. Em diferentes intervalos de tempos, as células foram contadas e seus tubos germinativos foram medidos em microscópio invertido até um mínimo de 100 conídios. Determinou-se o percentual de germinação como o quociente do total de conídios germinados sob o número total de células contadas X 100 (Manavathu *et al.*, 1999; Da Silva *et al.*, 2004).

#### **4.5. Susceptibilidade a estressores de membrana na presença do anticorpo anti-GlcCer**

Células ( $10^5$  conídios/ml) dos isolados de *S. aurantiacum* foram incubados com 100 µg/ml do anticorpo anti-GlcCer por 3 h a 37°C em meio RPMI 1640. Em seguida, soluções com cloreto de sódio (NaCl, 3%) ou branco de calcofluor (10 µg/ml) diluídos meio RPMI 1640 foram adicionados. Após 24 h de incubação a

atividade metabólica dos isolados foi avaliada através do ensaio de redução por XTT, onde foi adicionado aos poços 54 µl da solução de XTT (0,5 mg/ml em PBS) com menadiona (0,17 mg/ml em acetona) e incubado por 2 h a 37°C protegido da luz. (Fernandes *et al.*, 2016; Rollin-Pinheiro, *et al.*, 2019).

#### **4.6. Marcação das células com filipina para evidênciação de microdomínios de membrana na presença do anticorpo anti-GlcCer**

Células ( $10^5$  conídios/ml) dos isolados de *S. aurantiacum* foram marcadas com filipina de acordo com Liu *et al.*, 2014. As células foram pré-tratadas com 100 µg/ml do anticorpo anti-GlcCer e incubadas por 3 h em RPMI 1640 a 37°C. Células controle foram incubadas com IgG irrelevante. Os conídios germinados após 3 h (fixados com paraformaldeído 4%) foram marcados com 50 µg/ml de filipina (Sigma, F9765) em PBS por 2 h a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após duas lavagens com PBS, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Alemanha).

#### **4.7. Ensaio de formação de biofilme na presença do anticorpo anti-GlcCer**

O ensaio de formação de biofilme foi realizado como descrito por Rollin-Pinheiro *et al* (2017). Biofilmes foram crescidos em placas de 96 poços, a partir de uma suspensão de  $10^7$  conídios/ml por poço em meio RPMI 1640 suplementado com glucose 2% e soro fetal bovino 20%. A placa foi incubada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 24 h na presença ou ausência do anticorpo anti-GlcCer (100 µg/ml). Após a incubação, foram realizadas três lavagens com PBS para a remoção de células não aderidas. A avaliação da formação de biofilme foi feita conforme descrito a seguir.

Para a quantificação de biomassa fúngica total, o biofilme aderido foi fixado com metanol por 15 minutos e corados com cristal violeta 0,02% por 20 minutos. Após esse tempo, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril e o cristal violeta impregnado foi dissolvido pela adição de ácido acético 33% por 5 minutos. Após esse tempo, transferiu-se a solução para uma nova placa e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Rad, Estados Unidos) no comprimento de onda de 590 nm.

Para a avaliação da atividade metabólica dos biofilmes, foi utilizada a técnica de redução do XTT. Aos poços com biofilme adicionou-se 54 µl da solução de XTT (0,5 mg/ml em PBS) com menadiona (0,17 mg/ml diluído em acetona). Após a incubação por 2 h a 37°C protegido da luz, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda 490 nm (Pierce *et al.*, 2008).

#### **4.8. Ensaios de adesão de biofilme e conídios germinados na presença do anticorpo anti-GlcCer**

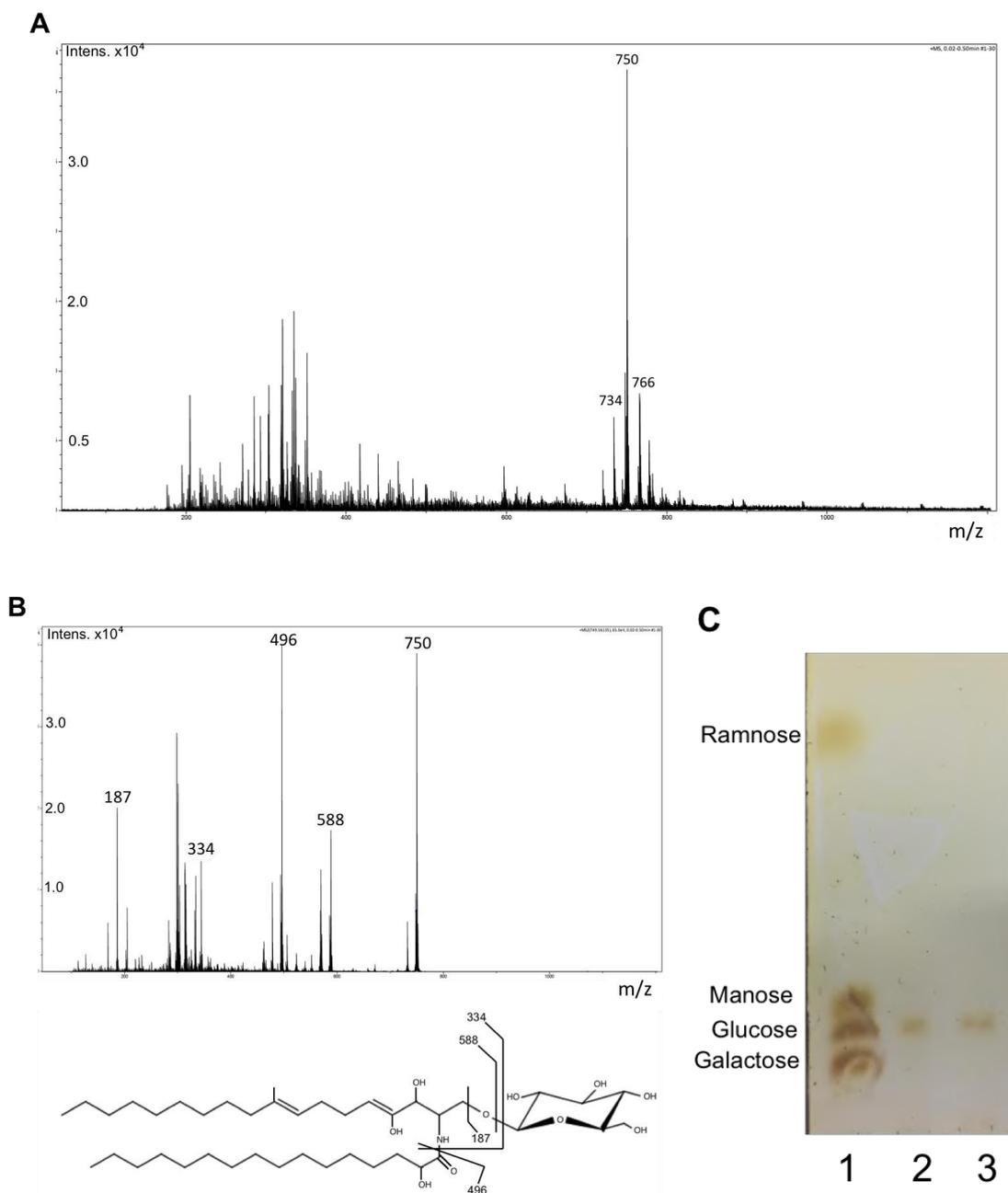
Para avaliar a influência do anticorpo anti-GlcCer na adesão do biofilme de *S. aurantiacum*, os isolados foram crescidos em placas de 96 poços, a partir de uma suspensão de  $10^7$  conídios/ml por poço em meio RPMI 1640 suplementado com glucose 2% e soro fetal bovino 20%. A placa foi incubada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 24 h na presença ou ausência do anticorpo anti-GlcCer (100 µg/ml). Após a incubação foi avaliado, através da densidade óptica (660 nm), o crescimento fúngico nos poços antes e depois de serem lavados três vezes com PBS estéril para a retirada de células não aderentes (Xisto *et al.*, 2018).

Com o objetivo de investigar a influência do anticorpo anti-GlcCer na adesão de *S. aurantiacum* em estágios iniciais do crescimento, os isolados foram crescidos em placas de 96 poços, a partir de uma suspensão de  $10^5$  conídios/ml por poço em meio RPMI 1640 e incubados a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 6 h na presença ou ausência de anti-GlcCer (100 µg/ml). Os poços foram lavados três vezes com PBS estéril para a retirada de células não aderidas e as células aderidas foram contadas em microscópio invertido. Cinco campos foram contados por poço para obter o número total de células aderidas a placa de poliestireno (Mello *et al.*, 2016).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização estrutural de glucosilceramidas de *S. aurantiacum*

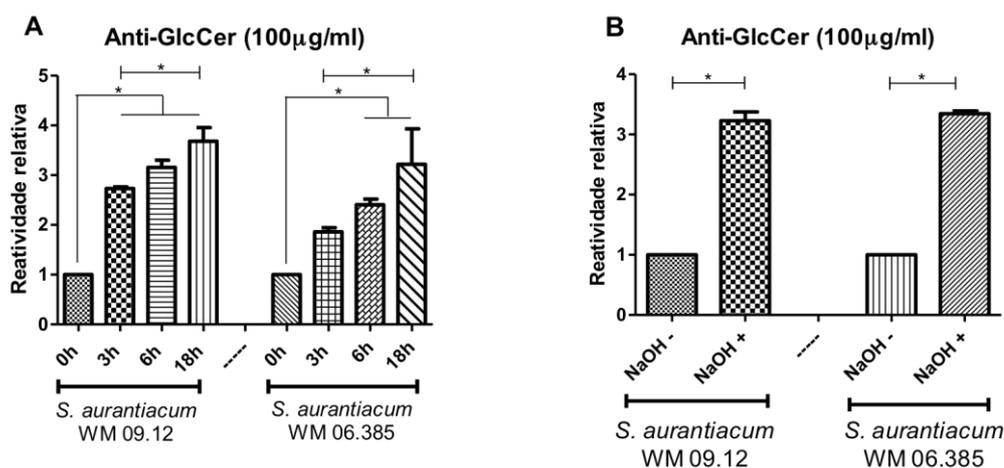
Glucosilceramidas (GlcCer) purificadas do micélio de *S. aurantiacum* WM 09.12 e *S. aurantiacum* WM 06.385 foram analisadas por espectrometria de massas (ESI-MS). Ambos os isolados apresentaram como íon molecular majoritário  $m/z$  750 e em menor intensidade foram detectados os íons moleculares  $m/z$  734 e  $m/z$  766 (**Figura 7A**). O íon molecular  $m/z$  750 das amostras de ambos os isolados de *S. aurantiacum* foram submetidos a fragmentação em espectrômetro de massas (MS/MS) gerando íons como  $m/z$  588, correspondente a perda de uma hexose, e  $m/z$  496, correspondente a perda de uma cadeia de ácido graxo hidroxilada com 16 carbonos (**Figura 7B**). Com essas análises, foi possível determinar para  $m/z$  750 a estrutura de N-2-hidroxihexadecanoil-1-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina que corresponde a uma GlcCer com uma cadeia de ácido graxo com 16 carbonos e uma esfingosina com metilação no carbono 9, insaturações nos carbonos 4 e 8 e presença de dois grupos hidroxilas (**Figura 7B**). A hidrólise ácida foi feita para a confirmação do monossacarídeo componente dessa molécula e, através da visualização por cromatografia em camada fina, foi encontrada glucose nas amostras dos dois isolados testados (**Figura 7C**).



**Figura 7:** Caracterização química de glucosilceramidas de *S. aurantiacum*. (A) Espectro de massas ESI-MS1. (B) ESI-MS2 do íon molecular  $m/z$  750 observado em (A) e estrutura química proposta para este íon molecular majoritário de *S. aurantiacum* WM 09.12 e WM 06.385. (C) Cromatografia em camada fina dos monossacarídeos das glucosilceramidas de *S. aurantiacum* após hidrólise ácida com TFA 3M. 1. Padrões de ramnose, manose, glucose e galactose (1 mg/ml); 2. Amostra de glucosilceramida hidrolisada de *S. aurantiacum* WM 09.12; 3. Amostra de glucosilceramida hidrolisada de *S. aurantiacum* WM 06.385.

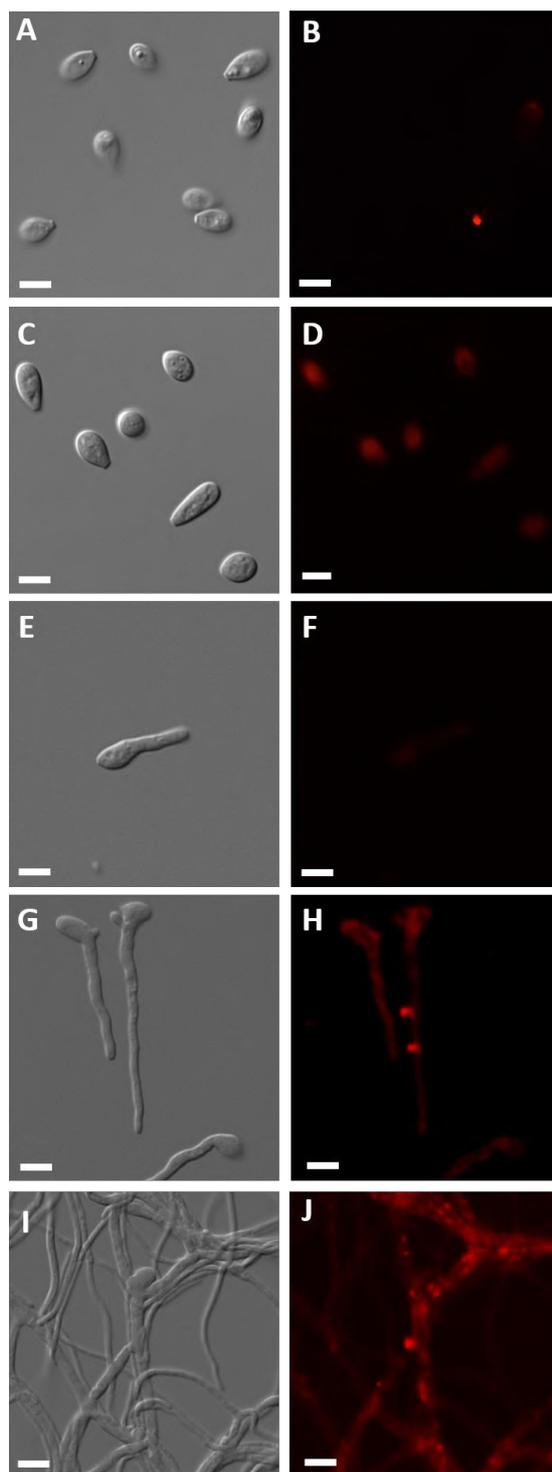
## 5.2. Reatividade do anticorpo anti-GlcCer com células de *S. aurantiacum* ao longo do processo germinativo

A exposição da GlcCer na superfície dos isolados de *S. aurantiacum* foi avaliada através da reatividade do anticorpo monoclonal anti-GlcCer com as células fúngicas em diferentes estágios de germinação. Utilizando a técnica de ELISA, foi possível constatar que a reatividade do anticorpo anti-GlcCer aumenta progressivamente ao longo do processo germinativo (**Figura 8A**), de 0 h onde estão presentes apenas conídios até 18 h de incubação onde já há a formação de micélio. Para avaliar a possível interferência de melanina na exposição de GlcCer, comparou-se a reatividade do anticorpo anti-GlcCer em conídios tratados ou não com NaOH 1M (**Figura 8B**). Observou-se que a reatividade do anticorpo é aproximadamente 4 vezes maior em conídios tratados, ou seja, em conídios cuja melanina foi removida através do tratamento com NaOH.



**Figura 8:** Reatividade do anticorpo monoclonal anti-GlcCer com células de *S. aurantiacum* WM 09.12 (ambiental) e *S. aurantiacum* WM 06.385 (clínico) em diferentes tempos de germinação (A) ou após tratamento de conídios com NaOH 1M para a retirada de melanina e outros componentes da camada mais externa da superfície celular (B). Os resultados estão apresentados como reatividade relativa em relação ao tempo de 0 h (A) e ao controle sem tratamento com NaOH (B).

A microscopia de imunofluorescência foi realizada para a visualização da exposição de GlcCer nos mesmos tempos de incubação e condições testadas com a técnica de ELISA (**Figura 9**). Foi possível observar a reatividade do anticorpo anti-GlcCer às hifas de *S. aurantiacum* assim como a diferença de reatividade em conídios tratados ou não com NaOH 1M.

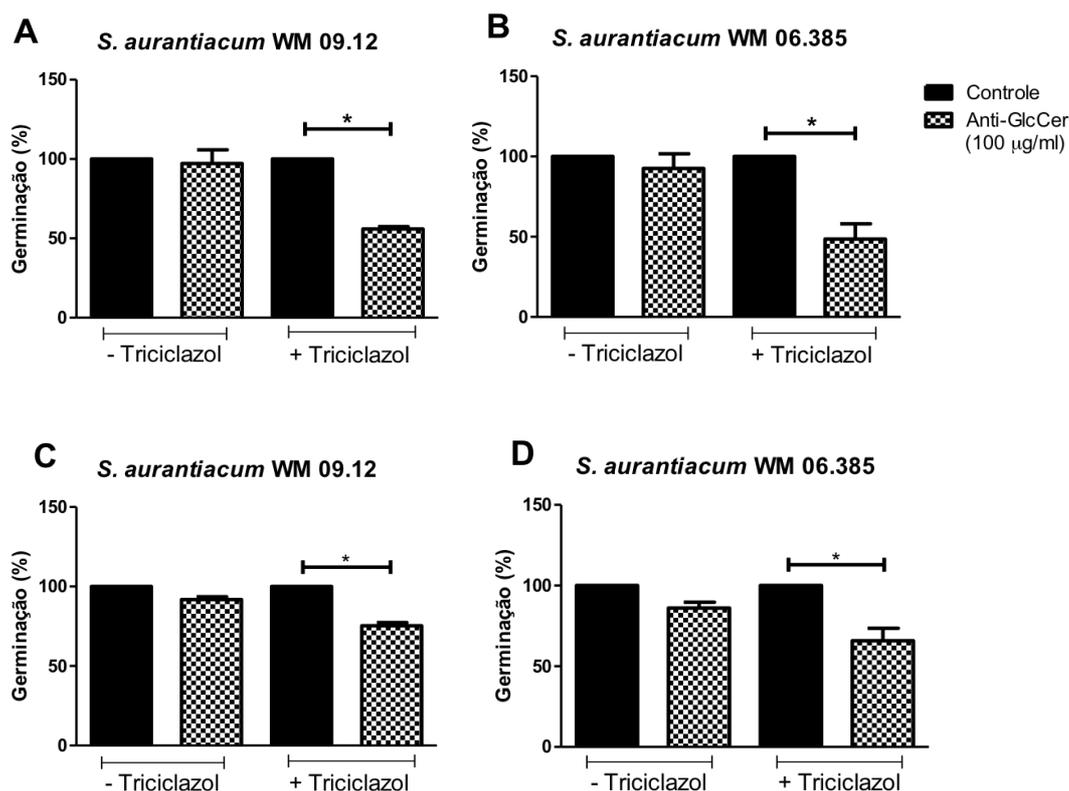


**Figura 9:** Análise por microscopia de imunofluorescência da reatividade do anticorpo anti-GlcCer com conídios e micélio de *S. aurantiacum* WM 06.385. (A, C, E, G, I) Microscopia de contraste de interferência diferencial. (B, D, F, H, J) Microscopia de fluorescência utilizando anti-GlcCer (100  $\mu\text{g/ml}$ ) conjugado a Alexafluor 546. A e B: conídios 0 h. C e D: conídios tratados com NaOH 1M. E e F: conídios germinados por 3 h. G e H: conídios germinados por 6 h. I e J: micélio após 18 horas de crescimento. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ .

Esses resultados demonstram que há um aumento na exposição de GlcCer durante o processo germinativo e que a presença de melanina nos conídios possivelmente interfere na exposição dessas moléculas neste estágio inicial de crescimento.

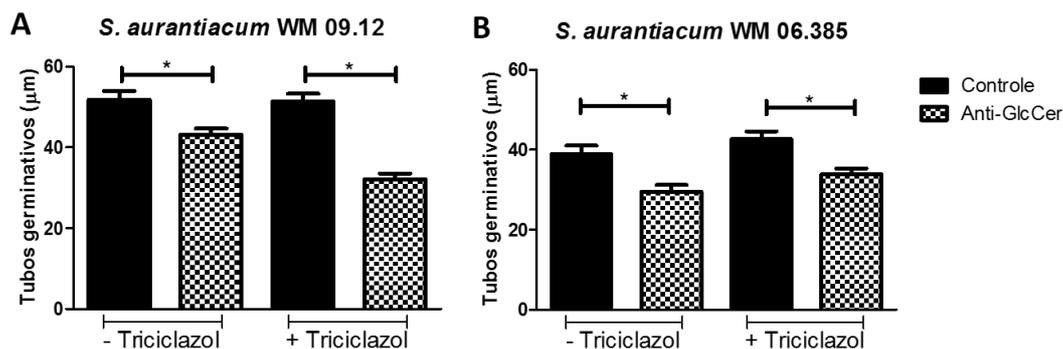
### **5.3. Influência do anticorpo anti-GlcCer no processo germinativo de *S. aurantiacum***

Para observar o efeito do anticorpo anti-GlcCer na germinação de *S. aurantiacum*, os isolados foram incubados por 3 e 6 horas na presença do anticorpo. Após 3 horas de incubação, observou-se que a presença do anticorpo não afetou a taxa de germinação (razão entre conídios que germinaram e conídios totais) dos isolados. No entanto, em conídios obtidos através do crescimento em meio contendo triciclazol, um inibidor da via de síntese de melanina, a taxa de germinação foi reduzida em 44,1% e 51,5% para os isolados WM 09.12 e WM 06.385, respectivamente (**Figura 10A e B**). Após 6 horas de incubação, a presença do anticorpo reduziu a taxa de germinação dos conídios crescidos na presença de triciclazol em 24,7% e 34,3% para WM 09.12 e WM 06.385, respectivamente (**Figura 10C e D**).



**Figura 10:** Taxa de germinação de conídios de *S. aurantiacum* WM 09.12 (ambiental) (A e C) e *S. aurantiacum* WM 06.385 (clínico) (B e D), previamente cultivados ou não com triciclazol (16 µg/ml), na presença do anticorpo monoclonal anti-GlcCer (100 µg/ml) durante 3 horas (A e B) e 6 horas (C e D) de germinação.

Para investigar melhor o desenvolvimento do crescimento fúngico, foram medidos os tubos germinativos dos conídios que foram capazes de germinar na presença do anticorpo, após 3 e 6 horas de incubação. Com 3 horas de crescimento, não houve diferença entre os tamanhos médios dos tubos germinativos em nenhuma condição testada. Já com 6 horas, foi possível observar que tanto os conídios não melanizados quanto os melanizados, na presença do anticorpo anti-GlcCer, possuíam tubos germinativos menores em comparação com os controles (**Figura 11**).

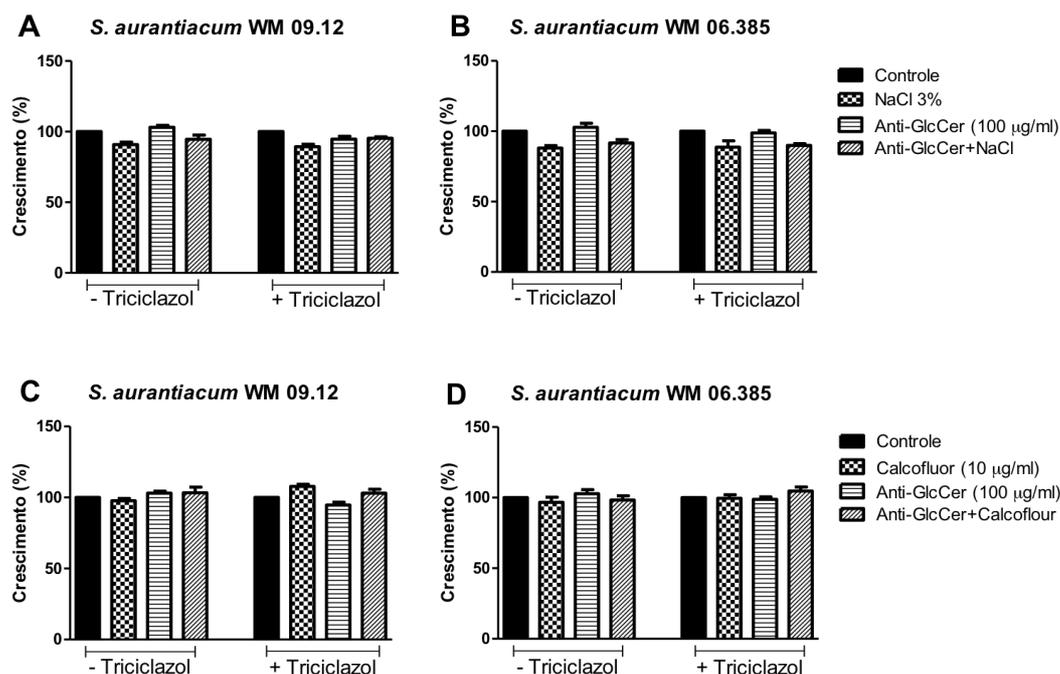


**Figura 11:** Medida dos tubos germinativos (em  $\mu\text{m}$ ) de *S. aurantiacum* WM 09.12 (ambiental) (A) e *S. aurantiacum* WM 06.385 (B), previamente cultivados ou não com triciclazol (15  $\mu\text{g/ml}$ ), na presença do anticorpo monoclonal anti-GlcCer (100  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 6 horas.

Estes resultados indicam que o anticorpo pode afetar o processo germinativo de *S. aurantiacum*, sendo que os conídios tratados com inibidor de melanina são mais afetados, provavelmente devido a exposição inicial maior de GlcCer resultante do crescimento fúngico na presença de triciclazol.

#### 5.4. Susceptibilidade das células de *S. aurantiacum* a estressores de superfície na presença do anticorpo anti-GlcCer

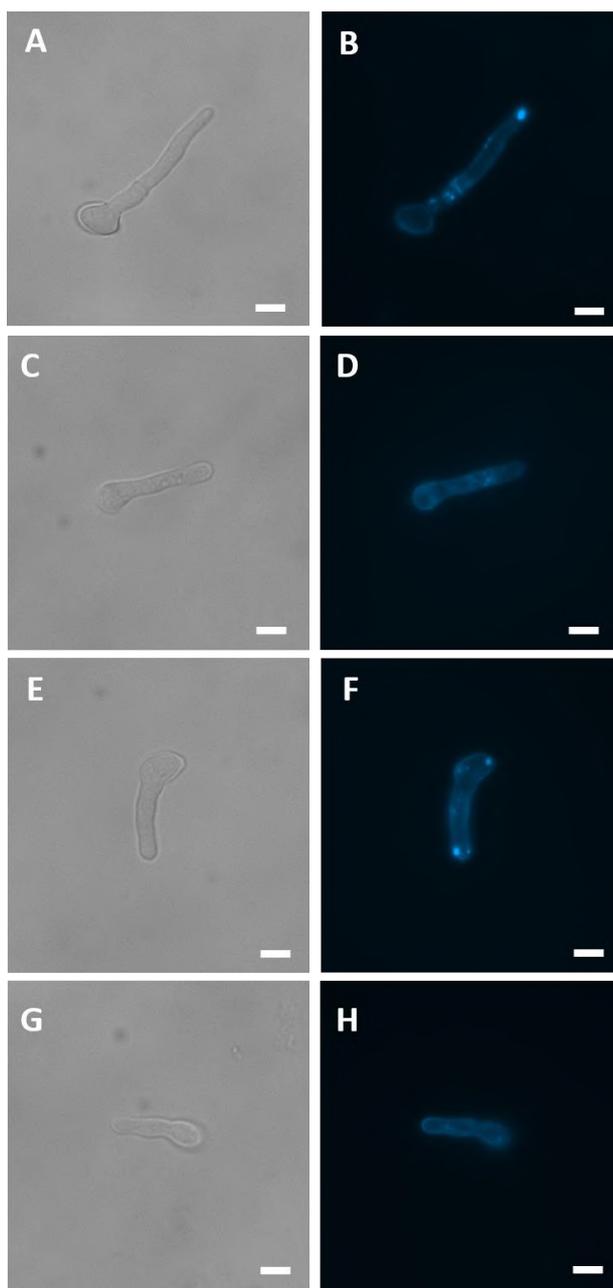
Para avaliar se o tratamento com anticorpo anti-GlcCer afeta a estabilidade da superfície celular dos isolados de *S. aurantiacum*, estes foram incubados na presença do anticorpo por 3 horas e, em seguida, incubados por 24 horas na presença de NaCl 3% (**Figura 12A e B**) e branco de calcoflúor 10  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 12C e D**). A susceptibilidade aos estressores de superfície não foi alterada após tratamento com anticorpo anti-GlcCer, visto que a viabilidade celular dos isolados tratados com anticorpo se mantém semelhante ao controle. Esses resultados indicam que a ligação do anticorpo não altera a estabilidade da superfície celular dos isolados de *S. aurantiacum*.



**Figura 12:** Susceptibilidade de *S. aurantiacum* WM 09.12 (ambiental) (A e C) e WM 06.385 (clínico) (B e D), previamente cultivados ou não com triciclazol, aos estressores de superfície NaCl 3% (A, B) e branco de calcofluor (10 µg/ml) (C, D) na presença do anticorpo monoclonal anti-GlcCer (100 µg/ml).

### 5.5. Organização de microdomínios de membrana de *S. aurantiacum* na presença do anticorpo anti-GlcCer

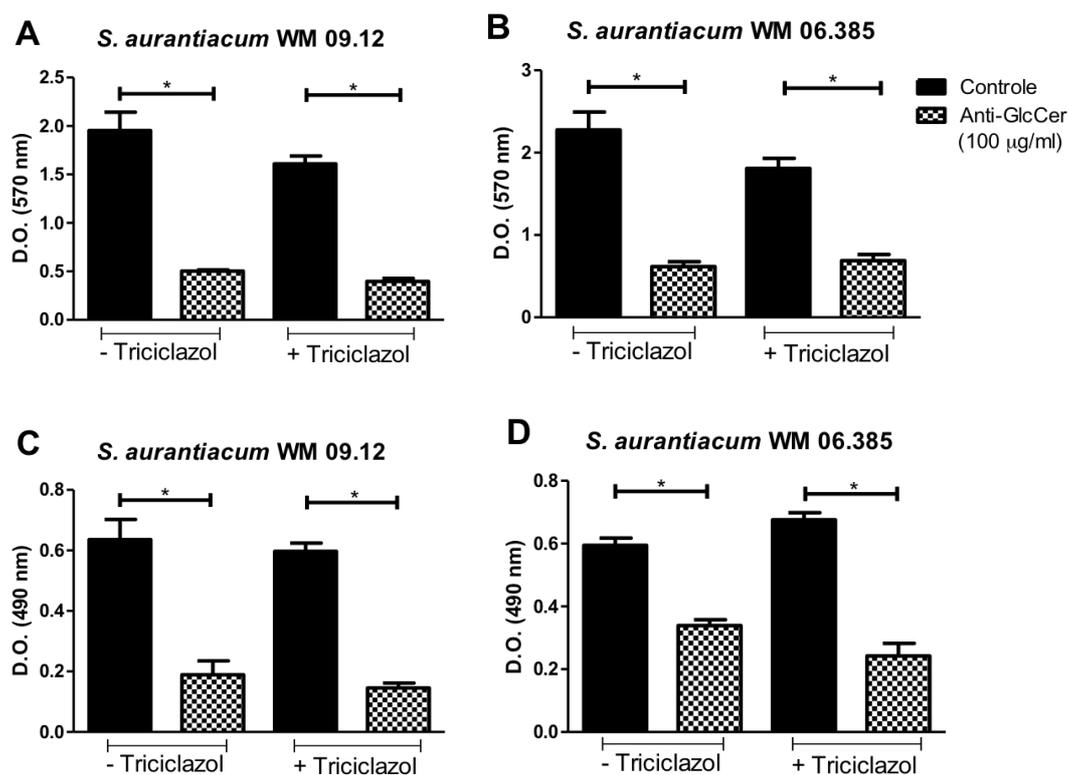
Com o objetivo de visualizar se a organização dos microdomínios de membrana é afetada na presença do anticorpo anti-GlcCer, conídios de *S. aurantiacum* cultivados ou não com triciclazol foram incubados por 3 horas (tempo onde há a maior redução da taxa de germinação) na presença do anticorpo. Em seguida, foi adicionado o marcador fluorescente filipina para a observação de regiões ricas em ergosterol. Nos conídios que não foram incubados com anticorpo anti-GlcCer (melanizados e não melanizados) observou-se um acúmulo de marcação nas pontas das hifas em formação (**Figura 13B e F**). Já nos conídios que foram incubados com anticorpo anti-GlcCer não foi possível observar o acúmulo nas pontas das hifas tanto dos conídios melanizados quanto dos não melanizados (**Figura 13D e H**). Essas observações demonstram que a presença do anticorpo anti-GlcCer pode afetar a organização de microdomínios de membrana, especialmente na região apical dos tubos germinativos, cuja formação é importante para o desenvolvimento de hifas de fungos filamentosos.



**Figura 13:** Organização de microdomínios de membrana de *S. aurantiacum* WM 06.385 após 3 horas de germinação. Foram utilizados conídios cultivados sem tricyclazol (B e D) ou com tricyclazol (F e H), sem a adição do anticorpo anti-GlcCer (B e F) e com anti-GlcCer (D e H). A, C, E e G: Microscopia de contraste de interferência diferencial. B, D, F e H: Microscopia de fluorescência usando o marcador fluorescente filipina (50 µg/ml). Barra de escala: 5 µm.

## 5.6. Influência do anticorpo anti-GlcCer no processo de formação de biofilme de *S. aurantiacum*

Para avaliar se o anticorpo anti-GlcCer possui algum efeito na formação de biofilme por isolados de *S. aurantiacum*, estes foram incubados na presença do anticorpo por 24 horas e em seguida, utilizando cristal violeta e XTT, foi avaliada a biomassa total e a viabilidade dos biofilmes formados em placas de poliestireno. Foi observado que tanto a biomassa total como a viabilidade dos biofilmes de ambos os isolados foram reduzidas após tratamento com anti-GlcCer (**Figura 14**).

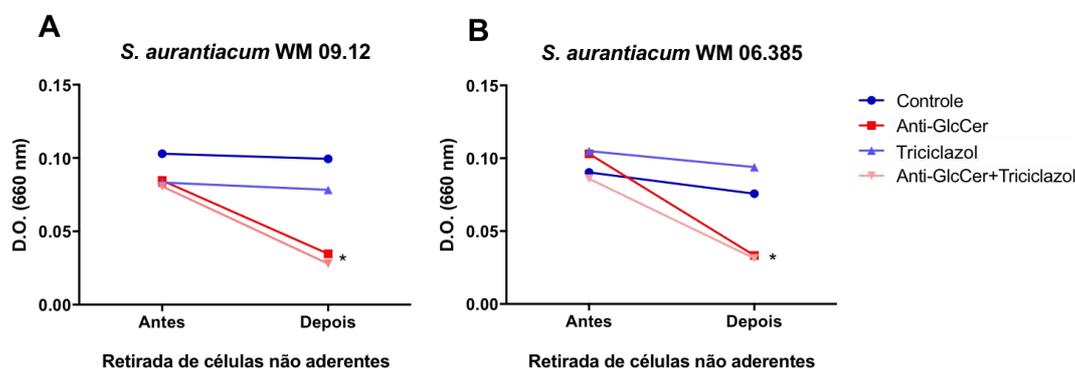


**Figura 14:** Formação de biofilme de *S. aurantiacum* WM 09.12 (A e C) e WM 06.385 (B e D) na presença do anticorpo anti-GlcCer, avaliado por cristal violeta para quantificação da biomassa total (A e B) e pela redução de XTT para a quantificação da viabilidade celular (C e D). Os condídios utilizados nos experimentos foram crescidos em meio na ausência ou presença de triciclazol.

## 5.7. Influência do anticorpo anti-GlcCer na adesão das células de *S. aurantiacum* a superfície de poliestireno

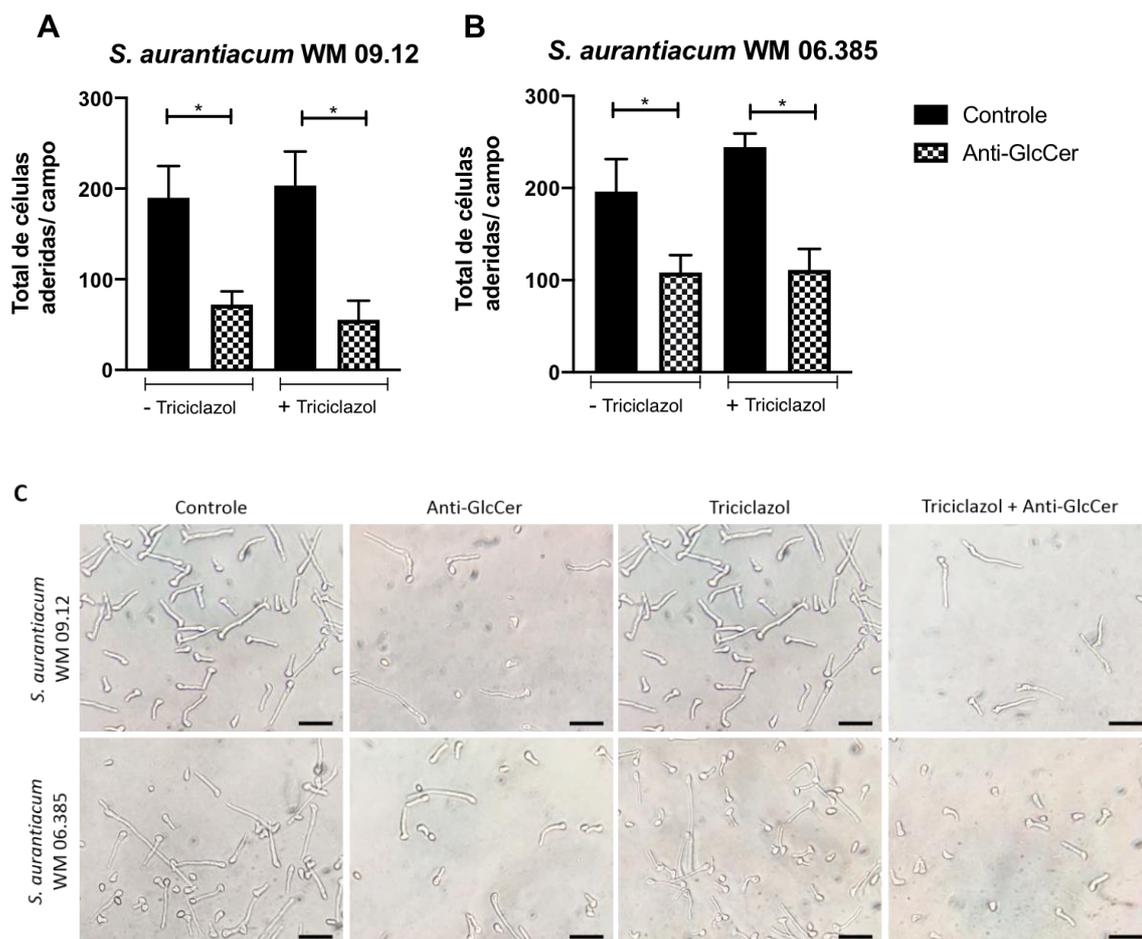
Foi observado durante a realização dos ensaios de formação de biofilme que após 24 h de crescimento os poços-controle aparentavam ter crescimento semelhantes aos poços que continham anti-GlcCer. Com isso, levantou-se a hipótese de que a

redução da biomassa e da viabilidade celular dos biofilmes era devido a um efeito na adesão das células ao fundo da placa de 96 poços. Para avaliar a aderência após 24 h de crescimento, a densidade ótica de crescimento foi quantificada antes e depois da retirada de células não aderentes através de lavagens com PBS estéril. Foi observado que há uma redução significativa da densidade ótica de crescimento dos poços com anti-GlcCer e esta redução ocorre de maneira semelhante em conídios previamente cultivados com ou sem triciclazol (**Figura 15**).



**Figura 15:** Densidade ótica do crescimento (660 nm) antes e depois da retirada de células não aderentes de *S. aurantiacum* WM 09.12 (A) e WM 06.385 (B) após 24 h de incubação na presença de anti-GlcCer (100 µg/ml). Conídios foram cultivados na presença ou ausência de triciclazol (15 µg/ml).

Para investigar o efeito do anticorpo no processo de adesão em estágios iniciais do crescimento, conídios (cultivados na presença ou ausência de triciclazol) dos dois isolados de *S. aurantiacum* foram incubados por 6 h na presença de anti-GlcCer e os poços foram lavados com PBS estéril, em seguida, as células aderidas foram contadas em microscópio invertido. Observou-se que em poços que continham anti-GlcCer haviam menos células aderidas quando comparados aos poços controles, esta redução é observada da mesma forma em conídios previamente cultivados com ou sem triciclazol (**Figura 16**). Esses resultados demonstram que anti-GlcCer afeta a adesão das células fúngicas tanto em estágios iniciais de germinação quanto de micélio após 24 h de crescimento.



**Figura 16:** Adesão de conídios de *S. aurantiacum* após 6 h de crescimento na presença de anti-GlcCer (100 µg/ml). Total de células de *S. aurantiacum* WM 09.12 (A) e WM 06.385 (B) após a retirada de células não aderentes, contadas em microscópio invertido. Imagens representativas (C) dos conídios aderidos a superfície de poliestireno após 6 h de germinação na presença de anti-GlcCer.

## 6. DISCUSSÃO

Os fungos do gênero *Scedosporium* vem emergindo nas últimas décadas como patógenos capazes de causar infecções tanto superficiais quanto invasivas. Infecções por *Scedosporium* acometem principalmente imunocomprometidos, com taxas de mortalidade que podem chegar a mais de 70% nesses indivíduos e também estão entre os principais fungos capazes de colonizar o trato respiratório de pacientes com fibrose cística (Cortez *et al.*, 2008; Blyth *et al.*, 2010; Tammer *et al.*, 2011). Algumas características da espécie *Scedosporium aurantiacum* demonstram sua importância como patógeno dentro do gênero: alta virulência em modelos experimentais, rápida transição morfológica e rápida formação de biofilme robusto em diversos tipos de superfície (Gilgado *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2016; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2017). Por isso, existe uma necessidade de um melhor entendimento dos processos de crescimento e interação com o hospedeiro deste fungo, com o objetivo de esclarecer o potencial patogênico dessa espécie.

Componentes celulares podem auxiliar na elucidação dos processos biológicos das células fúngicas, sendo a parede celular uma estrutura de destaque devido a sua importância no desenvolvimento do fungo e na interação deste com o ambiente (Gow *et al.*, 2017). Nesse sentido, as glucosilceramidas (GlcCers) são consideradas os principais glicosíngolípídeos neutros de fungos e também estão presentes na superfície celular de plantas e animais. No entanto, as GlcCers fúngicas possuem diferenças estruturais exclusivas em sua ceramida, sendo elas a metilação no carbono 9 e a insaturação no carbono 8. Presente na superfície de diversos fungos patogênicos, as GlcCers geralmente podem diferir na sua unidade de açúcar, e no tamanho e no grau de insaturação da cadeia de ácido graxo (Barreto-Bergter *et al.*, 2004, 2011). As análises das estruturas dos isolados testados demonstram um caráter conservado da molécula entre diferentes fungos, porém algumas diferenças podem ser encontradas entre espécies e isolados distintos. Por exemplo, nos dois isolados de *S. aurantiacum* testados foi encontrado  $m/z$  750 como íon molecular majoritário, semelhante ao encontrado em *L. prolificans*, *Rhizopus stolonifer*, *R. microspores* e em corpos escleróticos de *F. pedrosoi* (Nimrichter *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2018; Xisto *et al.*, 2019). Foi encontrado em menor intensidade o íon molecular  $m/z$  734, íon majoritário em outras espécies de *Scedosporium*, outros isolados de *S. aurantiacum* e nas formas de micélio e conídio de *F. pedrosoi* (Nimrichter *et al.*, 2005; Rollin-Pinheiro *et al.*,

2014; Calixto *et al.*, 2015; Canepa *et al.*, 2019). O outro íon molecular encontrado em menor intensidade foi  $m/z$  766, também encontrado em menor intensidade em *S. apiospermum*, *R. stolonifer* e *R. microspores* (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014; Xisto *et al.*, 2019). Os três íons moleculares encontrados correspondem a GlcCer com metilação no carbono 9 e insaturação no carbono 8 da esfingosina e cadeia de ácido graxo com 16 carbonos. No entanto, nos íons  $m/z$  750 e  $m/z$  766 existe uma hidroxila a mais na esfingosina do que o encontrado no íon  $m/z$  734. Além disso, a esfingosina encontrada na GlcCer que apresentou o íon  $m/z$  766 possui 20 carbonos ao invés de 18 como nos íons  $m/z$  750 e 734 (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014; Xisto *et al.*, 2019). Isso demonstra que, apesar de possuir um caráter conservado, GlcCers encontradas em diferentes espécies e cepas podem possuir pequenas diferenças estruturais.

Já foi demonstrado em outros trabalhos que o anticorpo monoclonal anti-GlcCer é capaz de reconhecer a superfície de conídios de *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. minutisporum* e *S. aurantiacum* (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014; Calixto *et al.*, 2015; Canepa *et al.*, 2019). Nos isolados de *S. aurantiacum* testados observou-se que a exposição de GlcCer aumenta progressivamente com o processo de germinação e que conídios tratados com NaOH possuem maior reatividade com o anticorpo anti-GlcCer do que conídios não tratados. Essas observações assemelham-se com o que já foi descrito em *L. prolificans* e em *F. pedrosoi*, onde conídios e corpos escleróticos tratados com NaOH eram mais reconhecidos por anti-GlcCer do que os controles não tratados (Nimrichter *et al.*, 2005; Xisto *et al.*, 2019). Estes dados sugerem uma possível interferência da melanina na exposição de GlcCer na superfície celular.

As GlcCers possuem um papel importante na diferenciação e patogenicidade de diversos fungos. Em uma cepa mutante de *Penicillium digitatum* com o gene glucosilceramida sintase deletado, foi visto que essas cepas tinham a germinação atrasada e produziam lesões menores em modelo de infecção em frutas cítricas (Zhu *et al.*, 2014). Em *C. neoformans* com o mesmo gene deletado foi observado que a cepa mutante não era capaz de crescer em ambientes com pH neutro ou alcalino assim como eram avirulentas em modelo de infecção animal (Rittershaus *et al.*, 2006). O uso de mutantes da via de síntese de GlcCer auxiliaram no entendimento da função dessa molécula em diversos fungos, no entanto, até o momento não foram desenvolvidas cepas de *Scedorporium* mutantes para esta via biossintética. Outra ferramenta que pode demonstrar a importância da GlcCer e suas funções no

crescimento fúngico é o anticorpo monoclonal anti-GlcCer. Já foi visto que, na presença do anticorpo, o crescimento de *C. neoformans* e *F. pedrosoi* assim como a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*, *S. apiospermum* e *S. minutisporum* são reduzidos (da Silva *et al.*, 2004; Nimrichter *et al.*, 2004; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2017; Canepa *et al.*, 2019). Por outro lado, Canepa e colaboradores (2019) demonstraram que a taxa de germinação de *S. aurantiacum* não é afetada na presença do anticorpo, semelhante ao que foi observado nos isolados testados neste trabalho. No entanto, quando os conídios foram cultivados na presença de inibidor da síntese de melanina e incubados na presença do anticorpo no nosso trabalho, houve redução da taxa de germinação. Com o objetivo de verificar o desenvolvimento das hifas, foi observado que a medida média dos tubos germinativos incubados por 6 horas com anticorpo é menor do que a dos controles tanto em conídios que foram cultivados com inibidor ou não. Os resultados indicam que o anticorpo é capaz de retardar o processo de germinação dos isolados de *S. aurantiacum*, principalmente em conídios com a síntese de melanina inibida, provavelmente devido a maior exposição inicial de GlcCer nesta condição. Esses dados indicam que possíveis diferenças na exposição de GlcCer na superfície dos fungos podem interferir na reatividade de anticorpos anti-GlcCer e, conseqüentemente, no seu efeito no processo germinativo.

Como principais glicosfingolipídeos neutros de células fúngicas, as GlcCers, além de estarem presentes na parede celular, são componentes importantes da membrana plasmática. Em *S. boydii*, o uso de um inibidor da síntese de glicosfingolipídios aumenta a susceptibilidade a estressores de membrana, além disso, por análise de microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que regiões com perda de integridade de membrana eram acompanhadas por um espessamento da parede celular (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2019). Em *C. neoformans*, as mudanças na estrutura de GlcCer levaram a um aumento na permeabilidade de membrana e essas alterações também resultaram na incapacidade de *C. neoformans* crescer no interior de macrófagos (Raj *et al.*, 2017). Em *A. nidulans* a alteração na estrutura e a falta de GlcCer resultou em defeitos no desenvolvimento de hifas e conidióforos, no entanto observou-se que as cepas mutantes possuíam resistência a estressores de superfície celular (Fernandes *et al.*, 2016). Nos isolados de *S. aurantiacum* testados, a presença de anti-GlcCer não alterou a susceptibilidade a estressores de superfície demonstrando que a ligação direta do anticorpo monoclonal possivelmente não afeta a

estabilidade da parede e da membrana celular. Apesar do uso de diferentes ferramentas que afetam glicosíngolipídios, supõe-se que a não alteração ou a resistência a estressantes de superfície observada em *A. nidulans* pode ocorrer devido a um mecanismo compensatório do fungo após a perda da integridade de membrana como foi observado em *S. boydii* (Fernandes *et al.*, 2016; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2019).

Se por um lado vários trabalhos já relataram o efeito da ligação direta de anticorpos monoclonais a GlcCer na superfície de fungos, ainda é desconhecido o mecanismo através do qual esses anticorpos agem no processo germinativo. Fungos filamentosos crescem a partir da extensão apical de suas hifas, este tipo de crescimento envolve uma estrutura especializada conhecida como “spitzenkorper”, que compreende as vesículas contendo enzimas para síntese de parede celular e membrana plasmática recrutadas para ponta da hifa e também uma membrana organizada em domínios ricos em ergosterol e esfingolípídeos (Harris e Momany, 2004; Alvarez *et al.*, 2007). Para investigar como a ligação do anticorpo anti-GlcCer consegue retardar o processo germinativo de *S. aurantiacum*, foi observada a organização dos microdomínios de membrana. Já foi demonstrado que a síntese de ceramidas é importante para a estabilidade do crescimento polarizado de hifas de *A. nidulans* (Li *et al.*, 2006). Também em *A. nidulans*, foi observado que mutantes da via de síntese de GlcCer não possuem microdomínios de membrana organizados na zona apical das hifas e que isto pode contribuir para os defeitos de crescimento visto nas cepas mutantes (Fernandes *et al.*, 2016). Neste trabalho, os isolados incubados com anticorpo anti-GlcCer não apresentaram o acúmulo de microdomínios de membrana nas extremidades das hifas, como foi visto nos controles sem anticorpo. Estes resultados indicam que a presença do anticorpo anti-GlcCer pode alterar a organização de microdomínios de membrana de *S. aurantiacum* e, devido a importância do crescimento polarizado em fungos filamentosos, isto pode estar ligado ao efeito do anticorpo monoclonal na germinação dos isolados testados.

Além dos anticorpos monoclonais, as defensinas (peptídeos antimicrobianos conservados em plantas, invertebrados e vertebrados) também são moléculas capazes de se ligar diretamente a glucosilceramidas de fungos. Já foi demonstrado que a defensina vegetal RsAFP2 interage com GlcCer purificada e induz a permeabilização de membrana da levedura *Pichia pastoris* (Thevissen *et al.*, 2004). Em *Candida*

*albicans*, RsAFP2 demonstrou ter ação antifúngica e observou-se que os isolados mais suscetíveis possuíam glucosilceramida em maior quantidade do que em isolados menos suscetíveis (Tavares *et al.*, 2008). Outra defensina vegetal, Psd1, é capaz de reduzir o crescimento de diferentes espécies como *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* e *Neurospora crassa* (Almeida *et al.*, 2000). A síntese de GlcCer e a estrutura específica da esfingosina demonstram-se essenciais para o reconhecimento de Psd1, já que mutantes de *A. nidulans* com genes da via de síntese de GlcCer deletados foram mais resistentes a ação das defensinas (Fernandes *et al.*, 2016).

Diversos fungos oportunistas como *Candida* spp., *Trichosporon* spp. e *Aspergillus* spp. são capazes de formar biofilme em superfícies bióticas ou abióticas, o que os confere diversas vantagens como a proteção contra a resposta imune do hospedeiro e a resistência a agentes antimicrobianos (Ramage *et al.*, 2009; Loussert *et al.*, 2010). Quando se trata de fungos filamentosos, primeiramente é necessário que os conídios e conídios germinados sejam capazes de se aderir às superfícies para que haja diferenciação em hifas e produção de matriz extracelular, assim formando a complexa estrutura tridimensional de um biofilme (Ramage *et al.*, 2009; Priegnitz *et al.* 2012). Espécies do gênero *Scedosporium* são capazes de formar biofilme em diferentes superfícies e com este processo de crescimento adquirem resistência a drogas antifúngicas. Já foi observado que *S. aurantiacum* é capaz de formar biofilme robusto em cateter após 24 horas de crescimento, enquanto que *S. boydii* só chega a níveis semelhantes de crescimento após 48 horas (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2017). O uso da miriocina, um inibidor da síntese de esfingolipídeos, reduziu a formação de biofilme de *A. fumigatus* demonstrando a relevância dessa classe de moléculas para este tipo de crescimento fúngico (Perdoni *et al.*, 2015). No presente trabalho, observou-se que o uso do anticorpo anti-GlcCer afetou a adesão de conídios germinados e de micélio dos isolados de *S. aurantiacum* resultando em uma redução significativa da biomassa e da viabilidade celular dos biofilmes. Estes resultados demonstram que GlcCer possui papel importante na adesão das células em crescimento e, conseqüentemente, no estabelecimento de um biofilme fúngico.

Utilizando anticorpos monoclonais anti-GlcCer como principal ferramenta foi possível concluir que as GlcCers caracterizadas neste trabalho possuem papel importante na transição morfológica, organização de microdomínios de membrana, adesão de células e estabelecimento de biofilme de isolados de *S. aurantiacum*. Os dados apresentados auxiliam no entendimento das funções que esta molécula de superfície celular exerce na biologia de *S. aurantiacum* e futuros trabalhos são necessários para aprofundar a compreensão do papel biológico de GlcCer na interação de *S. aurantiacum* com o hospedeiro.

## 7. CONCLUSÕES

A caracterização de GlcCer de *S. aurantiacum* WM 09.12 e WM 06.385 revelou estruturas semelhantes entre os isolados e entre estes e outros fungos, evidenciando um caráter conservado desta molécula.

A reatividade de anticorpos monoclonais anti-GlcCer aumenta gradativamente com o processo de germinação, assim como conídios tratados com NaOH 1M são mais reativos do que conídios sem tratamento. Isto demonstra uma possível interferência da melanina, ausente nas hifas de espécies de *Scedosporium* e nos conídios tratados com NaOH 1M, na exposição de GlcCer na superfície de *S. aurantiacum* WM 09.12 e WM 06.385.

A presença de anticorpos monoclonais anti-GlcCer reduziu a taxa de germinação de conídios cultivados com inibidor de melanina (triciclazol), assim como reduziu a medida média de tubos germinativos de conídios cultivados ou não com este mesmo inibidor. Com isso, é possível concluir que a GlcCer é uma molécula importante para o processo de transição morfológica dos isolados de *S. aurantiacum* e que o anticorpo anti-GlcCer é capaz de retardar este processo principalmente em conídios com a síntese de melanina inibida.

GlcCer está presente na parede celular fúngica e também é um importante constituinte de microdomínios de membrana plasmática. O uso de anticorpo anti-GlcCer não alterou a estabilidade da superfície celular dos isolados, no entanto alterou a organização de microdomínios de membrana presentes na zona apical de hifas de *S. aurantiacum* em formação.

Após 24 horas de crescimento na presença de anticorpo anti-GlcCer houve uma redução na biomassa total e na viabilidade dos biofilmes de *S. aurantiacum*. A redução da formação de biofilme é provavelmente devido ao efeito do anticorpo na aderência de *S. aurantiacum* visto em conídios germinados por 6 horas e em massa de células crescidas por 24 horas.

Os resultados apresentados demonstram a importância das glucosilceramidas em diferentes formas de crescimento do fungo *Scedosporium aurantiacum*.

## 8. PERSPECTIVAS

- Avaliar a citotoxicidade do anticorpo monoclonal anti-GlcCer em células humanas;
- Investigar o papel de GlcCer de *S. aurantiacum* na adesão em células epiteliais de pulmão e na interação com macrófagos utilizando o anticorpo monoclonal anti-GlcCer;
- Investigar a importância de GlcCer na virulência de *S. aurantiacum* em modelo de *Galleria mellonella* utilizando o anticorpo monoclonal anti-GlcCer;
- Avaliar se o anticorpo monoclonal anti-GlcCer possui efeito sinérgico com drogas antifúngicas como o voriconazol (droga de escolha para o tratamento de scedosporiose), em *S. aurantiacum*;

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- April, T.M., Abbott, S.P., Foght, J.M., Currah, R.S. (1998). Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (*Microascaceae*). *Can J Microbiol.* 44, 270–278.
- Al-Laaeiby, A., Kershaw, M.J., Penn, T.J., Thornton, C.R. (2016). Targeted disruption of melanin biosynthesis genes in the human pathogenic fungus *Lomentospora prolificans* and its consequences for pathogen survival. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 444.
- Alvarez, F.J., Douglas, L.M., Konopka, J.B. (2007). Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukaryot. Cell* 6, 755–763.
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R., Rodrigues, M. L. (2004). Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 76, 67–84.
- Barreto-Bergter, E., Sasaki, G. L., De Souza, L. M. (2011) Structural analysis of fungal cerebrosides. *Front. Microbiol.* 2, 239.
- Berenguer, J., Diaz-Mediavilla, J., Urra, D., Muñoz, P. (1989) Central nervous system infection caused by *Pseudallescheria boydii*: case report and review. *Rev Infect Dis.* 11, 890–896.
- Bernhardt, A., Seibold, M., Rickerts, V., Tintelnot, K. (2015). Cluster analysis of *Scedosporium boydii* infections in a single hospital. *Int J Med Microbiol.* 305, 724–728.
- Bittencout, V.C., Figueiredo, R.T., Da Silva, R.B., Mourao-Sa, P.L., Fernandez, P.L., Sasaki, G.L., Mulloy, B., Bozza, M.T., Barreto-Bergter, E. (2006). An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation. *J Biol Chem* 281, 22614–22623.
- Blyth, C.C., Middleton, P.G., Harun, A., Sorrell, T.C., Meyer, W., Chen, S.C. (2010). Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian CF patients: identification of novel risk factors? *Med. Mycol.* 48, S37-S44.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., White, T.C. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Sci Trans Med.* 4: 165rv13.
- Brakhage, A.A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P.F., Behnsen, J. (2010). Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 13, 409–415.
- Buzina, W., G. Feierl, D. Haas, F. F. Reinthaler, A. Holl, R. Kleinert, B. Reichenpfader, P. Roll, and E. Marth. (2006). Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature. *Med. Mycol.* 44, 473–477.
- Canepa, A., Meirelles, J.V., Rollin-Pinheiro, R., Xisto, M.I.D.S., Liporagi-Lopes, L.C., Souza, L., Romanos, M.T.V., Barreto-Bergter, E. (2019). Structural Differences Influence Biological Properties of Glucosylceramides from Clinical and Environmental Isolates of *Scedosporium aurantiacum* and *Pseudallescheria minutispora*. *J. Fungi*, 5, 62. doi: 10.3390/jof5030062

Calixto, R.O.R., Rollin-Pinheiro, R., Da Silva, M.I.D., Liporagi-Lopes, L.C., Vieira, J.M., Sasaki, G.L., Barreto-Bergter, E. (2015). Structural analysis of glucosylceramides (GlcCer) from species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex. *Fungal Biology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.007>

Castanheira, M., Duncanson, F.P., Diekema, D.J., Guarro, J., Jones, R.N., Pfaller, M.A. (2012). Activities of E1210 and comparator agents tested by CLSI and EUCAST broth microdilution methods against *Fusarium* and *Scedosporium* species identified using molecular methods. 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 352-357.

Castiglioni, B., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Fung, J., Kusne, S. (2002) *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine.* 81, 333–348.

Cheng, J., Park, T.S., Fischl, A.S., Ye, X.S. (2001). Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 21:6198 – 6209.

Cimon, B., Carrere, J., Chazalotte, J.P., Ginies, J.L., Six, P., Vinatier, D., Chabasse, D., Bouchara, J.P. (1995). Fungal colonization and immune response to fungi in CF. *J. Mycol. Med.* 5, 211-216.

Coronado, J.E., Mneimneh, S., Epstein, S.L., Qiu, W.G., Lipke, P.N. (2007). Conserved processes and lineage-specific proteins in fungal cell wall evolution. *Eukaryot Cell* 6, 2269–2277

Cortez, K.J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Milanovich, J., Sutton, D.A., Fothergill, A., Rinaldi, M.G., Shea, Y.R., Zaoutis, T., Kottlilil, S., Walsh, T.J. (2008). Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 157-197.

Cos, P., Toté, K., Horemans, T., Maes, L. (2010). Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Curr Pharm Des.* 16, 2279–2295.

Cuenca-Estrella, M., Alastruey-Izquierdo, A., Alcazar-Fuoli, L., Bernal-Martinez, L., Gomez-Lopez, A., Buitrago, M.J., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J.L. (2008). In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 1136–1139.

Cunha, M.M., Franzen, A.J., Alviano, D.S., Zanardi, E., Alviano, C.S., De Souza, W., Rozental, S. (2005). Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc. Res. Tech.* 68: 337-384.

Cunha, M.M., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, N.V., Borba, L.P., de Souza, W., Rozental, S. (2010). Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 10, 80.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122.

Da Silva, A.F.C., Rodrigues, M.L., Farias, S.E., Almeida, I.C., Pinto, M.R., Barreto-Bergter, E. (2004). Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. *FEBS Letters.* 561 (1-3): 137-143.

Da Silva, B.A., dos Santos, A.L., Barreto-Bergter, E., Pinto, M.R. (2006). Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Curr. Microbiol.* 53, 18-22.

De Hoog, G.S., Marvin-Sikkema, F.D., Lahpoo, G.A., Gottschall, J.C., Prins, R.A., Guicho, E. (1994). Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses.* 37, 71–78.

de Souza, L.M., Cipriani, T.R., Serrato, R.V., et al. (2008). Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatography A.* 1207(1-2): 101–109.

Engel T.G.P., Slabbers L., de Jong C., Melchers W.J.G., Hagen F., Verweij P.E., Merkus P., Meis J.F. (2019) Prevalence and diversity of filamentous fungi in the airways of cystic fibrosis patients – A Dutch multicenter study. *J. Cystic Fibrosis* 18(2): 221-226.

Erwig, L.P., Gow, N.A.R. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol.* 14, 163–176.

Fernandes, C., de Castro, P., Singh, A., Fonseca, F., Pereira, M., Vila, T., et al. (2016). Functional characterization of the *Aspergillus nidulans* glucosylceramide pathway reveals that LCB  $\Delta 8$ -desaturation and C9-methylation are relevant to filamentous growth, lipid raft localization and Psd1 defensin activity. *Mol. Microbiol.* 102 488–505.

Fernandes, C.M., Goldman, G.H., Del Poeta, M. (2018). Biological roles played by sphingolipids in dimorphic and filamentous fungi. *mBio* 9: e00642-18.

Figueiredo, R.T., Bittencourt, V.C., Lopes, L.C., Sasaki G., Barreto-Bergter E. (2012). Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. *Carbohydr. Res.* 356, 260-264.

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.

Fontaine T., Beauvais A., Loussert C., Thevenard B., Fulgsang C.C., Ohno N., Clavaud C., Prevost M.C., Latgé J.P. (2010). Cell wall  $\alpha 1$ –3 glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 47(8): 707–12.

Ghamrawi, S., Renier, G., Saulnier, P., Cuenot, S., Zykwinska, A., Dutilh, B.E., Thornton, C., Faure, S., Bouchara, J.P. (2014). Cell wall modifications during conidial maturation of the human pathogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *PLoS One* 9, e100290.

Gilgado, F., Serena, C., Cano, J., Gene, J., Guarro, J. (2006). Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 4211-4213.

Gilgado, F., Cano, J., Gene, J., Serena, C., Guarro, J. (2009). Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med. Mycol.* 47, 371-374.

Gil-Lamaignere, C., Winn, R.M., Simitsopoulou, M., Maloukou, A., Walsh, T.J., Roilides, E. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium* spp.: comparison with *Aspergillus* spp. (2005). *Med Mycol.* 43: 253–260.

Gorin, P.A.J., da Silva, M.I.D., Sasaki, G.L., Souza, L.M., Wagner, R., Bittencourt, V.C.B., Simas-Tosin, F.F., Nosedá, M.D., Barreto-Bergter, E., 2010. Carbohydrates present in the glycoprotein from conidia of the opportunistic pathogen *Scedosporium prolificans*. *Carbohydr. Polym.* 79, 927e932.

Gow N. A. R., Latge J. P., Munro C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* 5, 1–25.

Gravelat F.N., Beauvais A., Liu H., Lee M.J., Snarr B.D., Chen D., Xu W., Kravtsov I., Hoareau C.M., Vanier G., Urb M., Campoli P., Al Abdallah Q., Lehoux M., Chabot J.C., Ouimet M.C., Baptista S.D., Fritz J.H., Nierman W.C., Latgé J.P., Mitchell A.P., Filler S.G., Fontaine T., Sheppard D.C. (2013) *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal beta-glucan from the immune system. *PLoS Pathog.* 9:e1003575.

Guarro, J., Kantarcioglu, A.S., Horre, R., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Berenguer, J., de Hoog, G.S. (2006). *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy refractory opportunist. *Med. Mycol.* 44, 295-327.

Haido, R.M., Silva M.H., Ejzemberg, R., Leitao, E.A., Hearn, V.M., Evans E.G., Barreto-Bergter, E. (1998). Analysis of peptidogalactomannans from the mycelial surface of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 36(5): 313-21.

Han, Z., Kautto, L., Nevalainen, H. (2017). Secretion of Proteases by an Opportunistic Fungal Pathogen *Scedosporium aurantiacum*. *PLoS One* 12(1): e0169403.

Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B, Seiler, S., Plamann, M., Momany, M. (2005). Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot. Cell* 4, 225-229.

Harun, A., Gilgado, F., Chen, S.C., Meyer, W. (2010a) Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med Mycol.* 48(Suppl 1):S70–6.

Harun, A., Serena, C., Gilgado, F., Chen, S.C., Meyer, W. (2010b). *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med. Mycol.* 48 (Suppl 1), S45-S51.

Harun, A., Blyth, C.C., Gilgado, F., Middleton, P., Chen, S.C., Meyer, W. (2011). Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with CF. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1508e1512.

Heath C.H., Slavin M.A., Sorrell T.C., Handke R., Harun A., Phillips M., Nguyen Q., Delhaes L., Ellis D., Meyer W., Chen S.C. (2009). Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 689-693.

Husain, S., Muñoz, P., Forrest, G., Alexander, B.D., Somani, J., Brennan, K., Wagener, M.M., Singh, N. (2005). Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clin Infect Dis.* 40: 89–99.

Kaltseis, J., Rainer, J., De Hoog, G.S. (2009). Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* 47, 398–405.

Katragkou, A., Dotis, J., Kotsiou, M., Tamiolaki, M., Roilides, E. (2007) *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses.* 50, 412–421.

Kaur, J., Duan, S.Y., Vaas, L.A.I., Penesyan, A., Meyer, W., Paulsen, I.T., Nevalainen, H. (2015). Phenotypic profiling of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic pathogen colonizing human lungs. *PLoS One* 10, e0122354.

Kimura, M., Maenishi, O., Ito, H., Ohkusu, K. (2010). Unique histological characteristics of *Scedosporium* that could aid in its identification: Case Report. *Pathol Int.* 60: 131–136.

Köhler, J.R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., Perfect, J.R. (2017). Fungi that infect humans. *Microbiol Spectrum* 5(3): FUNK-0014- 2016.

Kolattukudy, P., Lee, J., Rogers, L., Zimmerman, P., Ceselski, S., Fox, B., et al. (1993). Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect Immun.* 61(6): 2357–68.

Kowacs P.A., Soares Silvado C.E., Monteiro de Almeida S., Ramos M., Abrão K., Madaloso L.E., et al. Infection of the CNS by *Scedosporium apiospermum* after near drowning. Report of a fatal case and analysis of its confounding factors. *J Clin Pathol.* 2004; 57:205-7.

Lackner, M., Rezusta, A., Villuendas, M.C., Palacian, M.P., Meis, J.F., Klaassen, C.H. (2011). Infection and colonization due to *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses* 54, 12-21.

Lackner, M. Guarro, J. Pathogenesis of *Scedosporium*. (2013). *Curr. Fungal Infect Rep.* 7, 326–333.

Lamaris, G.A., Chamilos, G., Lewis, R.E., Safdar, A., Raad, I.I., Kontoyiannis, D.P. (2006) *Scedosporium* infection in a tertiary care cancer center: a review of 25 cases from 1989–2006. *Clin Infect Dis.*; 43: 1580–1584.

Lamaris G.A., Lewis R.E., Chamilos G., May G.S., Safdar A., Walsh T.J., Raad I.I., Kontoyiannis D.P. (2008). Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *J Infect Dis.* 198, 186–192.

Latgé, J.P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66, 279–290.

Latgé, J.P., Beauvais, A. (2014). Functional duality of the cell wall. *Curr. Opin. Microbiol.* 20, 111–117

Latgé, J.P., Beauvais, A., Chamilos, G. (2017). The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response and Virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 71:99-115

Leitão, E.A., Bittencourt, V.C., Haido, R.M., Valente, A.P., Peter-Katalinic, J., Letzel, M., De Souza, L.M., Barreto-Bergter, E. (2003). Beta-galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology*, 13(10): 681-92.

Li, S., Du, L., Yuen, G., Harris, S.D. (2006). Distinct Ceramide Synthases Regulate Polarized Growth in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell.* 17, 1218-1227.

Liu R., Li J., Zhang T., Zou L., Chen Y., Wang K., Lei Y., Yuan K., Li Y., Lan J., Cheng L., Xie N., Xiang R., Nice E.C., Huang C., Wei Y. (2014). Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy: involvement of abnormal cholesterol trafficking. *Autophagy* 10(7), 1241–1255

Lopes, L.C.L., Rollin-Pinheiro, R., Guimarães, A.J., Bittencourt, V.C.B., Martinez, L.R., et al. (2010) Monoclonal Antibodies Against Peptidorhamnomannans of *Scedosporium apiospermum* Enhance the Pathogenicity of the Fungus. *PLoS Negl Trop Dis* 4(10): e853. doi:10.1371/journal.pntd.0000853

Loussert, C., Schmitt, C., Prevost, M.C., Balloy, V., Fadel, E., Philippe, B, Kauffmann-Lacroix, C., Latgé, J.P., Beauvais, A. (2010). *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol.* 12, 405–410.

Luplertlop, N. (2018). Pseudallescheria/Scedosporium complex species: From saprobic to pathogenic fungus. *Journal De Mycologie Médicale* 28(2): 249-256.

Manavathu, E.K., Cutright, J., Chandrasekar, P.H. (1999) Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J Clin Microbiol*, 37(3): 858-61.

Mandyam, K.G., Jumpponen, A. (2015) Mutualism–parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Front. Microbiol.* 5: 776.

Mello, T.P., Aor, A.C., Gonçalves, D.S., Seabra, S.H., Branquinha M.H., Santos, A.L.S. (2016). Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*, *Biofouling*, 32:7, 737-749.

Mello, T.P., Bittencourt, V.C.B., Liporagi-Lopes, L.C., Aor, A.C., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S. (2019). Insights into the social life and obscure side of *Scedosporium/Lomentospora* species: ubiquitous, emerging and multidrug-resistant opportunistic pathogens. *Fungal Biology Reviews* 33 (2019) 16-46.

Mor V., Farnoud A.M., Singh A., Rella A., Tanno H., Ishii K., Kawakami K., Sato T., Del Poeta M. Glucosylceramide Administration as a Vaccination Strategy in Mouse Models of Cryptococcosis. *PLoS One*. 2016 Apr 15;11(4):e0153853. doi: 10.1371/journal.pone.0153853. PMID: 27082428; PMCID: PMC4833283.

Musk M, Chambers D, Chin W, Murray R, Gabbay E. (2006). Successful treatment of disseminated *Scedosporium* infection in 2 lung transplant recipients: review of the literature and recommendations for management. *J Hear Lung Transplant*. 25: 1268–1272.

Nakamura, Y., Suzuki, N., Nakajima, Y. et al. (2013). *Scedosporium aurantiacum* brain abscess after near-drowning in a survivor of a tsunami in Japan. *Respir Investig*. 51, 207–211.

Nimrichter L, Barreto-Bergter E, Mendonca-Filho RR, Kneipp LF, Mazzi MT, et al. (2004) A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. *Microbes Infect* 6: 657–665.

Nimrichter, L., Cerqueira, M.D., Leitão, E.A., Miranda, K., Nakayasu, E.S., Almeida, S.R., Almeida, I.C., Alviano, C.S., Barreto-Bergter, E., Rodrigues, M.L. (2005). Structure, cellular distribution, antigenicity and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. *Infection and Immunity*, 71(12), 7860-7868.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*. 5, 203-223.

O'Brien H.E., Parrent J.L., Jackson J.A., Moncalvo J.M., Vilgalys R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 71:5544–5550 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005>.

Oliveira, F.M., Unis, G., Hochhegger, B., Severo, L.C. (2013). *Scedosporium apiospermum* eumycetoma successfully treated with oral voriconazole: report of a case and review of the Brazilian reports on scedosporiosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 55, 121–123.

Ortoneda, M., Pastor, F.J., Mayayo, E., Guarro, J. (2002). Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J. Med. Microbiol*. 51, 924-928.

Oura, T., Kajiwarra, S. (2008). Disruption of the sphingolipid Delta8- desaturase gene causes a delay in morphological changes in *Candida albicans*. *Microbiology* 154 (Pt 12), 3795–3803.

- Oura, T., Kajiwar, S. (2010). *Candida albicans* sphingolipid C9-methyltransferase is involved in hyphal elongation. *Microbiology* 156 (Pt 4), 1234–1243.
- Panackal A.A., Marr K.A. (2004). *Scedosporium/Pseudallescheria* Infections. *Semin Respir. Crit. Care Med.* 25, 171–181.
- Pappas, P. G. (2010). Opportunistic fungi: a view to the future. *Am. J. Med. Sci.* 340, 253–257.
- Paszkowski U. (2006). Mutualism and parasitism: the ying and yang of plant symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology.* 9, 364–370.
- Pearson, C.L., Xu, K., Sharpless, K.E., Harris, S.D. (2004). MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 15, 3658–3672.
- Pereira, M.M., Silva, B.A., Pinto, M.R., Barreto-Bergter, E., dos Santos, A.L. (2009). Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. *Mycopathologia.* 167, 25-30.
- Pham, T., Giraud, S., Schuliar, G., Rougeron, A., Bouchara, J.P. (2015). Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Medical Mycology* 53, 512-519. doi: 10.1093/mmy/myv015
- Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr, Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. A (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.* 3, 1494–1500.
- Pinto, M.R., Mulloy, B., Haido, R.M., Travassos, L. R., Barreto Bergter, E. (2001). A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology* 147, 1499-1506.
- Pinto, M.R., Rodrigues, M.L., Travassos, L.R., Haido, R.M.T., Wait, R. e Barreto-Bergter, E. (2002). Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* 12, 251-260.
- Pinto, M.R., De Sá, A.C., Limongi, C.L., Rozental, S., Santos, A.S., e Barreto-Bergter, E. (2004). Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microb. Infect.* 6, 1259-1267.
- Pinto, M.R., Gorin, P.A., Wait, R., Mulloy, B., e Barreto-Bergter, E. (2005). Structures of the O-linked oligosaccharides of a complex glycoconjugate from *Pseudallescheria boydii*. *Glycobiology* 15, 895-904.
- Pinto M. R., Barreto-Bergter E., Taborda C. P. (2008). Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. *Braz. J. Microbiol.* 39, 195–208.
- Powers-Fletcher, M.V., Kendall, B.A., Griffin, A.T., Hanson, K.E. (2016). Filamentous fungi. *Microbiol Spectrum* 4(3): DMIH2-0002- 2015.

Priegnitz BE, Wargenau A, Brandt U, Rohde M, Dietrich S, Kwade A, Krull R, Fleissner A. 2012. The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol.* 49:30–38. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2011.12.002>.

Raj, S., Nazemidashtarjandi, S., Kim, J., Joffe, L., Zhang, X., Singh, A., Mor, V., Desmarini, D., Djordjevic, J., Raleigh, D.P., Rodrigues, M.L., London, E., Del Poeta M., Farnoud, A.M. (2017). Changes in glucosylceramide structure affect virulence and membrane biophysical properties of *Cryptococcus neoformans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, 2224 –2233.

Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., Lopez-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 35, 340–355.

Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Buldain, I., Antoran, A., Arbizu-Delgado, A., et al. (2017). Proteomics as a tool to identify new targets against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the context of cystic fibrosis. *Mycopathologia.* 183(1):273-289.

Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Bergter E. et al. *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. (2018). *Med Mycol.* 56(suppl\_1):102-125.

Rappleye, C.A., Eissenberg, L.G., Goldman W.E. (2007). Histoplasma capsulatum  $\alpha$ -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the  $\beta$ -glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1366–1370.

Rittershaus P.C., Kechichian T.B., Allegood J.C., Merrill A.H. Jr, Hennig M., Luberto C., Del Poeta M. (2006). Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* 116(6), 1651–1659.

Rodrigues, M.L., Shi, L., Barreto-Bergter, E., Nimrichter, L., Farias, S.E., Rodrigues, E.G., Travassos, L.R., Nosanchuk, J.D. (2007). Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 14 (10): 1372-1376.

Rollin-Pinheiro, R., Lopes, L.C.L., Meirelles, J.V., Souza, L.M., Barreto-Bergter, E. (2014). Characterization of glucosylceramides in *Scedosporium apiospermum* and their involvement in fungal development and macrophage functions. *PLoS One.* 9(5): 98149.

Rollin-Pinheiro, R., Singh, A., Barreto-Bergter, E., Del Poeta, M. (2016). Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. *Future Med. Chem.* 8 1469–1484.

Rollin-Pinheiro, R., de Meirelles, J.V., Vila, T.V.M., Fonseca, B.B., Alves, V., Frases S., Rozental, S., Barreto-Bergter, E. (2017) Biofilm Formation by *Pseudallescheria/Scedosporium* Species: A Comparative Study. *Front. Microbiol.* 8:1568.

Rollin-Pinheiro R., Rochetti V.P., Dutra da Silva Xisto M.I., et al. (2019) Sphingolipid biosynthetic pathway is crucial for growth, biofilm formation and membrane integrity of *Scedosporium boydii* [published online ahead of print, 2019 Nov 12]. *Future Med Chem.* doi: 10.4155/fmc-2019-0186.

doi:10.4155/fmc-2019-0186

Rougeron, A., Schuliar, G., Leto, J. et al. (2015) Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ Microbiol.* 17: 1039–1048.

Rougeron, A., Giraud, S., Alastruey-Izquierdo, A., Cano-Lira, J., Rainer, J., Mouhajib, A., Le Gal, S., Nevez, G., Meyer, W., Bouchara, J.P. (2017). Ecology of *Scedosporium* Species: Present Knowledge and Future Research. *Mycopathologia.* 183(1):185-200.

Sampaio F.M.S., Wanke B., Freitas D.F.S., Coelho J.M.C.d.O., Galhardo M.C.G., Lyra M.R., Lourenço M.C.S, Paes R.A., do Valle, A.C.F. (2017) Review of 21 cases of mycetoma from 1991 to 2014 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005301.  
doi:10.1371/journal.pntd.0005301

Schwarz, C., Brandt, C., Whitaker, P., Sutharsan, S., Skopnik, H., Gartner, S., Smazny, C., Röhmel, J.F., (2018). Invasive pulmonary fungal infections in CF. *Mycopathologia* 183, 33-43.

Sedlacek, L., Graf, B., Schwarz, C., Albert, F., Peter, S., Würstl, B., Wagner, S., Klotz, M., Becker, A., Haase, G., Laniado, G., Kahl, B., Suerbaum, S., Seibold, M., Tintelnot, K., 2015. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with CF in a multicenter trial by use of a selective medium. *J. Cyst. Fibros.* 14, 237-241.

Staerck, C., Godon, C., Bouchara, J.P., Fleury, M.J.J. (2018). Varying susceptibility of clinical and environmental *Scedosporium* isolates to chemical oxidative stress in conidial germination. *Arch. Microbiol.* 200, 517-523.

Tammer, I., Tintelnot, K., Braun-Dullaes, R.C., Mawrin, C., Scherlach, C., Shlüter, D., König, W. (2011). Infections due to *Pseudallescheria/Scedosporium* species in patients with advanced HIV disease - a diagnostic and therapeutic challenge. *Int J Infect Dis.* 15: 422–429.

Tavares P.M., Thevissen K., Cammue B.P., François I.E., Barreto-Bergter E., Taborda C.P., Marques A.F., Rodrigues M.L., Nimrichter L. (2008) *In vitro* activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its *in vivo* efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(12), 4522–4525

Thevissen K., Warnecke D.C., Francois I.E. et al. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 279(6), 3900–3905

Thomas, P.A., Kalamurthy, J. (2013). Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19: 210–220.

Tintelnot, K., Wagner, N., Seibold, M., de Hoog, G.S., Horré, R. (2008). Re-identification of clinical isolates of the *Pseudallescheria boydii*-complex involved in near-drowning. *Mycoses.* 51, 11–16.

Tortorano, A.M., Richardson, M., Roilides, E., van Diepeningen, A., Caira, M., Munoz, P., Johnson, E., Meletiadiis, J., Pana Z-D., Lackner, M., Verweij P., Freiburger, T., Cornely, O.A., Arikian-Akdagli, S., Dannaoui E., Groll, A.H., Lagrou K., Chakrabarti A., Lanternier, F., Pagano L., Skiada A., Akova

M., Arendrup M.C., Boekhout, T., Chowdhary, A., Cuenca-Estrella, M., Guinea J., Guarro J., de Hoog, S., Hope, W., Kathuria, S., Lortholary, O., Meis, J.F, Ullmann, A.J, Petrikkos, G., Lass-Flörl, C. (2014). ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. Clin. Microbiol. Infect. 20, S27-S46.

Vieira, E.R., Xisto, M.I.D.S, Pele, M.A. Alviano, D.S., Alviano, C.S., Barreto-Bergter, E., Campos-Takaki, G. (2018). Monohexosylceramides from *Rhizopus* species isolated from Brazilian Caatinga: chemical characterization and evaluation of their anti-biofilm and antibacterial properties. Molecules, 23, 1331. doi: 10.3390/molecules23061331

Walts, A.E. (2001). *Pseudallescheria*: an underdiagnosed fungus? Diagn. Cytopathol. 25, 153-157.

Wang, Y., Casadevall, A., (1994). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. Infect. Immun. 62, 3004-3007.

Wheeler, R.T., Kombe, D., Agarwala, S.D., Fink, G.R. (2008). Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans*  $\alpha$ -glucan exposure during infection and drug treatment. PLoS Pathog 4:1000227

Wiederhold, N.P., Law, D., Birch, M. (2017). Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor F901318 has potent in vitro activity against *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. J. Antimicrob. Chemother. 72, 1977-1980.

Wongsuk, T., Pumeesat, P., Luplertlop, N. (2017). Genetic variation analysis and relationships among environmental strains of *Scedosporium apiospermum* sensu stricto in Bangkok, Thailand. PLoS One. 12:0181083.

Wüthrich, M., Deepe, G., Klein, B. Adaptive Immunity to Fungi. (2012). Annu Rev Immunol. 30: 115–148.

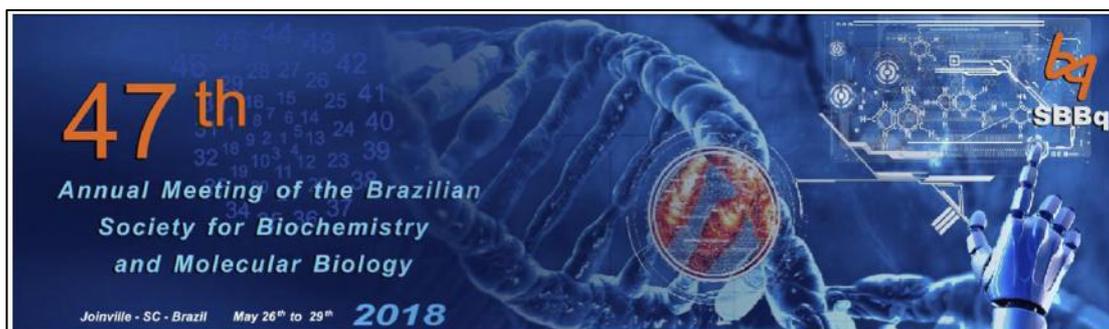
Xisto, M.I.D.S., Henao, J.E.M., Dias, L.S., Santos, G.M.P, Calixto, R.O.R., Bernardino, M.C., Taborda, C.P., Barreto-Bergter, E. (2019). Glucosylceramides From *Lomentospora prolificans* Induce a Differential Production of Cytokines and Increases the Microbicidal Activity of Macrophages. Front. Microbiol. 10: 554.

Zhu, C., Wang, M., Wang, W., Ruan, R., Ma, H., Mao, C. e Li, H. (2014). Glucosylceramides are required for mycelial growth and full virulence in *Penicillium digitatum*. Biochem Biophys Res Commun. 455, 165–171.

## ANEXO I

Outras atividades realizadas durante o período de graduação:

- 1) Apresentação de pôster sobre os resultados preliminares obtidos com as cepas de *Scedosporium aurantiacum* utilizadas nesta monografia, sob título de “Comparative study of *Scedosporium aurantiacum* clinical and environmental isolates”, na 47<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular em maio de 2018.
  
- 2) Coautoria de artigo sobre a importância da via de síntese de esfingolipídeos no crescimento de *Scedosporium boydii*, sob título de “Sphingolipid biosynthetic pathway is crucial for growth, biofilm formation and membrane integrity of *Scedosporium boydii*”, publicado na revista Future Medicinal Chemistry em 2019.



## Certificado

**Certificamos que VICTOR PEREIRA ROCHETTI apresentou o trabalho intitulado: COMPARATIVE STUDY OF SCEDOSPORIUM AURANTIACUM CLINICAL AND ENVIRONMENTAL ISOLATES de autoria de ROCHETTI VP, ROLLIN-PINHEIRO, R., MEIRELLES, J.V., BARRETO-BERGTER, E. durante a 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Joinville, Santa Catarina, no período de 26 a 29 de Maio de 2018.**

**Joinville, 29 de Maio de 2018.**

Glaucius Oliva  
Presidente da SBBq

Richard Charles Garratt  
Vice Presidente da SBBq

**SBBq**

Research Article

For reprint orders, please contact: [reprints@future-science.com](mailto:reprints@future-science.com)

Future  
**Medicinal  
 Chemistry**

## Spingolipid biosynthetic pathway is crucial for growth, biofilm formation and membrane integrity of *Scedosporium boydii*

Rodrigo Rollin-Pinheiro<sup>1</sup>, Victor Pereira Rochetti<sup>1</sup>, Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto<sup>1</sup>, Livia Cristina Liporagi-Lopes<sup>2</sup>, Beatriz Bastos<sup>3</sup>, Antonella Rella<sup>4</sup>, Ashutosh Singh<sup>4</sup>, Sonia Rozental<sup>5</sup>, Maurizio Del Poeta<sup>4,5,6</sup> & Eliana Barreto-Berger<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Parasitologia e Biologia Celular, Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil

<sup>4</sup>Molecular Genetics & Microbiology Department, Stony Brook University, NY 11794, USA

<sup>5</sup>Division of Infectious Diseases, Stony Brook University, NY 11794, USA

<sup>6</sup>Veterans Affairs Medical Center, Northport, NY 11768, USA

\*Author for correspondence: Tel.: +552139380358, [eliana.berger@micro.ufrj.br](mailto:eliana.berger@micro.ufrj.br)

**Aim:** Glycosphingolipids are conserved lipids displaying a variety of functions in fungal cells, such as determination of cell polarity and virulence. They have been considered as potent targets for new antifungal drugs. The present work aimed to test two inhibitors, myriocin and DL-threo-1-Phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol, in *Scedosporium boydii*, a pathogenic fungus which causes a wide range of disease. **Materials & methods:** Mass spectrometry, microscopy and cell biology approaches showed that treatment with both inhibitors led to defects in fungal growth and membrane integrity, and caused an increased susceptibility to the current antifungal agents. **Conclusion:** These data demonstrate the antifungal potential of drugs inhibiting sphingolipid biosynthesis, as well as the usefulness of sphingolipids as promising targets for the development of new therapeutic options.

First draft submitted: 17 June 2019; Accepted for publication: 23 September 2019; Published online: 12 November 2019

**Keywords:** antifungal drugs • antifungal therapy • biosynthetic pathway • glycosphingolipids • new targets • *Scedosporium*

*Scedosporium* species are filamentous fungi widely found in nature, especially in human-impacted areas [1,2]. *Scedosporium boydii* is one of the species associated with fungal infections in immunocompromised and immunocompetent patients. Scedosporiosis is cosmopolitan and has been reported in North and South America, Europe, Asia and Oceania [3]. It causes wide-spectrum diseases, ranging from cutaneous and subcutaneous tissue infections and traumatic inoculation to invasive and disseminated cases as result of conidia inhalation [4].

Glycosphingolipids, a class of lipid molecules present on cell surfaces and in membranes, play crucial roles in fungal growth and virulence. They are composed of a sphingoid backbone linked to a fatty acid chain through an amide bond and the presence of a sugar unit [5]. Disruption of genes, such as *gcs1* (glucosylceramide synthase), *ms1* (C9-methyltransferase) and *sld* ( $\Delta 8$  desaturase), has provided knowledge that highlights the importance of glycosphingolipid synthesis for fungal cells. Mutants of *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium digitatum* and *Candida albicans* displayed decreased virulence in animal and plant infection models, deficient fungal growth and hyphal elongation, defects in alkali tolerance, higher susceptibility to membrane stressors and reduced extravesicular secretion [6–10]. Molecules that directly bind to glycosphingolipids on fungal surfaces, such as defensins produced by plants (MsDef1 and RsAFP2) and monoclonal antibodies against glucosylceramides, are known to alter cell shape, conidia germination and yeast-to-hyphae transition, as observed for

newlands  
 press